

**UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Ciências Morfológicas - PCM**



**DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS  
TRIDIMENSIONAIS MULTICELULARES PARA O  
ESTUDO DE INTERAÇÕES CELULARES NO  
MICROAMBIENTE HEMATOPOÉTICO**

**ANA PAULA DANTAS NUNES DE BARROS**

**Tese apresentada como requisito para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Morfológicas**

**Orientador: Maria Isabel Doria Rossi**

**Radovan Borojevic**

**Programa Avançado de Biologia Celular Aplicada a Medicina**

**Banco de Células do Rio de Janeiro**

**Rio de Janeiro**

**Março 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**DESENVOLVIMENTO DE CULTURAS  
TRIDIMENSIONAIS MULTICELULARES PARA O  
ESTUDO DE INTERAÇÕES CELULARES NO  
MICROAMBIENTE HEMATOPOÉTICO**

**ANA PAULA DANTAS NUNES DE BARROS**

**Tese apresentada como requisito para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Morfológicas**

**Revisada por:**

**Profa. Maria Eugênia Leite Duarte – Dep. de Histologia e  
Embriologia, ICB, UFRJ**

**Avaliada por:**

**Profa. Adriana Bonomo – Instituto de Microbiologia, UFRJ e  
Instituto Nacional do Câncer**

**Profa. Christina Maeda Takiya – Dep. de Histologia e  
Embriologia, ICB, UFRJ**

**Prof. Marcelo Felipe Santiago – Instituto de Biofísica Carlos  
Chagas Filho, UFRJ**

**Suplentes:**

**Profa. Maria Eugênia Leite Duarte**

**Profa. Vivian Rumjanek**

Barros, Ana Paula Dantas Nunes de.

Desenvolvimento de culturas tridimensionais multicelulares para o estudo de interações celulares no microambiente hematopoético / Ana Paula Dantas Nunes de Barros. Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas, 2007.

xi, 121 p. il.

Tese de Mestrado - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, 2007.

1.Cultura Tridimensional 2.Medula Óssea 3.Interações Celulares  
4. Nicho subendosteal 5.Tese (Mestrado-UFRJ/ICB)

**Aos meus pais por acreditarem em mim e possibilitarem que eu continue em busca dos meus sonhos.**

**E a cada dia novo e imprevisível por vir.**

**“É verdade que não podemos encontrar a pedra filosofal, mas é bom que ela seja procurada; procurando-a, descobrem-se muitos bons segredos que se não procuravam”**

*Bernard Fontenelle*

## **Agradecimentos**

- Aos meus pais por acreditar em mim e me incentivar a cada passo desta jornada nada simples que é a vida científica.
- À minha irmã por todo o companheirismo nas horas mais animadas e nas mais difíceis também.
- Ao Hugo, meu sobrinho, por ser tão amoroso e compreensivo, liberando o computador para que eu pudesse escrever esta tese.
- Às minhas amigas Ellen, Maithê e Renata que muito me apoiaram ao longo destes anos e um agradecimento em especial à Manuela que além do apoio me presenteou com o belíssimo *layout* da capa.
- À Isabel por toda a paciência, dedicação, confiança, toques profissionais, incentivos sociais, piadas, lições de vida e empréstimos literários, que me ensinam a cada dia como me tornar além de uma boa profissional, uma pessoa melhor.
- Ao Leandro, pela ajuda nos PCRs, pelas conversas, cada dia mais loucas, saídas inusitadas e amizade ABSOLUTAMENTE inegável.
- À profa. Maria Eugênia Leite Duarte pela excelente revisão.
- Ao prof. Radovan sem o qual este trabalho não teria sido possível.
- À Luciana Garzoni por todo o apoio nas microscopias eletrônicas.
- À Prof. Nazareth Meirelles por ter permitido a utilização de seu laboratório para a realização dos processamentos de microscopia eletrônica.
- À Prof. Christina Takiya por ter me orientado nos processamentos de histologia e ter me recebido com tanta boa vontade no seu laboratório.
- Meu eterno agradecimento ao Prof. Marcelo Santiago pelos ensinamentos em microscopia confocal que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho.
- A Ivone Otazu que criou toda a estrutura dos PCRs no BCRJ e deixou muitas saudades quando seguiu sua jornada para os Emirados Árabes.
- A todos os companheiros de bancada: Leandra, Leandro, Daiana, Karina, Carol Pedrosa, Dani, Carol, Natália e Dani Bahia (jamais será esquecida!) todo o pessoal da Ivone (Guilherme, Fabiano, Marcela e Carol), do banco de células e transplante de medula óssea especialmente ao Gabriel (que sempre me socorria na ausência de seringas e filtros!!!).

➤ **Sumário**

<b>1. Introdução</b> .....	1
1.1. Hematopoese e Microambiente Medular.....	1
1.1.1. Células tronco mesenquimais e organização do microambiente hematopoético.....	7
1.2. Migração na medula óssea .....	9
1.3. O Nicho Subendosteal.....	16
1.3.1. Ancoragem e quiescência.....	17
1.3.2. Auto-renovação.....	21
1.4. O Nicho Vascular.....	28
1.5. Modelos <i>in vitro</i> tridimensionais.....	30
1.6. Técnicas de culturas 3D .....	36
1.7. Esferóides (Multicellular Tumor Spheroids, MCTS).....	38
<b>2. Objetivos</b> .....	41
<b>3. Material e Métodos</b> .....	42
<b>4. Resultados</b> .....	50
<b>5. Discussão</b> .....	76
<b>6. Conclusões Gerais</b> .....	94
<b>7. Bibliografia</b> .....	95
<b>8. Anexos</b> .....	109

## **RESUMO**

A manutenção de células-tronco hematopoéticas (HSC) depende do microambiente tridimensional da medula óssea (MO). Com o objetivo de estabelecer um modelo *in vitro* 3D representativo do nicho subendosteal humano de HSC, células-tronco mesenquimais (MSC) de MO humana, induzidas para a linhagem osteogênica, foram cultivadas como agregados esféricos (esferóides) sobre os quais MSC não induzidas foram distribuídas, formando esferóides mistos com populações segregadas. O padrão de matriz extracelular foi semelhante ao observado *in vivo*, com colágeno I exclusivamente na região central de pré-osteoblastos. Células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão (SC) ou de MO foram co-cultivadas e migraram para o interior dos esferóides, atingindo um platô em 24h, que se deveu a uma circulação contínua destas células. Elas localizaram-se na interface das duas populações e um maior percentual de células em quiescência foi observado. Portanto, o modelo de esferóide misto é representativo do nicho subendosteal de HSC, orientando sua migração e mantendo a quiescência.

## **ABSTRACT**

The maintenance of hematopoietic stem cells (HSC) depends of a tridimensional bone marrow (BM) microenvironment. In order to establish a 3D *in vitro* model that mimics the human HSC subendosteal niche, osteoblastic induced BM mesenchymal stem cells (MSC) were cultured as spheroid aggregates and non-induced MSC were plated onto these cell aggregates, forming mixed spheroids with both populations segregated. The extracellular matrix pattern was similar to what is described *in vivo*, with collagen I synthesis exclusively in the pre-osteoblast central region. Cord blood (CB) or BM CD34<sup>+</sup> cells were co-cultured and migrated into the spheroids reaching a plateau at 24h that was due to a continuous circulation of these cells. They localized at the interface between the two layers and a higher percentage of quiescent cells were observed. Therefore, the mixed spheroid model mimics the HSC subendosteal niche, guiding the HSC migration and maintaining them quiescent.

## **Lista de Abreviaturas**

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
5-FU	Fluorouracil
AGM/PAE	Aorta-Gonada-Mesonefrons/Para-Aorta-Esplancnopleura
Ang-1	Angiopietina-1
BMP-4	<i>Bone Morphogenetic Protein-4</i>
BSA	Éster albumina sérica bovina
BSS	<i>Balanced Saline Solution</i>
BSS.CMF	<i>Balanced Saline Solution. Calcium and Magnesium Free</i>
CFSE	5-(e 6-)-carboxifluoresceína diacetato succinil
CFU-e	<i>Colony Forming Unit-Erithrocyte</i>
CFU-F	<i>Colony Forming Unit-Fibroblast</i>
CFU-GM	<i>Colony Forming Unit-Granulocyte Macrophage</i>
CFU-S	<i>Colony Forming Unit-Spleen</i>
CM-Dil	Cell Tracker™ Chloromethylbenzamido
FACs	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAKs	<i>Focal Adhesion Kinasis</i>
FGF-4	Fibroblast Growth Factor-4
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
HA/TCP	Hidroxiapatita / tricálcio fosfato
HSC	Célula Tronco Hematopoética
Ig	Imunoglobulina
LT-HSC	<i>Long Term-Hematopoietic Stem Cell</i>
MCTS	<i>Multicellular Tumor Spheroids</i>
MEC	Matriz Extracelular
MMPs	Metaloproteinases
MO	Medula Óssea
MSC	Célula Tronco Mesenquimal
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NOD/SCID	<i>Non-Obese Diabetes Severe Combined Immunodeficient mice</i>
OP	Osteopontina

PBS	<i>Phosphate Buffered Solution</i>
PE	<i>Phyco-Eritryn</i>
PTx	Toxina Pertussis
Sca-1	<i>Stem Cell Antigen-1</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SDF-1	<i>Stromal Derived Factor-1</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Shh	Sonic Hedgehog
SLAM	<i>Signaling Lymphocyte Activation Molecule</i>
ST-HSC	<i>Short Term-Hematopoietic Stem Cell</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLA	<i>Very Late Antigen</i>

## **1. Introdução**

### **1.1. Hematopoese e Microambiente Medular**

A hematopoese é o processo de formação de todas as células sanguíneas, compreendendo as populações mielóides, linfóides e progenitores em diversos níveis de comprometimento com estas linhagens (Dorshkind, 1990). Todas as células hematopoéticas derivam de uma única célula, a célula-tronco hematopoética (HSC, *hematopoietic stem cell*), caracterizada por sua capacidade de auto-renovação ilimitada e de diferenciação para as várias linhagens hematopoéticas (Kondo et al., 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário a formação de células sanguíneas se divide em duas fases: hematopoese primária e secundária (Godin e Cumano, 2002). A hematopoese primária é o primeiro momento de surgimento de células hematopoéticas, no qual apenas ilhotas de eritrócitos são produzidas no saco vitelino, isso ocorre por volta do dia 7,5 no desenvolvimento murino, e, embora ainda possa existir algum questionamento sobre se este surto inicial contribui ou não para a hematopoese definitiva (Kumaravelu et al., 2002), há uma forte tendência na literatura de acreditar que a hematopoese do saco vitelino seja transitória (Godin e Cumano, 2002; Göthert et al., 2005).

A hematopoese secundária se origina na região Aorta-Gonada-Mesonefrons/Para-Aorta-Esplancnopleura (AGM/PAE) por volta do dia 10,5 no desenvolvimento murino ou 30º dia de desenvolvimento em humanos, e ela dá origem a todas as linhagens hematopoéticas, eritrócitos, granulócitos, linfócitos e plaquetas, e é neste momento que a HSC definitiva surgiria (revisado em Godin e Cumano, 2002; Dazzi et al., 2006). Nos momentos seguintes existe uma transferência do sítio de hematopoese através da migração da HSC para outros órgãos ao longo do desenvolvimento, nos quais encontra um nicho apropriado que sustente a hematopoese. Primeiro há transferência para o fígado fetal (10,5-12 dias de desenvolvimento murino), em seguida para o timo, baço, omento e medula óssea (MO) (14-16 dias de desenvolvimento murino). Após a colonização da MO há diminuição na produção de células

hematopoéticas nos demais órgãos e 4 dias após o nascimento a medula se torna o órgão hematopoético preferencial (Godin et al., 1999; Tada et al., 2006). Esta transição dos sítios de hematopoese durante a vida fetal é dita ser regulada por mudanças no microambiente, que criam ambientes mais atraentes para a manutenção da hematopoese e, condizente com isto, em 2006, Tada e colaboradores demonstraram que a mudança de sítio de hematopoese é precedida por uma mudança na observação de co-localização do par VCAM-1/fibronectina. Segundo estes autores, a hematopoese sempre ocorre em órgãos que apresentam esta co-localização e nos momentos de transição há perda desta co-localização no órgão abandonado, quando as moléculas passam a ser expressas em regiões espacialmente isoladas. No entanto, a migração específica das HSC para a MO durante o desenvolvimento embrionário parece depender da quimiocina SDF-1 $\alpha$ /CXCL12, pois este processo é severamente inibido em camundongos SDF1<sup>-/-</sup> (Ara et al., 2003).

As HSC murinas foram caracterizadas pela expressão de c-Kit e Sca-1 (*stem cell antigen-1*) e ausência de antígenos específicos das linhagens hematopoéticas (Lin<sup>-</sup>), células KSL (Morrison et al., 1995). Já as HSC humanas têm sido identificadas pela expressão da glicofosfoproteína CD34, que se acredita ser uma molécula de adesão. A fração CD34<sup>+</sup> da MO humana constitui uma população heterogênea e representa cerca de 1,5% das células mononucleares (Krause et al., 1996). A subpopulação de células CD34<sup>+</sup> que não expressa CD38 (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) é enriquecida em HSC, sendo capaz de reconstituir a hematopoese de hospedeiros imunodeprimidos, como os camundongos NOD/SCID (Civin et al., 1996).

A hematopoese é um processo hierárquico e ordenado onde as células-tronco de longa duração (LT-HSC, *Long Term-Hematopoietic Stem Cell*) dão origem a células iguais a si (auto-renovação) e a progenitores altamente proliferativos de curta duração que vão sucessivamente perdendo a capacidade de auto-renovação, dando origem a HSC capazes somente de reconstituir transitoriamente a hematopoese (ST-HSC, *Short Term-Hematopoietic Stem Cell*) e progenitores multipotentes que progressivamente

perdem o potencial de diferenciação, se comprometendo com determinada linhagem hematopoética (Kondo et al., 2003). A manutenção da propriedade de célula-tronco só é possível devido à manutenção de um pool de HSC em estado quiescente, evitando assim que a cada ciclo celular ocorra encurtamento dos telômeros (seqüência protetora do genoma). Este encurtamento de telômeros evidencia o envelhecimento celular pois gera um número fixo de ciclos ao longo da vida de uma célula. As HSC possuem alto potencial replicativo, logo devem ser mantidas quiescentes prevenindo encurtamento de telômeros e mantendo sua capacidade de reconstituição de da hematopoese (Suda et al., 2005).

As HSC possuem desta forma uma impressionante tarefa, originar todas as diferentes linhagens hematopoéticas e manter um pool de progenitores quiescentes. Acredita-se que ela realiza esta tarefa através de decisões binárias que vão progressivamente restringindo a possibilidade de fenótipos finais, ou seja, as decisões não são realizadas apenas na HSC e conforme a célula hematopoética prossegue na cascata, as decisões ficam “marcadas”. Existe uma pequena plasticidade principalmente nos progenitores mais jovens, porém, quanto mais avançadas na cascata, menor a chance de retorno, culminando com um fenótipo diferenciado irreversível (Kondo et al., 2003). Esta restrição progressiva se dá no contexto celular interno e é fundamental na decisão do destino celular. Por contexto interno refere-se principalmente à organização da cromatina. A cada decisão realizada ao longo do processo de diferenciação a cromatina é modificada, podendo sofrer metilação, fosforilação, acetilação ou retirada desses radicais, de forma que sua organização espacial se torna menos ou mais acessível a determinados fatores, mudando assim a capacidade de resposta da célula hematopoética ao seu ambiente externo (Berger, 2000).

No caso do sistema hematopoético um grande regulador do estado da cromatina é IKAROS, subunidade de um complexo chamado NURD que deacetila histonas. IKAROS é fundamental na embriogênese, durante a formação do sistema hematopoético, sendo expresso tanto na região de

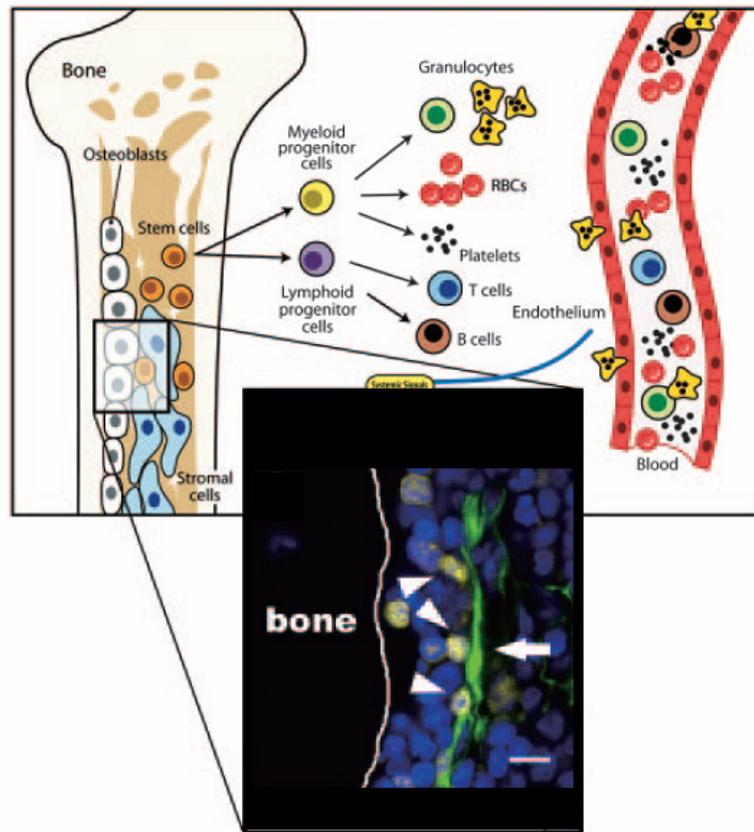
hematopoese primitiva, saco vitelino, quanto em áreas de hematopoese definitiva como fígado fetal. Em adultos, ainda há a expressão de IKAROS em populações da MO enriquecidas em HSC e linfócitos. Estudos com camundongos nocautes para IKAROS mostraram que este é fundamental na manutenção do pool de HSC e na linfopoese B e T, bloqueando a diferenciação mielóide, pois impede a acetilação da cromatina (Georgopoulos, 2002).

Quanto a conformação de cromatina, na manutenção da auto-renovação, uma família de possíveis fatores relevantes são os repressores da família PcG que formam multicomplexos que interagem com a cromatina, existem 2 tipos de complexos, o Eed possui atividade enzimática de acetilação e metilação, enquanto o Bmi-1 antagonizam o remodelamento efetuado pelo complexo SWI-SNF (Iwama et al., 2004). Em 2004, pode-se entender melhor o papel de Bmi-1 na hematopoese, observou-se que células KLS de animais nocautes para Bmi-1 apresentavam uma redução no número e tamanho de colônias multilinhagem que formavam em ensaios de colônia, apresentando uma diferenciação limitada (apenas neutrófilos e macrófagos) com perda acelerada de potencial de diferenciação e expansão ineficiente de progenitores. Em seguida, estudando a superexpressão de Bmi-1, observou-se um aumento de 56-80 vezes no número de colônias multilinhagem, demonstrando a retenção do potencial de diferenciação em diversas linhagens, estas células quando transplantadas apresentaram um enorme potencial de repopulação, 35 vezes maior que o controle, colocando desta forma Bmi-1 como um dos responsáveis *downstream* importantes para auto-renovação, reprimindo modificações na cromatina (Iwama et al., 2004).

Para a existência de uma hematopoese funcional há a necessidade da formação de células diferenciadas com simultânea manutenção do pool de progenitores. Para isso, além do impedimento da diferenciação, também é necessário um controle da divisão celular que permita formar células-filhas que dêem origem a células hematopoéticas funcionais e outras que mantenham o pool multipotente indiferenciado. Existem duas possibilidades de divisão celular que explicariam tal fenômeno, a primeira é a divisão simétrica na qual a célula

mãe daria origem a duas células-filhas idênticas entre si, sejam elas idênticas a célula mãe (auto-renovação) ou dois progenitores multipotentes sem capacidade de auto-renovação. Neste caso haveria a necessidade da coordenação destas duas possibilidades para manter o pool de células-tronco. A segunda possibilidade é a divisão assimétrica, a mais aceita, onde a HSC daria origem a uma HSC igual a si (LT-HSC) e a uma célula filha progenitora multipotente com reduzida capacidade de auto-renovação (ST-HSC), que iria então seguir a cascata de proliferação e diferenciação. Isto é possível quando o eixo da mitose se modifica de forma que uma das células filhas sofre influência de um outro nicho que não o da célula mãe (assimetria ambiental) ou se previamente à divisão celular a célula-mãe reorganiza um grupo de mediadores de sinalização (proteínas ou RNA) apresentando-os em uma localização assimétrica no citoplasma de forma que após a divisão as células filhas herdaram diferentes componentes (assimetria seccional). Este processo foi bem descrito durante o desenvolvimento embrionário principalmente de drosófilas (Brummendorf et al, 1999; revisado em Fuchs et. al., 2004), mas acredita-se que em mamíferos a divisão assimétrica das HSC se deva a uma assimetria ambiental (Ho , 2005).

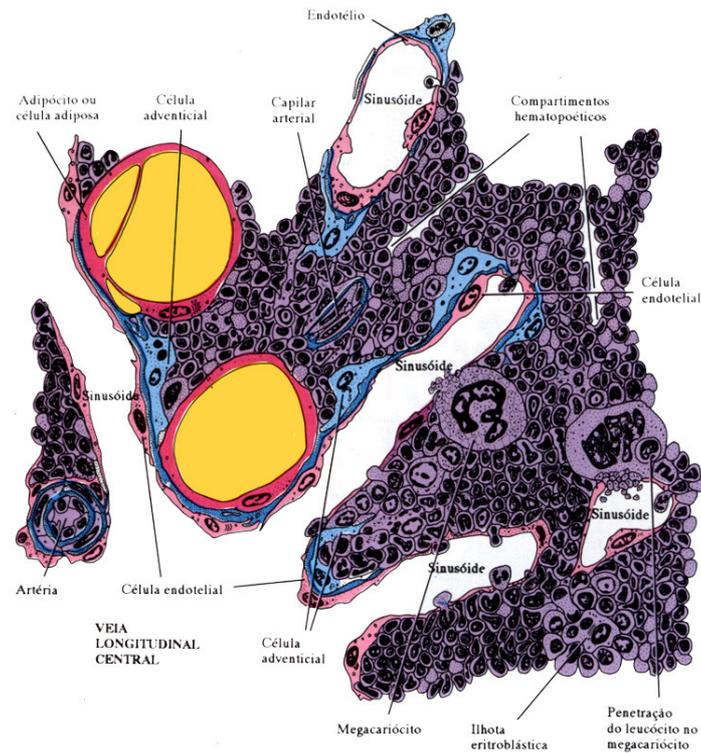
Em adultos, toda essa cascata de diferenciação ocorre na MO de forma organizada espacial e hierarquicamente, sendo que a HSC quiescente se localiza na região subendosteal (Calvi et al., 2003; Nilsson et al., 2001; Zhang et al., 2003) e conforme esta segue pela cascata de diferenciação há deslocamento em direção aos seios venosos centrais, região rica em populações em estado final de diferenciação que então atravessam o endotélio atingindo finalmente a corrente sanguínea (Fig.1) (Kondo et al., 2003; Taichman et al., 2005). Ao longo deste trajeto existem nichos para cada estágio de desenvolvimento (Schofield, 1978). Estes nichos são compostos pela interação dos progenitores hematopoéticos com as células do estroma medular, a matriz extracelular e fatores de crescimento, que geram sinalização intracelular e estabelecem determinado comportamento/fenótipo celular (Nilsson et al., 1997; Reya et al., 2001; Taichman et al., 2005).



**Figura 1.** Nicho subendosteal e cascata de diferenciação restritiva hematopoética. Esquema mostra a organização espacial das células em diferenciação, com as populações mais diferenciadas mais próximas da região central da medula. Em detalhe, imagem por microscopia confocal das células-tronco hematopoéticas humanas transplantadas, em amarelo, localizadas no nicho subendosteal de camundongos NOD/SCID irradiados, entre o osso e células mesenquimais derivadas de MO humana previamente implantadas na cavidade medular, em verde. Núcleos em azul. (Montagem a partir de Taichman, 2005; Muguruma et al., 2006).

O estroma da MO é heterogêneo e inclui células reticulares (progenitoras mesenquimais e adventícias), osteoblastos, células acumuladoras de gordura, endotélio e células de origem hematopoética, como macrófagos (Fig.2). Os principais componentes da matriz extracelular da MO são colágeno tipo I (osso trabecular), tipo IV, proteoglicanos (ex: heparan sulfato), glicosaminoglicanos (ex: ácido hialurônico), fibronectina e laminina (na cavidade medular) (Weiss et al., 1984; Friedenstein et al., 1976; Pittenger et al., 1999; Nilsson et al., 1998). Acredita-se que o microambiente tenha papel fundamental na regulação das funções celulares uma vez que as células interagem entre si e com a matriz, através de uma série de moléculas de

adesão, e essas inter-relações geram sinais intracelulares que alteram os padrões de expressão gênica em ambas as populações, levando assim a geração de nichos específicos, responsáveis pelo controle da quiescência, proliferação e diferenciação dos progenitores hematopoéticos (Nilsson et al., 2001; Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003).



**Figura 2.** Os diferentes tipos celulares que compõem o estroma da MO, reparar que estes se encontram entre grande número de células hematopoéticas (Fonte: Greep e Weiss, 1973).

### 1.1.1. Células-tronco mesenquimais e organização do microambiente hematopoético

Os trabalhos pioneiros de Friedenstein (1976), demonstrando a presença, na MO, de uma população de células aderentes fibroblastóides clonogênicas, denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblasto (CFU-F, *Fibroblast-colony forming unit*), sugeriram a hipótese, confirmada posteriormente, de que o estroma da medula também seria dependente de uma população de células-tronco quiescentes e multipotentes que geraria progenitores comprometidos com as diferentes linhagens celulares que

compõem o estroma medular. Esta população tem sido denominada, na literatura, de células-tronco mesenquimais (MSC, *mesenchymal stem cells*) ou células-tronco estromais da MO (revisado em Bianco et al., 2001 e Minguell et al., 2001).

As MSC representam 0,01-0,0001% das células nucleadas na MO, porém possuem um papel fundamental na hematopoese já que dão origem às células que constituem grande parte do nicho hematopoético. Por ser um progenitor pluripotente é capaz de originar todas as populações celulares do sistema músculo-esquelético (células musculares, osteoblastos e condroblastos) e alguns grupos discutem até mesmo seu potencial de originar populações não mesodérmicas como neurônios e hepatócitos (Pittenger et al., 1999; Kopen et al., 1999; Sato et al., 2005).

Recentemente, Miura e colaboradores produziram um ossículo ectópico no dorso de camundongos, utilizando cerâmica em pó (hidroxiapatita associada a fosfato de cálcio, HA/TCP) e MSC humanas expandidas em cultura. Observou-se, após 8 semanas, a formação de um ossículo apresentando uma MO organizada e funcional, ao contrário de quando eram colocadas MSC induzidas para a via osteogênica por 2 semanas ou osteoblastos trabeculares, quando só era formado osso. A análise das populações presentes mostrou que as populações mesenquimais eram humanas e as populações hematopoéticas eram do receptor murino. Além disso, a utilização das células hematopoéticas retiradas da MO do ossículo em transplante para camundongo imunodeficiente mostrou que elas tinham a mesma capacidade de pega e sustentação de hematopoese que o controle de células de MO do fêmur, ou seja, o ossículo sustentava a LT-HSC (Miura et al., 2006). Estes achados estenderam os resultados obtidos anteriormente pelo mesmo grupo e confirmaram a propriedade primordial e exclusiva das MSC da MO de organizar um microambiente hematopoético, uma vez que MSC de ligamento dentário não foram capazes de formar tecido hematopoético quando injetadas, com HA/TCP, no subcutâneo de camundongos imunodeprimidos (Shi et al., 2005).

Apesar de existirem diversos grupos estudando esta população celular mesenquimal, ainda não se tem descrito um marcador ou grupo de marcadores imunofenotípicos satisfatórios para identificá-la (Dazzi et al., 2006). As MSC da MO têm sido isoladas com base em sua propriedade de adesão ao plástico, capacidade de se diferenciar nas três linhagens mesodérmicas (osteoblasto, condrócito e adipócito) e ausência de marcadores de células hematopoéticas, como CD45, CD14 e CD34 (Dominici et al., 2006). Diversos grupos têm demonstrado sua localização na parede de vasos, estando relacionada com os chamados pericitos. Um dos trabalhos mais marcantes mostrou que células Stro-1<sup>+</sup> isoladas imuno-magneticamente de culturas de MSC humanas se mostraram positivas para  $\alpha$ -actina de músculo liso e CD146 (que é expresso por pericitos) e quando transplantadas com HA/TCP no dorso de camundongos construíam um ossículo ectópico com MO funcional, mostrando assim que células com fenótipo condizente com o de pericitos teriam propriedades de MSC (Bianco et al., 2001; Shi e Gronthos, 2003). Em 2006, um trabalho foi publicado com o objetivo de obter culturas de longa duração de células mesenquimais de diferentes órgãos, baseadas no princípio de adesão ao plástico. E foi observado que todos os órgãos de camundongos adultos possuíam tais células, com capacidade de diferenciação para osso e adipócitos, porém com diferenças na eficiência de diferenciação dependendo do órgão obtido. Os autores então testaram se estas células estaria associadas a vasos sanguíneos, comuns a todos os órgãos. Foram testadas células obtidas de glomérulo (estrutura capilar) e artéria aorta (vaso de grande calibre) e em ambos os casos houve diferenciação para as linhagens mesenquimais testadas, ou seja, as células perivasculares de ambas as estruturas tinham propriedades de MSC (Silva-Meirelles et al., 2006).

## **1.2. Migração na MO**

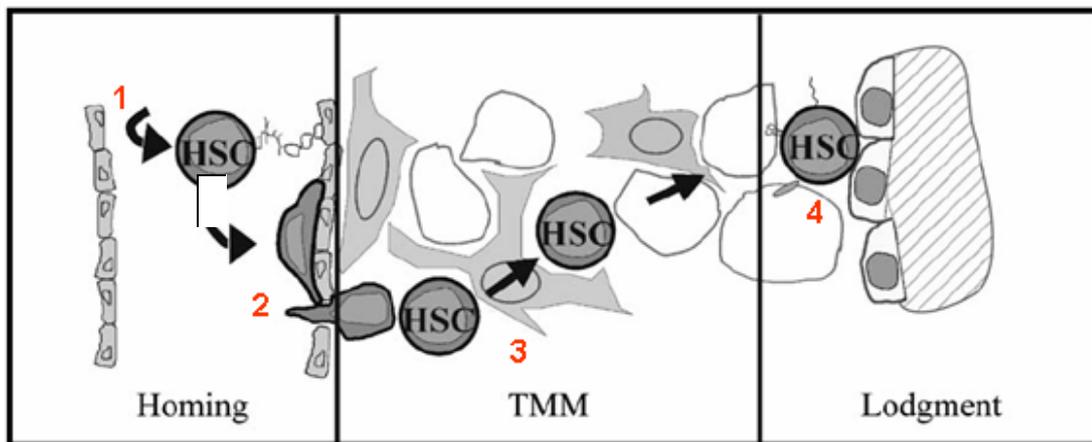
A MO é um órgão muito dinâmico, pois as células hematopoéticas migram intensamente. Além da migração durante o processo de diferenciação, as HSC freqüentemente saem da medula para o sangue periférico, sendo capazes de retornar e ocupar seus nichos na região subendosteal. Logo, as HSC circulam, mesmo em condições fisiológicas (Wright et al., 2001).

A principal via de migração para a medula é pelos seios venosos da região central desta (Nilsson et al., 2001) e a migração para o microambiente medular envolveria quatro etapas básicas: rolamento sobre o endotélio, migração transendotelial, migração transmedular e fixação em seu nicho (Fig.3) (revisado por Nilsson et al., 2006). Os mecanismos envolvidos neste processo ainda não foram completamente esclarecidos. A célula progenitora interage com o endotélio via selectinas-P, selectina-E e VLA-4 com conseqüente adesão superficial e sucessivo rolamento sobre o endotélio, facilitando o encontro com gradientes quimiotáticos (Alon et al., 1995; Hidalgo e Frenette, 2004). Este gradiente quimiotático é formado principalmente pela produção da quimiocina SDF-1 $\alpha$  pelas células estromais da MO (Nilsson et al., 2001; Sanz-Rodriguez et al., 2001; Teixeira et al., 1992). A interação com seu receptor, CXCR-4, expresso pelos progenitores hematopoéticos, gera um aumento, nestes, da afinidade dos pares LFA-1/ICAM1, VLA-5/fibronectina e da expressão e afinidade da integrina VLA-4 para VCAM1 e fibronectina, estimulando, assim, a adesão celular e a migração transendotelial e ecotaxia (*homing*) (Peled et al., 2000; Sanz-Rodriguez et al., 2001). O par SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 deve ser mantido em estado ativado nas células hematopoéticas na MO para que estas fiquem retidas em seus nichos, pois a interrupção desta ativação, por exemplo, através de tratamento com toxina pertussis (Ptx) que bloqueia a proteína Gi associada a CXCR4, gera uma forte leucocitose e mobilização das HSC para o sangue periférico (Papayannopoulou et al., 2003).

A importância de integrinas  $\beta$ 1, principalmente VLA-4, no processo de migração das HSC para a MO tem sido defendida por diversos grupos de pesquisadores uma vez que foi demonstrado que: (i) camundongos deficientes nesta molécula não apresentam migração para a medula após transplante de HSC; (ii) a administração de anticorpo anti-VLA-4 induz mobilização de HSC; e (iii) o papel de VLA4 é dominante em relação a outras integrinas (Papayannopoulou et al., 1993 e 2001; Vermeulen et al., 1998; Potocnik et al., 2000). Outra interação importante cujo bloqueio por anticorpos neutralizadores desencadeia mobilização é a do par CD44/ácido hialurônico (Vermeulen et al.,

1998), um par bastante interessante tendo em vista a grande presença de ácido hialurônico nas rotas migratórias durante todo o desenvolvimento do embrião, devido a sua capacidade de criar um ambiente pericelular hidratado permissivo a migração (Toole et al., 1997).

Outros membros da família  $\alpha$  de integrinas como  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  associando-se a  $\beta 1$  integrina também parecem estar envolvidos na migração de HSC, porém com papel secundário, através de interação com fibronectina e laminina, respectivamente, mas suas contribuições não são um consenso entre os grupos (Carstanjen et al., 2005; Qian et al., 2006).



**Figura 3.** Homing da HSC para a MO, seguindo suas quatro etapas básicas: rolamento sobre o endotélio (1), migração transendotelial, (2) migração transmedular (3) e fixação em seu nicho (4) (Nilsson et al., 2006).

No entanto, em 2002 um estudo de migração de progenitores hematopoéticos em cultura 3D de estroma de MO murina levantou algumas questões em relação aos mecanismos já descritos (Bug et al., 2002). Neste estudo observou-se que a migração era dependente de Rho, Rac e cdc42 (família Rho de pequenas GTPases) e independente de integrinas  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  ou de CXCR4. Em acordo com o descrito, Soede e colaboradores (2000) haviam observado que uma linhagem de leucemia mieloide murina, que não expressa CXCR4 e, portanto, não responde ao SDF-1 $\alpha$  (CXCL12), se disseminava normalmente *in vivo*. Além disso, outros autores observaram que a deleção de  $\alpha 4$  ou  $\alpha 5$  integrinas não foi capaz de bloquear a migração de

progenitores hematopoéticos para a MO (Kondo et al., 2003). A importância da família Rho de pequenas GTPases já foi confirmada *in vivo*, pois não só as células de camundongos nocautes para Rac1 são incapazes de reconstituir a hematopoese medular de camundongos irradiados, como esses animais apresentam enorme déficit na migração fisiológica para a medula e a região subendosteal (Cancelas et al., 2005).

Ainda não foi descrita a dinâmica de funcionamento dessas diferentes moléculas de adesão e quimiocinas durante o processo migratório, porém Bonig e colaboradores em 2006 demonstraram em modelo murino duas vias compensatórias de migração, uma dependente da interação  $\alpha 4$  integrina/VCAM1 e a outra de CXCR4/SDF-1 $\alpha$ . O bloqueio de uma das vias era ineficiente, pois a outra mantinha a taxa de migração. Somente o bloqueio duplo surtia efeito significativo, demonstrando assim a dinâmica e complexidade no processo de migração das HSC (Bonig et al., 2006).

Quanto ao papel das metaloproteases, é sabido que leucócitos utilizam proteases endógenas para degradar componentes das junções endoteliais, o que permitiria a projeção de pseudópodos por entre as células endoteliais e posterior migração (Cepinskas et al., 1999). Embora metaloproteinases (MMPs) pareçam ter papel durante a mobilização de progenitores hematopoéticos para o sangue periférico, acredita-se que essas proteases sejam liberadas por neutrófilos (Papayannopoulou, 2004). O papel de MMPs na migração de progenitores hematopoéticos para a medula é desconhecido. Em 2004, foi demonstrado que células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão secretam MMP-9, uma gelatinase que, entre outras moléculas, degrada colágeno IV. Curiosamente, não foi observada expressão de MMP-9 em células CD34 de MO, que também apresentaram menor eficiência de migração em comparação com células de sangue de cordão em ensaios *transwell*, sendo assim os autores propuseram que esta enzima poderia ter papel importante no *homing* (Rao et al., 2004b).

A mobilização das HSCs de seu nicho na MO para a circulação, classicamente induzida por tratamento com fator estimulador de colônias de

granulócitos (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*), parece depender da modificação do gradiente de SDF-1 $\alpha$ , tanto por diminuição de expressão quanto pela clivagem por proteases (elastase, catepsina G, catepsina K e CD26) (Petit et al., 2002; Christopherson et al., 2003; revisado por Lapidot et al., 2005), nestes trabalhos a capacidade das células propriamente ditas ou seus sobrenadantes de clivar SDF-1 foi testada, em ensaios de cultivo com substrato cromogênico ou até isolamento de fragmentos protéicos por HPLC e análise por espectrometria de massa, verificando a presença e caracterizando os fragmentos, desta forma verificou-se que SDF-1 é clivado no seu domínio N-terminal perdendo sua atividade. Sendo que, elastase e catepsina G também são capazes de clivar CXCR4 (Lapidot et al., 2005). Posteriormente, ensaios de migração ou homing demonstraram o efeito funcional sobre a célula, por exemplo foi observado que a inibição de CD26 aumenta em 30% o *homing* de HSC murinas para a medula do receptor. Ensaios com CD34 humana em condições de inibição de CD26 mostraram aumento da migração destas em gradiente de SDF-1 (Christopherson et al., 2003; Lapidot et al., 2005). Porém, existem outros mecanismos, como a já mencionada atividade de metaloproteinases, também parecem ter papel relevante na modulação da migração das HSCs, embora ainda não completamente esclarecidos em humanos (Lapidot e Petit, 2002; Papayannopoulou, 2004; Rossi et al., 2005). Em 2006, Katayama e colaboradores demonstraram a importância do Sistema Nervoso Simpático (SNS) na mobilização das HSC. Sua ação parece ser mediada por neurônios noradrenérgicos através da produção de  $\beta$ -antagonistas e  $\beta$ 2-agonistas, cujo balanço afeta os osteoblastos que são então modulados, retendo ou liberando as HSC (mobilização). G-CSF induz, entre outros fenômenos, a liberação de  $\beta$ 2-agonistas pelos neurônios, que por sua vez suprime a atividade dos osteoblastos, diminuindo a expressão de diversos genes como Runx2, colágeno-I e CXCL-12, esta última sendo responsável pela mobilização das HSC. Desde 2002 já havia sido descrita a presença de receptores de diversos neuropeptídeos em osteoblastos (Togari, 2002).

Este conceito parece inovador, porém já em 1968, Calvo descreveu a presença de fibras nervosas na MO e, em 1990, Yamazaki e Allen

descreveram os chamados complexos neuro-reticulares através de estudos ultraestruturais que seriam junções comunicantes entre neurônios e células do estroma da medula, porém nenhuma função, naquela ocasião, foi atribuída a esta interação. Até que ponto o SNS estaria modulando o comportamento dos osteoblastos e células estromais que participam da manutenção das HSC permanece um mistério. No entanto, como N-caderina, uma molécula de adesão expressa em neurônios, é também expressa na subpopulação de células que reveste internamente as trabéculas ósseas, as *bone-lining cells* (Zhang et al., 2003), que são células estromais comprometidas com a linhagem osteoblástica (Balduino et al., 2005) e que são capazes de interagir com as HSC, suspeita-se que esta subpopulação seja selecionada e ativada por neurônios dentre os demais osteoblastos. Este, portanto é um campo bastante interessante que deve se desenvolver nesses próximos anos (Li et al., 2006).

Também em 2006, Kollet e colaboradores demonstraram a influência de osteoclastos na mobilização de HSC. A administração de RANKL gerou um quadro de osteoclastogênese, com aumento de expressão de proteases como MMP-9 e catepsina K, levando a mobilização das HSC. Em camundongos transgênicos para a proteína tirosina fosfatase, epsilon (PTP $\epsilon$ ), que apresentam osteoclastos e macrófagos não funcionais, observou-se que a administração de RANKL não era mais capaz de induzir mobilização, demonstrando assim a importância direta dos osteoclastos no processo. Como a produção de RANKL está relacionada com inflamação e reparo tecidual, foi sugerido este pode ser um mecanismo de mobilização para situações de emergência (Purton e Scadden, 2006).

A migração espontânea das HSCs tem aplicação clínica e pode ser amplificada pela utilização de fatores de crescimento associados ou não a drogas citorrredutoras. O conhecimento dos mecanismos envolvidos na mobilização das HSCs da MO para o sangue periférico tem grande importância na clínica, pois cerca de 20% dos pacientes apresentam mobilização insuficiente, o que compromete o resgate hematológico pós-quimioterapia de altas doses (Knudsen et al., 1998).

A capacidade de migração para a MO de diferentes fontes de HSC varia. Assim, enquanto as células progenitoras de sangue periférico mobilizado e sangue de cordão umbilical migram rapidamente para a MO, as células derivadas de MO parecem apresentar menor capacidade de migração. No caso das células progenitoras de sangue periférico, esta capacidade se reflete na prática clínica, onde se observa rápido enxerto e recuperação precoce da hematopoese (Bonig et al, 2006). Entre as hipóteses propostas para explicar estas diferenças funcionais, recentemente, verificou-se que CXCR4, o receptor da quimiocina SDF-1 $\alpha$ , que faz parte dos receptores do tipo serpentina associados à proteína G, pode ser incorporado em microdomínios de membrana enriquecidos em gangliosídios (GEMs) ou *rafts* lipídicos, o que, em HSC, potencializa a migração para a MO. Esta associação de CXCR4 em microdomínios de membrana pode ser estimulada por microvesículas ou produtos de plaqueta, presentes na leucaférese (Wysoczynski et al., 2005).

### 1.3. O Nicho Subendosteal

As células hematopoéticas migram pela MO em busca de seus nichos, no caso das HSC, o seu nicho específico é na região subendosteal. A região subendosteal apresenta, além da camada de osteoblastos, uma camada de células reticulares subendosteais e osteoclastos, que não formam uma camada celular, mas que se encontram esparsamente dispostos ao longo do endósteo, em sítios de reabsorção óssea (Balduíno et al., 2005; Rossi et al., 2005; Muguruma et al., 2006; Purton e Scadden, 2006). A ligação com este nicho é fundamental para a manutenção da quiescência e a auto-renovação das HSC, mas, na verdade, ela parece ser bem mais complexa e dinâmica do que previamente pensado e é possível imaginar que isto afete a formação dos nichos de HSC, modificando a migração e a auto-renovação destas. Células da linhagem osteogênica (*bone lining cells*), que se encontram em diferentes graus de ativação, recobrem a superfície interna do osso compacto e a superfície do osso trabecular. O pólo basal está aderido firmemente à superfície óssea, enquanto o lado apical interage com as células do sistema hematopoético, especialmente com as HSC (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). As características e a função das células reticulares subendosteais são pouco conhecidas, pois, em geral, não há uma distinção muito clara entre estas e as demais células reticulares que constituem o estroma medular. Só recentemente, trabalhos experimentais com infusão de MSC de MO na cavidade medular mostraram a localização destas na região subendosteal, em íntimo contato com as HSC (Muguruma et al., 2006).

Não está bem claro que fatores, presentes nesta região, a tornam tão especial, porém sabe-se que os osteoblastos são fundamentais na regulação do pool de HSC (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Experimentos com linhagens osteoblásticas capazes de sustentar hematopoese apontam para a necessidade de contato físico entre as células, pois meio condicionado não tem o mesmo efeito sobre progenitores hematopoéticos (Nelissen et al., 2000). Alguns trabalhos têm indicado diversas interações moleculares realizadas entre HSC e células deste nicho que poderiam ser responsáveis por sua localização, controle de quiescência e auto-renovação.

### 1.3.1. Ancoragem e quiescência

A ancoragem das HSC ao nicho subendosteal parece ser intermediada por receptores dependentes de cálcio, íon abundante na parede óssea (Adams et al., 2006), interações do tipo osteopontina/ $\beta$ 1 integrinas (Nilsson et al., 2005), a forma transmembranar do fator de células-tronco (tm-SCF, *Stem Cell Factor*) e seu receptor, c-kit, expresso pelas HSC (Driessen et al., 2003), Angiopietina-1/Tie-2 (Arai et al., 2004) e co-localização de N-caderina (Zhang et al., 2003).

O papel de  $Ca^{2+}$  e de tm-SCF na localização das HSC no nicho subendosteal foi demonstrado em modelos murinos. Observou-se que a ausência tanto do receptor de  $Ca^{2+}$  nas HSC (Adams et al., 2006), quanto de tm-SCF no microambiente medular (Driessen et al., 2003), não afeta a migração para a medula (a migração transendotelial e transmedular ocorrem normalmente), porém não há localização das HSC no nicho subendosteal, mostrando assim que essas moléculas regulam especificamente a ancoragem das HSC. As vias que, ativadas, seriam responsáveis por esta localização específica ainda não estão descritas. Porém, Cancellas e colaboradores, em 2005, demonstraram que camundongos nocautes condicionais para Rac1 apresentavam deficiência na localização das HSC no nicho subendosteal, sem alterações significativas na migração para a medula nem na manutenção da hematopoese em condições fisiológicas, mostrando assim que esta via estaria fortemente relacionada com a localização das HSC no seu nicho (Cancelas et al., 2005).

A Osteopontina (OP) é uma glicoproteína fosforilada que, na MO, se localiza preferencialmente na superfície endosteal, é secretada por osteoblastos e fica preferencialmente ligada a elementos da matriz extracelular. O papel desta molécula na localização das HSC no nicho subendosteal ficou evidente pela distribuição marcadamente aberrante das HSC na MO de camundongos  $OP^{-/-}$ . Verificou-se que as HSC aderem especificamente à OP, principalmente via  $\beta$ 1-integrinas, apesar de existirem outros ligantes possíveis

como CD44,  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  e  $\alpha_4\beta_7$  (Nilsson et al., 2005) e, ainda, que OP reduz sua proliferação (Nilsson et al., 2005; Haylock e Nilsson, 2006) e apoptose, ao mesmo tempo que aumenta o seu número no nicho subendosteal (Haylock e Nilsson, 2006; Stier et al., 2005). A via de sinalização de OP ainda não foi descrita, porém já foi demonstrado que ela induz, em células CD34<sup>+</sup> mobilizadas de sangue periférico, diminuição da expressão de Notch-1 (Haylock e Nilsson, 2006; Iwata et al., 2004), cuja via está relacionada com auto-renovação das HSC (Stier et al., 2005; Karanu et al., 2000; Duncan et al., 2005), como veremos.

O trabalho de Arai e colaboradores, em 2004, mostrou não somente a localização específica de Ang-1 no nicho subendosteal, como também a presença de HSC Tie-2<sup>+</sup>, receptor de Ang-1, que expressavam ainda N-caderina e eram capazes de reter BrdU por longos períodos, um fenótipo idêntico ao de HSC quiescentes descrito por Zhang e colaboradores em 2003. Estes achados sugerem que a interação Ang-1/Tie2 seria não somente importante para a ancoragem das HSC no seu nicho, mas também para indução de quiescência (Arai et al., 2004).

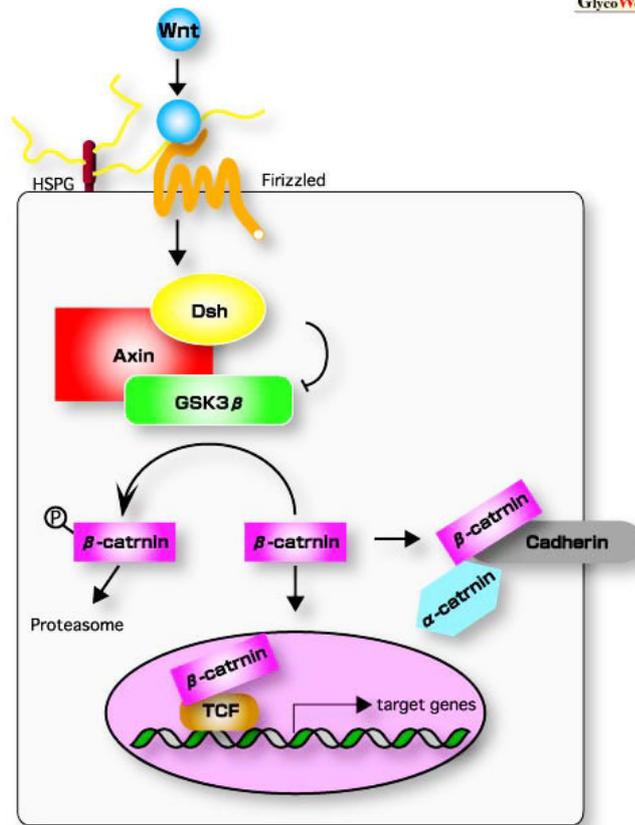
As vias de sinalização por trás do processo de quiescência ainda não estão totalmente elucidadas, porém existem dois mecanismos possíveis já descritos para Tie-2. O primeiro é direto e baseado na propriedade de Tie-2 como um receptor tirosina cinase, que desta forma poderia, uma vez ativado através da ligação com Ang-1, ativar a via de Pi3-k (fosfatidil inositol-3 cinase)/Akt. Akt, por sua vez, tem como um de seus alvos p21, proteína esta fundamental no controle de ciclo celular, levando a estabilização desta e possivelmente inibindo a continuação do ciclo celular. A outra possibilidade é uma ação indireta de Tie-2 devido a sua ação estimuladora dos níveis de expressão de  $\beta$ 1-integrina e N-caderina, também via Akt (Arboleda et al., 2003) e, conseqüentemente, aumentando a adesão celular (Suda et al., 2005).

Deve-se lembrar que  $\beta$ 1-integrina é o ligante de osteopontina que já teve sua ação na indução de quiescência comprovada (Nilsson et al., 2005) e que

N-caderina é um dos marcadores no nicho subendosteal das *bone-lining cells*, que interagem com as HSC (Zhang et al., 2003).

A presença de N-caderina no nicho subendosteal, intermediando a ligação das HSC com os osteoblastos que revestem o osso trabecular, pode ter um significado direto na regulação do comportamento das HSC. A N-caderina, através de interação homotípica, forma junções aderentes, onde  $\beta$ -catenina se liga à porção citoplasmática da molécula de caderina e se associa também com  $\alpha$ -catenina e  $\alpha$ -actina, formando um complexo estável com o citoesqueleto. Nesta conformação a  $\beta$ -catenina fica aprisionada, impossibilitada de se translocar para o núcleo e conseqüentemente ativar a via canônica de Wnt (Fig.4) (Shoval et al., 2007). Logo, pode-se levantar a hipótese de que a presença de N-caderina esteja diretamente relacionada com o bloqueio da via de Wnt e que isto seja importante na quiescência da célula, já que a via de Wnt parece ser importante no processo de expansão das HSC (Reya et al., 2003), como veremos.

Além disso, a organização da membrana celular também parece se correlacionar com o estado de quiescência das HSC. Foi demonstrado que as HSC quiescentes murinas (população KSL) não apresentam microdomínios (*rafts*) lipídicos de membrana plasmática, ao contrário de progenitores proliferativos e HSC estimuladas por citocinas. Curiosamente, se as HSC forem mantidas em 2- $\beta$ -mercaptoetanol, um inibidor da formação de *rafts* lipídicos, é possível mantê-las *ex vivo* em estado quiescente por até 5 dias, com viabilidade de 50%. Esta população multipotente foi capaz de se auto-renovar, pois, após transplante, deu origem a hematopoese de longo prazo em camundongos irradiados (Yamazaki et al., 2006).



**Figura 4.** Esquema da via de Wnt. A  $\beta$ -catenina pode estar associada a membrana ligada a complexo de caderina (seqüestrada) ou livre no citoplasma. No citoplasma ela é rapidamente fosforilada pelo complexo de GSK3 $\beta$  e em seguida degradada via proteassoma. A via de Wnt quando ativada leva ao bloqueio do complexo de GSK3 $\beta$  desta forma mantendo  $\beta$ -catenina livre no citoplasma, neste estado ela é translocada para o núcleo onde se complexa com TCF e induz a expressão de genes alvos da via de wnt.

(Fonte:<http://glycoforum.gr.jp/science/word/proteoglycan/PGB04E.html>)

Recentemente, Lacorazza e colaboradores identificaram um fator de transcrição MEF/ELF4, que parece ser um regulador de ciclo celular nas HSC. Em uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo*, eles demonstraram que a perda de expressão de MEF diminui a taxa de proliferação de HSC estimuladas por citocinas e provoca um acúmulo de células em G<sub>0</sub> *in vivo*. A indução de quiescência aumenta a resistência dos animais MEF<sup>-/-</sup> a agentes mieloablativos e, curiosamente, permite uma recuperação hematopoética mais rápida (Lacorazza et al., 2006), o que sugere que, embora quiescentes em condições fisiológicas, após quimioterapia as HSC MEF<sup>-/-</sup> são capazes de proliferar rapidamente. Isto implica que diferentes mecanismos e vias regulam a

proliferação das HSC em condições de homeostasia ou de regeneração (Passegué e Wagers, 2006).

### **1.3.2. Auto-renovação**

A auto-renovação é um fenômeno que pode ser dividido em 2 processos: manutenção da célula progenitora indiferenciada e indução de proliferação. Ou seja, a auto-renovação implica na entrada das HSC no ciclo celular sendo assim antagônico a quiescência. O controle de auto-renovação das HSC, como a maior parte dos fenômenos biológicos, possui na realidade diversos moduladores que conjuntamente produzem o efeito final. Alguns dos suspeitos incluem Notch-1 e sua ligação com seu receptor, Jagged-1 (Stier et al., 2002; Karanu et al., 2000; Duncan et al., 2005), ativação da via canônica de Wnt, ou seja, dependente de  $\beta$ -catenina (Reya et al., 2003; Chiba et al., 2004; Murdoch et al., 2003), BMP-4 e Sonic Hedgehog (Bhardwaj et al., 2001).

A sinalização por Wnt é uma das mais citadas como responsável pela expansão do pool de HSC (Duncan et al., 2005). Os genes Wnt codificam uma série de glicoproteínas que agem, em geral, como agentes insolúveis, pois se agregam à lipídeos na membrana celular (palmitato), potencializando sua ação devido a concentração da molécula (Cadigan e Nusse, 1997; Willert et al., 2003), além disso são altamente conservados e agem de forma parácrina ou autócrina, porém como apresentam insolubilidade, agem apenas em regiões de justaposição de membrana (Murdoch et al., 2003 e Cadigan e Nusse, 1997). A família protéica de Wnt possui vários membros e duas possíveis vias de sinalização distintas que podem ser ativadas, via canônica ou não canônica, dependendo do membro da família e do receptor envolvidos. A via canônica, após ligação de Wnt com um receptor frizzled, provoca liberação de  $\beta$ -catenina do citoesqueleto e translocação desta para o núcleo, onde forma um complexo com TCF/LEF originando um fator de transcrição que modula a expressão de diversas moléculas, entre elas ciclina D1 e c-myc (Fig.4) (Mulroy et al., 2002). Em experimentos com camundongos nocautes condicionais para c-myc foi verificado acúmulo de HSC no nicho subendosteal. Havia, concomitantemente, aumento da expressão de N-caderina e integrinas. Além disso, também foi

verificado que após a divisão das HSC, a célula filha que mantém alta expressão de c-myc e baixa expressão de moléculas de adesão entra em proliferação e diferenciação, sugerindo que c-myc seja fundamental na regulação da saída do nicho subendosteal e expansão do pool (Wilson et al., 2004).

A via não canônica não está tão bem descrita, porém sabe-se que ela envolve ativação de proteína G e fosfolipase C, levando a liberação de cálcio intracelular, e ativação de PKC (Wang e Malbon, 2003).

Análises da expressão de diferentes membros da via de Wnt em tecidos hematopoéticos durante o período fetal murino permitiu a observação de Wnt5a (que utiliza principalmente a via não canônica) e Wnt10b (via canônica) no saco vitelino no dia 11 e no fígado fetal no dia 14, condizente assim com o momento de expansão das HSC. Além disso, os autores estudaram o efeito de meio condicionado enriquecido em Wnt-1, 5a ou 10b no comportamento de HSC isoladas de fígado fetal e observaram uma significativa expansão no número de células e unidades formadoras de colônias, 7, 8 e 11 vezes respectivamente em relação ao controle (Austin et al., 1997).

Trabalhos com progenitores hematopoéticos humanos chegaram a resultados semelhantes. Em ensaios de co-cultura de células CD34 com células estromais de primata transfectadas com Wnt-5a, 2b ou 10b, observou-se expansão do número de células CD34<sup>+</sup> e de colônias mielóides de granulócito e macrófago e de eritrócitos (CFU-GM, *granulocyte macrophage-colony forming unit* e BFU-e, *erythrocyte-burst forming unit*) em todos os casos (Van Den Berg et al., 1998). Em 2003, o grupo de Weissman, em um belo trabalho demonstrando a contribuição da via canônica de Wnt na auto-renovação de HSC, observou que a transfecção de HSC com gene de  $\beta$ -catenina constitutivamente ativa levava a expansão celular, mantendo sua propriedade de HSC, já que o transplante destas células em camundongos irradiados letalmente levou a reconstituição da hematopoese de longa duração. O bloqueio de  $\beta$ -catenina diminuiu a proliferação e aumentou a morte celular,

comprovando o efeito da ativação da via canônica de Wnt (Reya et al., 2003). Curiosamente, em 2004, um grupo do Japão publicou um trabalho contradizendo o trabalho de Weissman. Neste trabalho, eles transfectaram células estromais de MO humana com Wnt5a (via não canônica) ou Wnt3a (via canônica) e analisaram o co-cultivo destas células com células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão umbilical. Eles observaram que os co-cultivos com Wnt5a foram responsáveis por um aumento do número de *cooblastone* (áreas de interação das HSC com o estroma de MO), de células CD34 e de unidades formadoras de colônias (CFC) após 2 semanas, que se mantinha por até 35 dias. Já células transfectadas com Wnt3a induziram efeito parecido com o controle, com exceção de um aumento no número de células CD34<sup>+</sup> e de CFC, porém com uma enorme diminuição de *cooblastone*. Após 35 dias o número de colônias foi menor em relação ao controle, levando-os a sugerir que Wnt3a não seria responsável pela expansão das HSC (Chiba et al., 2004). Neste mesmo ano, Cobas e colaboradores publicaram um trabalho com nocautes condicionais para  $\beta$ -catenina na MO mostrando que a ausência desta não impossibilita a auto-renovação ou a capacidade de formação das linhagens hematopoéticas diferenciadas (Cobas et al., 2004).

A literatura desta forma apresenta incongruências no que diz respeito ao papel de Wnt sobre as HSC, mas um dos pontos mais citados realmente é a importância de Wnt-5a na expansão do pool de HSC. Em 2003 foi publicado um trabalho demonstrando *in vivo* a importância desta molécula. Neste trabalho, camundongos imunodeficientes irradiados que recebiam injeção intraperitoneal de meio condicionado com Wnt5a em dias alternados por 2 semanas antes do transplante com células humanas CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>, apresentaram, após 14 dias, enxerto de células hematopoéticas humanas, inclusive de células CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, quatro vezes maior que os controles que não receberam Wnt5a. Ensaio funcionais *in vitro* mostraram que as células da MO de animais tratados com Wnt-5a possuíam um maior número de unidades formadoras de colônia em comparação com o controle, mostrando o papel desta molécula na expansão do pool de progenitores hematopoéticos humanos. Curiosamente, em ensaios com transplantes de HSC murinas

nenhum efeito de Wnt5a foi observado, sugerindo que a regulação de hematopoese por Wnt é espécie-específica (Murdoch et al., 2003).

Sonic Hedgehog (Shh) e BMP-4 têm um papel mais obscuro, porém em 2001 foi relatado que progenitores hematopoéticos de sangue de cordão humano eram expandidos e tinham sua capacidade de repopular a medula de camundongos imunodeficientes ampliada se mantidas em cultura na presença de Shh ou BMP-4. A inativação destas moléculas através de anticorpos neutralizadores contra BMP-4 (*noggin*) ou Shh induziu, no primeiro caso, inibição do efeito tanto do estímulo por Shh quanto por BMP-4, enquanto no segundo caso apenas o estímulo por Shh foi inibido, demonstrando assim que o efeito de Shh é dependente da via de BMP-4, porém o inverso não é verdadeiro (Bhardwaj et al., 2001).

Notch é uma proteína transmembranar bem conservada, que se ativa quando ligado ao seu receptor Delta ou Jagged. Esta interação leva a clivagem e liberação do fragmento intracelular de Notch, o qual entra no núcleo e forma um complexo com CBF-1, modulando a expressão de uma série de genes alvo (Artavanis-Tsakonas et al.1995). Ele é visto como um dos fatores implicados na auto-renovação das HSC, pois já havia sido observado que sua superexpressão em HSC induzia imortalização, com manutenção da sua capacidade de reconstituição de hematopoese (Varnum-Finney et al., 2000).

Em 2005, Duncan e colaboradores, trabalhando com camundongos transgênicos onde GFP foi associado a CBF-1 (gen Notch *reporter*), demonstraram que as células GFP<sup>+</sup> se localizavam preferencialmente associadas a trabéculas ósseas. Além disso, observaram, na MO, que 68% das células de uma fração enriquecida em HSC (*side population*) estavam com a via de Notch ativa em comparação com no máximo 12% das células diferenciadas, como linfócitos B e estas ainda apresentavam menor intensidade de expressão de GFP. Quando cultivadas em metilcelulose para análise de unidades formadoras de colônia-, não houve diferença no número de colônias formadas por células KSL GFP<sup>+</sup> e KSL GFP<sup>-</sup>, porém as células GFP<sup>+</sup> foram

capazes de formar um maior percentual de colônias multilinhagem, ou seja, mantiveram-se mais indiferenciadas em relação às células GFP<sup>-</sup>, que não expressavam Notch. Neste mesmo trabalho, usando camundongos transgênicos com duplo *reporter*, para Notch (CBF-1 associado a GFP) e para Wnt (TCF/LEF associado a  $\beta$ -galactosidase), os autores observaram que na MO destes animais o número de células duplo positivas na região trabecular era grande (85% das células  $\beta$ -galactosidase<sup>+</sup> também eram GFP<sup>+</sup>). Quando realizaram transplantes com HSC onde a via de Notch havia sido bloqueada através de transfecção de HSC com dominantes negativos, ou seja, com a porção intracelular inativa, observaram uma diminuição de 70% na pega dos transplantes. No entanto, estas células eram capazes de responder ao estímulo com Wnt3a, pois quando cultivadas com este fator aumentavam a taxa de proliferação, mostrando que o efeito de Wnt3a é independente de Notch. Porém, estas células diferenciaram com maior rapidez, indicando que a manutenção do estado indiferenciado é papel de Notch. Logo, na realidade, Notch e Wnt agiriam sinergicamente no controle da auto-renovação, controlando processos distintos de forma não acoplada (Duncan et al., 2005).

Porém assim como wnt, a literatura de notch também apresenta incongruências, em 2005 um trabalho com nocautes condicionais para jagged-1 e notch-1 foi realizado e surpreendentemente não houve nenhum déficit na hematopoese destes animais, mesmo o duplo nocaute não apresentou deficiências, inclusive quando desafiado por tratamento mieloablativo (5-FU). As HSC nocautes para notch-1 foram utilizadas em transplantes com camundongos receptores nocautes para jagged-1, e este teve uma recuperação normal de hematopoese (Mancini et al., 2005). Uma possibilidade de explicação para tantas controvérsias seria que talvez haja redundância do sistema, pois existem descrições em outros modelos de diversas vias que se cruzam para controle de um único processo (Silver e Rebay, 2005).

A decisão entre auto-renovação ou diferenciação é um processo refinado e complexo e algumas moléculas envolvidas neste controle já foram descritas acima, mas provavelmente outras mais podem ter papel importante,

como o ácido retinóico. Estudos *in vitro*, onde as HSC foram tratadas com ácido retinóico, mostraram uma manutenção destas em estado indiferenciado por maiores períodos de tempo, aumentando assim a capacidade de reconstituir a hematopoese de camundongos transplantados, em comparação com células controle cultivadas sem o ácido retinóico. Inclusive, transplantes sucessivos demonstraram que as células mantidas em ácido retinóico originaram maior número de gerações em comparação com células frescas, demonstrando assim que o ácido retinóico estimula a auto-renovação das HSC (Purton et al., 2000 e 2006).

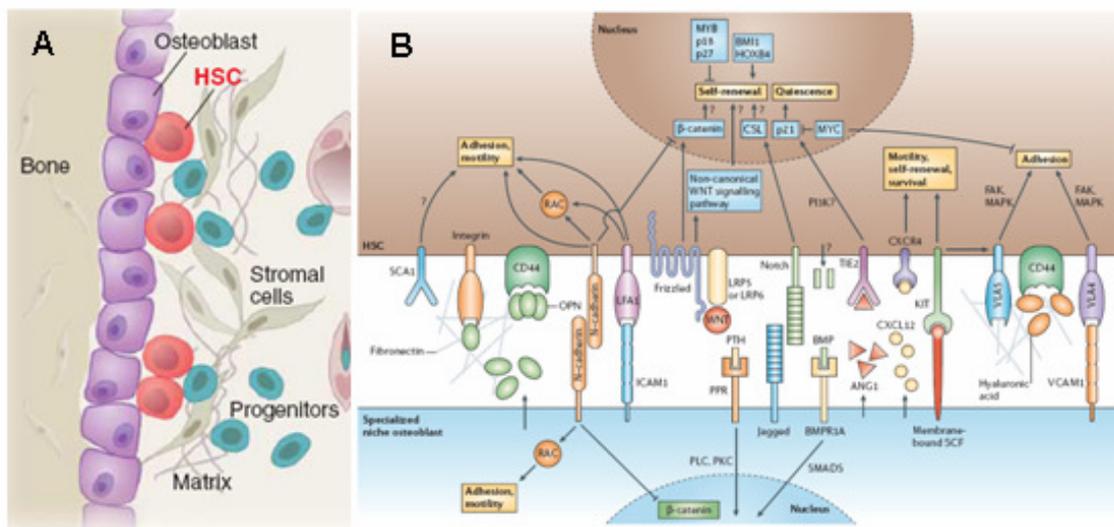
Pode-se então reunir estes dados designando ao nicho subendosteal três propriedades básicas: ancoragem, indução de quiescência e auto-renovação. Por definição quiescência e auto-renovação seriam propriedades temporalmente excludentes, assim, as HSC passariam por ciclos de auto-renovação intercalados por períodos de quiescência, desta forma o nicho subendosteal seria dinâmico e possuiria diferentes facetas temporais e espaciais (Wilson e Trumpp, 2006). Curiosamente, as via moleculares descritas na literatura para quiescência não se sobrepõem com as descritas para auto-renovação fortalecendo assim a hipótese de fenômenos temporal e/ou espacialmente excludentes.

Alguns grupos, recentemente, vêm apresentando um outro ponto de vista, um aspecto metabólico, quanto ao nicho subendosteal. A região subendosteal é um nicho hipóxico, no qual residem as HSC, em geral quiescentes (baixa atividade metabólica) enquanto, as regiões mais centrais da medula, nicho vascular, são ricas em oxigênio, e apresentariam progenitores hematopoéticos altamente proliferativos (Suda et al, 2005). A sobrevivência das HSC em condições de hipoxia, com baixa disponibilidade de energia, seria na realidade necessária, pois a prevenção de senescência depende da inibição de estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (ROS), e isso é melhor alcançado em condições de hipoxia e baixa atividade metabólica. Sabe-se que as em geral, células-tronco, apresentam baixa taxa de fosforilação oxidativa e altos níveis de glicólise anaeróbica para síntese de ATP (Suda et

al., 2005). Sabe-se ainda que as HSC apresentam altos níveis de expressão de ATM, proteína que mantém a estabilidade genética, ativando pontos de checagem do ciclo celular, bloqueando o ciclo e ativando a apoptose em casos de dano ao DNA devido a instabilidade de telômeros ou estresse oxidativo. Camundongos nocautes para ATM apresentam apenas HSC proliferativas, nunca quiescentes, o que levava a esgotamento da população e parada da hematopoese, este efeito era independente da telomerase e pôde ser revertido com o tratamento dos camundongos com anti-oxidantes, mostrando assim a importância de ATM, uma proteína responsiva a estresse oxidativo na manutenção da quiescência, sendo assim esta hipótese se torna interessante apesar de ainda pouco estudada (Ito et al, 2004).

Deve-se destacar que o nicho subendosteal possui duas populações celulares estromais descritas, os osteoblastos e as células mesenquimais subendosteais, sendo que a HSC ficaria exatamente entre as duas (Fig.5). Logo, a realização de estudos para determinar qual das duas populações seria preferencial no controle de qual fenômeno e em qual momento seria importante, pois possivelmente nos permitiria entender a dinâmica do nicho. Talvez seja exatamente um equilíbrio de influências “opostas” dessas duas populações que seja responsável pelas propriedades funcionais e o dinamismo do nicho subendosteal.

“Todo o progresso observado nos últimos anos no campo do nicho das HSC claramente indica que a expansão clonal substancial das HSC *in vitro* inquestionavelmente requer mais do que coquetéis de citocinas, ao invés disso requer uma reconstrução tridimensional do nicho, incluindo as células apropriadas e matriz extracelular para permitir a geração da sinapse no nicho da HSC” (Wilson e Trumpp, 2006).



**Figura 5. Nicho subendosteal e seus mediadores.** (A) Nicho subendosteal possui dois componentes estromais, entre os quais a HSC se localiza, na face óssea os osteoblastos (*bone lining cells*) e voltado para o centro da medula as células mesenquimais subendosteais. (B) Diversos mediadores moleculares já foram descritos no controle das funções do nicho subendosteal, porém qual das duas populações estromais é a responsável pela produção de quais fatores, permanece um mistério. (fonte: Moore e Lemishka , 2006; Wilson e Trumpp, 2006).

### 1.4. O Nicho Vascular

O nicho subendosteal está bastante consolidado quanto ao seu papel na manutenção das HSC, porém recentemente foi demonstrado que a ablação do endotélio através de anticorpo anti-VE caderina leva a interrupção da hematopoese, demonstrando a importância do nicho vascular para este processo (Avecilla et al., 2004). O endotélio dos sinusóides medulares se distingue do de outros órgãos, porque na medula há a expressão de citocinas como SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 e moléculas de adesão como E-selectina e VCAM-1 (Wilson e Trumpp, 2006). Em concordância com o conceito de nicho vascular, Li e colaboradores demonstraram em 2004 que culturas primárias de endotélio eram capazes de manter a população de HSC. Em seguida, um trabalho foi publicado descrevendo uma combinação de marcadores da família SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*), CD150, CD244 e CD48, que eram diferencialmente expressos nas HSC em diferentes graus de

comprometimento. A população mais primitiva KTLS ( $Sca-1^+c-kit^+Thy-1^{low}Lin^-$ ) apresentava o fenótipo  $CD150^+ CD244^+CD48^-$ , enquanto progenitores multipotentes ( $Sca-1^+Mac-1^{low}Thy-1^{low}CD4^{low}$ ) eram  $CD150^-CD244^+CD48^-$  e, ainda, os progenitoras restritos a determinadas linhagens podiam ser distinguidos dos demais pelo fenótipo  $CD150^-CD244^+CD48^+$  (Kiel et al., 2005). A grande vantagem deste painel fenotípico é que ele permitiu distinguir as populações de progenitores hematopoéticos em diferentes graus de comprometimento utilizando somente três marcadores, o que possibilitou verificar a localização *in situ* destas diferentes populações, através de imunofluorescência. Os autores observaram que a população de progenitores mais primitivos, HSC, se encontravam não só na região subendosteal, mas também associadas a vasos, confirmando assim *in vivo* que o nicho vascular coexiste com o nicho subendosteal (Kiel et al., 2005).

O papel deste nicho vascular ainda não está claro. Porém, alguns estudos mostraram que as células capazes de manter a incorporação de BrdU por longo período de tempo se encontram no nicho subendosteal e não no nicho vascular. Além disso, camundongos com depleção de osteoblastos desenvolvem hematopoese extramedular por algum tempo, mas são inviáveis por não manter hematopoese de longa duração (Zhang et al., 2003; Visnjic et al., 2004).

É mais comumente aceito, desta forma, que o nicho vascular seria um nicho de proliferação e diferenciação das HSC, enquanto o nicho subendosteal seria responsável principalmente pela manutenção do *pool* de HSC quiescentes. O nicho vascular é um microambiente rico em nutrientes, fatores de crescimento e com alta taxa de oxigênio, o que permitiria uma resposta rápida a estresses do ambiente, inclusive por estar presente em órgãos extramedulares como o baço (Avecilla et al., 2004). Outros autores apontam uma segunda função para o nicho vascular como mediador da migração transendotelial das HSC, processo realizado tanto durante a migração para a medula quanto durante a mobilização (Kiel et al., 2005; Lapidot et al., 2005; Koop et al., 2005). O recrutamento de HSC para o nicho vascular parece ser

regulado por FGF-4 e quimiocinas como SDF-1 $\alpha$ , que parecem aumentar a expressão de VLA-4 nas HSC e de VCAM-1 nas células endoteliais (Koop et al., 2005).

Na sua grande maioria, os conhecimentos sobre hematopoese foram construídos a partir de resultados que têm sido obtidos em modelos murinos, modelos de xenoenxerto, como as quimeras imunodeficientes onde camundongos como o NOD/SCID (*non-obese diabetes severe combined immunodeficient mice*) são transplantados com progenitores hematopoéticos humanos, ou, ainda, em modelos de cultura de células bidimensionais. Embora tenham contribuído enormemente para a compreensão dos mecanismos de migração de progenitores hematopoéticos e da organização do microambiente hematopoético, pequenas sutilezas da biologia das células humanas no microambiente tridimensional da MO humana poderiam ser reveladas com o desenvolvimento de sistemas de cultura 3D, a exemplo dos modelos já citados. Os modelos de xenoenxerto apresentam limitações pois diferenças espécie-específicas no microambiente podem modificar os resultados. Recentemente, Muguruma e colaboradores demonstraram nas quimeras com camundongos NOD/SCID onde MSC humanas haviam sido previamente injetadas em uma das tíbias, que as HSC de sangue de cordão umbilical humano migravam preferencialmente para a tíbia que possuía células mesenquimais humanas, comprovando as limitações de xenoenxertos e evidenciando a necessidade de modelos de cultura baseados em células humanas que permitam estudos mais complexos da fisiologia destas células (Muruguma et al., 2006).

### **1.5. Modelos *in vitro* tridimensionais**

Em 1887, Julius Richard Petri, descreveu o crescimento de colônias de bactérias em uma base gelatinosa em placas de vidro. Esta técnica, a primeira de cultura de células, originou as técnicas modernas e tornou Petri imortalizado, pois permitiu o desenvolvimento de várias áreas como bacteriologia, microbiologia, biologia celular e molecular. A primeira descrição de cultura de células animais foi feita por Harrison, em 1907. Estudando a

regeneração de tecidos em sapos (*Xenopus*), o autor estabeleceu uma cultura em monocamada a partir de explante tecidual com o objetivo de diminuir as variáveis e, assim, entender melhor as bases do comportamento celular (Freshney, 2000). A partir destes estudos, as culturas de células animais se tornaram amplamente difundidas. No entanto, são modelos de cultivo bidimensional e, embora tenham contribuído grandemente para ampliar os conhecimentos de biologia celular e sejam o melhor modelo de estudo para determinados protocolos experimentais, eles estão longe de mimetizar o que ocorre *in vivo*, onde as células estabelecem comunicações complexas num microambiente tridimensional.

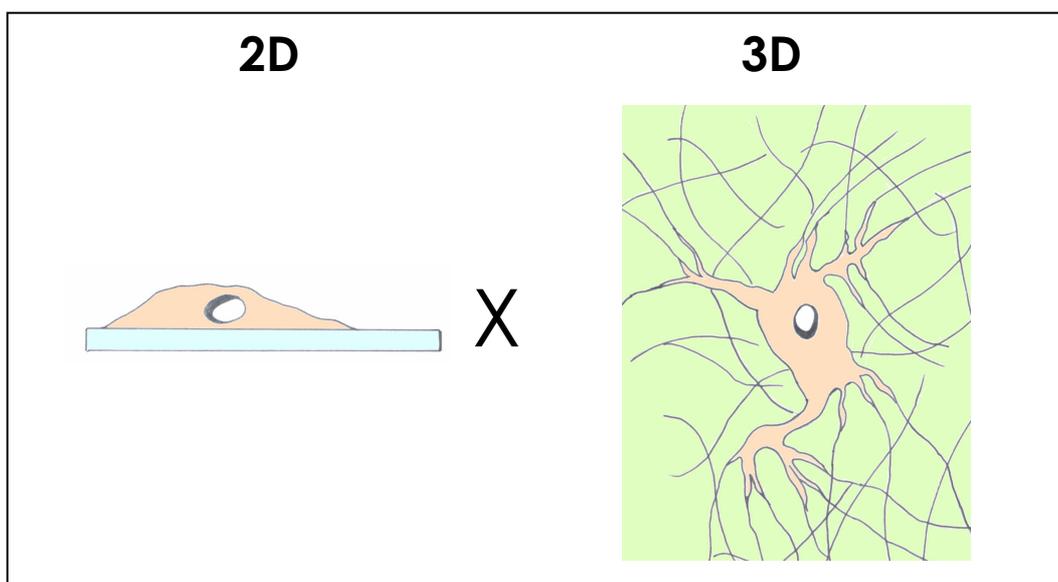
Atualmente, os pesquisadores, liderados pelos que trabalham na área de neoplasias, estão defendendo a utilização de culturas tridimensionais, pois uma série de publicações apresentou resultados distintos em ensaios em 2D *versus* 3D (Frankel et al., 1997; Klunder et al., 1993; Weaver et al., 1997). Posteriormente, foi detectado que culturas 3D estavam mais próximas dos fenômenos que ocorriam *in vivo* (Weaver et al., 1997; Wolf et al., 2003a).

As células de mamíferos no seu ambiente natural não se conectam apenas entre si, mas também a uma intrincada rede tridimensional de matriz extracelular (MEC), que contém proteoglicanos, glicosaminoglicanos (GAGs) e proteínas, como colágeno, elastina e laminina dando ao tecido suas características físicas e arquitetura particular (Alberts et al., 2002).

A interação entre células e matriz é feita por receptores na membrana plasmática chamados integrinas, que ancoram o citoesqueleto dessas células a matriz extracelular (MEC) e desencadeiam vias de sinalização devido a agrupamentos (*clustering*) e mudanças conformacionais na porção intracelular da integrina gerando sinal e modulação do comportamento da célula em questão (Fig.6) (Boudreau et al., 1999; Schwartz et al., 1995). Além disso, mudanças no formato celular, logo no citoesqueleto, também acionam vias de sinalização intracelular (Lambert et al., 2001). Um exemplo de comportamento influenciado pela sinalização por integrinas e pelo formato celular é o controle



vantagens desta forma de cultura é o restabelecimento destes dois fatores como o encontrado *in vivo*. Em culturas 2D, as células estabelecem uma falsa polarização, entre a porção aderida ao plástico e a porção superior em contato com o meio de cultura. Esta polarização gera um formato celular espraído e completamente diferente do encontrado *in vivo*, ao contrário do que ocorre nas culturas em 3D, que permitem um formato assimétrico, próximo do real (Fig.7) (Kunz-Schughart, 1999).



**Figura 7.** Esquema de cultura bidimensional e tridimensional, a cultura bidimensional apresenta uma polarização artificial enquanto a cultura tridimensional apresenta formato assimétrico sem polarização induzida (Barros, APDN)

Tradicionalmente, a adesão celular em monocamada induz a formação de adesão focal, caracterizada pela fosforilação de cinases de adesão focal (FAKs, *focal adhesion kinasis*). No entanto, este evento foi recentemente questionado, pois em fibroblastos cultivados em 3D não se observou a formação de adesões focais, nem fosforilação de FAKs, de forma semelhante ao observado *in vivo* (Cukierman et al., 2001).

Outro exemplo de modulação da via de sinalização de integrinas dependendo da complexidade do sistema foi mostrado pelo grupo de Bissel (Weaver et al., 1997). Os autores foram capazes de reverter o fenótipo maligno de células de carcinoma mamário em culturas 3D pela incubação destas com

anticorpo anti- $\beta$ 1 integrina. Este fenômeno foi confirmado *in vivo*, onde o implante das células tratadas previamente com anticorpo, mostrou uma redução da tumorigenicidade caracterizada pela diminuição do tamanho dos tumores e do número de camundongos com tumores. No entanto, o mesmo efeito não foi observado em culturas bidimensionais (monocamadas).

A utilização de culturas 3D tem gerado modificações nos conceitos estabelecidos de metástase e migração celular. Classicamente, a metástase tumoral dependeria da secreção de enzimas que digerem moléculas de matriz (metaloproteinases - MMPs), permitindo assim a sua migração para locais secundários, através de protrusões membranares com formação de lamelipódia (Palecek et al., 1997; Stetler-Stevenson et al., 1993). Porém, em muitos testes clínicos com administração de inibidores dessas enzimas não se via resultados favoráveis e as metástases continuavam se formando (Overall et al., 2002). Então, o grupo de Friedl (Wolf et al., 2003a) fez culturas 3D em gel de colágeno de linhagens incubadas com esses inibidores e observou que as células continuavam migrando, através de movimento amebóide, por entre as fibras de colágeno. A injeção dessas células em camundongo e a análise por microscopia multifóton permitiram a observação desses movimentos exatamente como nas culturas 3D, explicando assim os resultados dos testes clínicos.

No mesmo ano, o grupo de Christopher Marshall (Sahai et al., 2003) conseguiu determinar que a via de sinalização envolvida nessa forma de migração era Rho / Rock, e não Rac, que está ligada à migração dependente de MMPs, com formação de prolongamentos de membrana. A incubação com inibidores de proteases associados à inibidores de Rho e de Rock bloqueou totalmente a migração. Porém, quando só uma das vias foi inibida, a outra era ativada e a migração continuava. Esta mesma forma de migração independente de MMPs foi descrita em células não malignas como linfócitos T e células dendríticas (Wolf et al., 2003b).

As culturas 3D estão sendo aplicadas em diversas áreas, como bioengenharia tecidual e terapia gênica. Foi descrita uma técnica de cultura 3D

em nanofibras protéicas que permite a diferenciação de uma linhagem de célula-tronco hepática (Lig-8) para hepatócito maduro, capaz de expressar enzimas características. Este fato não era obtido com a manutenção desta linhagem em monocamada, onde as células se mantinham indiferenciadas e apresentavam alta taxa proliferativa (Semino et al., 2003). Os autores propuseram que o próximo passo seria a reconstrução de um microambiente representando o nicho da célula-tronco no organismo para promover a auto-renovação de células-tronco extraídas do tecido. Anders e colaboradores, em 2003, estudando receptores de superfície celular para adenovírus em monocamada e culturas 3D de epitélio de mama normal e maligno, observaram que em monocamada a expressão deste receptor é alta tanto nas células mamárias malignas quanto nas células de mama normais, porém, nas culturas 3D, apenas as células de carcinoma mamário apresentavam grande expressão deste receptor. Portanto, o adenovírus é um possível vetor para a realização de terapia gênica em células transformadas.

Não é surpreendente que há anos sutilezas biológicas têm sido perdidas levando em conta que grande parte do conhecimento construído teve como base o uso de monocamadas. E é através de culturas 3D que se pode observar e estudar tais sutilezas. Sendo assim, o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (*National Cancer Institute*, NCI) previu o lançamento, em 2003, de um programa em microambiente celular focado em estudos 3D, com um orçamento anual de 40 milhões de dólares. Alguns acreditam que em 10 anos quem estiver utilizando estudos 2D para responder suas perguntas terá sérias dificuldades para conseguir financiamento (Abbot, 2003). Este investimento já deu frutos, como, entre outros, o desenvolvimento de biorreatores que permitem a organização tridimensional das células, favorecendo sua diferenciação e formação de um microtecido com as características morfo-funcionais do tecido original. Já foram desenvolvidos reatores de cartilagem, osso, tendão, enxertos vasculares, entre outros (Huang et al., 2004; Mauney et al., 2004; Feng et al., 2006; Abilez et al., 2006).

## 1.6. Técnicas de culturas 3D

Existem várias técnicas utilizadas atualmente para cultivo em 3D: Gel de colágeno, gel de matriz extracelular tecidual, matrigel, nanofibras protéicas e esferóide (*multicellular tumor spheroids*, MCTS).

Uma das alternativas mais utilizadas ainda hoje é o matrigel, que é uma mistura de moléculas de matriz, fatores de crescimento e enzimas extraídas da matriz extracelular de um tumor murino. Este composto foi descrito há 20 anos e até hoje ainda não foram definidos quais são os compostos presentes na mistura, o que pode dificultar bastante a interpretação de resultados obtidos com a utilização desta matriz (Abbot, 2003).

Os géis de colágeno são bons para estudo de migração, mas não apresentam certas variáveis presentes *in vivo*, como a presença de diversos componentes de matriz e fatores de crescimento produzidos em determinado momento e em certa quantidade (Abbot, 2003).

Outra possibilidade é a extração de matriz de tecidos vivos que pode variar dependendo da amostragem, logo é difícil de padronizar. Além disso, o futuro da bioengenharia é o implante em humanos de enxertos cultivados de forma tridimensional e, para isso, seria interessante a utilização de uma alternativa às matrizes animais e cadavéricas (Abbot, 2003).

Atualmente, existe um mercado crescente objetivando o desenvolvimento de matrizes sintéticas padronizadas que dariam o suporte necessário para células de forma tecido-específica. Nesta busca já foram desenvolvidas nanofibras protéicas, que se polimerizam por um processo intrínseco, espontâneo e reversível, que pode ser controlado através da modificação do pH do meio, variando assim o grau de compactação da estrutura e, desta forma, controlando a difusão de fatores (Hartgerink et al., 2001). Além disso, o ambiente fisiológico é construído em nanoescala, o que aproxima esta forma de cultura do real. Porém, muitas outras variáveis existem e devem ser padronizadas, como a determinação de quais são os fatores de

crescimento e as enzimas que devem estar presentes, o controle da taxa e seqüência de liberação destes, enfim, muitos estudos ainda são necessários (Abbot, 2003).

Apesar das intrincadas relações 3D que regulam a hematopoese in vivo, a maior parte dos sistemas de hematopoese ex-vivo, com ou sem estroma, se baseiam no acréscimo de citocinas exógenas que ainda assim são incapazes de sustentar o desenvolvimento de células hematopoéticas de forma satisfatória ou mesmo manter a LT-HSC. As tentativas existentes de cultura 3D de MO utilizam células mesenquimais e se baseiam na semeadura destas em malhas e géis que sustentem fisicamente a cultura, como PolyEtileno Tereftato (PET), polivinil poroso formal (PVF), biomatriz porosa, e outras malhas artificiais (Panoskaltisis et al., 2005). Através destas técnicas alguns resultados animadores foram obtidos, como no caso de cultivo tridimensional de células progenitoras mesenquimais em malhas PET quando se observou um aumento na expressão de matriz extracelular em comparação com células cultivadas bidimensionalmente (Grayson et al., 2004), porém em nenhuma destas alternativas de cultura se obteve organização espacial das células de forma semelhante ao observado no tecido original .

Quanto a alterações no comportamento das células hematopoéticas devido a forma de cultura, um trabalho com culturas 3D de microesferas de colágeno com células estromais de MO e HSC murinas em meio de Dexter, sem citocinas adicionais, mostrou a produção de todas as linhagens hematopoéticas inclusive linfócitos, ao contrário do que é observado classicamente em culturas 2D com este meio de cultura (Wang et al., 1995). Em 2006, foi publicado um trabalho que visou correlacionar o tipo de cultura de MSC de MO, em 2D ou 3D em malha PET, com sua capacidade de sustentar progenitores hematopoéticos (Zhang et al., 2006). Os autores observaram que as células mesenquimais em culturas 3D têm maior capacidade de expandir as HSC, quase o dobro, mantendo sua capacidade de reconstituir a hematopoese após transplante em camundongos imunodeficientes. Este trabalho mostra bem a influência de uma organização tridimensional das células estromais na

capacidade de promover a expansão, sem diferenciação, das HSC, porém ainda não se tem uma organização tecidual como a da MO.

### **1.7. Esferóides (*Multicellular Tumor Spheroids*, MCTS)**

Esta forma de cultura foi criada na década de 40 por J. Holtfreter e A. Moscona e em 1971 foi adaptada por Sutherland e colaboradores, para possibilitar um modelo *in vitro* de crescimento tumoral, que permitisse testes com drogas antitumorais (observando a penetração, ligação com o alvo e sua ação), radioterapia e novas combinações de drogas e terapias (Kunz-Schughart , 1999). Utilizando esta técnica, observou-se uma resistência a terapias com radiação ionizante e drogas alquilantes, mediada pela “conformação multicelular”. A resistência do tumor murino EMT6 a estas drogas pôde ser completamente revertida quando as células foram isoladas e cultivadas em monocamada. Porém, se as células fossem mantidas em cultura como a de esferóide, a resistência às drogas se reestabelecia (Graham et al., 1994; Kobayashi et al., 1993).

Esta técnica é baseada no princípio de adesão celular. Assim, através da formação de uma película inerte (não aderente) na superfície de cultivo, a adesão ao plástico fica impossibilitada e as células aderentes passam a aderir entre si, formando uma estrutura multicelular arredondada, os esferóides (Kunz-Schughart et al., 1998 e 1999; Mueller-Klieser, 1997). Esta estrutura tridimensional reproduz com maior fidelidade as características encontradas *in vivo*, pois contém uma extensiva matriz extracelular que é diferente tanto na quantidade quanto na disposição dos seus componentes em comparação com a matriz produzida pelas células em monocamada (Kunz-Schughart , 1999). Em 2002, Layer e colaboradores estudando o comportamento de células da retina de embriões de galinha cultivadas na conformação de esferóides observaram uma reorganização histotípica absolutamente condizente com a organização de uma retina *in vivo*, com a presença de todas as camadas organizadas. Apresentou, inclusive, fotoreceptores organizados em rosetas após nove dias de cultura. Esta reorganização não foi apenas devido ao posicionamento das

células aplicadas inicialmente, mas também devido a proliferação e diferenciação celular ocorridas durante o cultivo *ex-vivo* (Layer et al., 2002).

Uma grande vantagem deste tipo de cultura é a possibilidade de criar um ambiente tridimensional com diferentes tipos celulares e, portanto, estudar os mecanismos de crescimento, proliferação e diferenciação celulares em um modelo reprodutível com um ambiente interno ditado pelo metabolismo e pelas respostas adaptativas das próprias células. Os MCTS possuem uma geometria morfológica e fisiológica que modula características celulares como formato, tamanho, distribuição de organelas, atividade enzimática (Kunz-Schughart et al., 1998) e expressão gênica (Klunder et al., 1993). Estes autores compararam a expressão do gene de  $\beta$ -actina em células mantidas em monocamada e em cultura tridimensional (esferóides) e observaram expressão de  $\beta$ -actina na monocamada, enquanto que nos esferóides a maioria das células era negativa. Este efeito era reversível, pois a dissociação dos esferóides e o cultivo em monocamada induzia a expressão do gene de  $\beta$ -actina.

Atualmente, este modelo vem sendo aplicado para avaliar o papel de fatores do microambiente e outras variáveis epigenéticas nas células em cultura, pois, como visto, o cultivo de agregados celulares esféricos restaura características bioquímicas, morfológicas e funcionais do tecido original (Kunz-Schughart et al., 1998, 1999 e 2001). Além disso, este modelo permite a adição de diferentes tipos celulares para analisar a interação deles (Kunz-Schughart et al., 1998; Korff et al., 2001, Kunz -Schughart et al., 2001) e migração de um tipo celular para o interior do esferóide de outro tipo celular (Kelm et al., 2005; Bug et al., 2002; Silzle et al., 2003). Tudo isso pode ser realizado através de técnicas simples como distribuição celular por etapas, distribuição simultânea ou fusão de esferóides celularmente distintos (Kunz-Schughart et al., 1998). Os diferentes tipos celulares podem então ser facilmente diferenciados por técnicas específicas.

Até o momento, não foi descrito na literatura, um modelo *in vitro* tridimensional que permita reorganização tecidual para estudo de

microambiente hematopoético, constituído exclusivamente com células humanas. Torna-se então interessante o desenvolvimento de modelos tridimensionais que permitam a separação das duas principais populações estromais do nicho subendosteal para então entendermos o papel de cada uma na regulação das propriedades deste nicho e da sua dinâmica. Uma vez que o modelo de esferóides apresenta diversas vantagens para estudos de interação e migração celular foi então selecionado como modelo para o desenvolvimento deste estudo.

## **2. Objetivo**

### **Principal**

Desenvolver um modelo complexo multicelular tridimensional de células de estroma de medula óssea humana representativo do nicho subendosteal humano.

### **Secundários**

- Estabelecer o melhor protocolo para formação de modelo multicelular tridimensional complexo (esferóide misto) representativo do nicho subendosteal e compará-lo com esfera simples de células mesenquimais de MO.
- Caracterizar morfológicamente os esferóides mistos e simples de células mesenquimais de MO.
- Investigar a capacidade e a cinética de migração de progenitores hematopoéticos CD34<sup>+</sup> de SC e MO adulta nos modelos de esfera simples e misto.
- Verificar a localização espacial de progenitores hematopoéticos CD34<sup>+</sup> de SC nos esferóides mistos e simples.
- Investigar a indução de quiescência de progenitores hematopoéticos CD34<sup>+</sup> de SC nos modelos de esfera simples e misto.
- Avaliar mecanismos envolvidos na migração de progenitores hematopoéticos CD34<sup>+</sup> de SC neste sistema de cultura.
- Identificar a expressão, nas diferentes populações estromais de MO que compõem os esferóides mistos, de mRNA para fatores envolvidos no nicho subendosteal de HSC (SDF-1 $\alpha$ , Wnt5a, Notch-1, osteopontina, Angiopietina-1, SCF, Jagged-1, Delta).

### **3. Material e Métodos**

#### **3. 1. Células e Amostras**

Osteoblastos e fibroblastos de pele humanos foram obtidos no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, RJ, Brasil).

Amostras de sangue de cordão umbilical humano (SC) foram obtidas de fetos nascidos a termo na maternidade Pró-Matre do Rio de Janeiro. Amostras de medula óssea (MO) foram obtidas a partir de aspirados da crista ilíaca de doadores voluntários do Unidade de Transplante de Medula Óssea do Serviço de Hematologia Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da UFRJ. Os procedimentos foram aprovados em 7 de outubro de 2002, pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, processo nº 022/02.

As células CD34<sup>+</sup> foram purificadas, por bilhas magnéticas (CD34 Progenitor Cell Selection System, Dynal Biotech, Lake Success, NY, USA), da fração mononuclear, obtida por gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, Uppsala Sweden), de sangue de cordão ou medula óssea adulta.

As células mesenquimais de medula óssea (MSC) foram obtidas após hemossedimentação em Hesperan® (hidroxietil de amido, McGahey, Irvine, CA, USA), seguindo-se o protocolo descrito anteriormente de Unidade Formadora de Colônia de Fibroblasto (CFU-F) (Friedenstein et al., 1976). Resumidamente, as células de medula óssea foram distribuídas em frascos de cultura com meio Iscove's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (100U/mL de Penicilina G sódica e 100µg/mL de Estreptomocina). As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e, após 3-4 dias em cultura, o sobrenadante foi retirado e as células aderentes mantidas até pré-confluência, quando foram expandidas, após retirada enzimática, com 0,125% de tripsina e 0,2g/L de EDTA.

### **3. 2. Indução de diferenciação para a linhagem osteogênica e desenvolvimento de reagregados esferóides multicelulares.**

As células foram induzidas para a linhagem osteogênica com meio indutor, ou seja, Iscove's suplementado com 10% de SFB e antibióticos contendo 10mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 50  $\mu$ M de ácido ascórbico e  $10^{-8}$ M de Dexametazona (Decadron, Prodome Química e Farmacêutica Ltda). As culturas foram mantidas por 7 dias com trocas de meio em dias alternados.

Para a formação dos esferóides, poços, com fundo em "U", de uma placa de 96 poços, foram previamente recobertos com uma película de agarose a 1% e as células foram distribuídas nas placas após polimerização da agarose. Para formação de esferóides simples,  $2,5 \times 10^4$  células mesenquimais, induzidas ou não, foram distribuídas em cada poço, em meio Iscove's suplementado com 10% de SFB e antibióticos. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por um período mínimo de 4 dias. O diâmetro dos esferóides mantidos em cultura por 4 ou 11 dias foi medido em microscópio invertido equipado com sistema de aquisição de imagem digitalizado. Para formação de esferóides multicelulares mistos, foram distribuídas  $1,25 \times 10^4$  células induzidas e, após a formação do esferóide,  $1,25 \times 10^4$  células mesenquimais não induzidas foram distribuídas sobre estes. A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por, no mínimo, 24 horas. Para identificação dos diferentes tipos celulares, as células induzidas para pré-osteoblasto foram previamente marcadas com CM-Dil (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### **3. 3. Migração de células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão ou medula óssea em esferóides simples ou mistos de células estromais de medula óssea.**

Após a formação dos esferóides, estes foram co-cultivados com  $2-3 \times 10^4$  células CD34<sup>+</sup> de SC ou MO, previamente marcadas ou não com 5 $\mu$ m de 5-(e 6)-carboxifluoresceína diacetato succinil éster (CFSE, Molecular Probes), por até 72h. Após 4, 16, 24 e 48h de co-cultura, as células no sobrenadante de duplicatas de pool de três esferóides por ponto foram retiradas e os esferóides foram lavados com PBS e dissociados por digestão enzimática com tripsina-

EDTA para análise por citometria de fluxo. As células foram quantificadas em hemocítômetro e a mortalidade foi determinada pelo método de exclusão com azul de tripan. Alguns esferóides foram mantidos íntegros para análise morfológica (microscopia óptica, confocal e eletrônica).

Para verificar se uma possível alteração no número de células CD34<sup>+</sup> no interior dos esferóides se devia a proliferação, após 24h de co-cultura as células que não haviam migrado (sobrenadante) foram retiradas de alguns esferóides e estes foram lavados com salina e mantidos em cultura por mais 48h para análise por citometria de fluxo.

Para verificar se havia circulação, as células CD34<sup>+</sup> foram marcadas com CM-Dil e distribuídas sobre os esferóides mistos. Após 24h de cultura, as células do sobrenadante foram retiradas e os esferóides foram lavados como descrito. Em seguida, células CD34<sup>+</sup> marcadas com CFSE foram distribuídas sobre os esferóides, que foram mantidos em cultura por mais 48h. O sobrenadante e os esferóides dissociados foram analisados após 24h e 48h por citometria de fluxo e o percentual das populações marcadas com os diferentes corantes fluorescentes foi determinado.

### **3. 4. Inibição da migração de progenitores hematopoéticos em esferóides de células mesenquimais de medula óssea.**

Para determinação do papel de proteína G na migração de progenitores hematopoéticos neste sistema, as células CD34<sup>+</sup> de SC foram pré-incubadas por 4h a 37°C com 200ng/mL de toxina Pertussis (PTx - Sigma Chemical Co.) (Bonig et al., 2006) e co-cultivadas com os esferóides para avaliação da migração como descrito. A co-cultura foi incubada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 24h. Após este período, as células no sobrenadante foram coletadas e os esferóides lavados e dissociados enzimaticamente para análise por citometria de fluxo, como descrito anteriormente.

### **3. 5. Citometria de fluxo e análise de proliferação celular**

Suspensões celulares de esferóides co-cultivados ou não com células CD34<sup>+</sup> de SC ou MO, obtidas por dissociação enzimática, e dos sobrenadantes destes foram lavadas com PBS contendo 3% de SFB e 0,01% de azida sódica (tampão de FACS) e incubadas com anticorpo anti-CD34 conjugado a PE (clone 8G12, BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas e ressuspensas rigorosamente em 400 µl de tampão de FACS para aquisição em citômetro de fluxo, estabelecendo-se o tempo como parâmetro da aquisição.

Para análise da proliferação das MSC de MO nos esferóides, a expressão do antígeno nuclear Ki67 foi investigada por citometria de fluxo, como descrito (Zupo et al., 1994). Resumidamente, a suspensão celular obtida por dissociação enzimática dos esferóides foi fixada com paraformol tamponado a 1% por 40 minutos a temperatura ambiente (TA). Após a fixação, as células foram permeabilizadas com etanol 70% a -20°C por 1 hora, lavadas com tampão de FACS, incubadas com anticorpo anti-Ki-67 conjugado a FITC (clone mib1, BD Biosciences) a 4°C por 1 h e lavadas com tampão de FACS.

A proliferação celular ao longo da cultura foi avaliada pela técnica de incorporação de bromo-deoxiuridina (BrdU, Sigma Chemical Co.). No momento da adição de células CD34<sup>+</sup> sobre os esferóides, 10µM de BrDU foi acrescentado na cultura e o meio foi trocado de 2 em 2 dias. Após 48h e 7 dias de co-cultura, o sobrenadante foi coletado e os esferóides dissociados, como descrito. Após marcação de superfície, as células foram fixadas com paraformaldeído 1% e permeabilizadas com etanol 70% gelado como descrito anteriormente. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas por 30 minutos a 25°C em solução de 0,15M de NaCl com 100 U/mL de DNase (Worthington Biochemical Corporation®), 4,2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 10 µ M de HCl. Após lavagem, as células foram incubadas com anticorpo anti-BrdU FITC (clone B44, BD) por 20 minutos a TA e lavadas com tampão de FACS.

A aquisição foi feita em FACSCalibur com software CellQuest 3.1 e as análises foram feitas utilizando o programa livre WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

### **3. 6. Análise histológica e ultraestrutural**

Os esferóides íntegros foram fixados em paraformaldeído tamponado a 4% e processados rotineiramente para inclusão em parafina. O material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool (70%, 100% por duas vezes) por 20 minutos cada. Após a desidratação, o material foi imerso em Xileno em dois banhos de 20 minutos cada. Em seguida o material foi imerso em Parafina purificada em dois banhos de 20 minutos cada a 58°C. Os blocos de parafina foram cortados com 5µm de espessura em micrótomo (Lupe “820” Spencer Microtome). Os cortes foram desparafinados, rehidratados e corados rotineiramente com Hematoxilina e Eosina-Floxina (H-E), Von Kossa modificado (Reyes et al., 2001) e Picrossírius modificado para confocal (Dolber e Spach, 1993). Para microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV), os esferóides foram fixados em Glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M 3,5% sacarose por 1 hora no gelo. Em seguida foram pós-fixados com uma solução de ósmio-ferrocianeto em tampão cacodilato 0,1M 3,5% sacarose, desidratados com séries crescentes de acetona e incluídos em resina Epon 812 (MET) e cortado em ultramicrótomo (Ultracut, Leica SUCT). Os cortes semifinos foram colocados sobre lâmina de vidro e corados com azul de toluidina e os cortes ultrafinos foram colocados sobre grades de cobre com 300-mesh, contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila e examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 10C. Para MEV o material, após desidratado, foi submetido ao ponto crítico de secagem com troca da acetona por CO<sub>2</sub> (Critical point drier, CPD 030, Balzers Union) e posteriormente metalização com ouro (MED 010, Balzers Union) para observação em microscópio eletrônico de varredura (TSM 940, Zeiss).

### **3. 7. Imunofluorescência e Microscopia Confocal**

Os esferóides foram fixados com paraformaldeído 4% tamponado por 6h e, em seguida, incubados com sacarose 15% (*overnight*), sacarose 30% (6h),

incluídos em OCT (*tissue teck*), congelados e cortados em criostato (Leica CM 1850).

Para análise de citoesqueleto, as células foram permeabilizadas com Triton X a 0,2% durante 15 minutos para identificação de  $\alpha$ -actina de músculo liso e 30 minutos para reação com faloidina (Sigma Chemical Co.). Para análise de moléculas de matriz extracelular, os cortes foram previamente incubados com Triton X a 0,01% durante 15 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de BSA 3% em PBS por 1h. As lâminas foram incubadas, por 16h a 4°C em câmara úmida, com os seguintes anticorpos primários: (i) camundongo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (Dako) diluído 1:50, (ii) coelho anti-fibronectina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:400, (iii) camundongo anti-colágeno I (Sigma) diluído 1:1000, (iv) coelho anti-laminina (Sigma Chemical Co.) diluído 1:50, (v) cabra anti-osteopontina (Santa Cruz) diluído 1:1000 e (vi) camundongo anti-colágeno IV diluído 1:50 (Sigma Chemical Co.). As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas, por 60 minutos a TA com os anticorpos secundários específicos conjugados a fluoresceína (FITC) ou rodamina. As lâminas foram lavadas e, em seguida, incubadas com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI, Sigma Chemical Co.), na concentração previamente determinada, por 5 minutos a TA. As lâminas foram montadas em vectashield e observadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse E400) ou em microscópio Confocal LSM 510 Meta (Carl Zeiss).

### **3. 8. Marcação fluorescente para identificação celular**

Para identificação dos diferentes tipos celulares após co-cultivo, as células foram marcadas com Clorometilbenzamido (CM-Dil, Molecular Probes) ou 5-(e 6-)-carboxifluoresceína diacetato succinil éster (CFSE, Molecular Probes).

As células progenitoras CD34<sup>+</sup> foram incubadas com 5-10 $\mu$ M de CFSE ou com 2 $\mu$ M de CM-Dil. A população de MSC induzida foi marcada com 2 $\mu$ M de CM-Dil. Para marcação com CFSE, a concentração da suspensão celular foi ajustada para 2-5 x 10<sup>6</sup> / mL em uma solução com 0,1% de albumina sérica

bovina (BSA) e as células foram incubadas por 15 minutos a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS com 10% de SFB, ressuspensas em meio de cultura e aplicadas nos poços de cultura. A marcação com CM-Dil foi feita após sua diluição em Iscoves' com 10% de SFB e as células foram incubadas por 5 minutos a 37°C, sob agitação, e por adicionais 15 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas quatro vezes com PBS, ressuspensas em meio de cultura e aplicadas nos poços como descrito.

### **3. 9. Isolamento de m-RNA e reação de polimerase em cadeia com transcrição reversa (RT-PCR).**

A expressão de genes envolvidos no processo de migração e manutenção de quiescência de progenitores hematopoéticos foi avaliada comparando as populações de MSC de medula, induzidas ou não, sob condições tridimensionais (esferóide) ou bidimensionais (monocamada). Para tanto, as células foram lisadas com Trizol (Gibco BRL) para extração de RNA total, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Para a síntese de cDNA, foram utilizadas 2 µg de RNA total. Foi adicionada 0,5µg de oligo-dT primer (oligo-dT primer 500 µg/mL, Gibco BRL) e a mistura foi incubada a 68 °C por 4 minutos. Após este período, adicionou-se 0,01 M de DTT (DTT, 0,1M, Invitrogen), e 0,5 mM de uma mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM, Invitrogen) e 200U da enzima de Transcrição Reversa (M-MLV RT 200 U/mL; Invitrogen). A mistura foi incubada a 39 °C por 2 h. Em seguida, foi colocada a 90° C por 10 minutos e armazenada a – 20 °C.

Para as reações de RT-PCR, 2 µL de cDNA foram adicionados numa solução contendo 0,4 pMoles/µL de primers (Tab. 1), 1,5U de Taq Polimerase (Cenbiot Enzimas) e tampão da enzima contendo 2mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,1 mM de uma mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM, Invitrogen). Após 60 segundos a 96°C, foram realizados 34 ciclos de 96°C por 30 segundos, seguidos de 45 segundos a temperatura média de anelamento para cada primer (Tab. 1) e 72°C por 1 minuto para alongamento. Ao final, um ciclo a 75°C por 5 minutos. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1,2% e posterior coloração com brometo de etídeo (0,17 µg / mL) em TAE (Tris-

Acetato-EDTA). A visualização foi realizada com o auxílio de um transiluminador. A quantificação da intensidade das bandas foi realizada através de imagens digitais com o auxílio do programa Scan Image.

**Tabela 1. Características dos primers utilizados.**

Fator	Sequência	TM	Produto amplificado
Ang-1	5'ACTGTGCAGATGTATATCAAGC3' 3'GTGGAATCTGTCATACTGTGAA5'	54°C	326pb
Cbfa-1	5'CTCACTACCACACCTACCTG3' 3'TCAATATGGTCGCCAAACAGATTC5'	57°C	319pb
Delta-1	5'CCACGCAGATCACGAACACC3' 3'TTGCTATGACGCACCATCC5'	57°C	335°C
DKK-1	5'TGGTCCAAGATCTGTAAACCTGTCC3' 3'CTGGCTTGATGGTGATCTTTCTGTA5'	67,5°C	149pb
GAPDH	5'ATCACCATCTTCCAGGAGCG3' 3'CCTGCTTCACCACCTTCTTG5'	57,5°C	573pb
Jagged-1	5'GACTCATCAGCCGTGTCTCA3' 3'TGGGGAACACTCACACTCAA5'	56°C	190pb
Osteopontina	5'CCCTTCCAAGTAAGTCCAACGAAAGC3' 3'CTGGATGTCAGGTCTGCGAAACTTC5'	62°C	323pb
SCF	5'GACAGCTTGACTGATCTTCTGGAC3' 3'ACTGCTGTCATTCTTAAGGGAGCT5'	58°C	359pb
SDF-1 $\alpha$	5'CCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGGAAG3' 3'CTTGTTTAAAGCTTTCTCCAGGTA5'	64°C	226pb
Wnt 5a	5'TTTTTCTCCTTCGCCAGGTTGT3' 3'GGCTCATGGCGTTCACCAC5'	57,5°C	358pb

TM = Temperatura média de anelamento

## **4. Resultados**

### **4. 1. Características morfológicas dos esferóides de MSC de MO**

Após quatro dias em cultura, as MSC de MO agregaram-se entre si, formando estruturas esferóides com diâmetro em torno de 400 $\mu$ m (420 $\mu$ m  $\pm$  23,7) (Fig. 8A). À microscopia óptica, verificou-se que, na periferia, a densidade celular era maior e as células apresentavam-se fusiformes, dispostas em múltiplas (4-6) camadas. Na região central, as células eram poliédricas, com amplo citoplasma vacuolizado (Fig. 8B e detalhe destacado). A microscopia eletrônica de varredura confirmou a estrutura multicelular esferóide (Fig. 8C). As células na superfície do esferóide apresentavam longas projeções citoplasmáticas do tipo filopódio (Fig. 8D). Delicadas projeções celulares e finos filamentos sugestivos de depósito de elementos de matriz extracelular foram observados na superfície dos esferóides (Fig. 8E, seta). A microscopia eletrônica de transmissão confirmou o aspecto fusiforme das células periféricas (Fig. 8F). Na região central as células apresentavam citoplasma amplo e vacuolizado, núcleo irregular e material granular no espaço intercelular (Fig. 8G). Observou-se em células centrais a presença de cisternas de retículo endoplasmático dilatadas apresentando no seu interior material granular similar ao observado no espaço intercelular (Fig. 8H, seta), além disso foi possível observar também grande quantidade de mitocôndrias com aparência íntegra indicativo de significativa atividade metabólica celular (Fig. 8H, cabeças de seta).

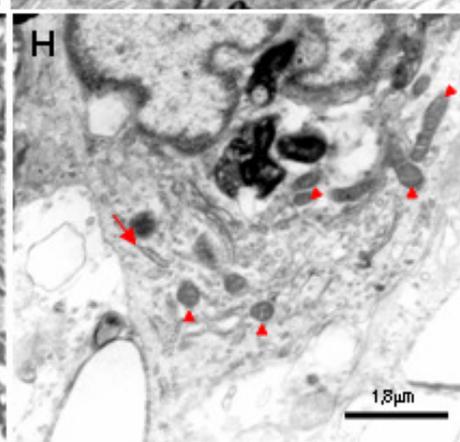
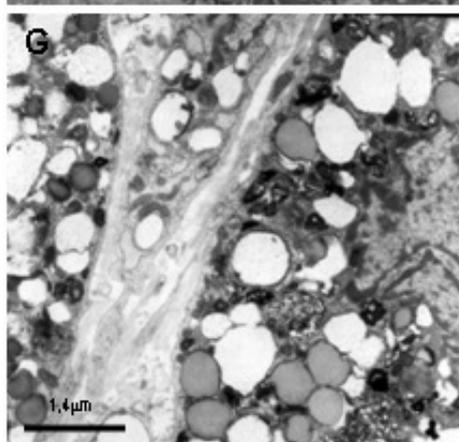
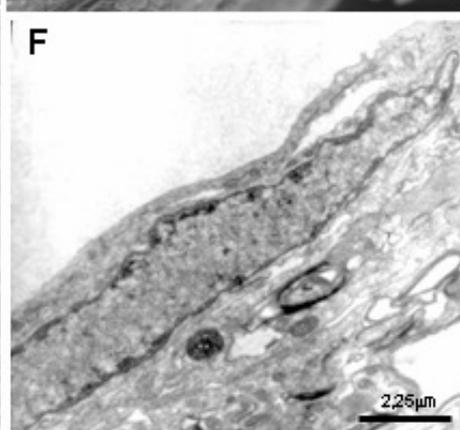
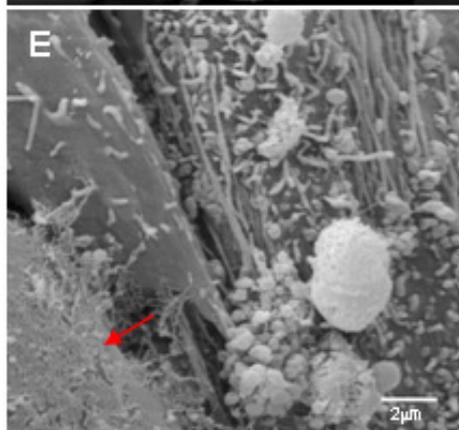
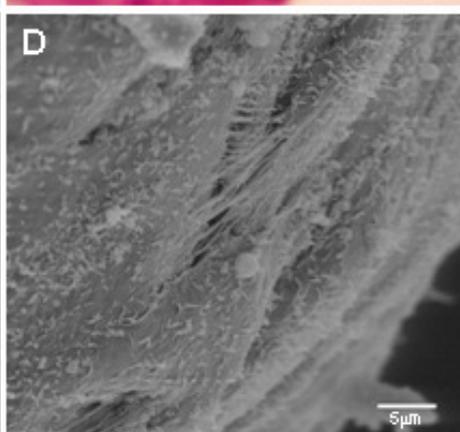
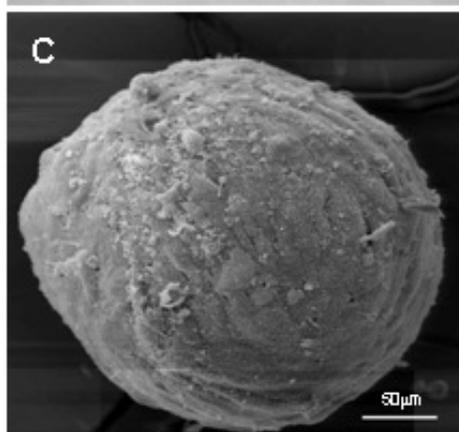
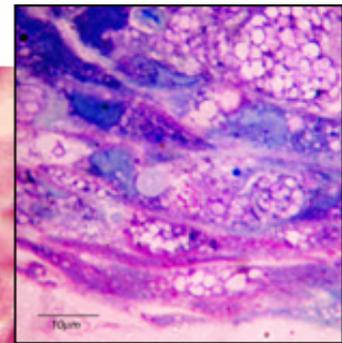
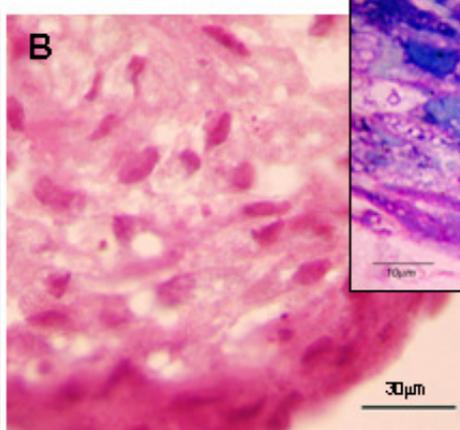
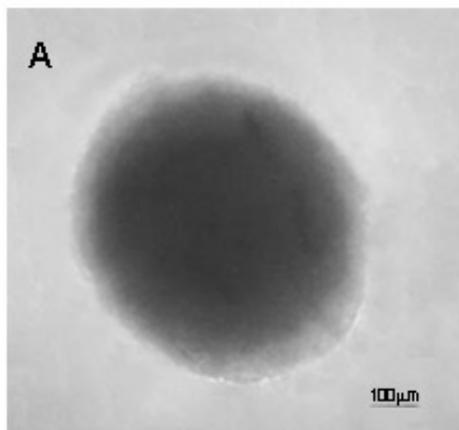
### **4. 2. Expressão de matriz extracelular em modelo 2D e 3D**

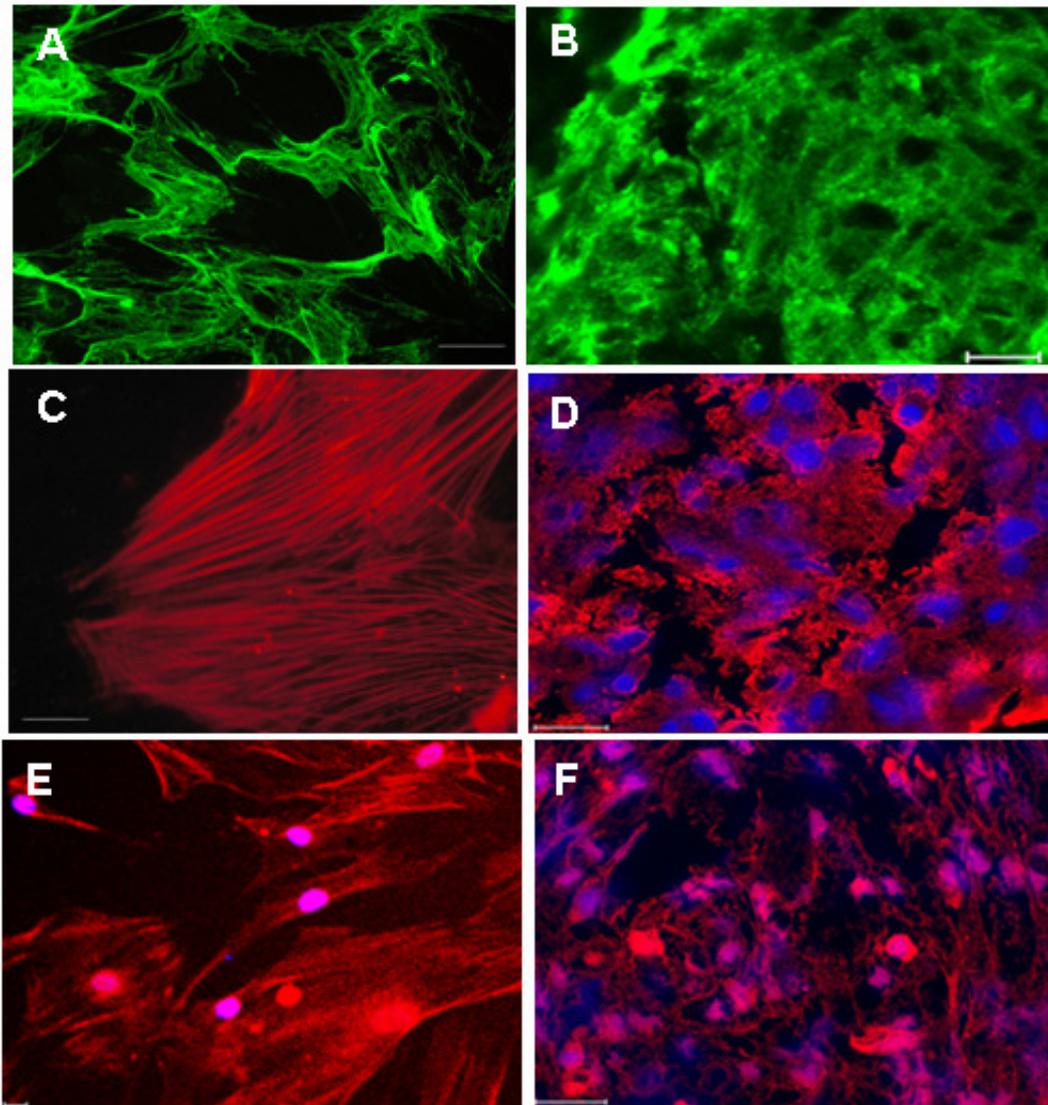
Tanto na monocamada, quanto nos esferóides de MSC de MO observou-se deposição de fibronectina (Fig. 9A-B). No entanto, na monocamada a fibronectina se apresentava na forma de delicados filamentos, enquanto que nos esferóides estes eram mais densos, especialmente na periferia dos esferóides e formavam uma rede tridimensional (Fig. 9B). Na monocamada observou-se a organização de filamentos de  $\alpha$ -actina de músculo liso em fibras de estresse (Fig. 9C). Na cultura em 3D observou-se uma intensa marcação, mas sem formação de fibras de estresse (Fig. 9D). A ausência de

fibras de estresse nos esferóides foi confirmada nas preparações com faloidina (Fig. 9F). Na monocamada, a formação dessas fibras foi mais uma vez demonstrada pela disposição de actina F (Fig. 9E).

---

**Figura 8.** Aspecto morfológico dos esferóides de MSC de MO. (A) Microscopia de contraste de fase. Microscópio invertido. (B) Microscopia óptica mostrando maior densidade celular na periferia e vacuolização citoplasmática na região central. H-E. No detalhe, corte semifino confirmando as múltiplas camadas de células fusiformes na periferia e a vacuolização citoplasmática das células na região central. Azul de metileno. (C) Aspecto do esferóide na MEV. (D) Projeções citoplasmáticas tipo filopódio das células estromais na periferia do esferóide. (E) Filamentos delicados na superfície celular (seta). (F) MET da região periférica do esferóide apresentando célula fusiforme. (G) MET da região central do esferóide, mostrando material granular extracelular, vacuolização citoplasmática e núcleo irregular. (H) Célula na região central com núcleo irregular, retículo endoplasmático bem desenvolvido com material granular no interior deste (seta) e rica em mitocôndrias (cabeças de seta).





**Figura 9.** Expressão de fibronectina e  $\alpha$ -actina de músculo liso em MSC de MO humana cultivadas sob forma de monocamada (A, C e E) e esferóide (B, D e F). (A) Fibronectina em monocamada, barra correspondente a 100 $\mu$ m e (B) em 3D, barra correspondente a 100 $\mu$ m. (C)  $\alpha$ -actina de músculo liso formando fibras de stress em monocamada, barra correspondente a 20 $\mu$ m. (D) células de estroma em 3D mantém expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, porém não formam fibras de estresse. (E-F) mostrando actina-F identificada por faloidina (em vermelho) em 3D (F) e monocamada (E). Núcleo identificado por DAPI, em azul. Barras representam 20  $\mu$ m (D, E-F). Microscopia confocal (B,D,E-F). Microscopia de fluorescência (A,C).

#### **4. 3. As MSC de MO não proliferam em cultura do tipo esferóide.**

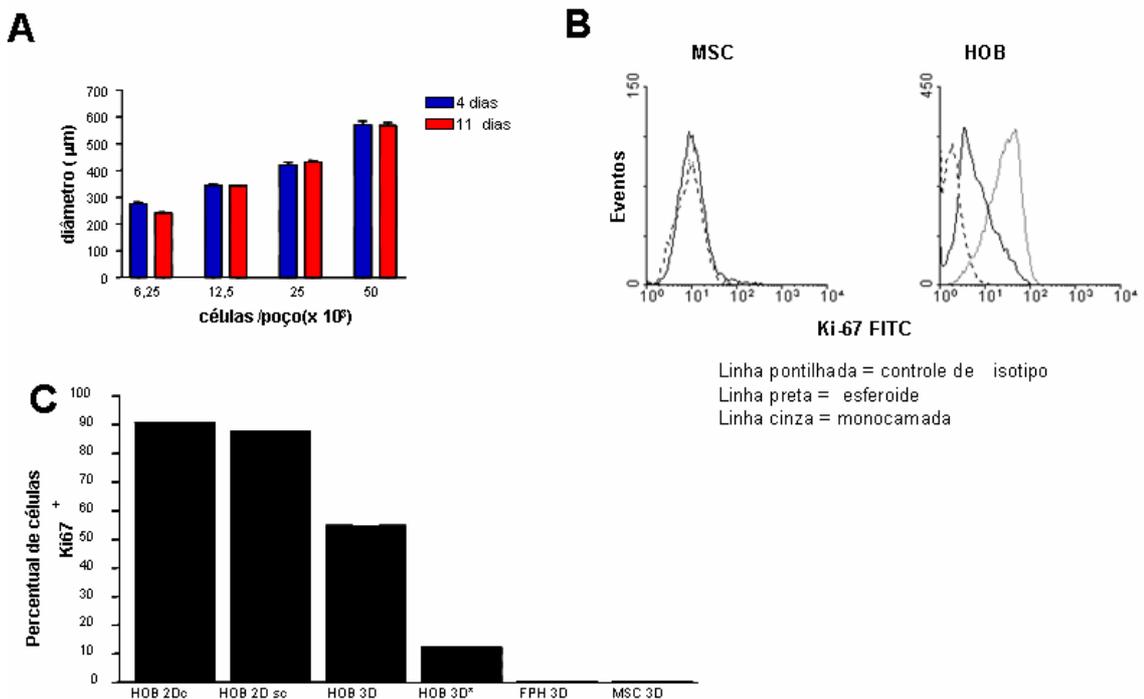
O diâmetro dos esferóides é um fator limitante para manutenção das células neste tipo de cultura, em função da hipoxia que pode se estabelecer no centro dos esferóides (Kunz-Schughart, 1999). Com o objetivo de determinar o diâmetro ideal dos esferóides de MSC de MO, diferentes concentrações celulares foram distribuídas em cada poço. Após quatro ou 11 dias de cultura o diâmetro dos esferóides foi determinado como descrito. Verificou-se que o tamanho dos esferóides de MSC de MO era proporcional ao número de células distribuídas por poço e que mesmo após 11 dias em cultura, independentemente da concentração celular inicial, este não se alterava (Fig. 10A). A análise de regressão linear mostrou que havia correlação entre essas variáveis, tanto em quatro dias ( $r^2 = 0,962$ ), quanto em 11 dias ( $r^2 = 0,991$ ).

Esta correlação entre o número de células que iniciaram o esferóide e seu diâmetro, independentemente do tempo de cultura, sugere que uma vez que se estabelece uma organização tridimensional, ou as células entram em quiescência, ou o desenvolvimento de hipoxia causa morte celular que é compensada por igual taxa de proliferação celular. Para testar estas hipóteses, as células do esferóide foram dissociadas para avaliação da taxa de proliferação e morte celular.

A análise por citometria de fluxo da expressão do antígeno nuclear associado à proliferação celular, Ki-67 (mib-1) mostrou que MSC de MO, após quatro dias de cultura do tipo esferóide, estão quiescentes (Fig. 10B). Menos de 1% das células nos esferóides expressava Ki-67. Fibroblastos de pele humana (FPH) também entraram em quiescência, porém células de linhagem osteoblástica humana (HOB) apresentaram uma alta taxa de proliferação (50%), embora houvesse uma redução desta comparando-se o percentual de células Ki-67<sup>+</sup> na monocamada e nos esferóides, sendo assim a quiescência observada nas MSC 3D não é artefato do modo de cultura (Fig. 10C). A viabilidade celular das MSC de MO nos esferóides, avaliada pelo método de exclusão com azul de tripan, foi maior que 95%, sugerindo que a morte celular

não era um fenômeno predominante mesmo nos esferóides iniciados com a maior concentração celular ( $5 \times 10^4$  células) (dados não apresentados).

Estes resultados sugerem que a organização tridimensional das MSC de MO e de fibroblastos é suficiente para induzir quiescência e que as células se mantêm viáveis neste sistema 3D por pelo menos durante 11 dias de cultura.

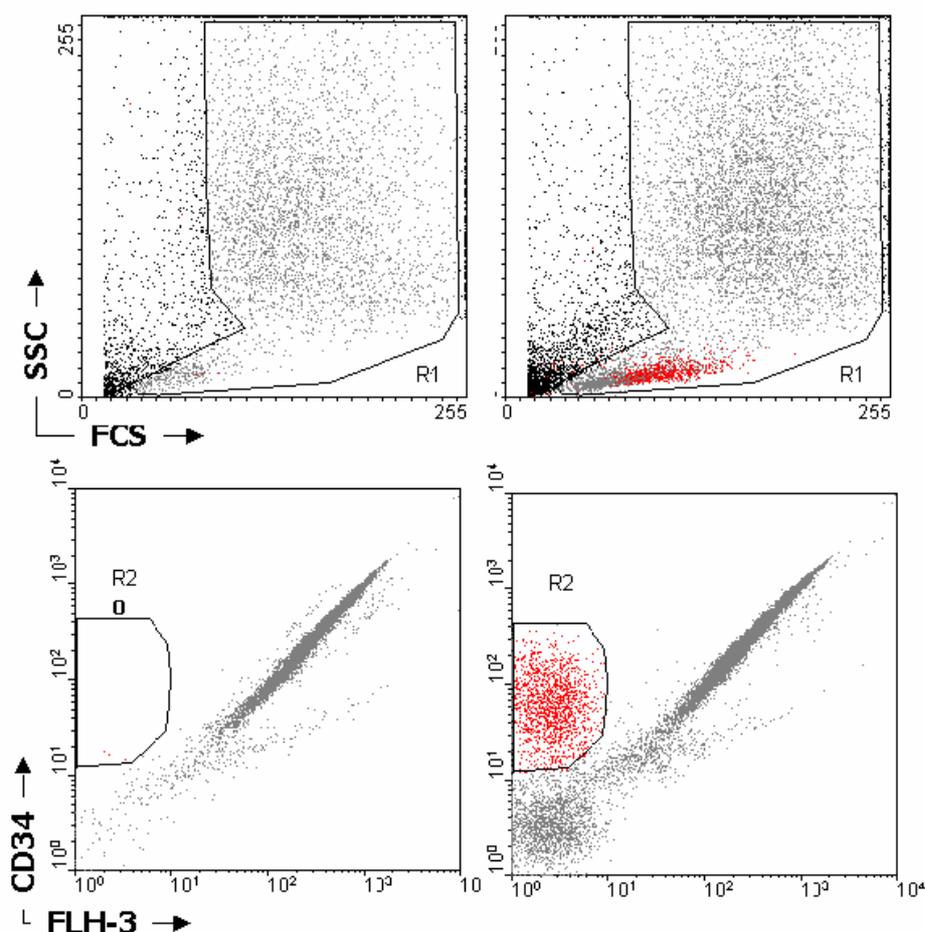


**Figura 10.** Análise da proliferação celular no modelo de esferóide. (A) Correlação entre o diâmetro dos esferóides e o número de células de estroma de MO utilizado no início da cultura. Barra de erro corresponde ao desvio padrão de 6 esferóides / concentração celular / em cada tempo de cultura. (B) Expressão de Ki-67 em MSCs de MO e em osteoblastos (linha pontilhada, isotipo; linha cinza, monocamada). (C) Percentual de células Ki-67<sup>+</sup> em esferóides de fibroblastos, mesenquimal de medula e em osteoblastos nos esferóides (3D) ou em monocamada (2D) (c, monocamada confluyente; sc, monocamada semiconfluyente; \* esferóide cultivado na presença de colchicina).

#### 4. 4. Células CD34<sup>+</sup> de sangue de cordão migram nos esferóides de MSC de MO

A seleção magnética de sangue de cordão umbilical permitiu enriquecer nossa amostra em 65-85% de células CD34<sup>+</sup>. As análises por citometria de fluxo de esferóides de MSC de MO, co-cultivados com suspensão celular enriquecida em células CD34<sup>+</sup>, permitiram identificar e quantificar estas células

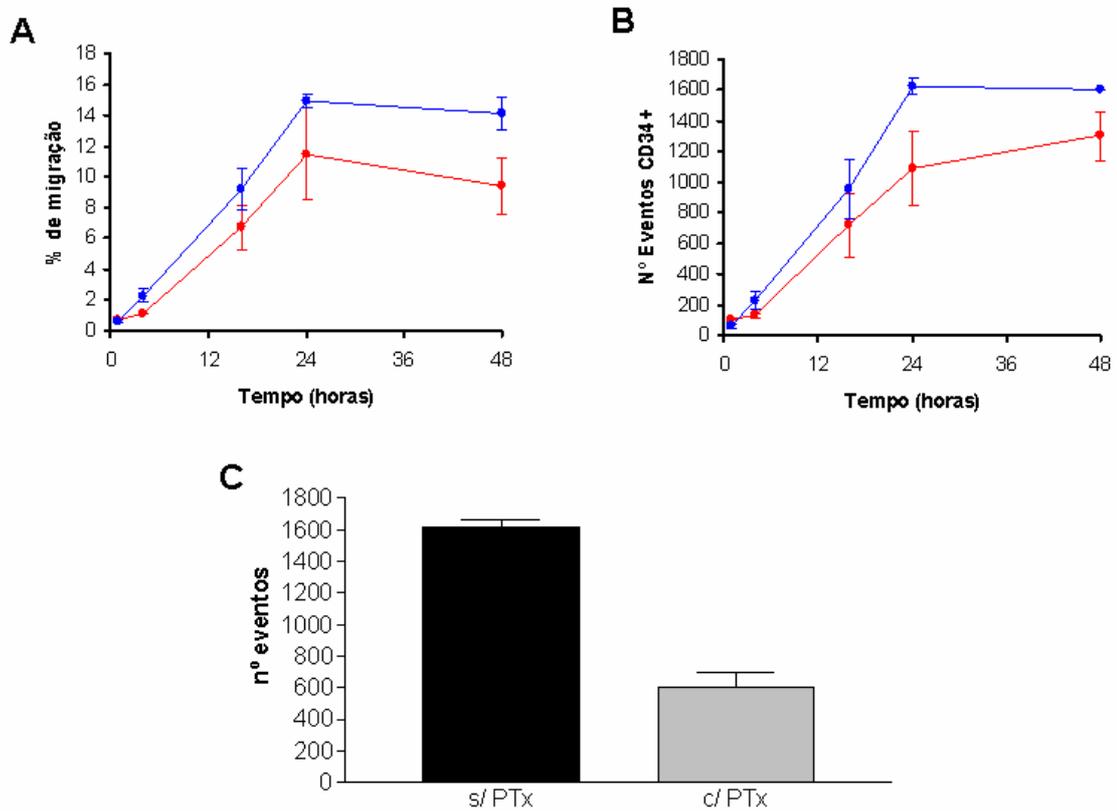
nos esferóides (Fig. 11). Para tanto, as células no sobrenadante e a suspensão celular obtida após dissociação enzimática dos esferóides foram incubadas com anticorpo anti-CD34, uma vez que a população celular inicialmente aplicada, como já falado, era apenas enriquecida em células CD34<sup>+</sup>.



**Figura 11.** Migração das células CD34<sup>+</sup> em esferóides de estroma de MO por citometria de fluxo. As células progenitoras foram identificadas pela expressão de CD34 (R2, em vermelho). Esferóide controle (primeira coluna), co-cultura de esferóides com células de CD34<sup>+</sup> após 24h (segunda coluna).

A análise quantitativa foi realizada tomando como base o número de eventos CD34<sup>+</sup> adquiridos por minuto num volume fixo. O percentual de migração foi calculado, considerando-se o número total de eventos CD34<sup>+</sup> no sobrenadante e nos esferóides dissociados. Observou-se que as células CD34<sup>+</sup> foram capazes de migrar nos esferóides, atingindo um máximo de 15% de migração em 24h (Fig. 12A-B). Resultados preliminares mostraram que a

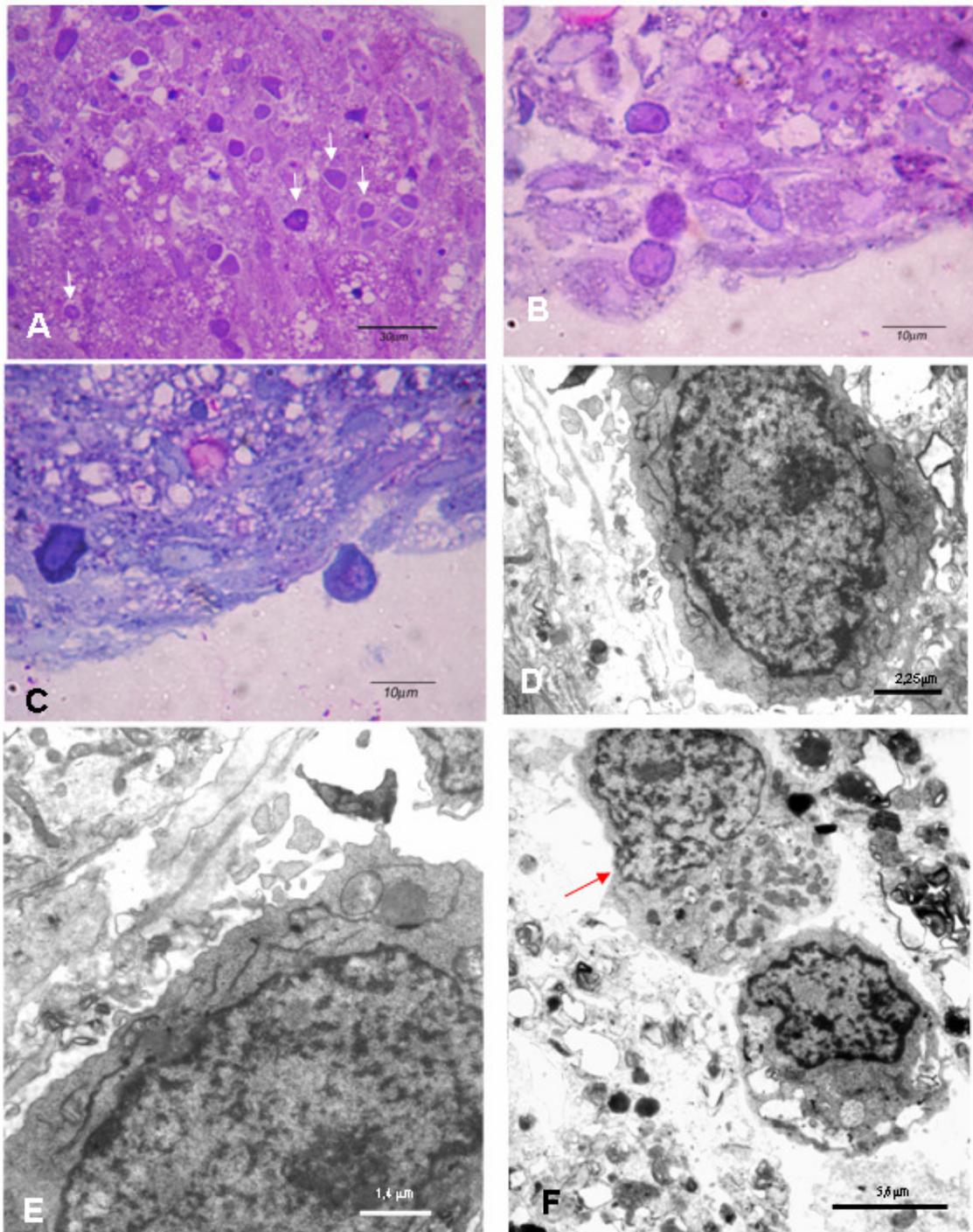
migração era dependente da via de proteína  $G_i$ , uma vez que a adição de toxina Pertussis (PtX) foi capaz de inibir em cerca de 50% a migração (Fig. 12C).



**Figura 12.** Cinética de migração de células  $CD34^+$  de SC em esferóides de MSC de MO. O percentual (%) de migração das células  $CD34^+$  (A) e o número total de eventos  $CD34^+$  (B) nos esferóides, ao longo do tempo de co-cultura, em dois experimentos independentes são mostrados. As barras indicam os valores máximos e mínimos de duplicatas de *pool* de 3 esferóides por ponto. (C) Número de eventos  $CD34^+$  observados no interior de esferóides controles e após incubação com PTx, barras.

Com o intuito de verificar se as células hematopoéticas haviam migrado efetivamente para o interior dos esferóides, foram feitos estudos morfológicos. As análises histológicas e ultraestruturais permitiram observar que as células hematopoéticas encontravam-se de permeio às células de estroma de MO que formam os esferóides (Fig. 13). As células progenitoras foram capazes de migrar por entre as células de estroma, penetrando na estrutura dos esferóides. Após 48h, células hematopoéticas foram observadas tanto no centro dos esferóides (Fig. 13A), quanto na periferia destes (Fig. 13B). Curiosamente,

célula hematopoética polarizada, com protrusões membranares junto às junções intercelulares de células de estroma da superfície dos esferóides foi observada (Fig 13C). À MET verificou-se que inúmeras células hematopoéticas apresentavam as características ultraestruturais de células CD34+ (Servida et al., 1996), ou seja, núcleo arredondado com cromatina frouxa, citoplasma escasso e pobre em organelas e apresentando alguns vacúolos (Fig. 13D-F). Estas estabeleceram interações com as células estromais, originando áreas em que as membranas plasmáticas de ambas as células encontravam-se próximas (Fig. 13D e E). Após 7 dias de co-cultura, ainda pôde-se observar células com morfologia de células CD34+ e outras semelhantes a progenitores mielóides, com núcleo irregular e cromatina frouxa e citoplasma mais amplo, contendo inúmeras mitocôndrias (Fig. 13F).



**Figura 13.** Análise histológica e ultraestrutural de co-culturas de esferóides de MSC de MO com células CD34<sup>+</sup> de SC. (A-C) Cortes semifinos de esferóide após 48h de co-cultura com células CD34<sup>+</sup>, mostrando inúmeras células hematopoéticas de permeio às células de estroma (setas). Azul de metileno. MET de esferóides após 48h de co-cultura com células CD34<sup>+</sup> (D). Detalhe da interação célula-célula (E) e após 7 dias de co-cultura, mostrando célula com morfologia mielóide –(seta) (F).

#### **4. 5. Desenvolvimento de esferóides complexos (Misto) com MSC de MO induzidas para a linhagem osteogênica.**

Como descrito, as células CD34<sup>+</sup> migraram nos esferóides de MSC se dispersando em toda a estrutura. Porém, na medula óssea o estroma é mais complexo, formando gradientes celulares e químicos que regem esta migração para sítios específicos (nichos), mais especificamente para a região subendosteal, nicho este responsável pela manutenção do *pool* de células-tronco hematopoéticas, pois induz estas a um estado de quiescência ou auto-renovação (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Por este motivo, tentamos aumentar a complexidade do modelo e mimetizar o nicho subendosteal através do co-cultivo de MSC de MO induzidas para a linhagem osteogênica por uma semana (pré-osteoblastos) com MSC não induzidas, de tal forma que o centro do esferóide seria formado por pré-osteoblastos e a periferia por células não induzidas. Esta organização seria similar a do nicho subendosteal da MO (Muguruma et al., 2006).

Após 4 dias em cultura, os pré-osteoblastos agregaram-se entre si, formando estruturas esferóides (Fig. 14A-B) sobre as quais foi aplicada suspensão de MSC não induzidas (cultivo sucessivo). Após 24h, estas células recobriram a superfície do esferóide (Fig. 14C-D, G) e, mesmo após tempos mais longos de cultivo, as duas populações celulares se mantiveram segregadas (dados não mostrados). No entanto, quando ambas as suspensões celulares foram distribuídas simultaneamente nas placas de cultura (cultivo simultâneo) não houve segregação entre as duas populações (Fig. 14E-F). A análise por microscopia confocal de cortes parafinados corados pela técnica de H-E permitiu observar a rede de prolongamentos celulares que se organiza no interior dos esferóides (Fig.14H).

Osteoblastos sintetizam colágeno I que, na MO, é encontrado nas trabéculas ósseas e osso cortical (Nilsson et al.,1998). A coloração de Picrossírius foi realizada com o objetivo de verificar se as MSC de MO induzidas por uma semana para a linhagem osteogênica eram capazes de sintetizar e depositar colágeno I nos esferóides induzidos. Verificou-se, tanto no

microscópio óptico convencional (Fig. 15A-B), quanto no confocal (Fig. 15C), a presença de feixes de colágeno somente na região das células induzidas para a linhagem osteogênica. A deposição de colágeno I foi confirmada por imunofluorescência (Fig. 15D-G). As colorações de Von Kossa, para identificação de focos de mineralização, foram negativas, sugerindo que o tempo de indução para a linhagem osteogênica foi insuficiente para diferenciação terminal e mineralização da matriz extracelular, condizente desta forma com o fenótipo de pré-osteoblasto (dados não mostrado).

---

**Figura 14.** Aspecto dos esferóides induzidos e mistos. Microscopia de contraste de fase em microscópio invertido de esferóides induzidos 4 dias (A) e misto de cultivo sucessivo (C). Microscopia óptica mostrando a organização dos esferóides induzidos após 4 dias de cultura (B), esferóide misto de cultivo sucessivo (D) e misto de cultivo simultâneo (E). Seta em D indica limite entre esferóide central induzido e células não induzidas da cobertura. H-E. Microscopia confocal mostrando a localização relativa dos tipos celulares (população induzida marcada previamente com CM-Dil, em vermelho) nos esferóides mistos de cultivo simultâneo (F) e sucessivo (G). Projeções celulares no esferóide misto de cultivo sucessivo, coloração por HE (H). Núcleo identificado por DAPI, em azul.

---

**Figura 15.** Caracterização de matriz extracelular nos esferóides mistos. Coloração de picrossírius mostrando fibras colágenas em vermelho (A e B) microscopia óptica e (C) confocal. Imunofluorescência para colágeno I (D-G). Imagem por contraste de fase (D) colágeno I em verde (E), área do esferóide formado por MSC induzidas para a linhagem osteogênica previamente marcadas com CM-Dil, em vermelho (F) e superposição de E e F (G).

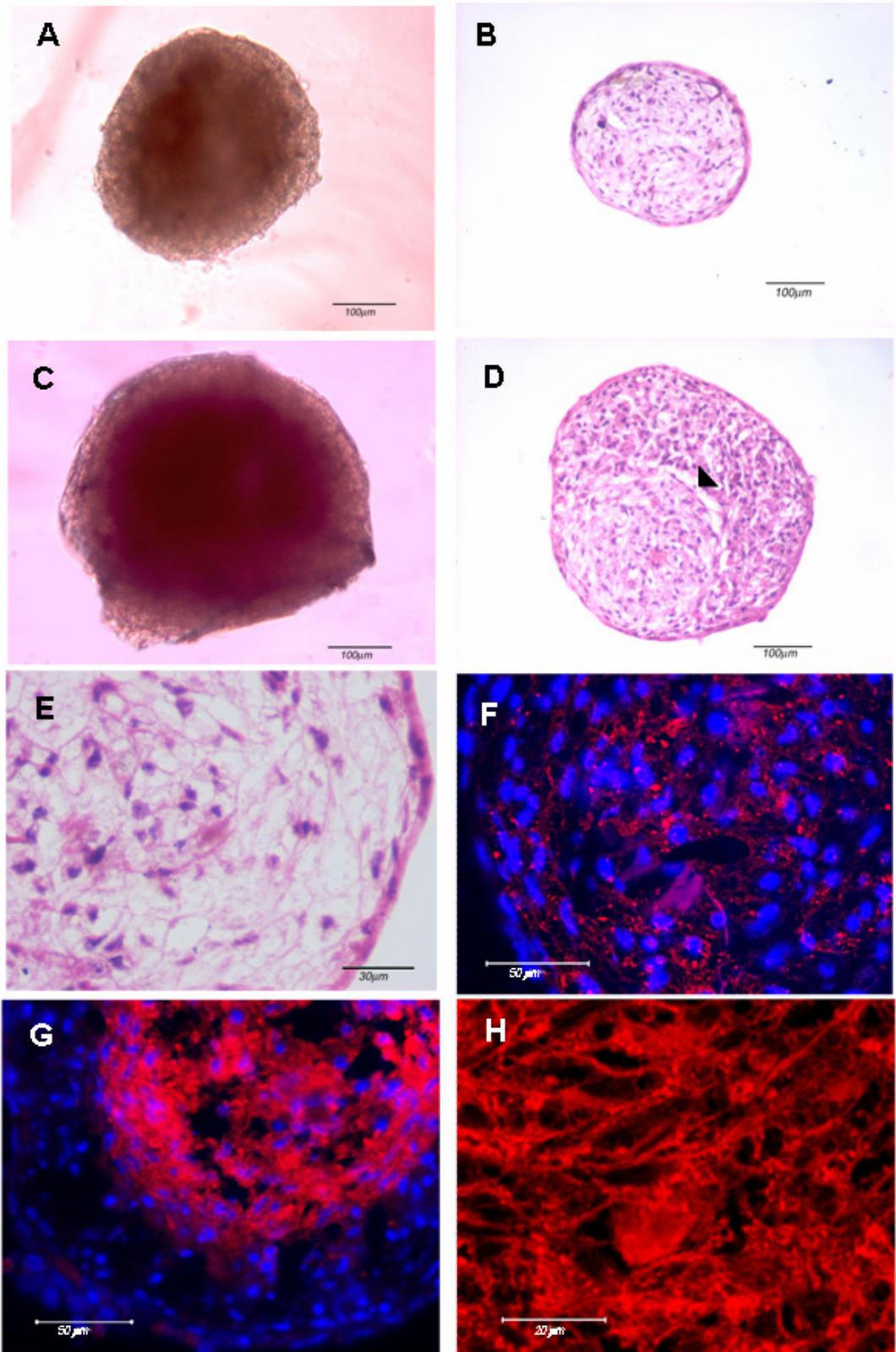


Fig. 14

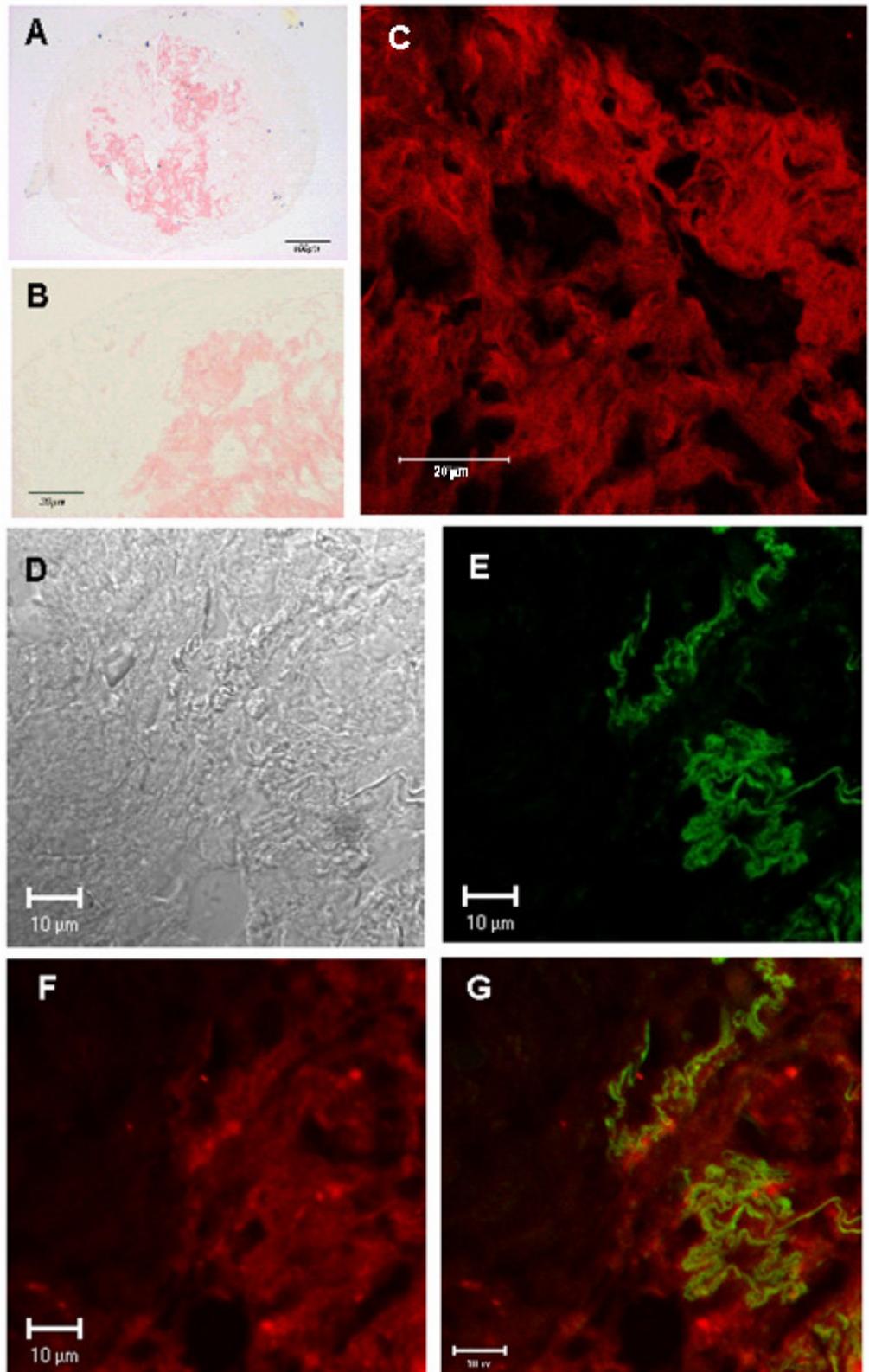
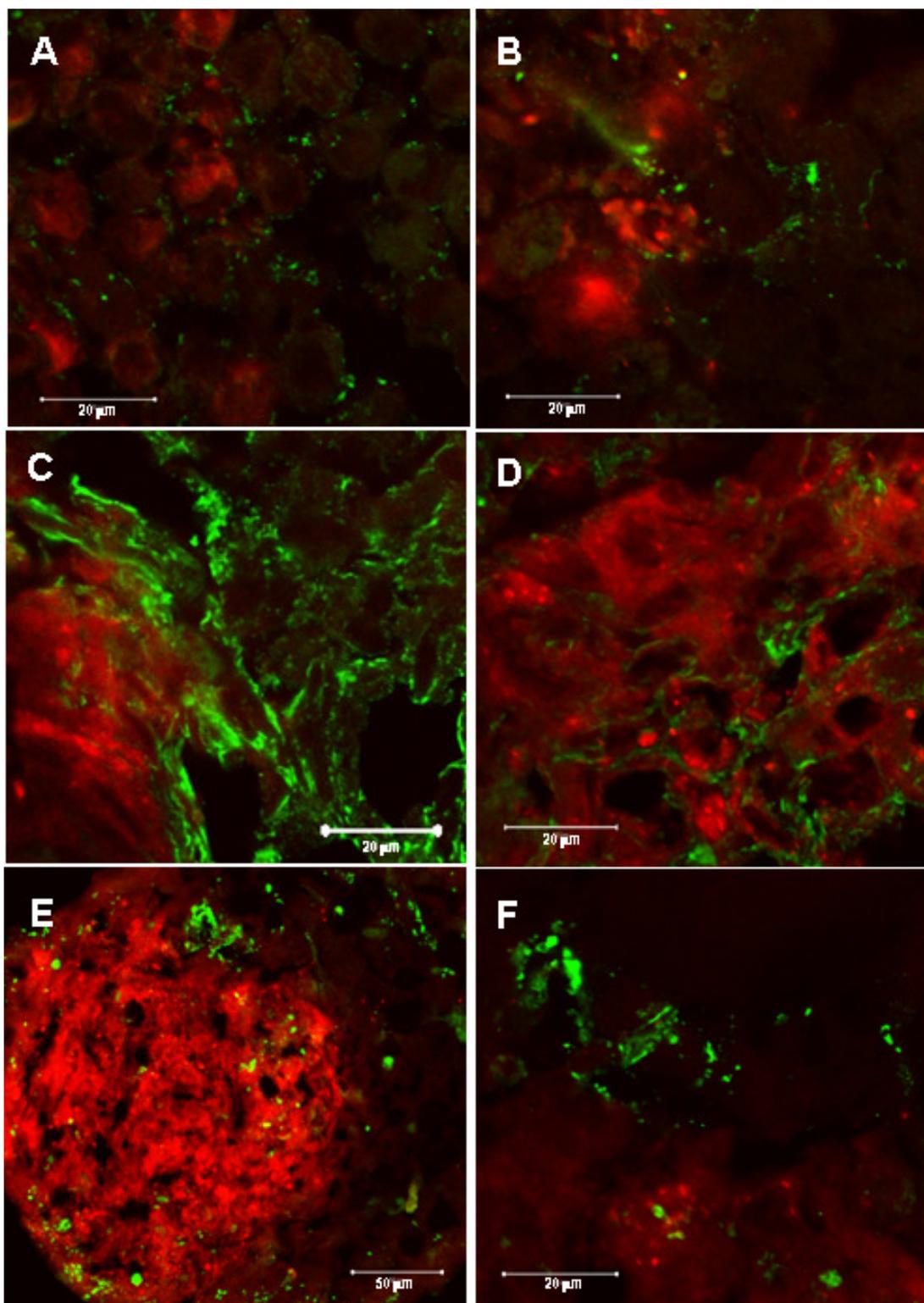


Fig. 15

A expressão, nos esferóides mistos, de outros componentes da matriz extracelular, presentes no microambiente medular, como fibronectina, laminina e colágeno IV, foi também investigada por imunofluorescência. Para determinar a localização destas moléculas, as MSC induzidas para a linhagem osoteogênica foram previamente marcadas com CM-Dil. Observou-se que laminina (Fig. 16A), colágeno IV (Fig. 16B) e fibronectina (Fig. 16C-D) eram expressas, distribuindo-se tanto na região das células induzidas, quanto na de não induzidas, assim como a glicoproteína osteopontina (Fig. 16 E-F).

Uma vez que somente o protocolo de cultivo sucessivo, ou seja, formação inicial de esferóide de pré-osteoblastos, seguido de distribuição de células não induzidas, permitiu a formação de regiões histologicamente definidas, este foi selecionado para estudo da migração de células CD34<sup>+</sup>.

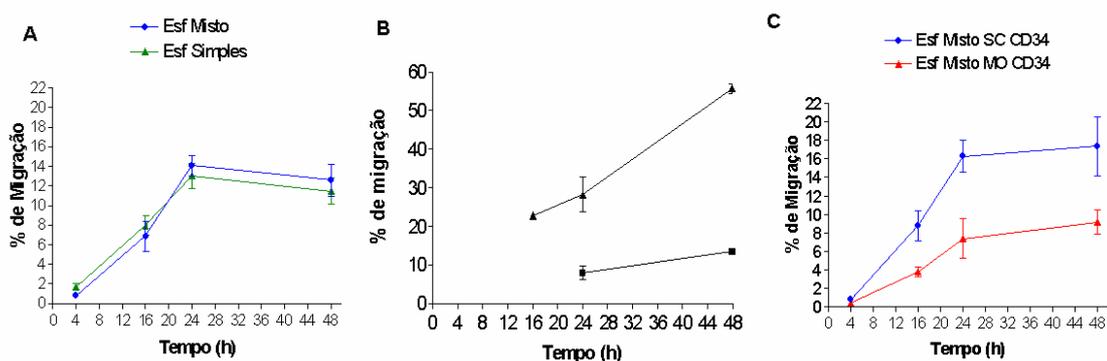


**Figura 16.** Expressão de moléculas de matriz extracelular nos esferóides mistos de cultivo sucessivo. Laminina, em verde (A), colágeno IV, em verde (B), fibronectina em verde, na região de MSC não induzidas (C) e no centro formado por MSC induzidas para a linhagem osteogênica (D). Osteopontina em verde, no centro formado por MSC induzidas para a linhagem osteogênica (E) e na região de MSC não induzidas (F). Microscopia confocal. MSC induzidas para a linhagem osteogênica marcadas com CM-Dil, em vermelho.

#### **4. 6. Células CD34+ de SC ou MO são capazes de migrar em esferóides mistos de cultivo sucessivo**

A cinética de migração das células CD34<sup>+</sup> de SC nos esferóides mistos de cultivo simultâneo foi testada, como descrito anteriormente, e comparada com a cinética de migração nos esferóides simples de MSC não induzidas (Fig. 17A). Verificou-se ainda a capacidade destas células migrarem nos esferóides simples de MSC induzidas (Fig. 17B). Observou-se que as células CD34<sup>+</sup> de SC migraram de forma semelhante tanto nos esferóides mistos quanto nos simples de células não induzidas, atingindo um platô em torno de 15% em 24h (Fig. 17A). Curiosamente, observou-se que as células hematopoéticas não só eram capazes de migrar nos esferóides simples de pré-osteoblastos, mas o faziam com grande eficiência, sem atingir um platô (Fig. 17B). Ao contrário do observado nos modelos anteriores de esferóides, as células continuaram a migrar mesmo após 24h de co-cultivo e, em 48 h, o percentual de migração chegou em um dos experimentos a 50%. A análise de esferóides onde as células não aderentes haviam sido retiradas após 24h de co-cultura mostrou que este aumento no percentual de células CD34<sup>+</sup> no interior dos esferóides induzidos não se deveu a proliferação destas (dado não mostrado), sendo, portanto, dependente de migração contínua.

A capacidade de migração *in vivo* de células CD34<sup>+</sup> derivadas de diferentes fontes difere, sendo que as células de SC parecem migrar mais eficientemente para a MO do que as de MO (Bonig et al., 2006). Com o objetivo de verificar se estas diferenças, observadas *in vivo*, seriam reproduzidas num modelo *in vitro* 3D, células CD34<sup>+</sup> foram isoladas de SC e MO e co-cultivadas com esferóides mistos para avaliar a cinética de migração. Ao contrário do SC, a seleção magnética de células CD34<sup>+</sup> de MO chegou a 90% de pureza. As análises por citometria de fluxo mostraram que, como descrito na literatura, as células progenitoras de SC parecem migrar com maior eficiência em relação às de MO (Fig. 17C). Enquanto a população de SC atingiu, em média, 16,28% ( $\pm$  4,14) de migração em 24h em três experimentos independentes, a população de MO atingiu somente 7,4 % ( $\pm$  4,34).



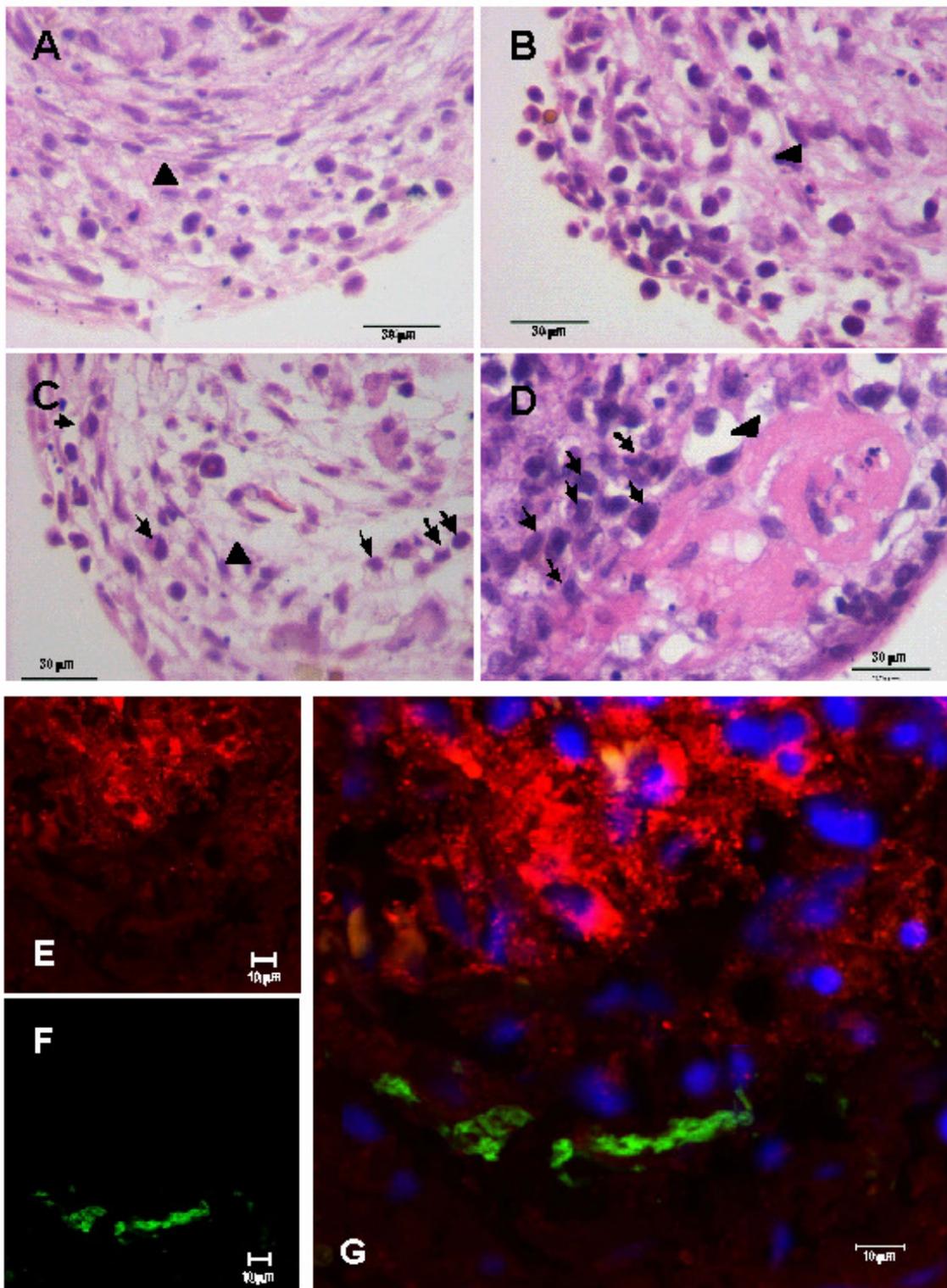
**Figura 17.** Cinética de migração de células CD34<sup>+</sup> em modelo 3D de cultura. (A) Percentual de migração de células CD34<sup>+</sup> de SC em esferóides simples de MSC não induzidas (em verde) e mistos (em azul) ao longo do tempo. É apresentada a média de três experimentos isolados em duplicata. As barras indicam o erro padrão. (B) Percentual de migração de células CD34<sup>+</sup> de SC em esferóides simples de MSC induzidas para a linhagem osteogênica. Dois experimentos independentes, com duplicatas, são apresentados. As barras indicam as variações em cada ponto. (C) Percentual de migração de células CD34<sup>+</sup> de SC (em azul) e de MO (em vermelho) em esferóides mistos ao longo do tempo de co-cultura. Os valores representam a média de três experimentos independentes com duplicatas. As barras indicam o erro padrão.

Estes resultados sugerem que este modelo 3D permite identificar diferenças na capacidade de migração em estroma medular de progenitores hematopoéticos. Além disto, mesmo na presença de pré-osteoblastos, que induzem migração eficiente das células CD34<sup>+</sup> de SC, a cinética de migração dos progenitores hematopoéticos parece ser determinada pelas MSC não induzidas.

As análises histológicas dos esferóides mistos co-cultivados com células CD34<sup>+</sup> de SC permitiram observar que neste modelo de cultura as células hematopoéticas encontram-se distribuídas na camada de MSC não induzida (Fig 18). As células progenitoras, em 24h, já foram capazes de migrar por entre as MSC não induzidas mas, até 48h, encontravam-se predominantemente na periferia dos esferóides (Fig. 18A-B). No entanto, após 72h de co-cultura, algumas células hematopoéticas foram observadas no limite entre o esferóide central formado por pré-osteoblastos e as MSC não induzidas que o recobriam, mas nunca no centro deste (Fig. 18C-D). Esta localização próxima à região formada por MSC induzidas para a linhagem osteogênica foi confirmada por microscopia confocal. Para tanto, as MSC diferenciadas para pré-osteoblastos

foram previamente marcadas com CM-Dil, enquanto as células CD34<sup>+</sup> de SC, selecionadas magneticamente, foram previamente marcadas com CFSE e co-cultivadas com os esferóides mistos por 72h. Após este período, os esferóides foram fixados e cortados em criostato, como descrito. Verificou-se que a maioria das células CFSE<sup>+</sup> localizava-se nas proximidades das MSC CM-Dil<sup>+</sup> (Fig. 18E-G), mas jamais de permeio a estas, confirmando a localização preferencial das células hematopoéticas.

Esta localização não se deve a um simples bloqueio físico em função do depósito de colágeno tipo I, por exemplo, que formam densas fibras no centro do esferóide de células induzidas, uma vez que as células CD34<sup>+</sup> de SC foram capazes de migrar de forma eficiente nos esferóides formados exclusivamente por MSC induzidas (Fig. 17B). Assim, estes resultados sugerem que se estabelece um gradiente específico formado pela interação das duas populações estromais que mimetiza o nicho subendosteal da MO.



**Figura 18.** Análise morfológica de co-culturas de esferóides mistos com células CD34<sup>+</sup> de SC. Notar que, após 24h (A) ou 48h (B) as células hematopoiéticas encontram-se na periferia dos esferóides, enquanto que em 72h (C-D), algumas células são observadas nas proximidades do centro de formado por MSC induzidas (setas). HE, Aumento original: 400X. As cabeças de seta indicam a região de transição entre MSC não induzidas e induzidas. (E-G) Microscopia confocal de esferóides mistos co-cultivados por 72h com células CD34<sup>+</sup> de SC. (E) MSC induzidas marcadas com CM-Dil (vermelho). (F) Células CD34<sup>+</sup> de SC marcadas com CFSE (verde). (G) Superposição de E e F evidenciado núcleo marcado com DAPI (azul).

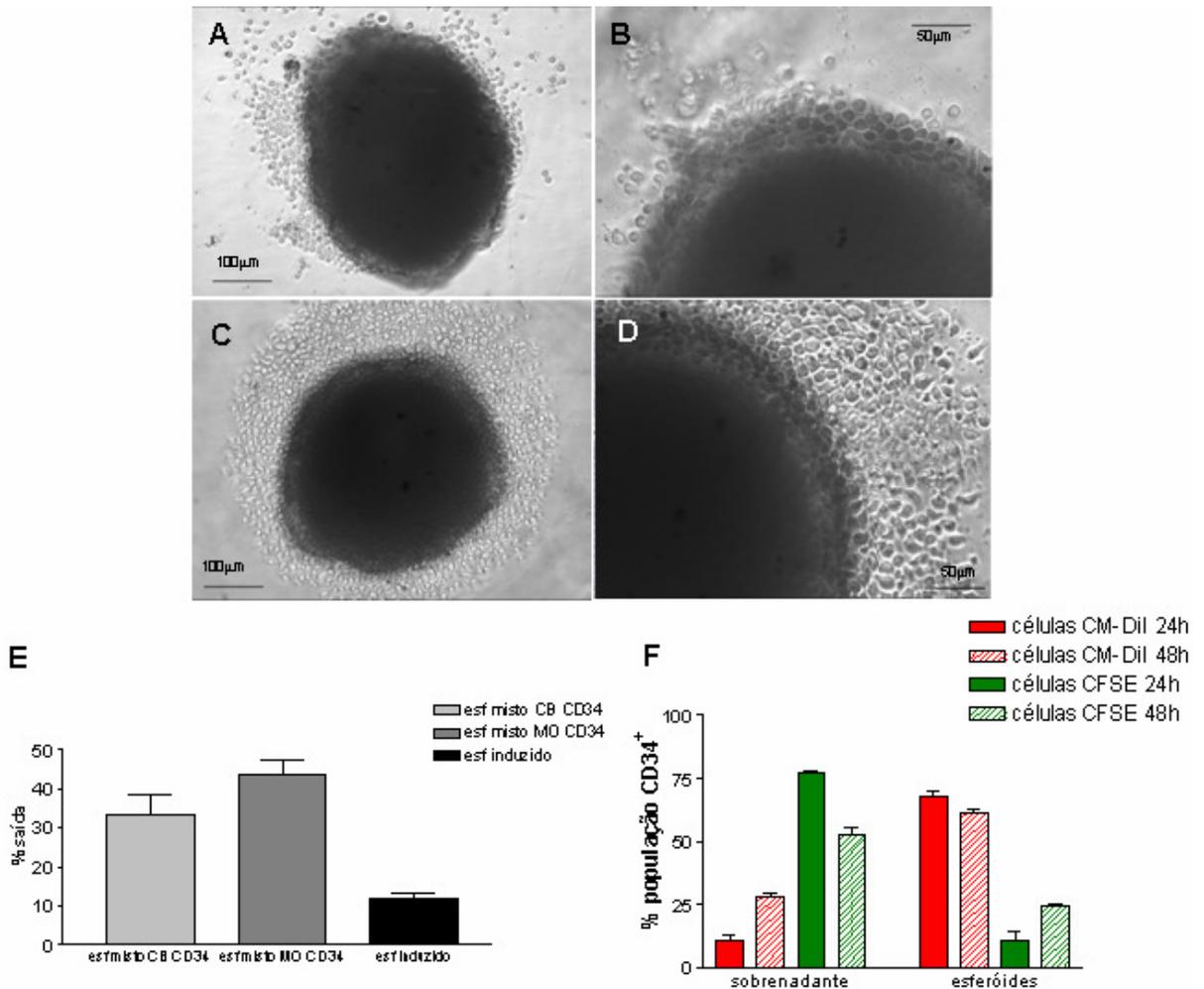
#### **4. 7. Recirculação das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides mistos.**

A cinética de migração das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides mistos e nos simples formados por MSC não induzidas ou induzidas para a linhagem osteogênica mostrou, como já descrito, que enquanto nos esferóides onde MSC não induzidas estavam presentes se estabelecia um platô em 24h, nos esferóides formados exclusivamente por células induzidas isto não era observado (Fig. 12 e 17). Curiosamente, nos poços onde as células hematopoéticas que não haviam migrado após 24h de co-cultura foram retiradas para controle da proliferação, observou-se, 24h e 48h após, a presença de células hematopoéticas no sobrenadante, principalmente dos esferóides mistos (Fig. 19A-D) ou de MSC não induzidas (dado não mostrado). Após, 48h o número de células nas proximidades, mas externamente, dos esferóides era ainda maior (Fig.19C-D), mostrando assim que a saída de células é um processo contínuo. . O percentual de saída em relação ao total de células CD34<sup>+</sup> presentes nos esferóides, quantificadas por citometria de fluxo, foi calculado no ponto de 48h, comparando-se a saída de células CD34<sup>+</sup> de SC ou MO em esferóides mistos ou simples de MSC induzidas. Tanto as células CD34<sup>+</sup> de SC, quanto as de MO migraram para o sobrenadante dos esferóides mistos, porém o percentual de saída dos esferóides simples induzidos foi menor (Fig.19E). Estes resultados sugerem que o platô de migração, observado nos esferóides mistos, poderia se dever a uma recirculação das células CD34<sup>+</sup>. Ou seja, se estabeleceria um equilíbrio dinâmico, com entrada e saída contínua de células hematopoéticas na mesma proporção.

Para verificar esta hipótese, células CD34<sup>+</sup> marcadas com CM-Dil foram distribuídas sobre esferóides mistos e, após 24h, as células do sobrenadante foram retiradas. Em seguida, células CD34<sup>+</sup> marcadas com CFSE foram distribuídas sobre os esferóides. O sobrenadante e os esferóides dissociados foram analisados após 24h e 48h por citometria de fluxo e o percentual das populações marcadas com os diferentes corantes fluorescentes nos esferóides e no sobrenadante foi determinado. Como previsto, verificou-se que 24h após a lavagem dos esferóides células marcadas com CM-Dil estavam presentes em pequenas quantidades no sobrenadante, havendo um aumento neste

percentual após 48h. Paralelamente, observou-se que o percentual de células CFSE<sup>+</sup> diminui progressivamente no sobrenadante. No interior dos esferóides verificou-se exatamente o contrário. Após 24h, já foi possível observar um pequeno percentual de células CFSE<sup>+</sup> e este valor aumentou após 48h, ao mesmo tempo que houve redução do percentual de células marcadas com CM-Dil (Fig. 19F).

Estes resultados preliminares confirmaram a hipótese de que nos esferóides mistos estabelece-se uma dinâmica de migração das células hematopoéticas, com entrada e saída simultânea de células por até 72h de cultura, o que leva a formação do platô.

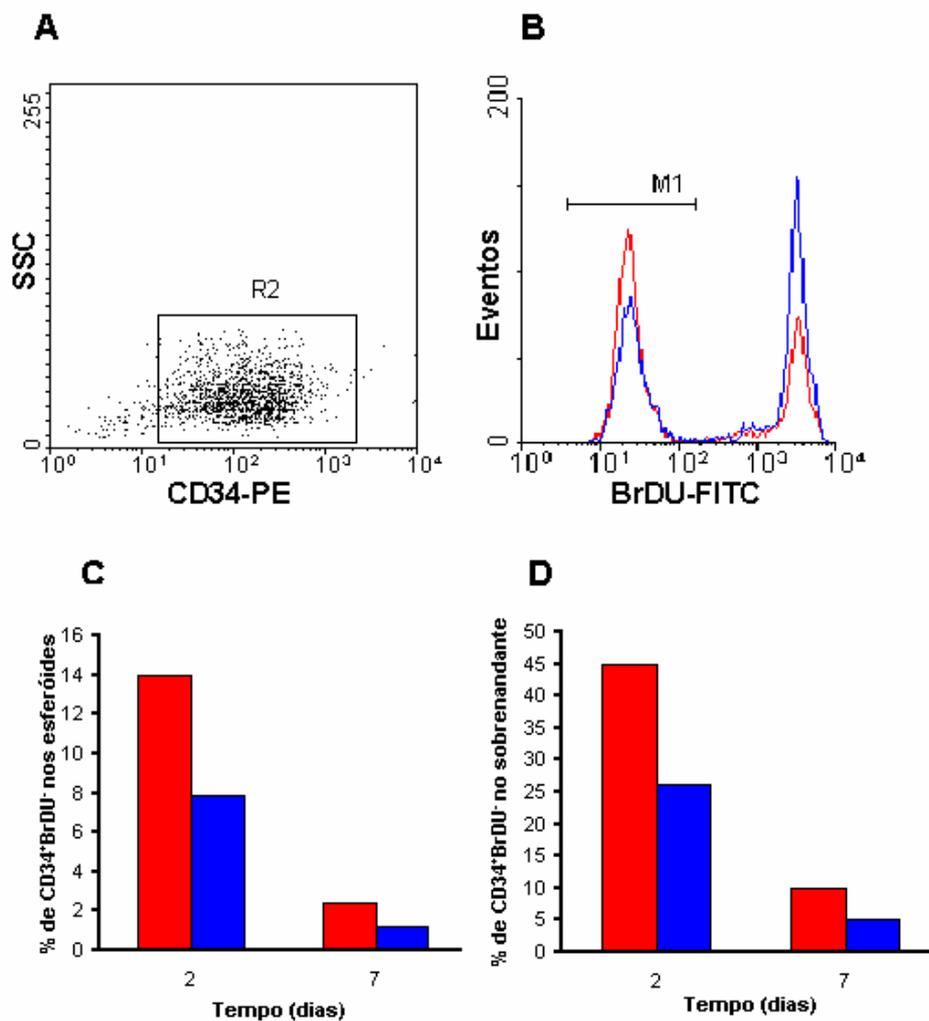


**Figura 19. Dinâmica de migração das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides.** Esferóides mistos foram cultivados com células CD34<sup>+</sup> por 24h, lavados e mantidos em cultura por 24h (A-B) e 48h (C-D). Microscopia de contraste de fase em microscópio invertido. Figura representativa de três experimentos independentes. (E) O percentual de migração de células hematopoéticas de SC ou MO para o sobrenadante dos esferóides mistos ou simples pré-osteoblasticos, 24h após retirada deste foi determinado por citometria de fluxo. As colunas representam a média de duplicatas de um experimento e as barras indicam a o valor máximo. (F) Percentual de migração de células CD34<sup>+</sup> de SC marcadas com CM-Dil ou CFSE. Esferóides mistos foram cultivados por 24h com células CD34<sup>+</sup> marcadas com CM-Dil, lavados e em seguida incubados com células CD34<sup>+</sup> marcadas com CFSE por até 48h. O percentual de células CD34<sup>+</sup> marcada com CM-Dil ou CFSE no sobrenadante ou no interior dos esferóides foi determinado por citometria de fluxo após 24h e 48h. Média de duplicatas de um experimento é mostrada. As barras indicam o valor máximo em cada ponto.

#### **4. 7. Análise da proliferação de células CD34<sup>+</sup> de SC em esferóides simples ou mistos.**

Foi observado que os esferóides mistos mantêm uma organização celular própria e que os progenitores hematopoéticos que migram neste modelo localizam-se preferencialmente na vizinhança das MSC induzidas, embora sejam capazes de migrar para o interior de esferóides formados somente por células induzidas. Estes resultados sugerem que haja a formação, nos esferóides mistos, de microambientes específicos capazes de controlar a localização dos progenitores hematopoéticos de forma semelhante ao nicho subendosteal da MO. Uma vez que esta região parece controlar não só a localização, mas também a quiescência das CTH *in vivo*, a proliferação das células CD34<sup>+</sup> de SC foi investigada no modelo de co-cultura com esferóides mistos e simples. Para tanto, esferóides mistos e simples foram co-cultivados por até 7 dias com progenitores CD34<sup>+</sup> de SC, na presença de BrdU, que foi adicionado ao meio de cultura. Posteriormente, os esferóides foram dissociados e o percentual de células CD34<sup>+</sup>BrdU<sup>-</sup> foi verificado por citometria de fluxo. Resultado preliminar mostrou que os esferóides mistos mantiveram, em média, o dobro das células CD34<sup>+</sup> em estado quiescente em relação aos esferóides simples, 14% e 7,9% em 48h, respectivamente. Após 7 dias esta proporção se manteve, porém com valores inferiores, 2,4% e 1,2% (Fig.20). Curiosamente, a mesma diferença foi observada nas células CD34<sup>+</sup> do sobrenadante das co-culturas, ou seja, 45% ou 26% de células CD34<sup>+</sup>BrdU<sup>-</sup> estavam presentes no sobrenadante de esferóides mistos ou simples, respectivamente, após 48h de co-cultura. Da mesma forma que nos esferóides, após 7 dias estes valores caíram para 10 e 5%, (Fig.20).

Em conjunto, os resultados sugerem que os esferóides mistos mimetizam o nicho subendosteal de CTH, determinando sua localização preferencial na vizinhança de pré-osteoblastos e induzindo quiescência.



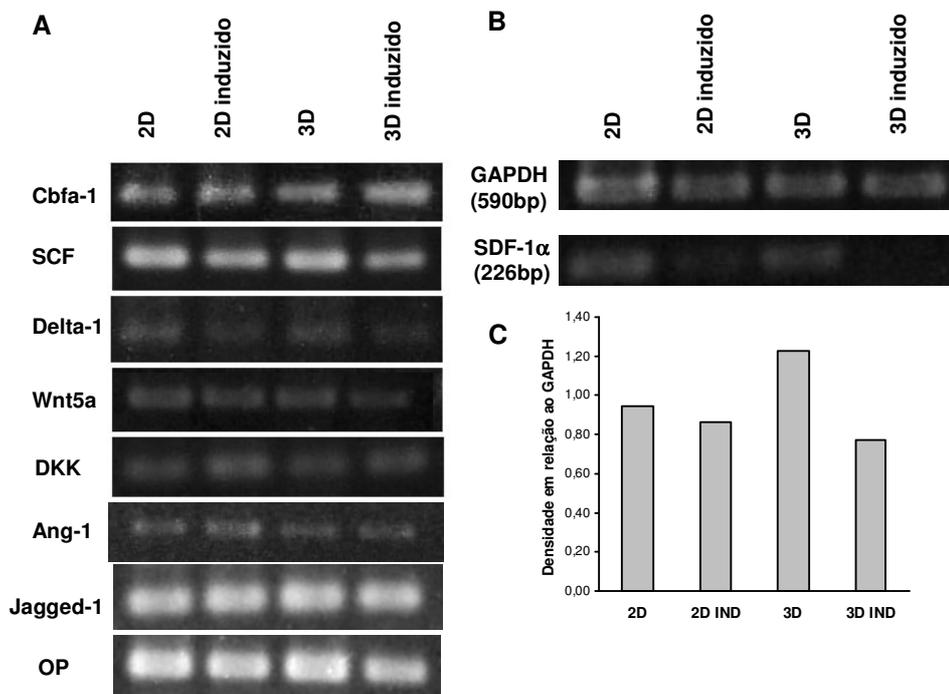
**Figura 20.** Análise comparativa da proliferação de células CD34<sup>+</sup> de SC em co-cultura com esferóides mistos ou simples após 2 ou 7 dias. (A) Expressão de CD34 nas células hematopoéticas do sobrenadante após 2 dias de co-cultura. (B) Histograma mostrando a incorporação de BrDU em células CD34<sup>+</sup> (R2) co-cultivadas por 2 dias com esferóides mistos (linha vermelha) ou simples de células mesenquimais não induzidas (linha azul). O pico de célula negativas para BrDU está assinalado (M1) assim como os percentuais de células CD34<sup>+</sup>BrDU no sobrenadante de esferóides mistos (vermelho) ou simples (azul). A linha preta pontilhada corresponde ao controle isotipo. Percentual de células CD34<sup>+</sup>BrDU no interior (C) ou no sobrenadante (D) de esferóides mistos (barras vermelhas) ou simples (barras azuis) após 2 ou 7 dias.

#### 4. 8. Análise comparativa da expressão de mRNA para fatores descritos no nicho subendosteal por RT-PCR em sistema tridimensional e bidimensional.

Uma vez que os esferóides mistos foram capazes de induzir localização específica e quiescência nas células CD34<sup>+</sup> de SC, a expressão de fatores envolvidos na organização do nicho subendosteal foi investigada por RT-PCR

em MSC induzidas ou não para a linhagem osteogênica e mantidas em cultura convencional (2D) ou de esferóide (3D).

Os ensaios de RT-PCR com ambas as populações celulares em cultura tridimensional ou bidimensional indicam que há uma expressão diferencial de SDF-1 $\alpha$  entre as duas populações que é dependente do modelo de cultura. Ambas as populações, independentemente do modelo de cultura, expressaram mRNA para cbfa-1, SCF, Delta-1, Wnt5a, DKK, Ang-1, Jagged-1 e osteopontina (OP) (Fig. 21). No entanto, análises por densitometria mostraram uma expressão de SDF-1 $\alpha$  40% maior nas MSC não induzidas mantidas em sistema 3D.



**Figura 21.** Análise por RT-PCR da expressão de genes em MSC de MO induzidas ou não para a linhagem osteogênica e mantidas em monocamada ou em 3D. (A) Gel de agarose para Cbfa-1, SCF, Delta-1, Wnt5a, DKK, Ang-1, Jagged-1 e OP. (B) Gel de agarose de RT-PCR semi-quantitativa para SDF1 $\alpha$ . (C) Análise quantitativa por densitometria do gel de agarose para SDF1 $\alpha$ .

## **5. Discussão**

No adulto, as HSC circulam em condições fisiológicas, migrando da MO para o sangue periférico e retornando para sítios específicos ou nichos, na região subendosteal (Nilsson et al., 2001; Wright et al., 2001). A literatura recente tem investigado os mecanismos de migração das HSC e a importância destes nichos específicos, que são responsáveis pelo controle do pool de HSC. Compreender estes fenômenos é fundamental, mas depende não só de uma descrição detalhada do microambiente para onde as HSC migram e onde se auto-renovam, diferenciam e entram em apoptose, mas também do papel de cada componente do nicho nestes processos. Ensaio utilizando camundongos imunodeficientes ou geneticamente modificados, bem como modelos *in vitro*, têm contribuído enormemente para a caracterização do nicho de HSC (Adams et al., 2006; Nilsson et al., 2006; Suda et al., 2005; Taichman, 2005; Wilson e Trumpp, 2006). No entanto, modelos *in vivo* são extremamente complexos, além de poderem ocultar detalhes espécie-específicos. Por outro lado, modelos *in vitro* bidimensionais não reproduzem as sutilezas da organização tridimensional que as células estabelecem *in vivo* (Abbot, 2003).

Para investigar a migração de HSC humanas num microambiente tridimensional formado por células estromais de MO humanas, foram desenvolvidas culturas 3D do tipo esferóide de MSC isoladas de MO humana. As MSC de MO cultivadas como esferóides se reorganizaram espacialmente, se dispondo umas sobre as outras (Fig. 8B-D) e mantendo um estado quiescente (Fig.10B-C). A morfologia destas células se assemelhou à das células reticulares na MO, com núcleo irregular, vacúolos citoplasmáticos e emissão de projeções de membrana que formaram uma rede tridimensional pela qual progenitores hematopoéticos poderiam migrar (Fig.8G e 14H). Além disso, as MSC estavam ativas, apresentando inúmeras mitocôndrias e retículo endoplasmático distendido repleto de material granular, também observado no interstício (Fig 8H). Embora a vacuolização citoplasmática não tenha sido descrita em células reticulares da MO, o núcleo irregular e a emissão de longos e inúmeros prolongamentos citoplasmáticos são bastante interessantes, pois

se correlacionam com a descrição morfológica das células reticulares *in vivo* (Weiss, 1984).

A natureza dos vacúolos citoplasmáticos não foi determinada e diversas técnicas histológicas estão sendo realizadas para verificar o seu conteúdo, mas eles se mostraram negativos para polissacarídeos e lipídeos (dados não mostrados). A presença destes vacúolos nas células da região mais central dos esferóides não parece ser um evento raro e vacúolos semelhantes foram também nitidamente observados em células mesenquimais de embrião de pinto cultivadas em 3D (Armstrong e Armstrong, 2003). Uma vez que a indução de um centro necrótico, decorrente da menor difusão de nutrientes e oxigenação, tem sido descrita geralmente em esferóides acima de 500µm de diâmetro, o que é uma das desvantagens deste tipo de cultura (Kunz-Shughart, 1999), a hipótese de que estes vacúolos estivessem associados a morte celular por autofagia (revisado em Edinger e Thompson, 2004; Shintani e Klionsky et al., 2004) foi aventada. No entanto, em nosso modelo, a morte celular não parece ter sido um evento importante, pois raras células em apoptose foram observadas nas preparações histológicas e ultraestruturais. Condizente com isto, a maioria dos vacúolos citoplasmáticos foi observada em células que apresentavam mitocôndrias íntegras. Além disso, a viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de tripan, após dissociação dos esferóides, foi sempre acima de 95% (dados não mostrados). Para completar, a correlação entre o número inicial de células e o diâmetro dos esferóides, que se manteve constante por até 10 dias (Fig. 10A), reforça a idéia de que, neste período de cultura, a morte celular não é um fenômeno relevante neste modelo.

As MSC nos esferóides apresentaram uma intensa reorganização do citoesqueleto, com formação de uma malha de filamentos de actina ao invés de fibras de estresse como observado em monocamadas (Fig 9E-F). A formação de fibras de estresse e adesão focal é freqüentemente relatada em fibroblastos cultivados em monocamada (Alberts et al., 2002), mas algumas dúvidas em relação a sua ocorrência *in vivo* têm sido levantadas. Em culturas 3D de

fibroblasto, assim como *in vivo*, foi descrito que, em vez da presença de adesões focais, há ocorrência de uma nova forma de adesão, denominada *3D-matrix adhesion*, composta de  $\alpha 5\beta 1$  integrina associada à paxilina, mas sem posterior fosforilação de FAK (Cukierman et al., 2001). Esta reorganização do citoesqueleto é um fator relevante devido à importância deste na ativação de vias de sinalização, podendo, portanto, interferir na modulação do padrão de comportamento das MSC, como claramente demonstrado pelo grupo do Dr. Christopher Chen, que observou modificação das vias de diferenciação de MSC de MO em decorrência de tensão do citoesqueleto (McBeath et al., 2004).

As MSC de MO humana mantidas, tanto em monocamada quanto em cultura 3D, apresentaram fenótipo de miofibroblastos, ou seja, expressavam  $\alpha$ -actina de músculo liso (Remy-Martin et al., 1999). Isto é interessante, pois o grupo liderado pela Dra. Kunz-Schughart observou que fibroblastos peritumorais e normais, quando em monocamada, expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso e formam fibras de estresse, mas, quando cultivados em esferóide, tornam-se negativos para  $\alpha$ -actina de músculo liso. A co-cultura de fibroblastos peritumorais com linhagens de células de carcinoma de mama, na forma de esferóide, induz a re-expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, de forma semelhante ao observado *in vivo* (Kunz-Schughart et al., 2001). Este trabalho sugere que a diferenciação para miofibroblasto pode ser modulada pelo contato célula-célula e pelo tipo de cultura. Células de estroma de MO tendem a apresentar, *in vitro*, o fenótipo de miofibroblasto e características de células de parede de vaso (Dennis e Charbord, 2002) enquanto, *in vivo*, as células que expressam  $\alpha$ -actina de músculo liso são restritas às regiões perivasculares e próximo ao endóstio (Bianco et al., 2001). Em nosso modelo, houve modificação na organização dos filamentos de  $\alpha$ -actina de músculo liso, mas as células mantiveram sua expressão, sugerindo que esta expressão é constitutiva.

Células cultivadas tridimensionalmente apresentam um comportamento que se aproxima do seu comportamento *in vivo* (Weaver et al., 1997; Wolf et al., 2003a) e um dos aspectos que pode ser ressaltado é o controle do ciclo

celular. Acredita-se que no organismo adulto, as MSC da MO sejam quiescentes, proliferando somente em casos de resposta a lesão (Bianco e Robey, 2000). Este estado de quiescência *in vivo*, em condições fisiológicas, pode se dever a contatos célula-célula e célula-matriz extracelular que se estabelecem num contexto tridimensional. Em monocamada, estas células se apresentam altamente proliferativas no início e somente quando as culturas entram em confluência há diminuição da proliferação, mas não necessariamente as células entram em quiescência (Gregory et al., 2005). Verificou-se que o cultivo em condição tridimensional, permitiu que as células resgassem o estado quiescente (Fig. 10) como proposto *in vivo*, em situações fisiológicas.

Assim, foi possível desenvolver um microtecido formado por MSC de MO humana, que se dispuseram num continuum tridimensional, mimetizando a organização das células reticulares *in vivo*. No entanto, o microambiente da MO é complexo e diferentes nichos estão presentes na cavidade medular, ressaltando-se o nicho subendosteal para onde migram preferencialmente as HSC (Adams et al., 2006; Nilsson et al., 2001). Neste nicho, osteoblastos têm um papel fundamental no controle do pool de HSC (Calvi et al., 2003; Zhang et al., 2003). Com o intuito de estabelecer esferóides multicelulares mais complexos, formados por pré-osteoblastos co-cultivados com MSC não induzidas (esferóide misto), de tal forma que mimetizasse a região subendosteal de uma trabécula óssea, foram desenvolvidos diferentes métodos de cultivo. Inicialmente, foi utilizado o tempo de indução para a linhagem osteogênica de apenas uma semana, uma vez que existem evidências de que osteoblastos imaturos, mas não os terminalmente diferenciados, são capazes de sustentar a osteoclastogênese *in vitro* (Atkins et al., 2003) e *in vivo* (Corral et al., 1998). Além disto, foi demonstrado que MSC de MO humana cultivadas por mais de duas semanas na presença de meio osteoindutor, perdem sua capacidade de sustentar a hematopoese *in vitro* e, embora sejam capazes de formar um ossículo ectópico quando injetadas com molde de HA/TCP no subcutâneo, não formam cavidade medular (Miura et al., 2006). Posteriormente, diferentes métodos de formação de esferóides complexos

(Kunz-Shugart et al., 1998 e 1999), por cultivo simultâneo das duas populações celulares, por fusão de dois esferóides individuais previamente formados por cada uma das duas populações (dado não mostrado) e, finalmente, por cultura sucessiva de MSC não induzidas sobre esferóides previamente formados por MSC induzidas por uma semana para a linhagem osteogênica (pré-osteoblastos) foram testados. Através de marcação prévia dos pré-osteoblastos com CM-Dil, foi possível identificar as diferentes populações e observou-se que somente pelo método de cultivo sucessivo houve segregação das duas populações. Os pré-osteoblastos formaram um esferóide central, enquanto as MSC não induzidas localizaram-se na periferia destes (Fig.14G). Esta organização se manteve por pelo menos quatro dias de cultura (gradiente celular).

Desde que na MO a distribuição de moléculas da matriz extracelular é bastante peculiar, sua deposição foi investigada neste modelo tridimensional complexo. *In vivo*, colágeno I, sintetizado por osteoblastos e pré-osteoblastos, é observado nas trabéculas ósseas, enquanto fibronectina é amplamente distribuída e forma uma delicada rede tridimensional na cavidade medular. Colágeno IV e laminina apresentam localização mais limitada. Colágeno IV é observado tanto na cavidade medular, quanto na região endosteal, onde apresentou um padrão de distribuição descontínua, mas laminina é observada exclusivamente nas regiões perivascular e periosteal (Nilsson et al., 1998). O padrão de expressão destas moléculas de matriz nos esferóides mistos foi comparável ao descrito *in vivo*. Colágeno IV e fibronectina foram igualmente expressas nas duas populações, induzida e não induzida, porém enquanto a deposição de colágeno IV era escassa e descontínua, uma grande quantidade de fibronectina, formando uma rede tridimensional, foi observada principalmente na região de MSC não induzidas (Fig. 16). A presença de laminina em ambas as regiões difere do observado *in vivo*, mas pode ser atribuída a origem perivascular e estabelecimento de fenótipo de célula de parede de vaso *in vitro* (Dennis e Charbord, 2002) e está de acordo com a observação de que nos esferóides as MSC mantêm a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso. Quanto ao colágeno I, uma grande secreção no interior do esferóide, na região correspondente aos pré-osteoblastos, e não na camada de

células não induzidas, foi observada (Fig. 15). A secreção de colágeno I restrita a região de MSC induzidas comprova a diferenciação destas para a linhagem osteogênica e indica que o tempo de cultivo com meio osteoindutor foi suficiente para induzir um fenótipo de pré-osteoblasto.

Desta forma, houve o estabelecimento de dois modelos, um composto unicamente por MSC de medula e outro com um centro formado por pré-osteoblastos revestido por MSC de MO. Esses modelos poderiam ser representativos de duas etapas distintas da migração das HSC na MO, a migração transmedular (modelo simples) e a ancoragem em sítios específicos, o nicho subendosteal (modelo complexo).

A migração de progenitores hematopoéticos para a MO é um evento complexo que ocorre em etapas e envolve diversas moléculas de adesão e quimiocinas. (Nilsson et al., 2001; Papayannopoulou et al., 1993 e 2001; Potocnik et al., 2000; Sanz-Rodriguez et al., 2001; Teixeira et al., 1992). Como falado anteriormente, a fase inicial, de interação com o endotélio e migração trans-endotelial é seguida de migração por entre as células do estroma medular. Esta fase de migração transmedular é menos compreendida em função de limitações técnicas (Nilsson et al., 2006). Uma vez que as MSC de MO emitiram, nos esferóides, prolongamentos formando uma rede tridimensional a semelhança do observado na cavidade medular, a capacidade de progenitores hematopoéticos de migrar por entre esses prolongamentos foi avaliada através de citometria de fluxo, microscopia óptica confocal e eletrônica.

Verificou-se, inicialmente, que células CD34<sup>+</sup> isoladas de SC foram capazes de migrar para o interior dos esferóides formados exclusivamente por MSC não induzidas, onde se distribuíram de forma homogênea ao longo de todo o esferóide (Fig. 13). A cinética de migração mostrou que ela era mais rápida no início da cultura, tornando-se mais lenta, até estabelecer um platô em 24h (Fig. 12A-B). Isto contrasta com os resultados obtidos por Bug e colaboradores, onde as células CD34<sup>+</sup> de SC migraram continuamente por até

48h em esferóides de células de estroma de MO murina (Bug et al., 2002). Até o momento não está claro que fatores estariam envolvidos nesta diferença, no entanto é possível que características espécie-específicas das interações celulares sejam responsáveis por isso, ressaltando a importância de desenvolver modelos experimentais que utilizem células da mesma espécie animal. Curiosamente, no entanto, a taxa de migração das HSC *in vivo* (Askenasy et al., 2002; Askenasy e Farkas, 2003) e *in vitro*, quando o estroma foi mantido em monocamada (Frimberger et al., 2001), é inicialmente elevada, reduzindo-se após 24h. Porém, não se verificou a ocorrência de um platô na migração em monocamada, pois, ao contrário do observado no sistema de esferóide, onde somente em torno de 15% das células CD34<sup>+</sup> foi capaz de migrar no período de 48h, na monocamada, cerca de 70% das células haviam migrado em 24h (Frimberger et al., 2001). As características fenotípicas e as propriedades biológicas da população capaz de migrar rapidamente nos esferóides devem ser investigadas, pois, Frimberger e colaboradores também verificaram que as células que migravam mais rapidamente por entre a monocamada apresentavam maior eficiência de enxerto pós-transplante (Frimberger et al., 2001).

Ensaio preliminares de inibição de migração com toxina pertussis demonstraram, assim como observado por Bug e seus colaboradores em seu sistema (Bug et al., 2002), que a migração é parcialmente dependente da via de proteína Gi, chegando a 50% de bloqueio (Fig. 12C), sugerindo desta forma que esta migração pode estar sendo mediada por CXCR4, receptor de SDF-1 $\alpha$  acoplado a proteína Gi (Papayannopoulou et al., 2003).

Uma vez que fatores produzidos pelos pré-osteoblastos no interior dos esferóides mistos poderiam modificar o padrão de migração das HSC (Adams et al., 2006), a cinética de migração de células CD34<sup>+</sup> de SC em esferóides mistos foi investigada e comparada com a migração em esferóides simples de MSC não induzidas ou induzidas. Verificou-se que, nos esferóides mistos, as células CD34<sup>+</sup> reproduziram uma cinética de migração similar a observada nos esferóides de MSC não induzidas, inclusive com platô em 24h em torno de

15% (Fig 17A). No entanto, a migração nos esferóides formados somente por MSC induzidas para a linhagem osteogênica foi mais acentuada e contínua, não se verificando a ocorrência de platô (Fig. 17B).

Uma análise da dinâmica das células CD34<sup>+</sup> mostrou que o platô de migração se estabelece, na realidade, por um equilíbrio dinâmico entre as células que entram e aquelas que saem continuamente do esferóide. Em média, 11,2% das células progenitoras marcadas com CM-Dil saíram do esferóide entre 24h e 48h, sendo que 10,8% das células marcadas com CFSE entraram no mesmo período de tempo (Fig.19F). A circulação das HSC é um fenômeno descrito *in vivo* como um processo fisiológico contínuo. Em indivíduos normais, um tráfego fisiológico de células entre a MO e o sangue periférico, que parece contribuir para a hematopoese fisiológica, possivelmente preenchendo e repopulando nichos vazios ou lesados, foi descrito, porém o mecanismo envolvido neste processo não foi esclarecido (Wright et al., 2001; Katayama et al., 2006).

Na MO, o nicho subendosteal é dinâmico, uma vez que a remodelagem de trabéculas ósseas, resultado de reabsorção por osteoclastos e produção de novo tecido osteóide, com posterior mineralização, por osteoblastos ativados, é um fenômeno que ocorre, com maior ou menor intensidade, durante toda a vida (Corral et al., 1998) e, uma vez que a atividade de osteoclastos modifica a migração das HSC no seu nicho (Purton e Scadden, 2006), isto poderia ser a razão da circulação contínua destas. No entanto, no modelo de esferóide misto, não só osteoclastos não estão presentes como não se observou mineralização do tecido osteóide produzido pelos pré-osteoblastos e, portanto, não é de se supor que uma remodelagem do centro do esferóide seja responsável pela recirculação das células CD34<sup>+</sup>. Além disto, o fenômeno não só ocorreu num período muito curto, que não é compatível com a remodelagem óssea de indivíduos adultos (Corral et al., 1998), como o perfil de migração das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides simples de MSC não induzidas (Fig. 12A) faz supor que também tenha ocorrido neste caso.

Por outro lado, a observação de que, após transplante, as HSC formam rapidamente adesões na cavidade medular, mas apresentam grande motilidade (Askenasy et al., 2002; Askenasy e Farkas, 2003), com diminuição do seu número após 24h, levou a hipótese de que, não se devendo a proliferação ou a remodelagem do nicho subendosteal, esta redução numérica só poderia ser atribuída a uma rápida mobilização das HSC, como consequência de uma incapacidade de estabelecer adesões firmes ao estroma medular (Askenasy e Farkas, 2003). De fato, a saída das células CD34<sup>+</sup> dos esferóides formados por MSC induzidas para a linhagem osteogênica, que são ricos em colágeno I, ao qual as células CD34<sup>+</sup> aderem (Adams et al., 2006), foi menor no período entre 24 e 48h (Fig. 19E), sugerindo que adesões firmes são necessárias para a manutenção das HSC nos esferóides e provavelmente também na MO. Assim, a ausência de platô estaria relacionada a uma menor circulação das células CD34<sup>+</sup> nestes esferóides.

Como a circulação das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides mistos ocorreu em escala maior do que a observada em esferóides de MSC induzidas e, aparentemente, também foi marcante em esferóides de MSC não induzidas, pode-se supor que a interação entre estas e as HSC, que constitui a etapa de migração transmedular, é crucial e seleciona as HSC que serão capazes de atingir a região subendosteal, onde irão estabelecer adesões estáveis que as ancoram. Os resultados obtidos sugerem que, na MO, uma parte da população de HSC não conclui a migração transmedular, sendo mobilizada e retornando para a circulação. Somente aquelas que são capazes de migrar até a região subendosteal, onde irão estabelecer adesões firmes serão retidas. É relevante investigar que mecanismos, intrínsecos das HSC ou das MSC, são responsáveis por esta propriedade. Como dito antes, verificou-se que a população de HSC murinas que mais rapidamente aderiu à monocamada de células de estroma de MO murina apresentou maior eficiência de enxerto pós-transplante (Frimberger et al., 2001). Além disto, mais recentemente, foi descrito que uma população de HSC humana com maior capacidade de auto-renovação apresentou maior taxa de adesão à MSC de MO humana,

provavelmente em consequência de maior expressão de moléculas de adesão, como caderina 11, conexina 43, VCAM-1 e  $\beta$ 1-integrinas (Wagner et al., 2007).

Por fim, a comparação de progenitores de diferentes fontes quanto a capacidade de migração, mostrou que as células CD34<sup>+</sup> de SC migram de forma mais eficiente do que células CD34<sup>+</sup> isoladas de aspirados de MO (Fig. 17C), resultado que está de acordo com descrições na literatura quanto a eficiência de “pega” de transplante de HSC em camundongos NOD/SCID (Bonig et al, 2006). Portanto, o modelo de migração em esferóide reproduziu, *in vitro*, as diferenças observadas *in vivo*, sugerindo que possa ser utilizado para investigar os mecanismos e fatores envolvidos neste fenômeno. Entre as hipóteses propostas para explicar estas diferenças funcionais, recentemente, verificou-se que CXCR4, que faz parte dos receptores do tipo serpentina associados à proteína G, pode ser incorporado em microdomínios de membrana enriquecidos em gangliosídios (GEMs) ou *rafts* lipídicos, o que, em células-tronco hematopoéticas, potencializa a migração para a medula óssea. Esta associação de CXCR4 em microdomínios de membrana pode ser estimulada por microvesículas ou produtos de plaqueta, presentes na leucaférese (Wysoczynski et al., 2005). Assim, este modelo se mostra interessante no estudo dos mecanismos moleculares que regem a migração e circulação de HSC.

As análises morfológicas dos esferóides mistos co-cultivados por 72h com as células CD34<sup>+</sup> de SC, mostraram que, inicialmente, estas células se localizam preferencialmente na camada de MSC não induzidas que reveste o esferóide de pré-osteoblastos, mas em 72h foi possível observar células CD34<sup>+</sup> alinhadas em volta do centro induzido, porém sem jamais penetrá-lo (Fig. 18). Esta distribuição das células CD34<sup>+</sup> nos esferóides mistos contrastou com o observado em esferóides simples de MSC não induzidas, onde após 48h de co-cultura, células hematopoéticas eram observadas, de forma aleatória, por todo o esferóide, inclusive no seu centro (Fig. 13A). Em um dos experimentos, em especial, foi possível observar um grande número de células aderidas ao esferóide central de pré-osteoblastos que claramente apresentou uma rica

matriz extracelular não mineralizada (Fig. 18D). Este fenômeno não parece se dever a uma incapacidade das células progenitoras de migrar em um esferóide induzido, mais compacto devido ao depósito de colágeno I, pois, em co-cultura com estes esferóides induzidos, observou-se que elas foram capazes de invadi-lo com enorme eficiência (Fig. 17B), se distribuindo aleatoriamente por todo o esferóide (dado não mostrado). Portanto, os esferóides mistos permitiram a formação de um gradiente que mimetizou o nicho subendosteal, induzindo, como descrito (Nilsson et al., 2001), uma migração e localização específica das células CD34<sup>+</sup> na vizinhança do centro formado por pré-osteoblastos. Deve ser ressaltado que raras células hematopoéticas interagem fisicamente com as MSC induzidas para a linhagem osteogênica. No entanto, as análises morfológicas de MO de camundongos NOD/SCID transplantados com MSC de MO e HSC de SC humanos mostraram uma co-localização destas células na região subendosteal, com a maioria das HSC localizando-se predominantemente nas proximidades das trabéculas ósseas e não em contato direto com as *bone lining cells* (Muguruma et al., 2006) como havia sido demonstrado em modelo murino (Zhang et al., 2003).

Esta regência, que tende a formar uma localização preferencial na camada não induzida, mas na vizinhança do esferóide de pré-osteoblastos, pode ser explicada através de gradientes quimiotáticos, que provocariam uma organização específica. Através de análises preliminares por RT-PCR verificou-se que a principal população celular produtora de SDF-1 $\alpha$ /CXCL12 seria a de MSC não induzidas (Fig. 21B-C) e não os osteoblastos e pré-osteoblastos como comumente descrito na literatura (Li et al., 2005; Jung et al., 2006; Neiva et al., 2005; Ponomaryov et al., 2000; Taichman et al., 2005). Esta maior expressão de SDF-1 $\alpha$  na região de MSC não induzidas poderia gerar um gradiente desta quimiocina, que, junto com outros fatores predominantes na região de pré-osteoblastos, como Ca<sup>2+</sup>, colágeno I (Adams et al., 2006) e osteopontina (Nilsson et al., 2005), resultaria na fixação das HSC na área limítrofe entre as duas populações celulares. Deve ser ressaltado que, embora não seja possível descartar diferenças quantitativas na concentração de íons Ca<sup>2+</sup> ou na expressão de mRNA de osteopontina, esta foi homogeneamente

distribuída nos esferóides mistos (Fig. 21A) e não foi observada mineralização da matriz dos esferóides de pré-osteoblastos (dado não mostrado).

Os resultados de um trabalho recentemente publicado, utilizando camundongos ou transgênicos com gene de SDF-1 $\alpha$  acoplado a GFP ou nocautes para CXCR4, reforçam a hipótese de que um gradiente de SDF-1 $\alpha$  seja importante na organização do microambiente medular. Foi demonstrado que as células fortemente positivas para SDF-1 $\alpha$ /GFP eram as células reticulares (e não osteoblastos) que localizavam-se ao redor das células endoteliais dos sinusóides e próximo ao endóstio. Estes achados foram confirmados pela expressão dissociada de GFP e osteocalcina, ou seja, raras células osteocalcina<sup>+</sup>SDF-1 $\alpha$ <sup>+</sup> foram observadas. Além disto, a expressão de SDF-1 $\alpha$ /GFP nestas raras células era de baixa intensidade, contrastando com a grande intensidade observada nas células reticulares perivasculares e subendosteais (Sugiyama et al., 2006), concordando desta forma com os nossos resultados. Neste trabalho, os autores levantaram a hipótese de que a interação de SDF-1 $\alpha$  e seu receptor CXCR4 seria modulador do microambiente, pois observaram nos nocautes para CXCR4 um grande aumento na proliferação de progenitores hematopoéticos mais diferenciados que foi acompanhado de uma diminuição no número de HSC, com conseqüente perda da capacidade de reconstituir a hematopoese de camundongos letalmente irradiados, sugerindo que o controle do pool de HSC seja dependente de sinalização de SDF-1 $\alpha$  e CXCR4 (Sugiyama et al., 2006). Porém, é possível que o rompimento deste eixo acarrete principalmente um deslocamento das HSC que ficariam impossibilitadas de alcançar seu nicho de quiescência, o que levaria a sua expansão e esgotamento.

Apesar das células CD34<sup>+</sup> se localizarem na camada não induzida com poucas células interagindo fisicamente com os esferóides induzidos, elas de fato são moduladas por ele. Em ensaio funcional de manutenção de quiescência, foi observado que esferóides mistos mantêm 50% mais células CD34<sup>+</sup> de SC no estado quiescente em relação aos esferóides simples de células não induzidas, em dois e 7 dias (Fig. 20C), mostrando assim um

importante papel dos osteoblastos na construção do nicho de quiescência, em acordo com o demonstrado anteriormente (Zhang et al., 2003) e reforçando a hipótese de que o modelo de esferóide misto mimetiza o nicho subendosteal.

Curiosamente, a mesma diferença percentual de HSC quiescentes foi observada comparando-se os sobrenadantes dos esferóides mistos com os simples de MSC (Fig. 20D). De fato, as HSC circulantes, encontradas no sangue periférico, estão quiescentes (Roberts et al., 1995; Ushida et al., 1997) e a entrada dessas células na medula depende do momento do ciclo, tendo sido demonstrado que o enxerto de quimeras de NOD/SCID é máximo quando as HSC se encontram em  $G_0/G_1$  (Gothod et al., 1998). Acredita-se que isto decorra de diferenças na expressão de moléculas de adesão e na capacidade de migrar em substrato de matriz extracelular. Foi demonstrado que HSC quiescentes apresentam uma maior eficiência de migração *in vitro* comparativamente às células em ciclo (Giet et al., 2002; Huygen et al., 2002). Portanto, é possível que o maior percentual de células quiescentes no sobrenadante dos esferóides se deva a migração contínua principalmente das células em  $G_0/G_1$ . Ou seja, a proporção de células quiescentes na população dinâmica é maior, mas refletiria o total de células quiescentes presentes no esferóide, maior no caso dos mistos em função da presença de pré-osteoblastos.

Os resultados sugerem que o nicho subendosteal de HSC depende, minimamente, de duas populações celulares, MSC e pré-osteoblastos (*bone lining cells*), que se encontram fisicamente próximas, mas organizadas espacialmente de tal forma que uma área limítrofe entre ambas se estabelece. O papel de cada uma destas duas populações no nicho ainda deve ser investigado, mas suspeita-se que a população de MSC tenha papel relevante na migração dos progenitores hematopoéticos, enquanto osteoblastos, ou pré-osteoblastos, controlariam a quiescência.

Algumas evidências de que MSC são importantes mediadores da migração de HSC podem ser encontradas na literatura. Durante o período de

hematopoese embrionária, quando ocorrem diversas mudanças de sítio/órgão hematopoético, foi demonstrado que antecedendo cada mudança havia o aparecimento de MSC no futuro sítio/órgão hematopoético (Van den Heuvel et al., 1987; Mendes et al., 2005;). Além disso, experimentos de transplantes em camundongos imunodeficientes em que MSC foram administradas simultaneamente às HSC, demonstraram um aumento na recuperação de hematopoese, ou seja, na “pega” do enxerto (Noort et al., 2002). O mesmo foi observado em pacientes com neoplasia hematológica que realizaram transplantes autólogos de HSC com administração simultânea de MSC expandida (Lazarus et al., 2005). Finalmente, em 2006, Muruguma e colaboradores, num elegante trabalho, realizaram, pela primeira vez, o transplante, através de injeções intraósseas, de MSC de MO humana para o interior da cavidade medular de camundongos imunodeficientes, antes da infusão de células CD34<sup>+</sup> de SC humano, e observaram que estas enxertavam preferencialmente a tíbia que havia recebido as MSC humanas em detrimento da tíbia contra-lateral que não havia recebido estas células. Este trabalho demonstra desta forma não só que a interação entre HSC e MSC possui características espécie-específicas, como também que as MSC são essenciais na regência da migração de HSC humanas.

O papel de osteoblastos no controle de quiescência de HSC tem sido mais amplamente explorado. Diversos fatores expressos por essas células, que envolvem mecanismos de adesão, via N-caderina (Zhang et al., 2003), Notch-1 (Calvi et al., 2003), osteopontina (Nilsson et al., 2005) e Ang-1 (Arai et al., 2004), têm sido propostos como moduladores da quiescência das HSC. Segundo Nilsson e colaboradores (Nilsson et al., 2005), osteopontina estaria envolvida tanto na manutenção de quiescência, quanto na migração transmedular, uma vez que camundongos nocautes condicionais para OP perdem a localização subendosteal das HSC. Porém, este efeito pode ser devido ao papel da OP na ancoragem, via  $\beta$ 1-integrinas, das HSC aos osteoblastos e/ou à matriz por elas produzidas, pois, apesar de não se observar uma localização subendosteal, as HSC são capazes de entrar na medula, logo migram. Além disso, a OP é secretada preferencialmente por

osteoblastos e se liga à matriz extracelular, não se difundindo pela medula (Haylock e Nilsson,2006), o que torna improvável que ela forme um gradiente quimiotático. Outro indício de que seu efeito é mais provavelmente produto da ancoragem, é o fato de que a interação de Ang-1 com seu receptor Tie-2, aumenta os níveis de expressão de  $\beta$ 1-integrina e N-caderina (Arboleda et al., 2003). Novamente, a ligação de Tie-2, expresso em HSC, com Ang-1, produzida por osteoblastos, parece regular a adesão das HSC na região subendosteal e sua quiescência (Arai et al., 2004).

Ao contrário do observado na MO de camundongos, a análise por RT-PCR da expressão de OP nas populações de MSC, induzidas ou não, mostrou uma expressão significativa de mRNA para esta molécula, independentemente da forma de cultivo (Fig. 21A). Posteriormente, através de imunofluorescência foi observada nos esferóides mistos a presença da proteína em ambas as regiões de MSC, induzidas e não induzidas (Fig. 16E). Como comentado anteriormente, não foi possível determinar se haviam diferenças quantitativas na expressão e síntese desta molécula, mas notou-se, por vezes, a presença de focos de OP depositados na interface das duas populações de MSC (Fig 16F). Possivelmente, são estas subregiões que apresentam os diferentes sinais necessários para o controle da quiescência das HSC. Portanto, este modelo seria útil para investigar se as HSC quiescentes localizam-se preferencialmente nestas regiões e se há co-expressão de Ang-1 e N-caderina.

As adesões celulares mediadas por caderinas parecem ser importantes no nicho de células-tronco. Verificou-se que as HSC quiescentes e localizadas no nicho subendosteal expressam N-caderina (Zhang et al., 2003). As adesões celulares mediadas por caderinas envolvem  $\beta$ -catenina que forma complexos com a porção citoplasmática das moléculas de caderina. Por sua vez,  $\beta$ -catenina é a principal mediadora da via canônica de Wnt, que parece promover proliferação e auto-renovação das HSC (Duncan et al., 2005; Reya et al., 2003). Assim, o mecanismo de adesão mediado por caderinas poderia sequestrar  $\beta$ -catenina e, conseqüentemente, inibir a via de Wnt, bloqueando a proliferação, ou seja, mantendo a quiescência. Existem evidências em outros

sistemas que o aumento da expressão de caderina inibe a via de Wnt. Por exemplo, a transfecção de células da crista neural com N-caderina inibe sua transformação epitélio-mesenquimal e migração, por inibição da via de Wnt (Shoval et al., 2007). Assim, é possível que no nicho subendosteal a interação das HSC, via Ang-1/Tie-2, ao induzir um aumento da expressão de  $\beta$ 1-integrinas e N-caderina, promova ancoragem das HSC ao nicho, por ligação com as células e proteínas da matriz (especialmente, OP e colágeno I) e inibição da via de Wnt por sequestro de  $\beta$ -catenina.

Verificou-se, por RT-PCR que tanto as MSC induzidas quanto as não induzidas expressam Wnt-5a e Ang-1, além de outros fatores que têm sido descritos nos nichos de células-tronco, como Notch, que controla as divisões assimétricas de células-tronco neurais (Fuchs et al., 2004) e SCF (Driessen et al., 2003; Bonig et al., 2006) (Fig. 21A). No entanto, somente uma análise quantitativa, por RT-PCR em tempo real, poderia determinar se existem diferenças nos níveis de expressão numa população em relação à outra.

Como já citado, alguns grupos, recentemente, vêm apresentando um outro ponto de vista, um aspecto metabólico, quanto ao nicho subendosteal. A região subendosteal seria um nicho hipóxico, no qual residem as HSC, em geral quiescentes (baixa atividade metabólica), enquanto, as regiões mais centrais da medula, nicho vascular, seriam ricas em oxigênio e apresentariam progenitores hematopoéticos altamente proliferativos (Suda et al., 2005). A hipóxia facilitaria a sobrevivência das HSC, pois a prevenção de senescência depende da inibição de estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (ROS) e isso seria melhor alcançado em condições de baixa atividade metabólica. Recentemente, foi demonstrado que um fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF, *hipoxia-inducible factor*) prolonga a vida de neutrófilos através de sinais de sobrevivência mediados por NF $\kappa$ -B (Walmsley et al., 2005). Tendo em vista que o modelo de esferóide é um agregado celular compacto, é de se imaginar que a hipóxia pode ser um dos fatores que também estaria favorecendo a quiescência das HSC, privilegiando células com baixa atividade metabólica. Vários trabalhos na literatura descreveram o surgimento

de hipóxia em esferóides e, quanto maior o diâmetro da esfera, maior a hipóxia no centro da mesma (Kunz-Schughart et al., 1999; Timmins et al., 2004). Deve-se avaliar se existe alguma diferença no grau de hipóxia dos esferóides mistos e simples, mesmo tendo-se mantido o mesmo diâmetro para ambos.

Até onde sabemos, é a primeira vez que um modelo de cultura 3D, do tipo esferóide, que mimetiza o nicho subendosteal da MO, desenvolvido com MSC de MO humana em diferentes fases de diferenciação é descrito na literatura. Este modelo permitiu confirmar alguns eventos, descritos na literatura, relacionados com a biologia das HSC em seu nicho. Verificou-se, utilizando este modelo, que o nicho subendosteal depende de uma organização específica das MSC e dos pré-osteoblastos, pois a localização ordenada das HSC só ocorre quando uma interface entre essas duas populações estromais se forma. Esta organização criaria um gradiente quimiotático, provavelmente envolvendo SDF-1 $\alpha$ , que mantém as HSC na região entre pré-osteoblastos e MSC. A interação com as MSC é fundamental na migração transmedular até o nicho subendosteal e na circulação das HSC. Além disso, confirmou-se que a presença de pré-osteoblastos é essencial na indução de quiescência.

Estas observações nos permitem inferir que este modelo pode ser aplicado no estudo dos mecanismos das metástases para a MO de neoplasias malignas, como câncer de mama e de próstata. Existem neoplasias não hematológicas que caracteristicamente evoluem com micrometástases na MO, havendo uma correlação entre essas micrometástases e o mau prognóstico destas neoplasias. Porém como estas micrometástases se formariam e seriam sustentadas ainda não é conhecido. As micrometástases são pequenos agregados de células neoplásicas, menores que 2mm, em geral, associadas a vasos, onde há reação estromal, proliferação das células tumorais e possível extravazamento com disseminação para outros órgãos, diferentes do da lesão primária. Estas micrometástases surgem a partir da migração para a MO de células tumorais individuais quiescentes e constituem um sinal de doença residual mínima (Ozbas et al., 2003). Estudos nesta área têm sido ampliados e já foi demonstrado, por exemplo, que células de câncer de mama expressam

em altos níveis CXCR4 e são responsivas a SDF-1 $\alpha$  e meio condicionado de células de MO, explicando assim o tropismo destas por este órgão (Müller et al., 2001). Alguns autores acreditam que a medula sirva de reservatório de células-tronco tumorais dormentes (resistentes à quimioterapia), sendo desta forma responsável pelas recidivas da doença (Ozbas et al., 2003; Nicola et al., 2003). Como o nicho de quiescência das HSC na MO é o nicho subendosteal, é possível que, embora tenha sido descrita uma localização perivascular das micrometástases, as células-tronco tumorais localizem-se no nicho subendosteal (Bianco P., 2005, comunicação pessoal; Rao et al., 2004a) e utilizem os mecanismos fisiológicos das HSC para sua manutenção. Logo, o modelo de esferóides pode servir para estudar este fenômeno e descrever quais os mecanismos envolvidos nestes processos.

## **6. Conclusões Gerais**

Foi possível estabelecer esferóides complexos, com um centro de pré-osteoblastos humanos recoberto por MSC de MO humana, que apresentavam uma arquitetura tridimensional com formação de uma rede 3D a partir de seus prolongamentos citoplasmáticos e deposição de matriz extracelular semelhante ao observado no nicho subendosteal da MO.

A co-cultura com células progenitoras mostrou que, como modelo, os esferóides reproduziram o padrão de migração de HSC *in vivo* e, portanto, é útil para o estudo dos mecanismos que regulam este processo.

O modelo de esferóide com pré-osteoblastos se mostrou funcional, tendo restaurado uma propriedade fundamental do nicho subendosteal que é a indução de quiescência nas HSC.

Sendo assim, a cultura 3D do tipo esferóide multicelular misto é um modelo representativo do nicho subendosteal humano para estudos de mecanismos de migração e manutenção de quiescência de progenitores hematopoéticos humanos.

## 7. Bibliografia

1. ABBOT, A. Biology's new dimension. *Nature*, 424: 870-872, 2003.
2. ABILEZ, O., BENHARASH, P., MEHROTRA, M., MIYAMOTO, E., GALE, A., PICQUET J., XU, C., ZARINS, C. A novel culture system shows that stem cells can be grown in 3D and under physiologic pulsatile conditions for tissue engineering of vascular grafts. *J. Surg. Res.*, 132: 170-8, 2006.
3. ADAMS, G.B., CHABNER, K.T., ALLEY, I.R., OLSON, D.P., SZCZEPIORKOWSKI, Z.M., POZNANSKY, M.C., KOS, C.H., POLLAK, M.R., BROWN, E.M., SCADDEN, D.T. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*, 439: 599-603, 2006.
4. ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science, Fourth edition, New York, 2002.
5. ALON, R., KASSNER, P.D., CARR, M.W., FINGER, E.B., HEMLER, M.E., SPRINGER, T.A. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.*, 128: 1243-53, 1995.
6. ANDERS, M., HANSEN, R., DING, R.X., RAUEN, K.A., BISSELL, M.J., KORN, W.M. Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100: 1943-1948, 2003.
7. ARA, T., TOKOYODA, K., SUGIYAMA, T., EGAWA, T., KAWABATA, K., NAGASAWA, T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*, 19: 257-67, 2003.
8. ARAI, F., HIRAO, A., OHMURA, M., SATO, H., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., ITO, K., KOH, G.Y., SUDA, T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*, 118: 149-61, 2004.
9. ARBOLEDA, M.J., LYONS, J.F., KABBINAVAR, F.F., BRAY, M.R., SNOW, B.E., AYALA, R., DANINO, M., KARLAN, B.Y., SLAMON, D.J. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.*, 63: 196-206, 2003.
10. ARMSTRONG, M.T. & ARMSTRONG, P.B. Growth factor modulation of the extracellular matrix. *Exp. Cell Res.*, 288 : 235-245, 2003.
11. ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MATSUNO, K., FORTINI, M.E. Notch signaling. *Science*, 268: 225-32, 1995.
12. ASKENASY N. & FARKAS D.L. In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow. *Br. J. Haematol.*, 120:505-15, 2003.
13. ASKENASY N., YOLCU E.S., SHIRWAN H., STEIN J., YANIV I., FARKAS D.L. Characterization of adhesion and viability of early seeding hematopoietic cells in the host bone marrow in vivo and in situ. *Exp. Hematol.*, 31:1292-300, 2003.

14. ATKINS G.J., KOSTAKIS P., PAN B., FARRUGIA A., GRONTHOS S., EVDOKIOU A., HARRISON K., FINDLAY D.M., ZANNETTINO A.C. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 18:1088-98, 2003.
15. AUSTIN, T.W., SOLAR, G.P., ZIEGLER, F.C., LIEM, L., MATTHEWS, W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, 89: 3624-35, 1997.
16. AVECILLA, S.T., HATTORI, K., HEISSIG, B. et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.*, 10: 64-71, 2004.
17. BALDUINO, A., HURTADO, S.P., FRAZAO, P., TAKIYA, C.M., ALVES, L.M., NASCIUTTI, L.E., EL-CHEIKH, M.C., BOROJEVIC, R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell. Tissue Res.*, 319: 255-66, 2005.
18. BERGER, S.L. Gene regulation. Local or global? *Nature*, 408: 412-3, 2000.
19. BHARDWAJ, G., MURDOCH, B., WU, D., BAKER, D.P., WILLIAMS, K.P., CHADWICK, K., LING, L.E., KARANU, F.N., BHATIA, M. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.*, 2: 172-80, 2001.
20. BIANCO P. & ROBEY P. Marrow stromal stem cells. *J. Clin. Invest.*, 105:1663-8, 2000.
21. BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, 19: 180-92, 2001.
22. BONIG, H., PRIESTLEY, G.V., PAPAYANNOPOULOU, T. Hierarchy of molecular-pathway usage in bone marrow homing and its shift by cytokines. *Blood*, 107: 79-86, 2006.
23. BOUDREAU, N.J. & JONES, P.L. Extracellular matrix and integrin signaling: the shape of things to come. *Biochem. J.*, 339: 481-488, 1999.
24. BRUMMENDORF, T.H., DRAGOWSKA, W., LANSDORP, P.M. Asymmetric cell divisions in hematopoietic stem cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 872: 265-72, 1999.
25. BUG, G., ROSSMANITH, T., HENSCHLER, R., KUNZ-SCHUGHART, L.A., SCHRODER, B., KAMPFMANN, M., KREUTZ, M., HOELZER, D., OTTMANN, O.G. Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into multicellular spheroids of bone marrow stroma cells. *J. Leukoc. Biol.*, 72: 837-845, 2002.
26. CADIGAN, K.M. & NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.*, 11: 3286-305, 1997.
27. CALVI, L.M., ADAMS, G.B., WEIBRECHT, K.W., WEBER, J.M., OLSON, D.P., KNIGHT, M.C., MARTIN, R.P., SCHIPANI, E., DIVIETI, P., BRINGHURST, F.R., MILNER, L.A., KRONENBERG, H.M., SCADDEN, D.T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425: 841-846, 2003.
28. CALVO, W. The innervation of the bone marrow in laboratory animals. *Am. J. Anat.*, 123: 315-28, 1968.

29. CANCELAS, J.A., LEE, A.W., PRABHAKAR, R., STRINGER, K.F., ZHENG, Y., WILLIAMS, D.A. Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat. Med.*, 11: 886-91, 2005.
30. CARSTANJEN, D., GROSS, A., KOSOVA, N., FICHTNER, I., SALAMA, A. The alpha4beta1 and alpha5beta1 integrins mediate engraftment of granulocyte-colony-stimulating factor-mobilized human hematopoietic progenitor cells. *Transfusion*, 45: 1192-200, 2005.
31. CEPINSKAS, G., SANDIG, M., KVIETYS, P.R. PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell Sci.*, 112: 1937-1945, 1999.
32. CHIBA, H., KOBUNE, M., KATO, J., KAWANO, Y., ITO, Y., NAKAMURA, K., ASAKURA, S., HAMADA, H., NIITSU, Y. Wnt3 modulates the characteristics and cobblestone area-supporting activity of human stromal cells. *Exp. Hematol.*, 32: 1194-203, 2004.
33. CHRISTOPHERSON, K.W., COOPER, S., HANGOC, G., BROXMEYER, H.E. CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26<sup>-/-</sup> mice. *Exp. Hematol.*, 31: 1126-34, 2003.
34. CIVIN, C.I., ALMEIDA-PORADA, G., LEE, M.J., OLWEUS, J., TERSTAPPEN, L.W., ZANJANI, E.D. Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood*, 88: 4102-4109, 1996.
35. COBAS, M., WILSON, A., ERNST, B., MANCINI, S.J., MACDONALD, H.R., KEMLER, R., RADTKE, F. Beta-catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *J. Exp. Med.*, 199: 221-9, 2004.
36. CORRAL, D.A., AMLING, M., PRIEMEL, M., LOYER, E., FUCHS, S., DUCY, P., BARON, R., KARSENTY, G. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95: 13835-40, 1998.
37. CUKIERMAN, E., PANKOV, R., STEVENS, D.R., YAMADA, J.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 294: 1708-1712, 2001.
38. DAZZI, F., RAMASAMY, R., GLENNIE, S., JONES, S.P., ROBERTS, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.*, 20: 161-71, 2006.
39. DENNIS J.E. & CHARBORD P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells*, 20:205-14, 2002.
40. DOLBER P.C. & SPACH M.S. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J. Histochem. Cytochem.*, 41:465-9, 1993.
41. DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D.J., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-7, 2006.
42. DORSHKIND, K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu. Rev. Immunol.*, 8: 111-137, 1990.

43. DRIESSEN, R.L., JOHNSTON, H.M., NILSSON, S.K. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp. Hematol.*, 31: 1284-91, 2003.
44. DUNCAN, A.W., RATTIS, F.M., DIMASCIO, L.N., CONGDON, K.L., PAZIANOS, G., ZHAO, C., YOON, K., COOK, J.M., WILLERT, K., GAIANO, N., REYA, T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.*, 6: 314-22, 2005.
45. EDINGER A.L., THOMPSON C.B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16:663-9, 2004.
46. FENG, Z., TATEISHI, Y., NOMURA, Y., KITAJIMA, T., NAKAMURA, T. Construction of fibroblast-collagen gels with orientated fibrils induced by static or dynamic stress: toward the fabrication of small tendon grafts. *J. Artif. Organs*, 9: 220-5, 2006.
47. FRANKEL, A., BUCKMAN, R., KERBEL, R.S. Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.*, 57: 2388-2393, 1997.
48. FRESHNEY, R.I. *Culture of animal cells, a manual of basic technique*, Wiley-Liss , fourth edition, New York, 2000.
49. FRIEDENSTEIN, A.J., GORSKAJA, J.F., KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.*, 4: 267-74, 1976.
50. FRIMBERGER A.E., STERING A.I., QUESENBERRY P.J. An in vitro model of hematopoietic stem cell homing demonstrates rapid homing and maintenance of engraftable stem cells. *Blood*, 98:1012-8, 2001.
51. FUCHS, E., TUMBAR, T., GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116: 769-78, 2004.
52. GEORGOPOULOS, K. Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat. Rev. Immunol.*, 2: 162-74, 2002.
53. GIET O., VAN BOCKSTAELE DR., DI STEFANO I., HUYGEN S., GREIMERS R., BEGUIN Y., GOTHOT A. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 99:2023-31, 2002.
54. GODIN, I. & CUMANO, A. The hare and the tortoise: an embryonic haematopoietic race. *Nat. Rev. Immunol.*, 2: 593-604, 2002.
55. GODIN, I., GARCIA-PORRERO, J.A., DIETERLEN-LIEVRE, F., CUMANO, A. Stem cell emergence and hemopoietic activity are incompatible in mouse intraembryonic sites. *J. Exp. Med.*, 190: 43-52, 1999.
56. GOTHERT, J.R., GUSTIN, S.E., HALL, M.A., GREEN, A.R., GOTTGENS, B., IZON, D.J., BEGLEY, C.G. In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood*, 105: 2724-32, 2005.
57. GOTHOT, A., VAN DER LOO, J.C., CLAPP, D.W., SROUR, E.F. Cell cycle-related changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood*, 92: 2641-9, 1998.
58. GRAHAM, C.H., KOBAYASHI, H., STANKIEWICZ, K.S., MAN, S., KAPITAIN, S.J., KERBEL, R.S. Rapid acquisition of multicellular drug resistance after a

- single exposure of mammary tumor cells to antitumor alkylating agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 975-982, 1994.
59. GRAYSON, W.L., MA, T., BUNNELL, B. Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices. *Biotechnol. Prog.*, 20: 905-12, 2004.
  60. GREGORY C.A., PROCKOP D.J., SPEES J.L. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell Res.*, 306:330-5, 2005.
  61. GREEP R.O., & WEISS L. *Histology*. McGraw-Hill book Company / Blakistow, third edition, New York, 1973.
  62. HARTGERINK, J., BENIASH, E., STUPP, S.I. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294: 1684-1687, 2001.
  63. HAYLOCK, D.N. & NILSSON, S.K. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br. J. Haematol.*, 134: 467-74, 2006.
  64. HIDALGO, A. & FRENETTE, P.S. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood*, 105:567-75, 2005.
  65. HO, A.D. Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.*, 33: 1-8, 2005.
  66. HUANG, C.Y., HAGAR, K.L., FROST, L.E., SUN, Y., CHEUNG, H.S. Effects of cyclic compressive loading on chondrogenesis of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22: 313-23, 2004.
  67. HUANG, S. & INGBER, D.E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat. Cell Biol.*, 1: E131-E138, 1999.
  68. HUYGEN, S., GIET, O., ARTISIEN, V., DI STEFANO, I., BEGUIN, Y., GOTHOT, A. Adhesion of synchronized human hematopoietic progenitor cells to fibronectin and vascular cell adhesion molecule-1 fluctuates reversibly during cell cycle transit in ex vivo culture. *Blood*, 100: 2744-52, 2002.
  69. ITO, K., HIRAO, A., ARAI, F., MATSUOKA, S., TAKUBO, K., HAMAGUCHI, I., NOMIYAMA, K., HOSOKAWA, K., SAKURADA, K., NAKAGATA, N., IKEDA, Y., MAK, T.W., SUDA, T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 431: 997-1002, 2004.
  70. IWAMA, A., OGURO, H., NEGISHI, M., KATO, Y., MORITA, Y., TSUKUI, H., EMA, H., KAMIJO, T., KATOH-FUKUI, Y., KOSEKI, H., VAN LOHUIZEN, M., NAKAUCHI, H. Enhanced self-renewal of hematopoietic stem cells mediated by the polycomb gene product Bmi-1. *Immunity*, 21: 843-51, 2004.
  71. IWATA, M., AWAYA, N., GRAF, L., KAHL, C., TOROK-STORB, B. Human marrow stromal cells activate monocytes to secrete osteopontin, which down-regulates Notch1 gene expression in CD34+ cells. *Blood*, 103: 4496-502, 2004.
  72. JUNG, Y., WANG, J., SCHNEIDER, A., SUN, Y.X., KOH-PAIGE, A.J., OSMAN, N.I., MCCAULEY, L.K., TAICHMAN, R.S. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*, 38: 497-508, 2006.
  73. KARANU, F.N., MURDOCH, B., GALLACHER, L., WU, D.M., KOREMOTO, M., SAKANO, S., BHATIA, M. The notch ligand jagged-1 represents a novel

- growth factor of human hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 192: 1365-72, 2000.
74. KATAYAMA, Y., BATTISTA, M., KAO, W.M., HIDALGO, A., PEIRED, A.J., THOMAS, S.A., FRENETTE, P.S. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124: 407-21, 2006.
  75. KELM J.M., DIAZ SANCHEZ-BUSTAMANTE C., EHLER E., HOERSTRUP S.P., DJONOV V., ITTNER L., FUSSENEGGER M. VEGF profiling and angiogenesis in human microtissues. *J. Biotechnol.* 118:213-29, 2005.
  76. KIEL M.J., YILMAZ O.H., IWASHITA T., YILMAZ OH, TERHORST C, MORRISON SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, 121:1109-21, 2005.
  77. KLUNDER I. & HULSER D.F.. Beta-galactosidase activity in transfected Ltk-cells is differentially regulated in monolayer and in spheroid cultures. *Exp. Cell Res.* 207:155-162, 1993.
  78. KNUDSEN L.M., GAARSDAL E., JENSEN L., NIKOLAISEN K., JOHNSEN H.E. Evaluation of mobilized CD34+ cell counts to guide timing and yield of large-scale collection by leukapheresis. *J. Hematother.*, 7:45-52, 1998.
  79. KOBAYASHI H., MAN S., GRAHAM C.H., KAPITAIN S.J., TEICHER B.A., KERBEL R.S. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 3294-3298, 1993.
  80. KOLLET O., DAR A., SHIVTIEL S., KALINKOVICH A., LAPID K., SZTAINBERG Y., TESIO M., SAMSTEIN R.M., GOICHBURG P., SPIEGEL A., ELSON A., LAPIDOT T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat. Med.*, 12:657-64, 2006.
  81. KONDO M., WAGERS A., MANZ M.G. , PROHASKA S.S., SCHERER D.C., BEILHACK G.F., SHIZURU J.A., WEISSMAN I.L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: Implications for Clinical Application. *Annu. Rev. Immunol.*, 21:759–806, 2003.
  82. KOPEN G.C., PROCKOP D.J., PHINNEY D.G. 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.*, 96:10711-6, 1999.
  83. KOPP H.G., AVECILLA S.T., HOOPER A.T., RAFII S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology*. 20:349-56, 2005.
  84. KORFF T., KIMMINA S., MARTINY-BARON G., AUGUSTIN H.G. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J.*, 15:447-57, 2001.
  85. KRAUSE D.S., FACKLER M.J., CIVIN C.I., MAY W.S. CD34: Structure, Biology, and Clinical Utility. *Blood*, 87:1-13, 1996.
  86. KUMARAVELU P., HOOK L., MORRISON A.M., URE J., ZHAO S., ZUYEV S., ANSELL J., MEDVINSKY A. Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs):

- role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development*. 129:4891-9, 2002.
87. KUNZ-SCHUGHART L.A. Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and *in vivo* tumor. *Cell Biol. Int.*, 23: 157-161, 1999.
  88. KUNZ-SCHUGHART L.A., HEYDER P., SCHROEDER J., KNUECHEL R. A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation. *Exp. Cell. Res.*, 266: 74-86, 2001.
  89. KUNZ-SCHUGHART L.A., KREUTZ M., KNUECHEL R. Multicellular spheroids: a three-dimensional *in vitro* culture system to study tumor biology. *Int. J. Exp. Path.*, 79: 1-23, 1998.
  90. LACORAZZA H.D., YAMADA T., LIU Y., MIYATA Y., SIVINA M., NUNES J., NIMER S.D. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell*, 9:175-87, 2006.
  91. LAMBERT C.A., COLIGE A.C., MUNAUT C., LAPIÈRE C.M., NUSGENS B.V. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.*, 20: 397-408, 2001.
  92. LAPIDOT T. & PETIT I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.*, 30:973-81, 2002.
  93. LAPIDOT T., DAR A., KOLLET O. How do stem cells find their way home? *Blood*, 106:1901-10, 2005.
  94. LAYER P.G., ROBITZKI A., ROTHERMEL A., WILLBOLD E. Of layers and spheres: the reaggregate approach in tissue engineering. *Trends Neurosci.*, 25:131-4, 2002.
  95. LAZARUS H.M., KOC O.N., DEVINE S.M., CURTIN P., MAZIARZ R.T., HOLLAND H.K., SHPALL E.J., MCCARTHY P., ATKINSON K., COOPER B.W., GERSON S.L., LAUGHLIN M.J., LOBERIZA F.R. JR., MOSELEY A.B., BACIGALUPO A. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant*, 11:389-98, 2005.
  96. LI L., XIE T. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21:605-31, 2005.
  97. LI W., JOHNSON S.A., SHELLY W.C., YODER M.C. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained *in vitro* by some primary endothelial cells. *Exp. Hematol.*, 32:1226-37, 2004.
  98. LI Z., LI L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem. Sci.*, 31:589-95, 2006.
  99. MANCINI S.J., MANTEI N., DUMORTIER A., SUTER U., MACDONALD H.R., RADTKE F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*. 105:2340-2, 2005.
  100. MAUNEY J.R., SJOSTORM S., BLUMBERG J., HORAN R., O'LEARY J.P., VUNJAK-NOVAKOVIC G., VOLLOCH V., KAPLAN D.L. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow

- stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. *Calcif. Tissue Int.*, 74:458-68, 2004.
101. MCBEATH R., PIRONE D.M., NELSON C.M., BHADRIRAJU K., CHEN C.S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell.*, 6:483-95, 2004.
  102. MENDES S.C., ROBIN C., DZIERZAK E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development.* 132:1127-36, 2005.
  103. MINGUELL J.J., ERICES A., CONGET P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, 226:507-20, 2001.
  104. MIURA Y., GAO Z., MIURA M., SEO B.M., SONOYAMA W., CHEN W., GRONTHOS S., ZHANG L., SHI S. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells.* 24:2428-36, 2006.
  105. MOORE K.A. & LEMISCHKA I.R. Stem cells and their niches. *Science*, 311:1880-5, 2006.
  106. MORRISON S.J., UCHIDA N., WEISSMAN I.L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11:35-71, 1995.
  107. MUELLER-KLIESER W. Three dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *The Am. Physiol. Soc.*, C1109-C1123, 1997.
  108. MUGURUMA Y., YAHATA T., MIYATAKE H., SATO T., UNO T., ITOH J., KATO S., ITO M., HOTTA T., ANDO K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107:1878-87, 2006.
  109. MULLER A., HOMEY B., SOTO H., GE N., CATRON D., BUCHANAN M.E., MCCLANAHAN T., MURPHY E., YUAN W., WAGNER S.N., BARRERA J.L., MOHAR A., VERASTEGUI E., ZLOTNIK A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410:50-6, 2001.
  110. MULROY T., MCMAHON J.A., BURAKOFF S.J., MCMAHON A.P., SEN J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.*, 32:967-71, 2002.
  111. MURDOCH B., CHADWICK K., MARTIN M., SHOJAEI F., SHAH K.V., GALLACHER L., MOON R.T., BHATIA M. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100:3422-7, 2003.
  112. NEIVA K., SUN Y.X., TAICHMAN R.S. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38:1449-54, 2005.
  113. NELISSEN J.M., TORENSMA R., PLUYTER M., ADEMA G.J., RAYMAKERS R.A., VAN KOOYK Y., FIGDOR C.G. Molecular analysis of the hematopoiesis supporting osteoblastic cell line U2-OS. *Exp. Hematol.*, 28:422-32, 2000.
  114. NICOLA M.H., BIZON R., MACHADO J.J., SOLLERO T., RODARTE R.S., NOBRE J.S., MAGALHAES M.M., TAKIYA C.M., BOROJEVIC R. Breast cancer micrometastases: different interactions of carcinoma cells with normal

- and cancer patients' bone marrow stromata. *Clin. Exp. Metastasis*, 20:471-9, 2003.
115. NILSSON S.K., DEBATIS M.E., DOONER M.S., MADRI J.A., QUESENBERRY P.J., BECKER P.S. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. *J. Histochem. Cytochem.*, 46:371-7, 1998.
  116. NILSSON S.K., DOONER M.S., TIARKS C.Y., WEIER H.U., QUESENBERRY P.J. Potential and distribution of transplanted hematopoietic stem cells in a nonablated mouse model. *Blood*, 89: 4013-4020, 1997.
  117. NILSSON S.K., JOHNSTON H.M., COVERDALE J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, 97:2293-2299, 2001.
  118. NILSSON S.K., JOHNSTON H.M., WHITTY G.A., WILLIAMS B., WEBB R.J., DENHARDT D.T., BERTONCELLO I., BENDALL L.J., SIMMONS P.J., HAYLOCK D.N.. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106:1232-9, 2005.
  119. NILSSON S.K., SIMMONS P.J., BERTONCELLO I. Hemopoietic stem cell engraftment. *Exp. Hematol.*, 34:123-9, 2006.
  120. NOORT W.A., KRUISELBRINK A.B., IN'T ANKER P.S., KRUGER M., VAN BEZOOIJEN R.L., DE PAUS R.A., HEEMSKERK M.H., LOWIK C.W., FALKENBURG J.H., WILLEMZE R., FIBBE W.E.. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp. Hematol.*, 30:870-8, 2002.
  121. OVERALL C.M. & LOPES-OTIN C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nature Rev. Cancer*, 2: 657-672, 2002.
  122. OZBAS S., DAFYDD H., PURUSHOTHAM A.D.. Bone marrow micrometastasis in breast cancer. *Br. J. Surg.*, 90:290-301, 2003.
  123. PALECEK S.P., LOFTUS J.C., GINSBERG M.H., LAUFFENBURGER D.A., HORWITZ A.F. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385: 537-540, 1997.
  124. PANOSKALTSIS N., MANTALARIS A., WU J.H. Engineering a mimicry of bone marrow tissue ex vivo. *J. Biosci. Bioeng.*, 100:28-35, 2005.
  125. PAPAYANNOPOULOU T. & NAKAMOTO B. Peripheralization of hemopoietic progenitors in primates treated with anti-VLA4 integrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 9374-9378, 1993.
  126. PAPAYANNOPOULOU T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103:1580-1585, 2004.
  127. PAPAYANNOPOULOU T., PRIESTLEY G.V., BONIG H., NAKAMOTO B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 101:4739-4747, 2003.
  128. PAPAYANNOPOULOU T., PRIESTLEY G.V., NAKAMOTO B., ZAFIROPOULOS V., SCOTT L.M. Molecular pathways in bone marrow homing: dominant role of alpha(4)beta(1) over beta(2)-integrins and selectins. *Blood*, 98:2403-2411, 2001.
  129. PASSEGUE E. & WAGERS A.J. Regulating quiescence: new insights into hematopoietic stem cell biology. *Dev Cell*, 10:415-7, 2006.

130. PELED A., KOLLET O., PONOMARYOV T., PETIT I., FRANITZA S., GRABOVSKY V., SLAV M.M., NAGLER A., LIDER O., ALON R., ZIPORI D., LAPIDOT T.. The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood*, 95:3289-96, 2000.
131. PETIT I., SZYPER-KRAVITZ M., NAGLER A., LAHAV M., PELED A., HABLER L., PONOMARYOV T., TAICHMAN R.S., ARENZANA-SEISDEDOS F., FUJII N., SANDBANK J., ZIPORI D., LAPIDOT T. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* , 3:687-94, 2002.
132. PETRI R.J. Eine kleine modification des Koch'schen Plattenverfahrens. *Centralblatt für Bacteriologie und Parasitenkunde.* 1:279-280, 1887.
133. PITTENGER M.F., MACKAY A.M., BECK S.C., JAISWAL R.K., DOUGLAS R., MOSCA J.D., MOORMAN M.A., SIMONETTI D.W., CRAIG S., MARSHAK D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-7, 1999.
134. PONOMARYOV T., PELED A., PETIT I., TAICHMAN R.S., HABLER L., SANDBANK J., ARENZANA-SEISDEDOS F., MAGERUS A., CARUZ A., FUJII N., NAGLER A., LAHAV M., SZYPER-KRAVITZ M., ZIPORI D., LAPIDOT T. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J. Clin. Invest.*, 106:1331-9, 2000.
135. POTOČNIK A.J., BRAKEBUSCH C., FÄSSLER R. Fetal and adult hematopoietic stem cell require  $\beta 1$  integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity*, 12: 653-663, 2000.
136. PURTON L.E. & SCADDEN D.T. Osteoclasts eat stem cells out of house and home. *Nat. Med.*, 12:610-1, 2006.
137. PURTON L.E., BERNSTEIN I.D., COLLINS S.J. All-trans retinoic acid enhances the long-term repopulating activity of cultured hematopoietic stem cells. *Blood*, 95:470-7, 2000.
138. PURTON L.E., DWORKIN S., OLSEN G.H., WALKLEY C.R., FABB S.A., COLLINS S.J., CHAMBON P. RAR $\gamma$  is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *J. Exp. Med.*, 203:1283-93, 2006.
139. QIAN H., TRYGGVASON K., JACOBSEN S.E., EKBLOM M. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. *Blood*, 107:3503-10, 2006.
140. RAO G., PATEL P.S., IDLER S.P., MALOOF P., GASCON P., POTIAN J.A., RAMESHWAR P. Facilitating role of preprotachykinin-I gene in the integration of breast cancer cells within the stromal compartment of the bone marrow: a model of early cancer progression. *Cancer Res.*, 64:2874-81, 2004a.
141. RAO Q., ZHENG G.G., LIN Y.M., WU K.F. Production of matrix metalloproteinase-9 by cord blood CD34+ cells and its role in migration. *Ann. Hematol.*, 83: 409-413, 2004b.
142. REMY-MARTIN J.P., MARANDIN A., CHARLLIER B., BERNARD G., DESCHASEAUX M., HERVE P., WEI Y., TSUJI T., AUERBACH R., DENNIS J.E., MOORE K.A., GREENBERGER J.S., CHARBORD P. Vascular smooth

- muscle differentiation of murine stroma: A sequential model. *Experimental Hematology*. 27:1782-1795, 1999.
143. REYA T., DUNCAN A.W., AILLES L., DOMEN J., SCHERER D.C., WILLERT K., HINTZ L., NUSSE R., WEISSMAN I.L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423:409-14, 2003.
  144. REYA T., MORRISON S.J., CLARKE M.F., WEISSMAN I.L. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature*, 414: 105-111, 2001.
  145. REYES, M., LUND, T., AGUIAR, D., KOODIE, L., VERFAILLE, C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cell. *Blood*, 98: 2615-2625, 2001.
  146. ROBERTS A.W. & METCALF D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood*, 86:1600-5, 1995.
  147. ROSSI M.I., BARROS A.P., BAPTISTA L.S., GARZONI L.R., MEIRELLES M.N., TAKIYA C.M., PASCARELLI B.M., DUTRA H.S., BOROJEVIC R. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional in vitro culture system for the study of hematopoietic cell migration. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38:1455-62, 2005.
  148. SAHAI E. & MARSHALL C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.*, 5: 711-720, 2003.
  149. SANZ-RODRIGUEZ F., HIDALGO A., TEIXIDÓ J. Chemokine stromal cell-derived factor-1 $\alpha$  modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1. *Blood*, 97: 346-351, 2001.
  150. SATO Y., ARAKI H., KATO J., NAKAMURA K., KAWANO Y., KOBUNE M., SATO T., MIYANISHI K., TAKAYAMA T., TAKAHASHI M., TAKIMOTO R., IYAMA S., MATSUNAGA T., OHTANI S., MATSUURA A., HAMADA H., NIITSU Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106:756-63, 2005.
  151. SCHOFIELD R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4:7-25, 1978.
  152. SCHWARTZ M.A., SCHALLER M.D., GINSBERG M.H. Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11: 549-599, 1995.
  153. SEMINO C.E., MEROK J.R., CRANE G.G., PANAGIOTAKOS C., ZHANG S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*, 71: 262-270, 2003.
  154. SERVIDA F., SOLIGO D., CANEVA L., BERTOLINI F., HARVEN DE E., CAMPIGLIO S., CORSINI C., DELILIERIS G. Functional and Morphological Characterization of Immunomagnetically Selected CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells. *Stem Cells*, 14:430-438, 1996.
  155. SHI S., BARTOLD P.M., MIURA M., SEO B.M., ROBEY P.G., GRONTHOS S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod. Craniofac. Res.*, 8:191-9, 2005.

156. SHI S., GRONTHOS S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res.*, 18:696-704, 2003.
157. SHINTANI T. & KLIONSKY D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306:990-5, 2004.
158. SHOVAL I., LUDWIG A., KALCHEIM C. Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. *Development*, 134:491-501, 2007.
159. SILVA MEIRELLES L., CHAGASTELLES P.C., NARDI N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, 119:2204-13, 2006.
160. SILVER S.J. & REBAY I. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development*, 132:3-13, 2005.
161. SILZLE T., KREUTZ M., DOBLER M.A., BROCKHOFF G., KNUECHEL R., KUNZ-SCHUGHART L.A.. Tumor-associated fibroblasts recruit blood monocytes into tumor tissue. *Eur. J. Immunol.*, 33:1311-20, 2003.
162. SOEDE R.D., WIJNANDS Y.M., KAMP M., VAN DER VALK M.A., ROOS E. Gi and Gq/11 proteins are involved in dissemination of myeloid leukemia cells to the liver and spleen, whereas bone marrow colonization involves Gq/11 but not Gi. *Blood*, 96: 691-698, 2000.
163. STETLER-STEVENSON W.G., AZNAVOORIAN S., LIOTTA L.A. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 541-573, 1993.
164. STIER S., CHENG T., DOMBKOWSKI D., CARLESSO N., SCADDEN D.T. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood*, 99:2369-78, 2002.
165. STIER S., KO Y., FORKERT R., LUTZ C., NEUHAUS T., GRUNEWALD E., CHENG T., DOMBKOWSKI D., CALVI L.M., RITTILING S.R., SCADDEN D.T. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.*, 201:1781-91, 2005.
166. SUDA T., ARAI F., SHIMMURA S. Regulation of stem cells in the niche. *Cornea*. 24:S12-S17, 2005.
167. SUGIYAMA T., KOHARA H., NODA M., NAGASAWA T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25:977-88, 2006.
168. SUTHERLAND R.M., MCCREDIE J.A., INCH W.R. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 46: 113-120, 1971.
169. TADA T., WIDAYATI D.T., FUKUTA K. Morphological study of the transition of haematopoietic sites in the developing mouse during the peri-natal period. *Anat. Histol. Embryol.*, 35:235-40, 2006.
170. TAICHMAN R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105:2631-9, 2005.
171. TEIXIDO J., HEMLER M.E., GREENBERGER J.S., ANKLESARIA P. Role of  $\beta$ -1 and  $\beta$ -2 integrins in the adhesion of human CD34hi stem cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Invest.*, 90: 358-367, 1992.

172. TIMMINS N.E., DIETMAIR S., NIELSEN L.K. Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis. *Angiogenesis*, 7:97-103, 2004.
173. TOGARI A. Adrenergic regulation of bone metabolism: possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microsc. Res. Tech.*, 58:77-84, 2002.
174. TOOLE B.P. Hyaluronan in morphogenesis. *J. Intern. Med.*, 242:35-40, 1997.
175. UCHIDA N., HE D., FRIERA A.M., REITSMA M., SASAKI D., CHEN B., TSUKAMOTO A. The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood*, 89:465-72, 1997.
176. VAN DEN BERG D.J., SHARMA A.K., BRUNO E., HOFFMAN R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*, 92:3189-202, 1998.
177. VAN DEN HEUVEL R.L., VERSELE S.R., SCHOETERS G.E., VANDERBORGHT O.L. Stromal stem cells (CFU-f) in yolk sac, liver, spleen and bone marrow of pre- and postnatal mice. *Br. J. Haematol.*, 66:15-20, 1987.
178. VARNUM-FINNEY B., XU L., BRASHEM-STEIN C., NOURIGAT C., FLOWERS D., BAKKOUR S., PEAR W.S., BERNSTEIN I.D. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat. Med.*, 6:1278-81, 2000.
179. VERMEULEN M., LE PESTEUR F., GAGNERAULT M.C., MARY J.Y., SAINTENY F., LEPAULT F. Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 92:894-900, 1998.
180. VISNJIC D., KALAJZIC Z., ROWE D.W., KATAVIC V., LORENZO J., AGUILA H.L. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*, 103:3258-64, 2004.
181. WAGNER W., WEIN F., RODERBURG C., SAFFRICH R., FABER A., KRAUSE U., SCHUBERT M., BENES V., ECKSTEIN V., MAUL H., HO A.D. Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human mesenchymal stem cells as a model for cell-cell interaction. *Exp. Hematol.*, 35:314-25, 2007.
182. WALMSLEY S.R., PRINT C., FARAH N., PEYSSONNAUX C., JOHNSON R.S., CRAMER T., SOBOLEWSKI A., CONDLIFFE A.M., COWBURN A.S., JOHNSON N., CHILVERS E.R. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.*, 201:105-15, 2005.
183. WANG H.Y. & MALBON C.C. Wnt signaling, Ca<sup>2+</sup>, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions. *Science*, 300:1529-30, 2003.
184. WANG T.Y., BRENNAN J.K., WU J.H. Multilineal hematopoiesis in a three-dimensional murine long-term bone marrow culture. *Exp. Hematol.*, 23:26-32, 1995.
185. WEAVER V.M., PETERSEN O.W., WANG F., LARABELL C.A., BRIAND P., DAMSKY C., BISSEL M.J. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J. Cell Biol.*, 137: 231-245, 1997.
186. WEISS L. & SAKAI H. The hematopoietic stroma. *Am. J. Anat.* 170: 447-463, 1984.

187. WILLERT K., BROWN J.D., DANENBERG E., DUNCAN A.W., WEISSMAN I.L., REYA T., YATES J.R. 3RD, NUSSE R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423:448-52, 2003.
188. WILSON A. & TRUMPP A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.*, 6:93-106, 2006.
189. WILSON A., MURPHY M.J., OSKARSSON T., KALOULIS K., BETTESS M.D., OSER G.M., PASCHE A.C., KNABENHANS C., MACDONALD H.R., TRUMPP A. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.*, 18:2747-63, 2004.
190. WOLF K., MAZO I., LEUNG H., ENGELKE K., VON ADRIAN U.H., DERYUGINA E.I., STRONGIN A.Y., BRÖCKER E.B., FRIEDL P. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol.* 160: 267-277, 2003 a.
191. WOLF K., MULLER R., BORGMANN S., BROCKER E.B., FRIEDL P. Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood*, 102: 3262-3269, 2003 b.
192. WRIGHT D.E., WAGERS A.J., GULATI A.P., JOHNSON F.L., WEISSMAN I.L. Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*, 294:1933–1936, 2001.
193. WYSOCZYNSKI, M., RECA R., RATAJCZAK J., KUCIA M., SHIRVAIKAR N., HONCZARENKO M., MILLS M., WANZECK J., JANOWSKA-WIECZOREK A., RATAJCZAK M.Z. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood*, 105: 40-48, 2005.
194. YAMAZAKI, K. & ALLEN, T.D. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the "neuro-reticular complex". *Am. J. Anat.*, 187: 261-76, 1990.
195. YAMAZAKI, S., IWAMA, A., TAKAYANAGI, S., MORITA, Y., ETO, K., EMA, H., NAKAUCHI, H. Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J.*, 25: 3515-23, 2006.
196. ZHANG, J., NIU, C., YE, L., HUANG, H., HE, X., TONG, W., ROSS, J., HAUG, J., JOHNSON, T., FENG, J.Q., HARRIS, S., WIEDEMANN, L.M., MISHINA, Y., LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425: 836-841, 2003.
197. ZHANG, Y., CHAI, C., JIANG, X.S., TEOH, S.H., LEONG, K.W. Co-culture of umbilical cord blood CD34+ cells with human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, 12: 2161-70, 2006.
198. ZUPO, S., DONO, M., MASSARA, R., TABORELLI, G., CHIORAZZI, N., FERRARINI, M. Expression of CD5 and CD38 by human CD5 B cells: requirement for special stimuli. *Eur. J. Immunol.*, 24: 1426-1433, 1994.

## **8. Anexo I**

### **Soluções Utilizadas**

#### **Phosphate Buffered Saline – PBS**

NaCl	8,0g
KCl	0,2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2g
H <sub>2</sub> O tridestilada q.s.p.	1000mL
PH	7,4

Autoclavar para esterilizar.

#### **Balanced Saline Solution. Calcium and Magnesium Free - BSS.CMF**

NaCl	8,0g
KCl	0,4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	0,39g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1g
Glicose	1,1g
Vermelho de fenol	0,0025g
H <sub>2</sub> O tridestilada q.s.p.	1000mL
PH	7,4

Filtrar em membrana estéril milipore de 0,22µm.

#### **Meio de Congelamento**

Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	10%
Soro fetal Bovino (SFB)	40%
Meio Iscove's	50%

#### **Tripsina-EDTA**

Tripsina	0,125g
EDTA	0,02g
BSS.CMF q.s.p.	100mL
PH	7,8

**Solução de Azul de tripan**

Azul de Tripan	400mg
PBS q.s.p.	100mL
PH	7,2

**Solução de TURK**

Ácido Acético	2%
Cristal Violeta	0,01%

**Fixador de Eletrônica**

Glutaraldeído	2,5%
Em tampão Cacodilato 0.1 M com 3,5% sacarose	
pH	7,4

**Tampão Cacodilato 0,1M**

Cacodilato Sódico	4,28g
Cloreto de Cálcio	25g
Ácido Hidroclórico 0,2N	2,5mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p.	200mL
PH	7,4

**Tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA)**

Tris	4,84g
Ácido Acético Glacial (Merck)	2 mL
EDTA 0,5 M	2 mL
H <sub>2</sub> O destilada q.s.p	1000 mL
Ajustar o pH para 8,0	

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)