

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Diferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais de placenta humana em fenótipo neural: modelo de co-cultura**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Maristela Maria Martini  
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – CCB/UFSC  
Fevereiro de 2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**Diferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais de placenta humana em fenótipo neural: modelo de co-cultura**

Trabalho apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez Silva

Maristela Maria Martini  
Departamento de Biologia Celular Embriologia e Genética – CCB/UFSC  
Fevereiro de 2008

“Muito obrigada a você que iluminou os meus olhos, que enriqueceu a minha mente, que encheu de amor e ternura o meu coração. Que me animou, que sorriu para mim, que me deu a mão. Muito obrigada a você, não importa quantos nomes você tenha”.

(Autor desconhecido)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Márcio Alvarez Silva, pela constante orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho.

A DEUS, por ter me dado forças e ânimo durante a realização de minhas tarefas.

A minha família, por compreender minha ausência, tanto no dia-a-dia quanto em datas especiais. Pelo constante apoio e carinho que sempre me deram. À minha irmã Graci e seu marido Júnior com quem morei durante o período do mestrado, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado Juliano, que sempre esteve do meu lado me dando apoio, carinho, força e tranqüilidade. Obrigada por entender meus dias de mau humor!!! Eu te amo!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de apoio técnico e pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), PRONEX/CNPq e FAPESC pelo apoio financeiro aos projetos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD, Brasil), pela bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro aos projetos.

Queridos amigos Tine, Fá, Gelci e Josef, obrigada pelos momentos de descontração nos finais de semana.

Galera do laboratório: difícil falar... Primeiro tenho de agradecer a Talita, que além de amiga foi à pessoa que me ensinou tudo quando entrei no lab, que teve muita paciência e disponibilidade.

A Meline, Ricardo Garcez, Bruno e Cláudia, que além de amigos me ensinaram e ajudaram muito durante este tempo.

A Cissa, Fer e Denise, pela amizade e pelas nossas longas conversas.

Ao Ricardinho, Ricardo New, Suelen, Bianka, Bianca, Zucco, Ezequiel, Rossana e Beatriz, pela amizade, pelas conversas, pela companhia.

A Andréa, pelas dicas, por ajudar a tirar dúvidas ao longo dos experimentos.

A Mariana, minha aluna que infelizmente não pode permanecer durante todo o mestrado, porém me ajudou muito!

Ao Lucas, Cássio, Larissa e Sara, pelo interesse em dar continuidade ao nosso trabalho.

Bem, se esqueci de alguém por favor me perdoe, é a correria de final de dissertação.

A TODOS, obrigada pelo carinho, compreensão, amizade. Pelas festas, pelos churrascos, momentos de descontração e alegrias. Pelas longas conversas, pelos segredos confiados. Por dividirem os momentos tristes e alegres, pelos conselhos. Pelo apoio e paciência, pelos risos e lágrimas. Com certeza sem todos vocês eu não estaria aqui!!!! OBRIGADA!

## RESUMO

As células tronco (CTs) são células indiferenciadas com habilidade de se auto-renovar infinitivamente, e que em condições apropriadas podem gerar diversos tipos celulares maduros. As células da placenta possuem características morfológicas, imunofenotípicas e funcionais similares as células tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea, porém é improvável que estas células possuam o mesmo potencial de diferenciação e proliferação de CTs embrionárias. Estas células são ainda de origem fetal e podem ser superiores a CTs somáticas em muitos aspectos. Juntamente com o seu fácil acesso, ausência de problemas éticos e abundância celular, as CTMs da placenta podem ser uma alternativa atrativa de progenitores de CTs para pesquisa básica e aplicações clínicas. É importante o estudo do microambiente, pois este e as CTs regulam-se de forma dinâmica e também, torna-se relevante a caracterização das vias de sinalização envolvidas nos processo de diferenciação de CTMs em fenótipo neural, onde são escassos os estudos. Nesta dissertação investigamos o potencial de diferenciação das CTMs de placenta humana, utilizando modelo de co-cultura, para fenótipos neurais. Para alcançarmos nossos objetivos, foram realizadas culturas de CTMs de placenta humana, bem como cultura de células astrocitárias de ratos neonatos. Foram realizados experimentos de co-cultura para verificação da importância do microambiente neural na diferenciação de CTMs, bem como a análise da importância da matriz extracelular (MEC) e dos fatores de crescimento liberados pelas células astrocitárias. Também investigamos as vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação de CTMs para fenótipo neural. As análises dos experimentos se deram por RT-PCR e imunofluorescência, utilizando marcadores de células precursoras neurais, células gliais e neurônios. Nossos resultados demonstram que as CTMs quando em microambiente favorável, têm a potencialidade para se diferenciar em fenótipos neurais, estes resultados são vistos quando as CTMs são co-cultivadas com células astrocitárias de ratos neonatos, bem como quando apenas tratadas com o meio condicionado produzido por estes, demonstrando a importância dos fatores de crescimento liberados pelas células astrocitárias na diferenciação neural de CTMs. Além de apresentarem expressão gênica, estas células possuem a expressão protéica de Nestina, GFAP e B-Tubulina III e também as alterações morfológicas necessárias na diferenciação. Sugerem estar envolvidas na diferenciação para células gliais e precursores neurais as vias MAPK, PI3K e JNK II, porém ambas não afetam a diferenciação para o fenótipo neuronal.

**Palavras chave:** Células tronco mesenquimais. Placenta humana. Diferenciação neural.

## ABSTRACT

The stem cells (SCs) are undifferentiated cells with ability to self-renew, and that under appropriate conditions can generate various cell types ripe. The cells of the placenta have morphological characteristics, and functional immunophenotypes similar mesenchymal stem cells (MSCs) of the bone marrow, but it is unlikely that these cells have the same potential for proliferation and differentiation of embryonic CTs. These cells are of fetal origin and can be greater than somatic SCs in many respects. Along with its easy access, lack of ethical problems in cellular abundance, the MSCs the placenta may be an attractive alternative for parents of SCs for basic research and clinical applications. It is important to the study of the microenvironment as this and the governing SCs are dynamic way and also, it is relevant to the characterization of signalling pathways involved in the process of differentiation of neural MSCs in phenotype, where the studies are scarce. In this dissertation investigated the potential of varying MSCs from human placenta, using model of co-culture, for neural phenotypes. To achieve our goals, cultures were performed for MSCs from human placenta and culture of astrocytes cells of newborn rats. Experiments were conducted in co-culture for verification of the importance of microenvironment in neural differentiation of MSCs, and the analysis of the importance of the extracellular matrix (MEC) and growth factors released by astrocytes cells. We also investigate ways of signalling involved in the process of differentiation of neural MSCs to phenotype. The analysis of the experiments is given by RT-PCR and immunofluorescence using markers of neural precursor cells, gliais cells and neurons. Our results show that the microenvironment favorable MSCs when they have the potential to differentiate into neural phenotypes, these results are seen when the MSCs are co-cultured with cells astrocytes of newborn rats, and only when treated with the means produced by conditioning these, demonstrating the importance of growth factors released by astrocytes cells in neural differentiation of MSCs. Besides submit gene expression, these cells have the protein expression of Nestin, GFAP and B-Tubulin III and the changes needed in morphological differentiation. Suggested to be involved in cell differentiation gliais neural precursors and the MAPK pathways, PI3K and JNK II, but both do not affect the differentiation for the neuronal phenotype.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells. Human placenta. Neural differentiation.



## LISTA DE ABREVIATURAS

01. BRDU: Bromo-dioxiuridina
02. B-Tubulina: Beta-Tubulina
03. cDNA: DNA complementar, seqüência exógena de DNA
04. CT: Célula tronco
05. CTE: Célula tronco embrionária
06. CTH: Célula tronco hematopoética
07. CTM: Célula tronco mesenquimal
08. CTS: Célula tronco somática
09. DAPI: Brometo de etídeo, di-amino-fenilindol
10. DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
11. EDTA: Etileno-dinitrilo-tetracético
12. FITC: Isotiocianato de fluoresceína
13. GAPDH: Gliceraldeído 6 fosfato desidrogenase
14. GFAP: Proteína ácida fribilar glial
15. Glicerina tamponada: Solução de glicerina em tampão carbonato-bicarbonato a pH 9,0
16. IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
17. JNK II: Jun NH<sub>2</sub>-terminal quinase
18. MAPK: Proteínas quinases ativadas por mitógenos
19. MEC: Matriz extracelular
20. MO: Medula óssea
21. Pb: Pares de base
22. PBS: Tampão fosfato salino
23. PBS Triton: PBS contendo 0,2% de Triton X100
24. PBS Tween: PBS contendo 0,05% de Tween 20
25. PCR: Reação de polimerização em cadeia
26. PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase
27. SFB: Soro fetal bovino
28. SNC: Sistema Nervoso Central
29. TXRD: Vermelho do Texas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático da placenta humana.....	13
Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a cultura de CTMs de placenta humana. .....	24
Figura 3. Desenho esquemático ilustrando a obtenção e cultura de células astrocitárias de ratos neonatos. ....	25
Figura 4. Desenho esquemático mostrando o procedimento de co-cultura. ....	26
Figura 5. Expressão gênica de CTMs controle. ....	30
Figura 6. Expressão gênica nas CTMs em co-cultura. ....	31
Figura 7. Expressão gênica das células astrocitárias de ratos.....	32
Figura 8. CTMs.....	33
Figura 9. Células astrocitárias e matriz extracelular .....	34
Figura 10. CTMs em co-cultura .....	36
Figura 11. CTMs em matriz extracelular tratadas com meio condicionado.....	37
Figura 12. CTMs tratadas com meio condicionado .....	39
Figura 13. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – B-Tubulina III.....	41
Figura 14. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – GFAP. ....	42
Figura 15. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – Nestina. ....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para realização das PCR.....	28
Tabela 2. Análise da Expressão Gênica .....	41
Tabela 3. Análise Imunofenotípica.....	40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1 CÉLULAS TRONCO .....	12
1.2 PLACENTA HUMANA .....	13
1.3 O MICROAMBIENTE .....	14
<b>1.3.1 Matriz extracelular.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2 Fatores de Crescimento .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.3 Contato celular.....</b>	<b>17</b>
1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO .....	17
1.5 O DESENVOLVIMENTO DO CEREBELO E SUA UTILIZAÇÃO COMO MODELO DE ESTUDO .....	19
1.6 TERAPIA CELULAR .....	20
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 PLACENTA HUMANA .....	23
3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA.....	23
3.3 ANIMAIS .....	24
3.4 CULTURA DE ASTRÓCITOS .....	25
3.5 CO-CULTURA .....	25
3.6 TRAÇADOR CELULAR (C2110) .....	27
3.7 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA E FENOTÍPICA.....	27
3.8 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR).....	28
3.9 INIBIDORES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR.....	29
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA .....	30
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA .....	32
<b>4.2.2 Células astrocitárias .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.3 CTMs em co-cultura.....</b>	<b>35</b>

4.2.4 CTMs em matriz extracelular .....	36
4.2.5 CTMs tratadas com meio condicionado .....	38
4.3 ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO .....	40
4.3.1 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo neuronal - B-Tubulina III: .....	41
4.3.2 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo neural – GFAP .....	42
4.3.3 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo precursor neuronal – nestina .....	43
5 DISCUSSÃO .....	44
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS .....	49

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÉLULAS TRONCO

A produção e a manutenção da maioria das linhagens de células em organismos adultos é conduzida através de uma cadeia de processos altamente regulados que envolvem a proliferação, migração, diferenciação e a maturação de células. O tipo de células precursoras iniciais nesta cadeia é chamado de células tronco (CTs) (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001). As CTs são células indiferenciadas com habilidade de se auto-renovar infinitivamente, e que em condições apropriadas podem gerar diversos tipos celulares maduros (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Quatro termos têm sido sugeridos com relação ao potencial de diferenciação celular: totipotentes (originam todos os tecidos embrionários e extra-embrionários), pluripotentes (produzem todos os tipos celulares do embrião propriamente dito), multipotentes (contribuem para várias linhagens celulares) e unipotentes (produzem um único tipo celular maduro) (WAGERS; WEISSMAN, 2004). As CTMs podem se diferenciar em múltiplos tipos celulares, podendo assim, ser consideradas como CTs multipotentes (PITTENGER *et al.*, 1999).

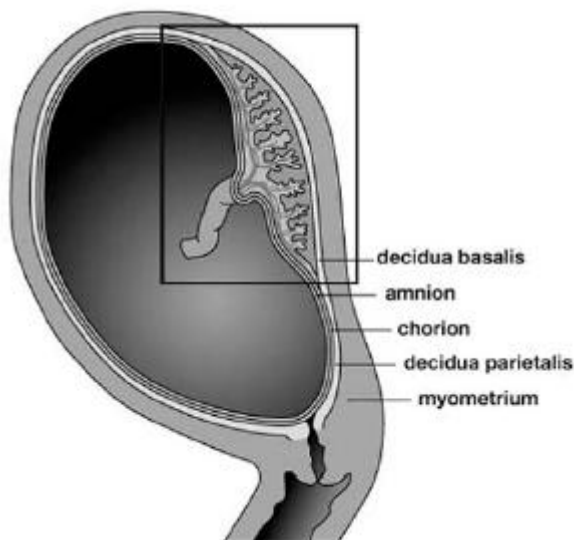
As CTs podem ser distinguidas de acordo com sua origem e potencial de diferenciação em: células tronco embrionárias (CTEs) e células tronco somáticas (CTSs). CTEs são células pluripotentes derivadas da massa celular interna do blastocisto do embrião de mamíferos e podem se diferenciar nas três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. CTSs são isoladas de células fetais, após gastrulação, ou tecidos adultos, sendo classicamente programadas para se diferenciar somente em tipos celulares que pertencem ao tecido das quais originaram. Entretanto, estudos recentes demonstram que CTSs possuem uma maior plasticidade do que fora previamente descrito, sendo capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Já é bem descrito na literatura que a medula óssea (MO) contém duas populações de CTs: as células tronco hematopoéticas (CTHs), que dão origem as células sanguíneas e as células tronco mesenquimais (CTMs), que dão suporte as

células estromais e ainda, dão origem a derivados mesenquimais, tais como estroma medular e adipócitos. Atualmente já é bem descrito que as CTMs podem se diferenciar em diversos fenótipos, como adipócitos, condrócitos, osteócitos e cardiomiócitos (FUKUCHI *et al.*, 2004). Porém a diferenciação de CTMs em elementos neurais *in vitro* e *in vivo* levantou questões fundamentais sobre linhagens de CTs e sua plasticidade (WOODBURY; REYNOLDS; BLACK, 2002).

## 1.2 PLACENTA HUMANA

A placenta humana é um órgão materno-fetal, contendo uma região fetal, o córion, e uma materna, a decídua basal (Figura 1). Sua formação é um processo crítico na embriogênese, e o desenvolvimento normal e funcional da placenta é crucial para o desenvolvimento embrionário e fetal (YEN *et al.*, 2005).



**Figura 1. Desenho esquemático da placenta humana.** O desenho mostra a córion (parte fetal), decidua basal e decidua parietal (parte materna) (Fonte: In T Anker *et al.*, 2004).

Este órgão é descartado pós-parto, após ter executado sua função necessária de suportar o embrião e o feto. As CTMs isoladas da placenta têm uma série de vantagens. Embora seja improvável que as CTs possuam os potenciais de

diferenciação e proliferação de CTEs, estas são ainda de origem fetal e podem ser superiores a CTSs em muitos aspectos. Nenhum procedimento invasivo é necessário para obtenção deste órgão, uma vez que este é expelido após o nascimento do neonato. Além disso, não enfrenta os conflitos éticos enfrentados pelo uso de CTEs, já que o órgão é rejeitado de outra maneira (YEN *et al.*, 2005).

As CTMs da MO adulta são uma população escassa (aproximadamente 0,001% - 0,01%), sendo que este número diminui significativamente com o avanço da idade (FUKUCHI *et al.*, 2004). Sabe-se hoje que as células da placenta possuem características morfológicas, imunofenotípicas e funcionais similares as CTMs da medula óssea (ZHANG *et al.*, 2004). Devido as CTMs da placenta exibirem muitos marcadores das CTMs da MO, esta se torna uma fonte atrativa experimental e para futuras aplicações clínicas (MIAO *et al.*, 2006).

### 1.3 O MICROAMBIENTE

O termo microambiente tem sido amplamente utilizado para se referir à região próxima às células de estudo, a qual pode exercer influência em diferentes processos da vida celular como migração, proliferação, diferenciação ou o metabolismo típico da célula. O microambiente é normalmente constituído por fatores de crescimento, matriz extracelular (MEC) e pelas próprias células que se relacionam diretamente a este objeto de estudo (KENDALL, 1991; FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004; ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006).

Desde trabalhos clássicos, tem sido sugerido que a maioria das células indiferenciadas de vertebrados, durante a escolha do destino de diferenciação, responde aos constituintes do microambiente, nos eventos chamados de interação (ou comunicação) celular. Esta comunicação celular é mediada por receptores celulares como integrinas, receptores acoplados a proteína G, canais iônicos, selectinas, caderinas, mucinas e certas imunoglobulinas, entre outros (ALBERTS *et al.*, 2002; LODISH *et al.*, 2002). Todos estes receptores agem de modo a provocar respostas rápidas e específicas a uma gama de estímulos do microambiente.

Um sistema interessante para exemplificar a importância do microambiente é o nicho celular, modo como é chamado o microambiente de CTs em diferentes



tecidos (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004). CTs presentes em tecidos não embrionários se relacionam intimamente com células adjacentes, através de junções aderentes (SONG *et al.*, 2002). Estas células vizinhas a CTs são as principais responsáveis por modular sua migração, auto-renovação e diferenciação (ZHAO *et al.*, 2002).

Caracteriza-se, desta forma, um plano em que o microambiente e as CTs se regulam de forma dinâmica: os fatores produzidos por uma destas células (proteínas solúveis, MEC ou mesmo proteínas relacionadas a membranas celulares) influenciam a célula próxima e geram uma resposta mútua contínua (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

No encéfalo, os astrócitos são células importantes na formação do microambiente, uma vez que atuam na regulação da diferenciação celular (TRENTIN; MOURA NETO, 1995; LIM; ALVAREZ-BUYLLA, 1999; TRENTIN *et al.*, 2001; MARTINEZ; GOMES, 2005; TRENTIN, 2006), além das funções classicamente definidas como astrocitárias: regulação do metabolismo e da atividade neuronal adulta, suprimento de glicose, concentração iônica extracelular, fluxo sanguíneo cerebral, nível de neurotransmissores e liberação de substâncias neuroativas (ABBOTT; RÖNNBÄCK; HANSSON, 2006). Adicionalmente, os astrócitos guiam o crescimento axonal e migração neuronal e modulam a diferenciação dos neurônios (GARCIA-SEGURA; CHOWEN; NAFTOLIN, 1996).

### **1.3.1 Matriz extracelular**

A MEC não é meramente uma estrutura passiva. Há poucos anos, emergiu que a matriz é uma zona ativa dinâmica cuja função é instruir o fenótipo celular. As proteínas da MEC interagem diretamente com os receptores de superfície das células para iniciar vias de transdução de sinal e para modular aquelas ativadas para diferenciação e fatores de crescimento. A MEC controla também a atividade e a apresentação de uma larga escala de fatores de crescimento. Assim, a modulação da MEC, remodelando sua estrutura e atividade, tem efeitos profundos em sua função e no conseqüente comportamento das células que residem nela ou dentro dela (STREULI, 1999).

A MEC é um conjunto de elementos integrados que podem se ligar à membrana celular através de receptores de superfície chamados integrinas. A MEC tem uma organização estrutural complexa que envolve as células, permitindo a sustentação, conectividade, comunicação, diferenciação celular e o próprio desenvolvimento ontogênico junto às demais células de um tecido (STREULI, 1999). A MEC é composta por duas grandes classes: as cadeias de polissacarídeos, os glicosaminoglicanos (GAGs) e as proteínas fibrosas (colágeno, elastina, fibronectina, laminina, tenascina, entre outros). O citoesqueleto pode exercer funções que orientam as macromoléculas da MEC secretadas pelas células. As proteínas da matriz podem, por sua vez, organizar o citoesqueleto com as quais ela faz contato. A MEC influencia a sobrevivência, o desenvolvimento, a migração, a forma, a função e o comportamento celular pela ligação às integrinas, que ativam vias intracelulares sinalizadoras (ALBERTS *et al.*, 2002). Estes efeitos da MEC podem ocorrer por dois principais mecanismos: o armazenamento de fatores de crescimento; e as interações entre a célula e a matriz que podem diretamente regular o comportamento da célula, por meio da sinalização mediada por um receptor, ou por modulação da resposta celular a fatores de crescimento (GARCEZ, 2004).

Estudos prévios usando CTs de mamíferos têm demonstrado a importância de proteínas de MEC na diferenciação e migração celular *in vivo* (HINSCH; ZUPANC, 2006).

### **1.3.2 Fatores de Crescimento**

Em paralelo com as pesquisas com CTs, há um interesse crescente nos mecanismos moleculares envolvidos na determinação e diferenciação dos tipos celulares durante o desenvolvimento. A descoberta de fatores intrínsecos e extrínsecos que conduzem à diferenciação em ectoderma, endoderma e mesoderma durante os primeiros estágios do desenvolvimento; e a identificação dos fatores que são responsáveis pela posterior diferenciação nos mais restritos tipos celulares no desenvolvimento, permitiria uma compreensão melhor dos mecanismos que controlam a plasticidade fenotípica das CTs (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Estudos demonstraram que astrócitos de cérebro fetal de ratos secretam alguns fatores de sinalização que direcionam a diferenciação de CTMs em glia e neurônio (LEI *et al.*, 2007).

### 1.3.3 Contato celular

Cada tipo celular apresenta um conjunto de receptores protéicos que permite à célula responder a um conjunto de moléculas sinalizadoras correspondentes produzidas por outras células, Estas moléculas sinalizadoras trabalham em combinações para regular o comportamento celular. Muitas células requerem sinais múltiplos para sobreviver, dividir ou ainda para diferenciar. No desenvolvimento embrionário, por exemplo, a sinalização dependente de contato tem um papel importante nos tecidos onde as células adjacentes, que são inicialmente semelhantes, precisam se tornar especializadas em diferentes fenótipos (ALBERTS *et al.*, 2002).

Em 2007, Lei e colaboradores demonstrando que CTMs de MO quando co-cultivadas sobre astrócitos, podem se diferenciar em células da glia, demonstrando que CTMs são uma população de CTs multipotentes, que podem se diferenciar, em condições apropriadas, para fenótipo neural, dependendo do seu protocolo de indução (LEI *et al.*, 2007).

Já é descrito que os astrócitos são responsáveis pela regulação do metabolismo e atividade neuronal. Os astrócitos produzem a maioria dos componentes da matriz extracelular no sistema nervoso central, incluindo fibronectina e laminina. Estes exercem um importante papel durante o desenvolvimento, modulando a diferenciação neuronal, guiando a migração neuronal e crescimento axonal (TRENTIN, 2006).

## 1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO

Os sistemas de sinalização celular se organizam na forma de uma

verdadeira rede como módulos de sinalização dependentes de interações proteína-proteína e envolvendo diversos elementos que incluem: receptores, proteínas G, canais iônicos, proteínas de ancoragem, segundos mensageiros fosfolípidios de membrana, proteínas envolvidas na regulação gênica (WONG; SCOTT, 2004). Atualmente é amplamente reconhecido que uma das principais respostas observadas, frente à modulação destes sistemas, é a regulação da atividade de proteínas quinases e proteínas fosfatases (PAPIN *et al.*, 2005). Desta forma, a resultante observada, em resposta aos sinais extracelulares, é a modulação do estado de fosforilação de proteínas, que pode regular a atividade catalítica de enzimas, abertura/fechamento de canais iônicos, atividade de receptores, atividade de fatores de transcrição e regulação da expressão gênica. Como consequência, diversos processos celulares podem ser regulados como proliferação e diferenciação celular, morte celular, e interações celulares entre outras (SWEATT, 2004).

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são uma família de serina/treonina quinases, ativadas por fosforilação sobre resíduos de treonina e tirosina, e medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos. As três principais MAPKs identificadas são as quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs) tais como: Jun NH<sub>2</sub>-terminal quinase (JNK, SAPK1) e as p38<sup>MAPK</sup> (SAPK2) (CHANG; KARIN, 2001). A cascata de ERK1/2 é primariamente ativada por fatores de crescimento e nos mamíferos, elas regulam importantes processos que incluem: expressão gênica, proliferação, sobrevivência/morte celular, neuroplasticidade (CHANG; KARIN, 2001; WONG; SCOTT, 2004; SWEATT, 2004). Entre seus alvos estão fatores de transcrição, colocando esta via de sinalização como um importante elemento regulatório da expressão gênica (HUGANIR, 2004). JNK e p38<sup>MAPK</sup> são ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular (COWAN; STOREY, 2003). Entretanto, muitas evidências também apontam papéis fisiológicos destas enzimas na neuroplasticidade e no desenvolvimento (COWAN, STOREY, 2003; WAETZIG; HERDEGEN, 2004).

As vias de sinalização representam pontos fundamentais de propagação bem como de integração de sinais intracelulares o que torna bastante complexo estes sistemas de sinalização. Em células-tronco embrionárias tem sido demonstrado que LIF ativa a via de sinalização da Janus Quinase (JAK) resultando

na ativação de Stat3 (NAKASHIMA; COLAMARINO; GAGE, 2004). A ativação deste fator de transcrição é um elemento importante na manutenção da autorenovação de CTEs. Estímulo de CTEs com Wnt estabiliza  $\beta$ -catenina induzindo a transcrição de genes, mantendo o potencial de autorenovação da células-tronco (SATO *et al.*, 2004).

Em 2007 foi demonstrado o envolvimento da via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) na diferenciação de CTMs para fenótipo adipogênico, onde o bloqueio da mesma resultou na não diferenciação das CTMs para este fenótipo (YU *et al.*, 2007).

A via de ERK foi relatada para regular a proliferação e diferenciação de células de osso e de CTMs durante a diferenciação osteogênica. ERK também está envolvida e ativada na diferenciação de CTMs e na linhagem 3T3-L1 de células de pré-adipócitos nos adipócitos maduros. A ativação de p38 é requerida para induzir a diferenciação de CTMs para osteoblasto no rato, com aumento na expressão do gene Runx2 e osteocalcina, resultando em um aumento da matriz mineralizada. JNK e p38 foram relatados também como sendo ativados por uma variedade de citocinas em células osteoblásticas humanas e de ratos para regular a reabsorção do osso (CHEN *et al.*, 2007).

Desta forma, torna-se relevante a caracterização das vias de sinalização envolvidas nos processo de diferenciação de CTMs em fenótipo neural, onde são escassos os estudos.

## 1.5 O DESENVOLVIMENTO DO CEREBELO E SUA UTILIZAÇÃO COMO MODELO DE ESTUDO

Mesmo sendo uma estrutura de tamanho um tanto reduzido ao comparar com o encéfalo total (10% do volume), o cerebelo pode possuir mais de 50% das células nervosas existentes no encéfalo humano (KANDEL; SCHWARTZ; JESSELL, 2000). Deste modo, o cerebelo é formado por um complexo celular extremamente elaborado, rico em neurônios de associação, que resulta de uma série de movimentos de migração, em um sincronismo de diferenciação celular ímpar no SNC (PORCIONATTO, 2006)

O desenvolvimento do cerebelo começa ao final do segundo trimestre de gestação em humanos e durante o 13º dia embrionário (E13) em ratos. Progenitores neuronais migram dorsalmente, guiados pela MEC, a partir do lábio rômico para formar os núcleos cerebelares primordiais. A diferenciação destes progenitores ocorre principalmente entre o terceiro trimestre gestacional e o sexto mês de vida em humanos. Em ratos, esta diferenciação celular ocorre durante o período 8 pós-natal, entre o nascimento até a segunda semana (P0 – P14) (revisado por PORCIONATTO, 2006). Durante o período pós-natal, predominam células progenitoras de neurônios, principalmente progenitoras de neurônios granulares, as quais estão presentes em uma proporção 100 vezes maior que os progenitores de neurônios estrelados (ECCLES, 1970). Estas células se diferenciam gradualmente, ao decorrer de seguidas mitoses, de modo que no sexto dia predominam os neuroblastos de neurônios granulares. Um estudo recente demonstrou que mesmo depois de determinado período de diferenciação, durante o sétimo dia pós-natal (P7), 90% das células podem ser consideradas precursores de neurônios granulares e dos 10% restantes, aproximadamente 80% expressa o marcador de progenitores neurais Map-2 (LEE *et al.*, 2005). Além disto, neste mesmo estudo, foi demonstrada a existência de uma população de CTs multipotentes para neurônios e glia. Portanto, o cerebelo de ratos neonatos pode ser uma fonte interessante de progenitores neurais, além de CTs, e será utilizado como modelo de estudo neste trabalho.

## 1.6 TERAPIA CELULAR

As CTMs, juntamente com outros tipos de CTs e células progenitoras podem ter potencial para uso terapêutico em aplicações cardiovasculares. Estudos *in vivo* com animais mostraram resultados promissores em terapias cardíacas e vasculares, com CTMs promovendo a vascularização, podendo se diferenciar no tipo celular necessário (PARK *et al.*, 2007).

Tem sido investigada a utilização de CTMs em terapias celulares, principalmente em pacientes afetados com doenças neurodegenerativas, em razão ao seu potencial de diferenciação em progenitores neuro-gliais. Marcadores como nestina e neurofilamento são expressos durante o desenvolvimento do sistema

nervoso central (SNC) em células neuroepiteliais. Tal expressão também ocorre em CTs neurais de mamíferos adultos, podendo ser usada para identificar, em cultura, progenitores neurais de adultos. Estudos com CTMs de placenta têm relatado a expressão de diversos destes marcadores neurais. Alguns destes marcadores são expressos quando as células são induzidas a expressar este fenótipo. No entanto, outros são expressos sem tratamento específico (TONDREAU *et al.*, 2004). Apesar deste mecanismo não ser ainda bem compreendido, os estudos com CTMs visando a diferenciação neural desempenham um papel de suma importância na medicina regenerativa.

A presença de CTMs na placenta pode ter inúmeras implicações. Assim, devido a sua capacidade de diferenciação estas células podem ser importantes no uso terapêutico. Juntamente com o seu fácil acesso, ausência de problemas éticos e abundância celular, as CTMs de placenta podem ser uma alternativa atrativa para obtenção de CTs para pesquisa básica e aplicações clínicas.

Estudos em nosso laboratório demonstraram que CTMs obtidas de placenta humana possuem potencialidade para diferenciação, e estas quando induzidas, podem se diferenciar em diversos fenótipos, como adipócitos e condrócitos. Com base nestas observações nos perguntamos se as CTMs fossem mantidas em um microambiente neural, se poderiam diferenciar para fenótipo neural.

Neste mesmo contexto, esta dissertação visou investigar o potencial de diferenciação das CTMs de placenta humana para fenótipos neurais, em modelo de co-cultura com células astrocíticas de cerebelo de rato recém natos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a diferenciação *in vitro* de CTMs de placenta humana em fenótipo neural utilizando o sistema de co-cultura sobre células astrocíticas de ratos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Monitorar a indução fenotípica de CTMs, de diferentes passagens, em sistema de co-cultura com astrócitos cerebelares;
- b) Analisar o efeito da matriz extracelular, produzida pelos astrócitos, na indução para diferenciação neural das CTMs, bem como a influência do meio condicionado produzido pelos astrócitos nesta diferenciação;
- c) Verificar, nas CTMs, a possível expressão de genes marcadores de células indiferenciadas e diferenciadas;
- d) Investigar as vias de sinalização celular envolvidas no processo de diferenciação das CTMs.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PLACENTA HUMANA

As placentas foram obtidas através de colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no qual pacientes com saúde qualificada doaram suas placentas, após apresentação do termo de consentimento. Tal termo tem por objetivo esclarecer às doadoras, a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta será realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através de número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG, em processo de renovação.

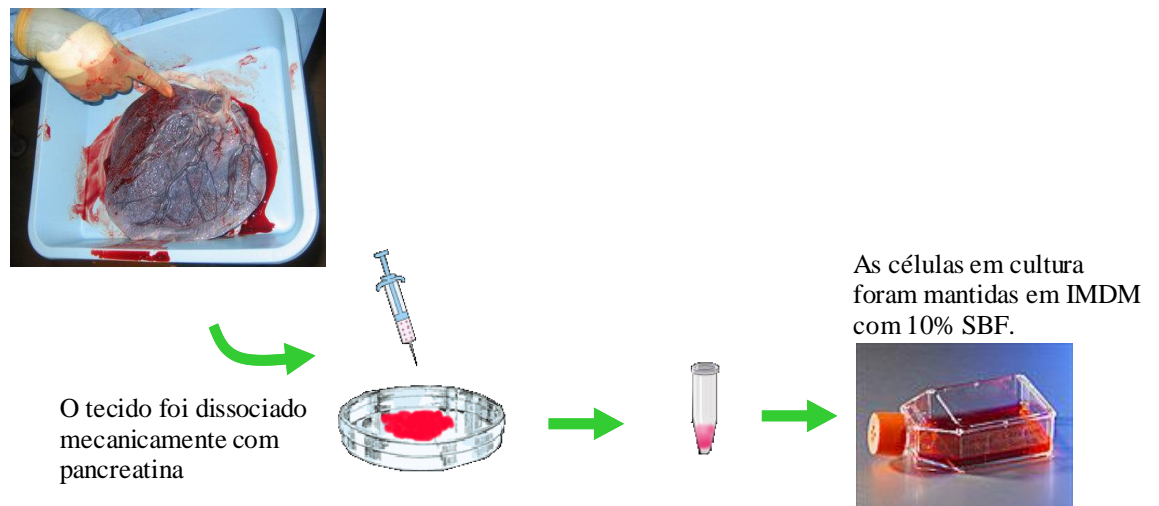
A placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril, contendo salina tamponada por fosfato (PBS) e encaminhada para cultura no Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular. Para realização das culturas, foi utilizada apenas a região da placenta localizada na parte fetal do anexo embrionário, próxima ao cordão umbilical.

#### 3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA

Fragmentos de placenta (aproximadamente 2 cm<sup>2</sup>) foram dissociados mecanicamente e digeridos enzimaticamente com pancreatina, por aproximadamente 20 minutos, em temperatura ambiente. O tecido foi dissociado homogeneamente e submetido à centrifugação (500g) durante 5 minutos e o *pellet* ressuspenso em IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab), penicilina/estreptomicina (Gibco) conforme orientações do fabricante. Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) e mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO<sub>2</sub> (Figura 2). Após 4 dias o meio de cultura foi trocado

e as células não aderidas foram descartadas. A troca do meio ocorreu periodicamente (3-4 dias), sempre havendo remoção das células não aderentes, selecionando, assim, as CTMs por sua adesão ao plástico.

Após duas semanas de cultura, quando a monocamada estava confluenta (80 a 90%), as células aderentes foram retiradas usando solução de tripsina e EDTA, lavadas com PBS e re-plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL em IMDM suplementado com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina (passagem 1).



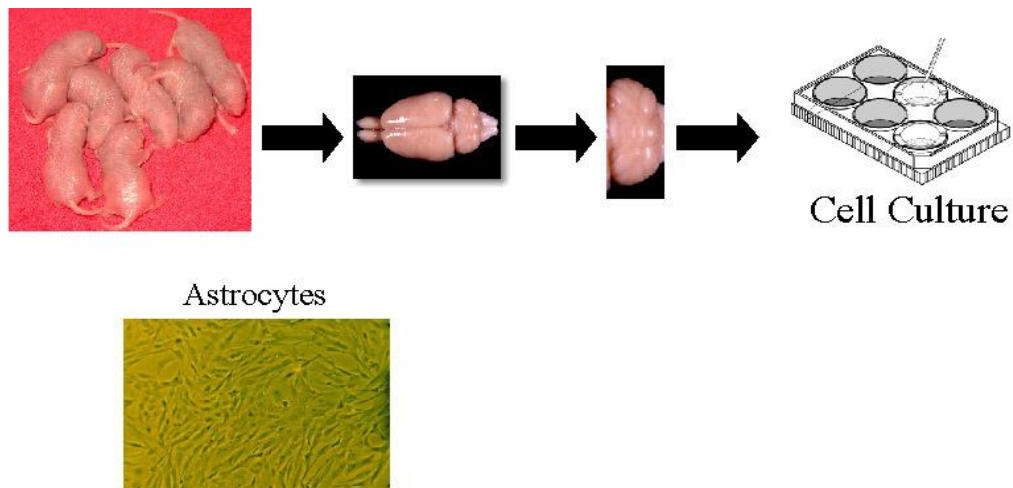
**Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a cultura de CTMs de placenta humana.**

### 3.3 ANIMAIS

Para a realização das culturas de astrócitos foram utilizados ratos Wistar recém-nascidos (0-3 dias) de ambos os sexos. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e sacrificados por decapitação, de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pelo CEUA (337) e UFSC (23080.007341/2005-81).

### 3.4 CULTURA DE ASTRÓCITOS

As culturas primárias de astrócitos foram obtidas de cerebelos de ratos neonatos. Após decapitação os encéfalos foram retirados da caixa craniana em fluxo laminar, em PBS-glicose. Os cerebelos foram separados e as meninges retiradas. O tecido foi picotado e dissociado manualmente com pipeta pasteur em PBS-glicose. As células foram centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços, sobre lamínulas de vidro preparadas previamente com poliornitina em solução 1,5mg/mL de poliornitina em PBS, na densidade de  $2,5 \times 10^5$  células (Figura 3).



**Figura 3. Desenho esquemático ilustrando a obtenção e cultura de células astrocíticas de ratos neonatos.**

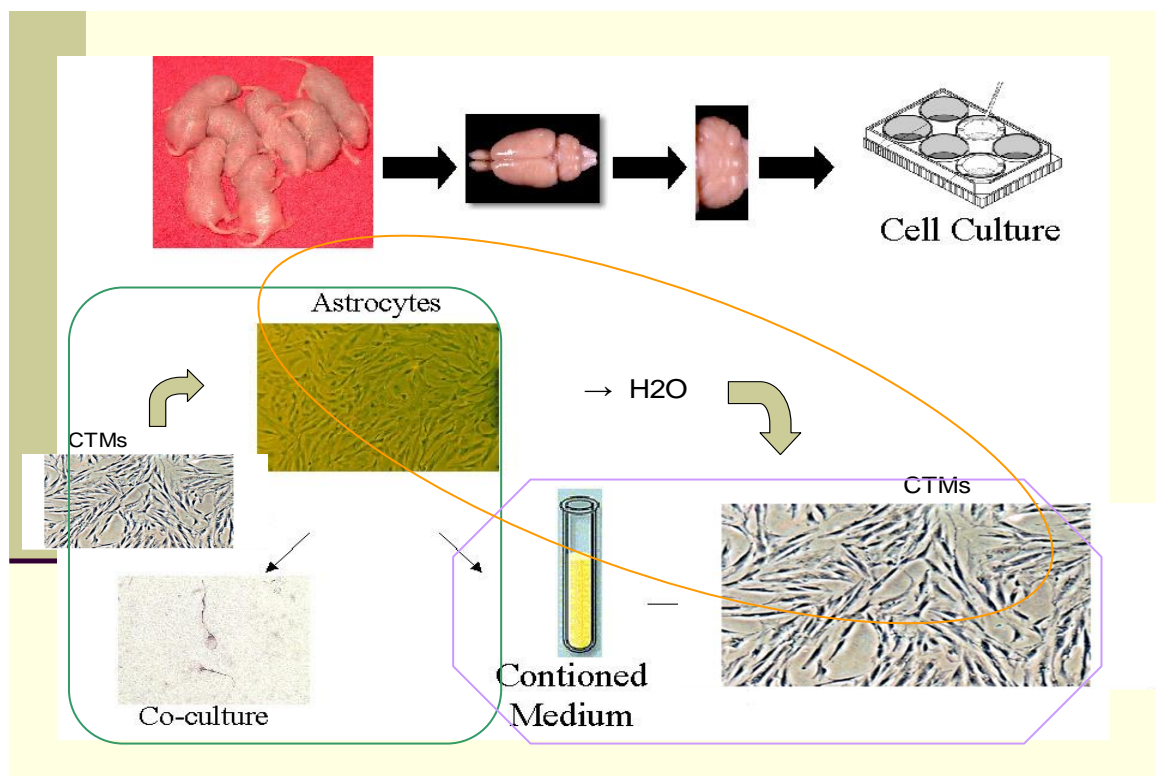
### 3.5 CO-CULTURA

Após confluência da cultura de astrócitos (80 – 90%), o que ocorre por volta de 11 dias, o DMEM-F12 com 10% de SBF foi substituído por DMEM-F12 sem SBF (a substituição do meio com SBF por meio sem SBF se deu para garantir que após os 14 dias só teríamos células astrocíticas, devido aos neurônios morrerem na

ausência de soro). Após 3 dias, totalizando 14 dias de cultura astrocitária, as CTMs (de baixa e alta passagem) foram plaqueadas sobre a monocamada de astrócitos, na densidade de  $10^4$  células, e mantidas em co-cultura durante 4 dias, suplementadas em IMDM com 10% SBF, para posterior análise da influência do contato celular entre CTMs e células astrocárias.

Para análise da influência da matriz produzida pelos astrócitos, estes após os 14 dias de cultura, foram retirados através de choque osmótico com água ultrapura (MilliQ), permanecendo assim só a MEC produzida por estes, e as CTMs, de diferentes passagens, foram plaqueadas sobre esta MEC, na mesma densidade anteriormente descrita e mantidas em IMDM com 10% de SBF, e ainda em outro experimento, com meio condicionado produzido pelos astrócitos, também por 4 dias.

Foram plaqueadas também somente CTMs, de ambas passagens, em placas de 24 poços, na mesma densidade acima descrita, e mantidas com meio condicionado de astrócitos, para análise da influência de fatores liberados pelos mesmos (Figura 4). Todos experimentos foram realizados em sextuplicatas.



**Figura 4. Desenho esquemático mostrando o procedimento de co-cultura.** No quadro verde temos a co-cultura onde as CTMs são plaqueadas sobre a monocamada de astrócitos. No quadro laranja temos a ilustração dos experimentos de MEC onde os astrócitos através de choque osmótico pela adição de água ultrapura, são removidos e as CTMs plaqueadas sobre a MEC produzida pelos mesmos. No quadro roxo, temos somente CTMs mantidas com meio condicionado produzido pelos astrócitos, para análise da influência de fatores liberados por estes.

### 3.6 TRAÇADOR CELULAR (C2110)

Para confirmar que o fenótipo estudado se refere às CTMs, foi usado um traçador celular específico de humanos que se incorpora na membrana plasmática de células vivas, se mantendo a longo prazo (Cell Tracker Blue C2110, Molecular Probes, Invitrogen). Este traçador foi adicionado ao meio de cultura de CTMs previamente no experimento de co-cultura. A detecção de CTMs foi feita por imunofluorescência.

### 3.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

As co-culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% e submetidas à reação imunocitoquímica onde foram utilizados marcadores específicos para os diferentes fenótipos, incluindo principalmente marcadores de fenótipo neural.

As células foram fixadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, sendo lavadas posteriormente com PBS. Tais células foram permeabilizadas com Triton X-100 durante 20 minutos e lavadas 3 vezes com PBS Tween. Sítios não específicos foram bloqueados com 10% de SBF. Logo após, estas células foram incubadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpos primários específicos humanos para determinados fenótipos. Após serem lavadas com PBS Tween, as células foram incubadas com anticorpo secundário durante 1 hora, em temperatura ambiente.

O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI). As células gliais foram identificadas pela presença da proteína fibrilar acida glial (GFAP). Para a identificação dos neurônios, foi utilizado o anticorpo anti-B-tubulina III. Para identificação de precursores neurais foi usado anticorpo anti-nestina.

Foram utilizados anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao Texas Red (TXRD). A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus BX 40.

### 3.8 REAÇÃO DE POLIMERASE EM CADEIA VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

As co-culturas foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e após 4 dias foi analisada a expressão de diferentes genes através da extração de RNA total para ensaios de RT-PCR. O meio de cultura foi removido e os RNAs totais destas amostras foram purificados utilizando reagente TRIZOL™, de acordo com as orientações do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total, obtido pela extração do RNA, utilizando um Kit para transcrição reversa ThermoScript RT-PCR System, conforme especificações do fabricante. Para a PCR foi utilizado o cDNA sintetizado e o produto da PCR foi visualizado em gel de agarose corado com brometo de etídeo e fotografado. Foi analisada a expressão de genes marcadores, como nestina, GFAP e B-tubulina III (Tabela 1). Foram realizadas RT-PCR de diferentes passagens de CTMs, com astrócitos em co-cultura, sobre matriz extracelular e com meio condicionado de astrócitos. Todos experimentos foram realizados em sextuplicatas. Para todos experimentos de RT-PCR foram realizados controle positivo das amostras com GAPDH, para confirmar a presença do cDNA, e controle negativo dos primers para descartar a possibilidade de contaminação dos mesmos. Todos os primers possuem especificidade para células humanas.

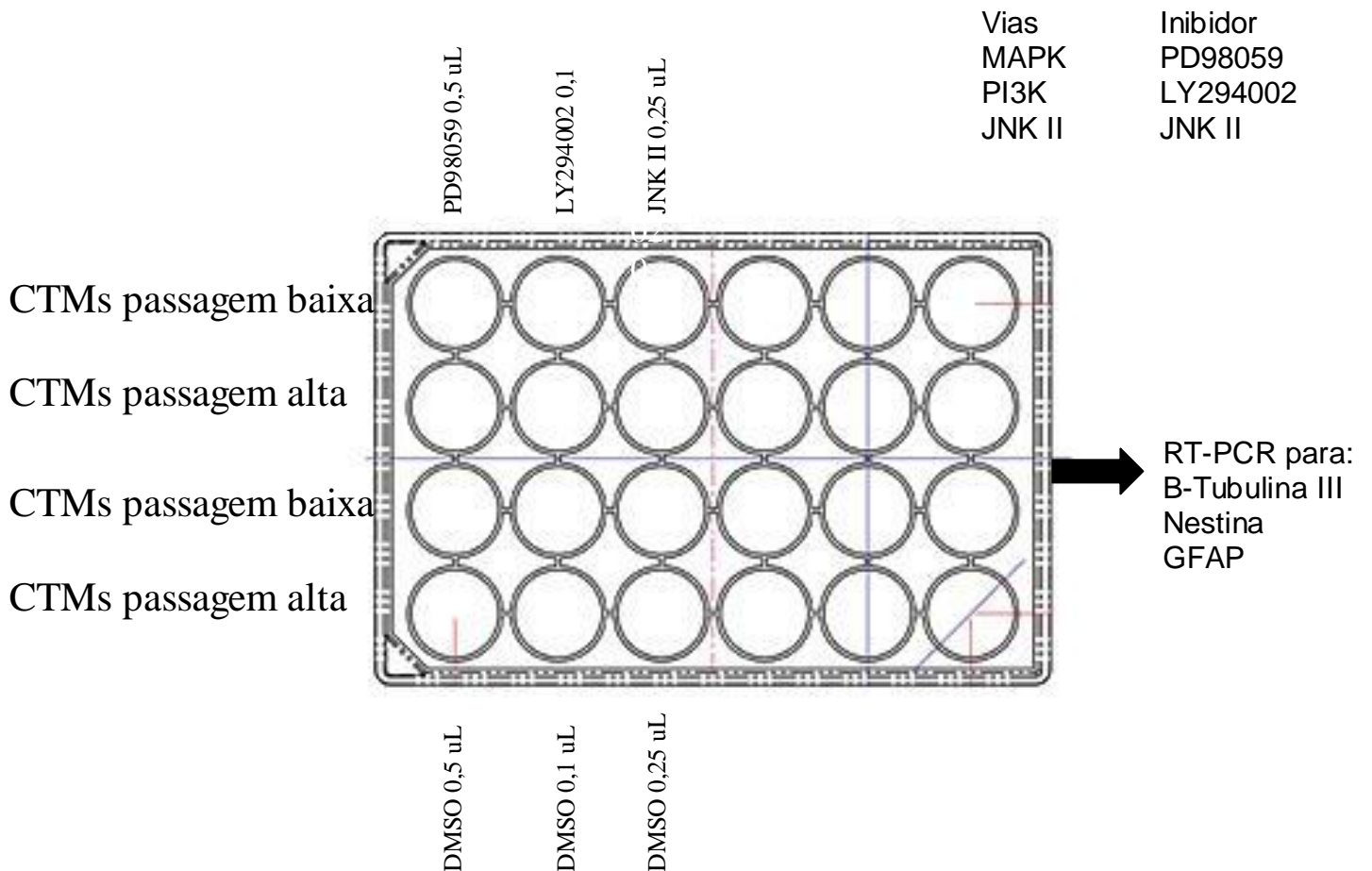
**Tabela 1. Primers utilizados para realização das PCR.**

Gene	Primers	Condições do PCR	pb
B-tubulina III	5'-AGATGTACGAAGACGACGAGGAG-3' 5'-GTATCCCCGAAAATATAAACACAAA-3'	34 ciclos: 58.5 <sup>o</sup> C	312
Nestina	5'-CAGCTGGCGCACCTCAAGATG-3' 5'-AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG-3'	35 ciclos: 64 <sup>o</sup> C	208
GFAP	5'-GTGGGCAGGTGGGAGCTTGATTCT-3' 5'-CTGGGGCGGCCTGGTATGACA-3'	34 ciclos: 65 <sup>o</sup> C	387
GAPDH	5'-ATGAGGTCCACCACCCTGTT-3' 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'	34 ciclos: 60 <sup>o</sup> C	441

### 3.9 INIBIDORES DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR

CTMs foram tratadas com 50 $\mu$ M PD98059 (inibidor MAP kinase), 10  $\mu$ M LY294002 (inibidor phosphatidylinositol 3-kinase), 10 $\mu$ M JNK inhibitor II (todos Calbiochem). O tratamento foi feito durante 4 dias. A avaliação do envolvimento destas vias na possível diferenciação foi feita por análise de RT-PCR.

Células Tronco Mesenquimais + 500  $\mu$ L meio condicionado produzido pelos astrócitos + inibidor diluído em DMSO ou só DMSO (controle) :

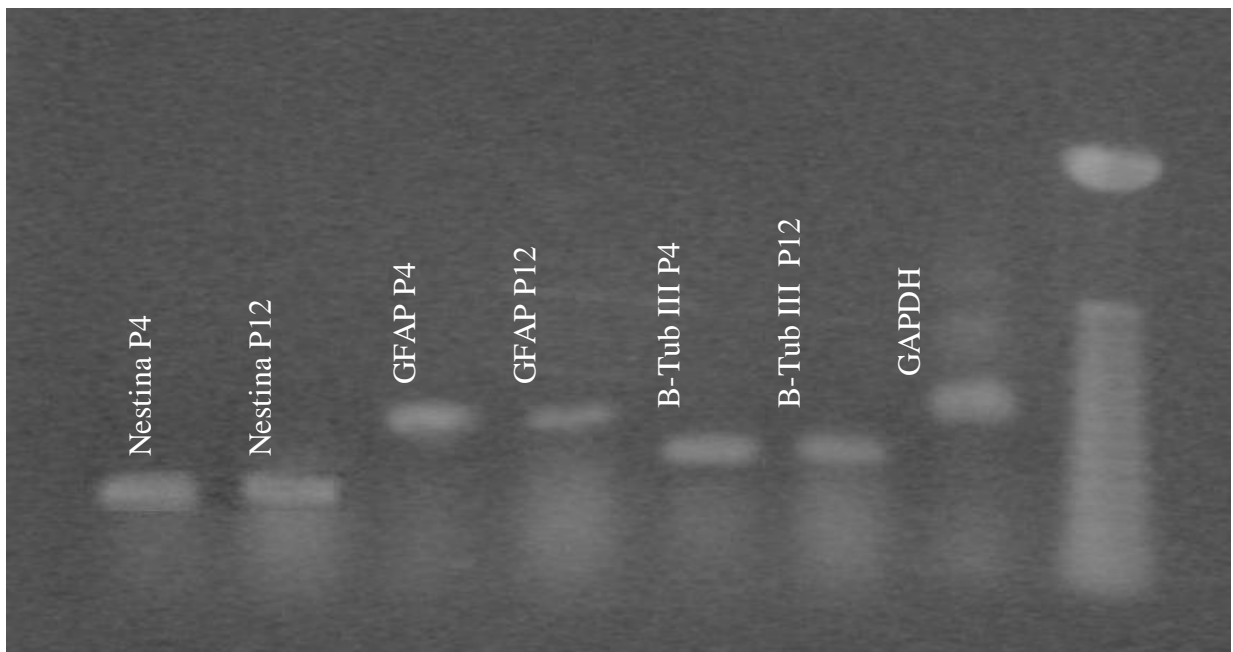


**Comitê de Bioética Humana e de Animais:** Este Projeto foi aprovado pelo: Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina através de número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

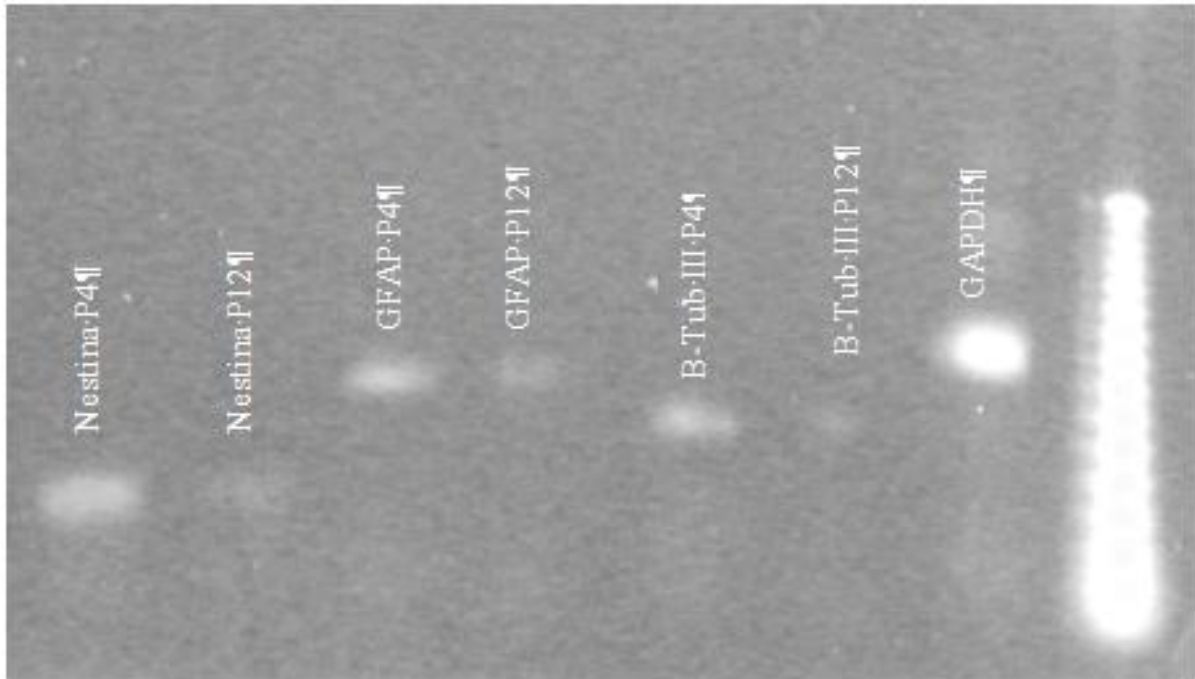
Inicialmente analisamos a expressão dos genes acima relacionados em CTMs controle em diferentes passagens (P4 e P12) (Figura 5), nos experimentos de co-cultura (Figura 6) e também nas células astrocíticas de cerebelo de ratos (Figura 7).



**Figura 5. Expressão gênica de CTMs controle, sem indução.** Expressão dos genes: precursor neural (Nestina), células glias (GFAP) e neuronais (B-Tubulina III) em células de baixa (P4) e alta passagem (P12). Controle positivo GAPDH.

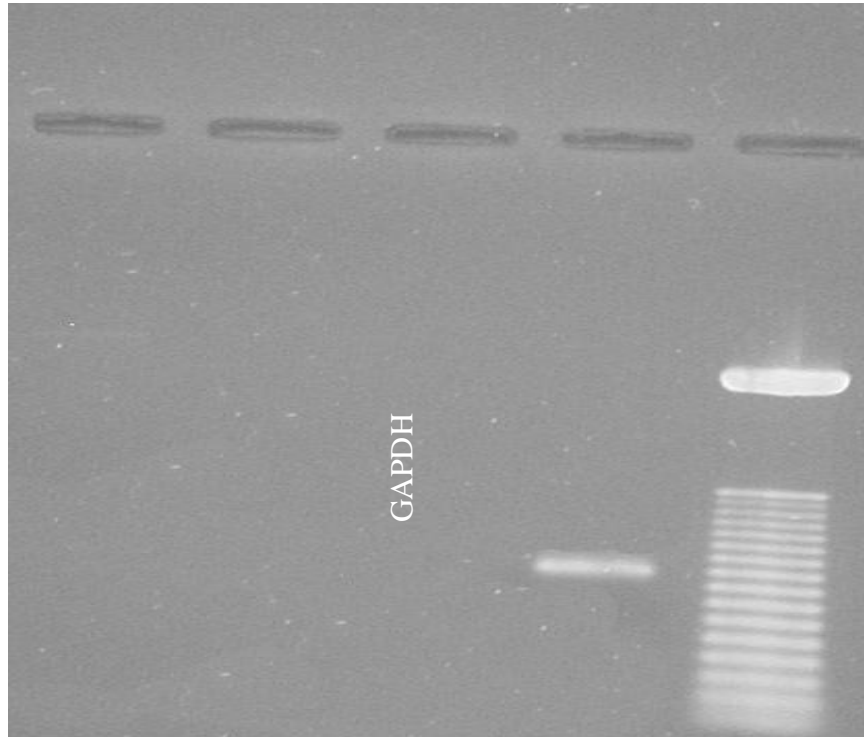
Observamos a expressão gênica de todos os marcadores humanos utilizados, tanto em CTMs de passagem baixa assim como de passagem alta.





**Figura 6. Expressão gênica nas CTMs em co-cultura.** Expressão dos genes: precursor neural (Nestina), células gliais (GFAP) e neuronais (B-Tubulina III) em células de baixa (P4) e alta (P12) passagem respectivamente. Controle positivo GAPDH.

A figura 6 nos mostra a expressão gênica de CTMs quando em co-cultura com células astrocitárias de ratos neonatos, mostrando que estas, em diferentes passagens, mantém sua expressão. Os mesmos resultados foram observados nos experimentos em que CTMs foram plaqueadas sobre matriz extracelular produzida pelos astrócitos, tanto tratadas com IMDM quanto com meio condicionado de astrócitos neonatos. Também observamos os mesmos resultados quando CTMs foram mantidas apenas em meio condicionado de astrócitos neonatos.



**Figura 7. Expressão gênica das células astrocíticas de ratos.** RT-PCR para Nestina, GFAP, e B-Tubulina III em astrócitos, onde não ocorreu a marcação. GAPDH controle positivo.

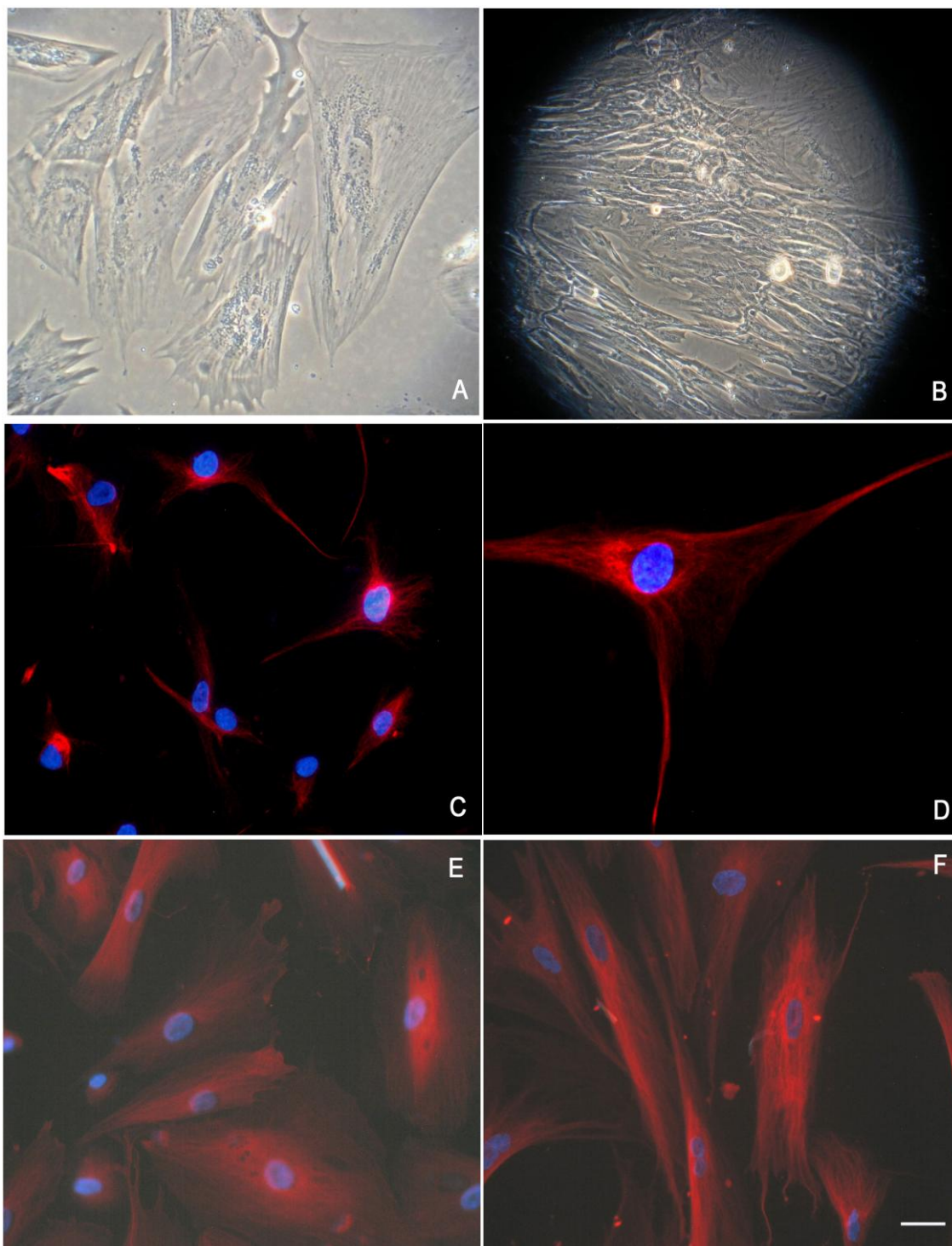
A figura 7 nos mostra que a expressão gênica dos marcadores utilizados, Nestina, GFAP e B-Tubulina III não ocorreu em células astrocíticas de ratos neonatos, mostrando a especificidade dos oligonucleotídeos utilizados nestes ensaios pelas células humanas.

## 4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA E IMUNOFENOTÍPICA

### 4.2.1 CTMs

As CTMs controle, quando em cultura, sem indução, selecionadas pela sua aderência a placa, apresentaram uma morfologia fibroblastóide, tanto em células de baixa (P4) quanto de alta passagem (P12) (Figura 8A e 8B respectivamente). Através de imunocitoquímica, observamos que estas expressaram Nestina (Figura 8C,D) e B-Tubulina III (Figura 8E,F), mas não expressaram GFAP (não

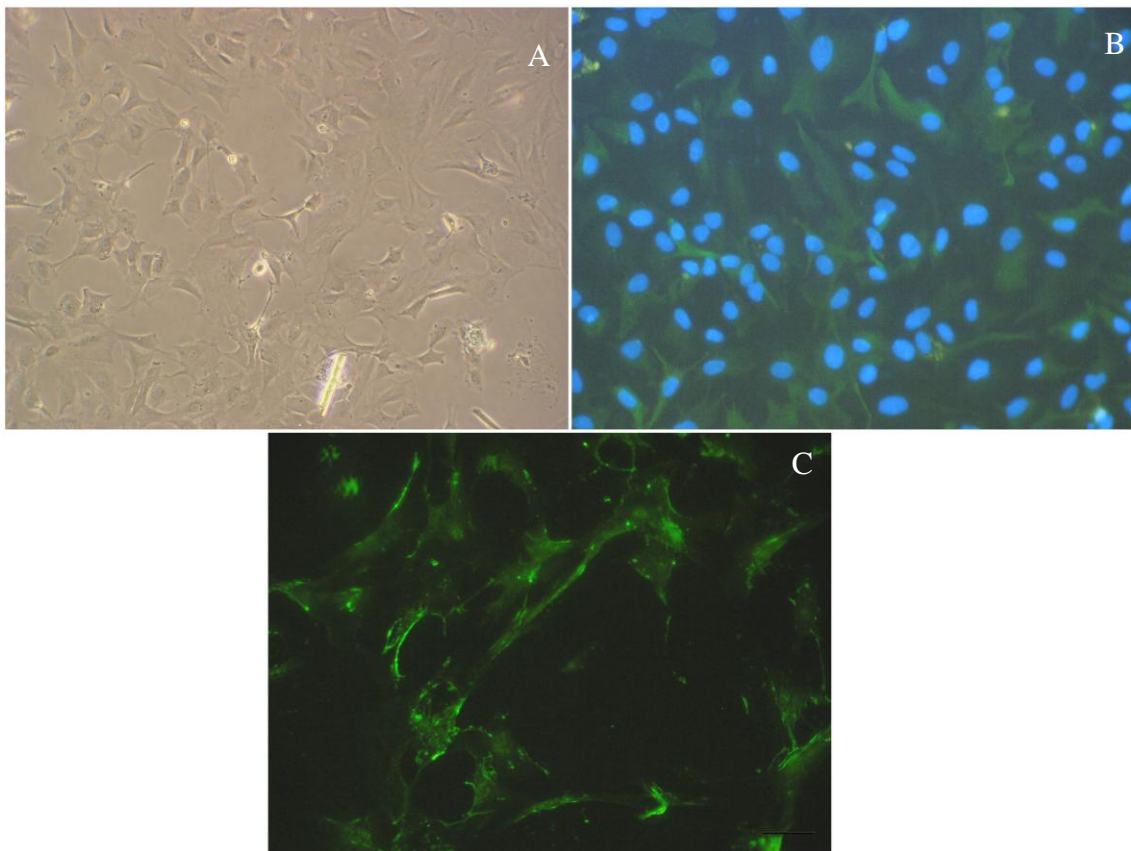
demonstrado). A expressão de Nestina e B-Tubulina III ocorreu em células de morfologia fibroblastóide, sugerindo que não houve diferenciação para o fenótipo neural.



**Figura 8. CTMs.** Morfologia de CTMs controle em cultura (A,B), microscópio de contraste de fase. As CTMs expressaram marcadores como Nestina (C,D) e B-tubulina III (E,F). A, C, E baixa passagem (P4). B, D, F alta passagem (P12). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e em azul os núcleos-DAPI. CTMs de baixa e alta passagem respectivamente. Barra: 40um.

#### 4.2.2 Células astrocitárias

Antes de iniciar os experimentos de co-cultura, analisamos a morfologia dos astrócitos do cerebelo de ratos neonatos (Figura 9A) e também a expressão dos marcadores Nestina, GFAP e B-Tubulina III nestas células, porém não houve marcação, devido à especificidade dos anticorpos por células humanas. Fizemos então marcação para GFAP murino para mostrar a existência e morfologia das células astrocitárias (Figura 9B). Para demonstrar a remoção dos astrócitos com água ultrapura e a existência da matriz produzida pelos mesmos fizemos marcação para fibronectina (Figura 9C).



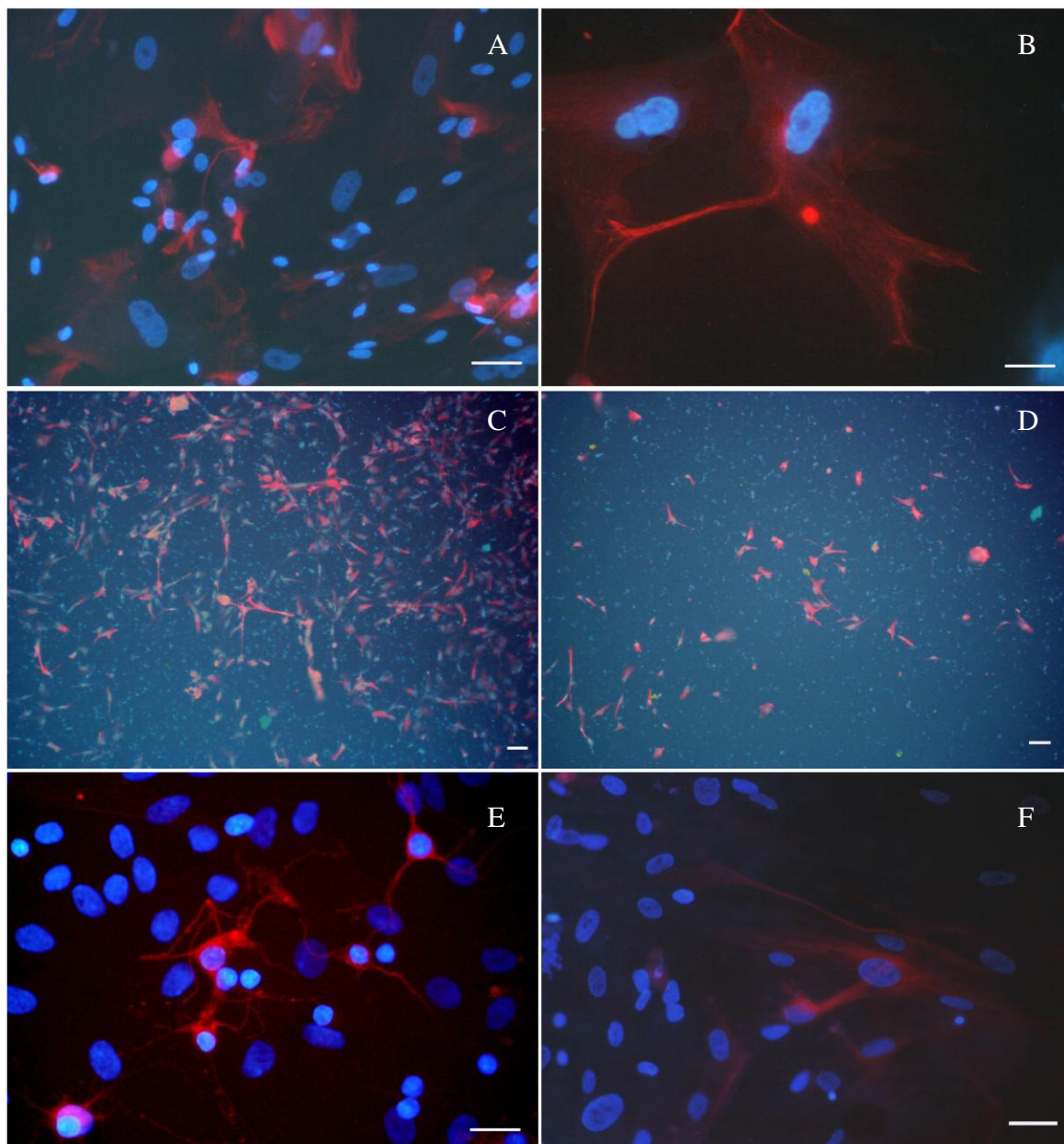
**Figura 9. Células astrocitárias e matriz extracelular.** Células astrocitárias de cerebelo de ratos neonatos (A) em microscópio de contraste de fase. Em B sobreposição de astrócitos e seus núcleos em imunocitoquímica para GFAP murino (Verde-GFAP e Azul-Núcleos-DAPI). Em C mostramos a matriz extracelular produzida pelos astrócitos após a retirada dos mesmos com água ultrapura. Barra = 40µm.

### 4.2.3 CTMs em co-cultura

As CTMs quando em co-cultura com células astrocíticas, durante 4 dias, expressaram marcadores como Nestina (Figura 10A,B), GFAP (Figura 10C,D), e B-Tubulina III (Figura 10E,F), tanto nas células de baixa quanto de alta passagem respectivamente. Podemos analisar também que a morfologia das CTMs quando em co-cultura, são alteradas para um fenótipo neural, sugerindo assim que houve diferenciação.

Não foram realizadas marcações cruzadas, ou seja, duas marcações no mesmo poço, devido ao fato de todos os anticorpos usados terem o mesmo anticorpo secundário, evitando assim, marcações inespecíficas.



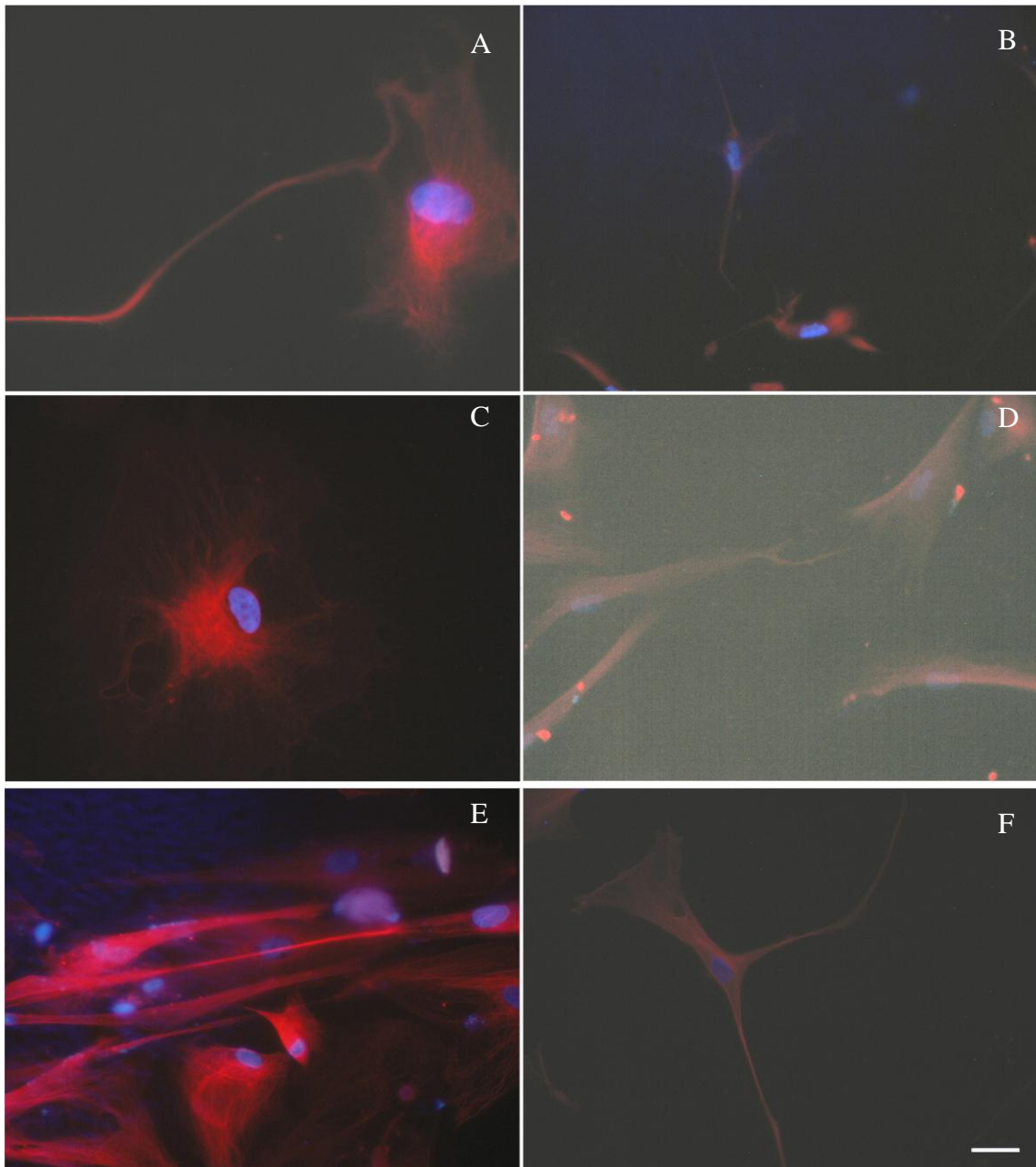


**Figura 10. CTMs em co-cultura.** Expressão de Nestina (A,B), de GFAP (C,D) E B-Tubulina III (E,F) em CTMs de baixa e alta passagem respectivamente. A, C, E baixa passagem (P4). B, D, F alta passagem (P12). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e em azul os núcleos-DAPI. Barra = 40um.

#### 4.2.4 CTMs em matriz extracelular

Após a remoção dos astrócitos com água ultrapura, as CTMs foram plaqueadas sobre a MEC produzida pelos mesmos, e mantidas em IMDM ou meio condicionado derivado de astrócitos. As CTMs mantidas somente em IMDM não

expressaram nenhum dos marcadores, porém as CTMs mantidas no meio condicionado expressaram os marcadores Nestina (Figura 11A,B), GFAP (Figura 11C,D) e B-Tubulina III (Figura 11E,F), em passagens baixas e altas respectivamente. Neste experimento também analisamos mudança morfológica das CTMs, sugerindo que embora o contato celular seja de suma importância para diferenciação das CTMs no fenótipo neural, o mesmo resultado é obtido apenas na presença de matriz extracelular e meio condicionado produzido pelos astrócitos.



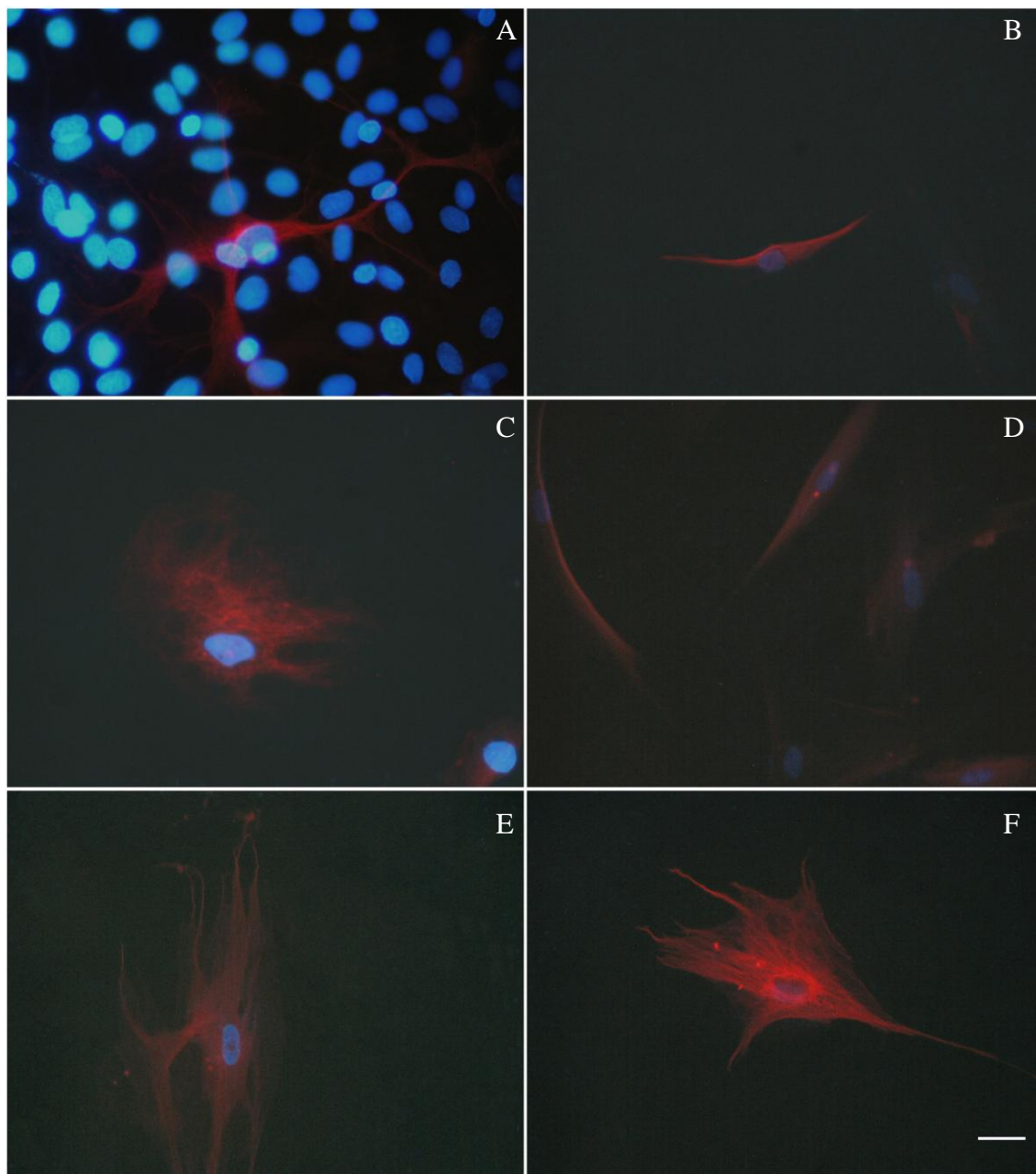
**Figura 11. CTMs em matriz extracelular tratadas com meio condicionado.** Expressão de Nestina (A,B), de GFAP (C,D) E B-Tubulina III (E,F) em CTMs de baixa e alta passagem respectivamente. A, C, E baixa passagem (P4). B, D, F alta passagem (P12). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e em azul os núcleos-DAPI. Barra = 40um.

#### 4.2.5 CTMs tratadas com meio condicionado

Diante dos resultados obtidos, fomos analisar se somente com o meio condicionado de astrócitos teríamos os mesmos resultados. Então plaqueamos somente CTMs e as tratamos com o meio condicionado de astrócitos durante 4 dias, e obtivemos os mesmos resultados. Estas células expressaram ambos os marcadores: Nestina (Figura 12A e B), GFAP (Figura 12C e D) e B-Tubulina III (Figura 12E e F), em passagens baixas e altas. Também apresentaram diferenciação morfológica, sugerindo sua diferenciação.

Estes resultados sugerem que o contato celular e a influência da matriz extracelular na diferenciação neural são de grande importância, porém um fator essencial para que ocorra a diferenciação celular das CTMs são os fatores produzidos e liberados pelos astrócitos.





**Figura 12. CTMs tratadas com meio condicionado.** Expressão de Nestina (A,B), de GFAP (C,D) E B-Tubulina III (E,F) em CTMs de baixa e alta passagem respectivamente. A, C, E baixa passagem (P4). B, D, F alta passagem (P12). Microscópio de imunofluorescência, onde em vermelho temos as marcações celulares e azul os núcleos-DAPI. Barra = 40um.

**Tabela 2. Análise da Expressão Gênica.**

	<b>Nestina</b>	<b>GFAP</b>	<b>B-tub III</b>
CTMs controle – sem indução	+	+	+
Só astrócitos	-	-	-
Co-cultura	+	+	+
Mec + CTMs + mca	+	+	+
Mec + CTMs + IMDM	+	+	+
CTMs + mca	+	+	+

**Tabela 3. Análise Imunofenotípica.**

	<b>Nestina</b>	<b>GFAP</b>	<b>B-tub III</b>
CTMs controle – sem indução	+	-	+
Só astrócitos	-	-	-
Co-cultura	+	+	+
Mec + CTMs + mca	+	+	+
Mec + CTMs + IMDM	-	-	-
CTMs + mca	+	+	+

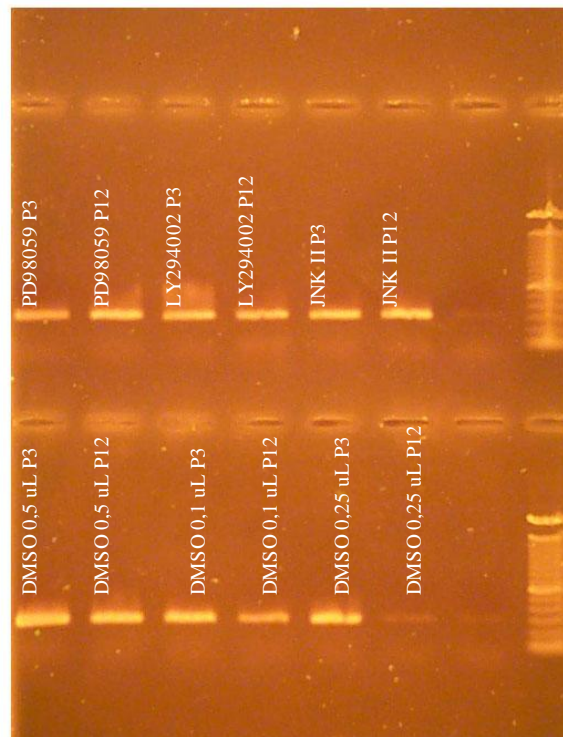
#### 4.3 ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO

Após a realização e análise dos experimentos de co-cultura, encontramos os mesmos resultados somente tratando CTMs com meio condicionado produzido pelos astrócitos. Sendo assim, os experimentos para análise das vias de sinalização envolvidas na diferenciação celular encontrada, foram realizados com CTMs

tratadas com meio condicionado, juntamente com o inibidor das vias estudadas, diluído em DMSO e o respectivo controle com somente DMSO, na concentração descrita acima.

#### 4.3.1 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo neuronal - B-Tubulina III

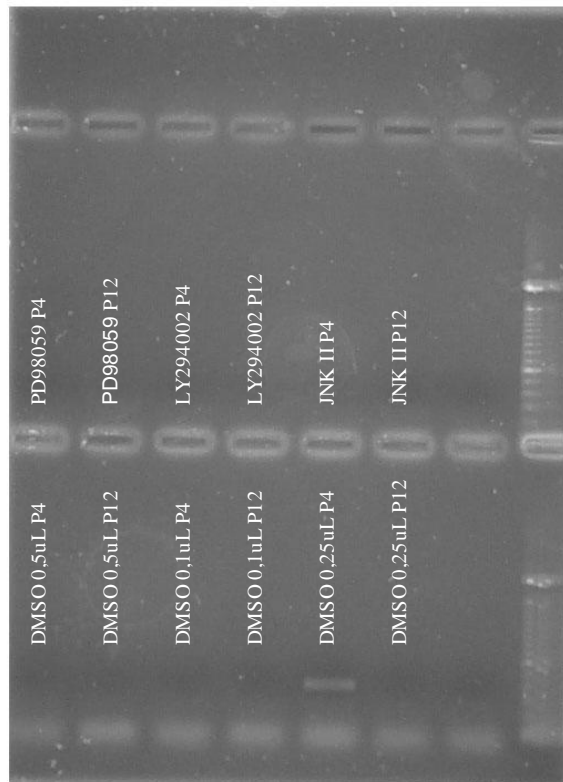
Nossos resultados demonstraram que nenhuma das vias estudadas está envolvida na diferenciação celular de CTMs para o fenótipo neuronal - B-Tubulina III (Figura 13).



**Figura 13. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – B-Tubulina III.** CTMs foram tratadas com meio condicionado produzido pelos astrócitos juntamente com 0,5 uL de PD98059, inibidor da via MAPK, 0,1 uL de LY294002 inibidor da via PI3K, e 0,5 uL de JNK II inibidor da via JNK II em células de baixa e alta passagem, bem como seus respectivos controles. A expressão gênica para B-Tubulina III foi avaliada por RT-PCR. Controle negativo de oligonucleotídeo e padrão de 100pb.

### 4.3.2 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo neural – GFAP

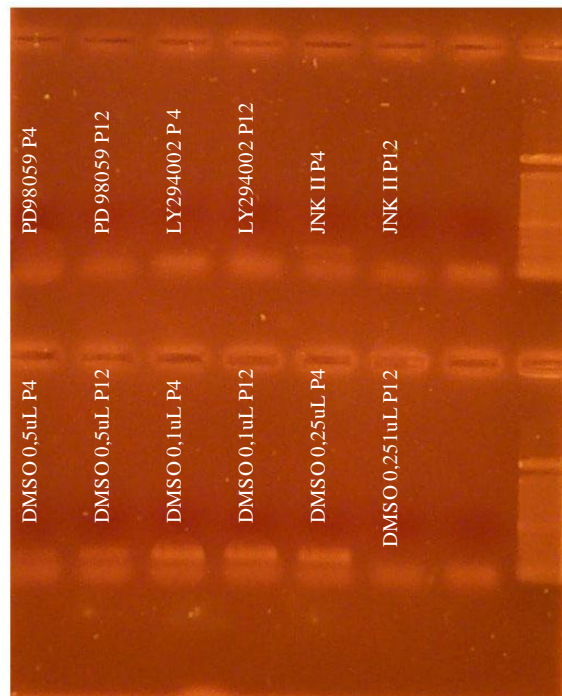
Os experimentos realizados nos mostraram que CTMs, após o tratamento com os inibidores das vias estudadas, não diferenciam para o fenótipo neural GFAP (Figura 14), sugerindo o envolvimento destas vias nessa diferenciação. Porém os controles apenas com DMSO também são inibidos, com exceção do controle da via JNK II em células de baixa passagem.



**Figura 14. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – GFAP.** CTMs foram tratadas com meio condicionado produzido pelos astrócitos juntamente com 0,5 uL de PD98059, inibidor da via MAPK, 0,1 uL de LY294002 inibidor da via PI3K, e 0,5 uL de JNK II inibidor da via JNK II em células de baixa e alta passagem, bem como seus respectivos controles. A expressão gênica para GFAP foi avaliada por RT-PCR. Controle negativo de oligonucleotídeo e padrão de 100pb.

### 4.3.3 Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de CTMs para fenótipo precursor neural – nestina

Observamos que as CTMs quando tratadas com PD98059, inibidor da via MAPK e LY294002 inibidor da via PI3K, não expressaram marcadores de célula precursor neural – nestina, em ambas passagens celulares (Figura 15), sugerindo estas vias estarem envolvidas nesta diferenciação. Os respectivos controles não alteraram a expressão. Já a via JNK II não parece estar envolvida nesta diferenciação uma vez que não inibiu a diferenciação em células de baixa passagem. Em células de alta passagem ocorreu a inibição, inclusive do controle.



**Figura 15. Vias envolvidas na diferenciação de CTMs – Nestina.** CTMs foram tratadas com meio condicionado produzido pelos astrócitos juntamente com 0,5 uL de PD98059, inibidor da via MAPK, 0,1 uL de LY294002 inibidor da via PI3K, e 0,5 uL de JNK II inibidor da via JNK II em células de baixa e alta passagem, bem como seus respectivos controles. A expressão gênica para nestina foi avaliada por RT-PCR. Controle negativo de oligonucleotídeo e padrão de 100pb.

## 5 DISCUSSÃO

Como já bem descrito na literatura, as CTMs estão distribuídas em uma variedade de tecidos do organismo humano adulto, como medula óssea, pulmão, fígado e rins. Em 2006, Miao e colaboradores demonstraram que a placenta humana também é uma fonte de CTMs, onde utilizando técnicas de cultura, estas podem ser isoladas e expandidas *in vitro*. Esta cultura inicial possui células fibroblastóides e não fibroblastóides, onde após o aumento de passagens com digestão enzimática, permanecem somente células fibroblastóides. Este trabalho é consistente com as observações do nosso estudo, onde nossos resultados demonstram que as CTMs de placenta humana, utilizando técnicas de cultura, podem ser expandidas *in vitro* e apresentam células aderentes com morfologia fibroblastóide.

Em nosso modelo de estudo inicialmente avaliamos a expressão gênica de CTMs de placenta humana. Demonstramos que as CTMs de baixa (P4) e alta (P12) passagem expressam os genes necessários para diferenciação em células gliais, precursores neurais e neurônios. A mesma observação ocorre quando as CTMs são co-cultivas com células astrocíticas de ratos neonatos. Quando plaqueadas somente em matriz extracelular e tratadas com meio condicionado produzido pelos astrócitos ou meio de cultivo normal esta expressão se mantém. O mesmo resultado é observado quando CTMs são tratadas com meio condicionado. Dados da literatura afirmam que as CTMs de MO possuem expressão dos genes relacionados as três camadas germinativas (WOODBURY; REYNOLDS; BLACK, 2002).

Quando analisamos os mesmos genes em células astrocíticas, vimos que estes não são expressos, garantindo assim a especificidade dos mesmos por células humanas, além de servir como um bom controle dentro da análise da técnica. Com isto foi possível uma abordagem referente às diferenças na expressão gênica comparando somente CTMs com estas co-cultivadas sobre a monocamada de astrócitos. Com a referida especificidade dos reagentes, analisamos a variação morfológica e expressão protéica de CTMs.

Um estudo tem demonstrado, que CTMs da MO são capazes de diferenciação à neurônios e glia, quando co-cultivadas com astrócitos do cérebro de ratos neonatos (LEI *et al.*, 2007). Nossos estudos demonstraram que as CTMs da placenta humana possuem a mesma plasticidade quando comparadas com as de

medula óssea. As CTMs, mesmo sem indução, expressam os marcadores Nestina e B-Tubulina III, mas não expressam GFAP, em células de baixa e alta passagem. Entretanto a morfologia das células se manteve fibroblastóide, indicando que não houve indução fenotípica. A expressão de proteínas marcadoras pode ser um padrão importante dentro da plasticidade que a célula possui para rápida diferenciação quando desafiada em um meio indutivo específico. Rápidas mudanças fenotípicas podem acontecer quando as CTMs já possuem um certo número de proteínas expressas no seu citoplasma, favorecendo sua diferenciação (PITTENGER *et al.*, 1999). Quando plaqueamos CTMs sobre monocamada de astrócitos, vimos que estas expressam além dos marcadores já expressos no controle, GFAP, em células de ambas passagens. Um ponto importante nos experimentos de co-cultura é a modificação na morfologia destas células. As células que antes possuíam morfologia fibroblastóide, passaram a exibir processos, resultando em uma morfologia neural.

Após estes resultados, surgiu a pergunta se esta diferenciação seria devido ao contato celular das CTMs com as células astrocíticas; decorrente da influência da matriz produzida por estas, ou ainda, consequência dos fatores secretados pelas células astrocíticas, tornando-se este o próximo objeto de estudo. Visto que em 2005, Wislet-Gendebien e colaboradores, observaram que para diferenciação de CTMs de medula óssea em fenótipo neural é de suma importância o contato célula-célula bem como o meio condicionado produzido por astrócitos.

Nossos resultados confirmam as observações de Wislet-Gendebien e colaboradores, pois observamos que, quando as CTMs são plaqueadas sobre a matriz produzida pelos astrócitos, estas só se diferenciam quando tratadas com meio condicionado produzido por estes, o que não ocorre quando suplementadas com meio de cultivo normal. Plaquear CTMs somente sobre a matriz extracelular obtida de astrócitos não é efetivo na mudança fenotípica com formação de processos. Este dado sugere que não há uma relevância da MEC no processo de diferenciação de CTMs. Entretanto quando plaqueadas sobre MEC e mantidas com meio condicionado derivado de astrócitos, as CTMs expressam todos os marcadores estudados, como GFAP, Nestina e B-Tubulina III, além de desenvolver processos, resultando em uma morfologia típica de células neurais. As CTMs tratadas somente com meio condicionado produzido pelos astrócitos também mantêm este perfil.

Estes resultados nos levam a concluir que embora o contato celular seja importante, o fator relevante para que ocorra a diferenciação das CTMs são os fatores produzidos pelas células astrocíticas de ratos neonatos.

Na tentativa de quantificar a porcentagem de células que se diferenciaram, marcamos as células com o traçador celular Cell Tracker Blue (conforme descrito na metodologia), porém este não marcou as células o tempo necessário para realização dos experimentos, pois após a incubação, as células eram co-cultivadas durante quatro dias, e após fixadas, para realização de imunofluorescência. Neste tempo houve perda da marcação com o Cell Tracker Blue. Então, incubamos as CTMs com Hoescht, porém este também perdeu sua fluorescência antes do término dos experimentos similarmente ao Cell Tracker Blue. Tentamos também incubar as células com Brdu, mas estes só se incorporam as células em proliferação, e nem todas as células que se proliferam se diferenciam reciprocamente. Lembrando que as CTMs não podem ser quantificadas pela sua relação marcações-núcleo, pelo fato de estarmos trabalhando com um modelo de co-cultura, ou seja, dois tipos celulares no mesmo poço, e ainda devido a células diferenciadas diminuírem o tamanho nuclear. Sendo assim, não obtivemos sucesso na tentativa de quantificar as células. Entretanto foi possível avaliar que houve um grande número de células GFAP positivas após a co-cultura (figura 10C), sugerindo uma grande diferenciação para o fenótipo glial. Considerando a especificidade do anticorpo para células humanas, é possível que tenha havido para o fenótipo glial pelo menos uma diferenciação na ordem de aproximadamente 20-30%.

Dentro deste panorama, tivemos o interesse em estudar algumas vias de sinalização que poderiam estar envolvidas na indução fenotípica. Ao analisarmos quais das vias estudadas (PI3K, MAPK E JNK II) poderiam estar envolvidas na diferenciação para fenótipo neuronal através da expressão de B-Tubulina III, observamos que ao tratarmos as CTMs com os respectivos inibidores, a expressão deste marcador se manteve. Concluímos então que para este fenótipo, estas vias não estão envolvidas.

Seguindo o mesmo racional, avaliamos o fenótipo de precursor neural nestina positivo. Podemos analisar que as CTMs quando tratadas com PD98059, inibidor da via MAPK e LY294002 inibidor da via PI3K, não expressam marcadores de célula precursora neural – nestina, em passagens celulares baixas e altas, sugerindo que estas vias estão envolvidas nesta diferenciação. Os respectivos



controles não alteraram a expressão. Já a via JNK II não parece estar envolvida nesta diferenciação uma vez que o tratamento com JNK II inibidor não bloqueou a diferenciação em células de baixa passagem. Em células de alta passagem ocorreu a inibição, inclusive do controle, sugerindo que células com alta passagem são muito mais sensíveis ao solvente utilizado nestes estudos: DMSO.

Para o fenótipo glial, após o tratamento com os inibidores das vias estudadas, não ocorreu a expressão de GFAP, sugerindo o envolvimento destas vias nesse padrão de diferenciação. Porém os controles apenas com DMSO também são inibidos, com exceção do controle da via JNK II em células de baixa passagem. Wang em 1993, já havia demonstrado que o DMSO inibe a expressão do fenótipo adipogênico em CTMs (WANG; SCOTT, 1993). É possível que em nosso modelo experimental haja maior suscetibilidade de células dependendo de sua passagem in vitro ao DMSO, que pode modificar a expressão de proteínas marcadoras em CTMs.

## 6 CONCLUSÃO

- a) O modelo desenvolvido de co-cultura foi adequado para os objetivos propostos neste trabalho;
- b) As CTMs quando co-cultivadas com astrócitos cerebelares de ratos neonatos, diferenciam para fenótipo neural;
- c) O meio condicionado produzido pelas células astrocitárias é um importante fator indutivo para a diferenciação neural;
- d) As vias PI3K, MAPK E JNK II, parecem estar envolvidas na diferenciação de CTMs para células precursoras neurais e células gliais.
- e) CTMs obtidas de placenta podem ser manipuladas *in vitro* para um fenótipo de interesse como o neural.

## REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RÖNNBÄCK., L.; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. Nature Reviews Neuroscience., v.7, n.1, p.41-53. 2006.

ALBERTS, B. *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4<sup>th</sup>. New York: Garland Science, 2002.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature, v.410, p.37-40, 2001.

CHEN, T-H. *et al.* Sodium butyrate activates ERK to regulate differentiation of mesenchymal stem cells Biochemical and Biophysical Research Communications v.355, n.4, p.913-918, 2007.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. J Exp Biol, v.206, n.7, p.1107-1115, Apr. 1, 2003.

ECCLES, J. C. Neurogenesis and morphogenesis in the cerebellar cortex\*. Proc Natl Acad Sci, v.66, n.6, p.294-301, 1970.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors stem cells and their niche. Cell, v.116, p. 769-778, 2004.

FUKUCHI, Y. *et al.* Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. Stem Cells, v.22, n.5, p.649-658, sep. 1, 2004.

GARCEZ, R. Adesão, proliferação e migração de células do astrocitoma humano U-87 sobre fibronectina, laminina e colágeno IV e a expressão e organização de vimentina e GFAP. 2004. 75f. Dissertação - (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC - Brasil, 2004.

GARCIA-SEGURA, L. M.; CHOWEN, J. A.; NAFTOLIN, F. Endocrine glia: roles of glial cells in the brain actions of steroid and thyroid hormones and in the regulation of hormone secretion. Frontiers in Neuroendocrinology, v.17, n.2, p.180-211. 1996.

HINSCH, K.; ZUPANC, G. K. Isolation, cultivation, and differentiation of neural stem cells from adult fish brain. Journal of Neuroscience Methods, v.158, n.1, p.75-88, 2006.

In 'T ANKER, P. S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. Stem Cells, v.22, n.7, p.1338-1345, dec. 1, 2004.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M. Principles of neural science. 4<sup>th</sup> New York: McGraw-Hill, 2000.

KENDALL, M. D. Functional anatomy of the thymic microenvironment. J Anat., v.177, p.1-29, 1991.

LEE, A. *et al.* Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. Nature Neuroscience v.8, p.723-729, 2005.

LEI, Z. *et al.* Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Cell Biology International, v.31, n.9, p.916-923, 2007.

LIM, D. A.; ALVAREZ-BUYLLA, A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. Proc Natl Acad Sci, v.96, n.13, p.7526–7531, 1999.

LODISH, H. *et al.* Molecular Cell Biology. 4<sup>th</sup> . New York: W. H. Freeman & Co., 2002

MARTINEZ, R.; GOMES, F. C. A. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. Journal of Neuroscience Research, v.80, n.3, p.341-349, 2005.

MIAO, Z. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. Cell Biology International, v.30, n.9, p.681-687, 2006.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. Experimental Biology and Medicine, v.226, n.6, p.507-520, jun. 1, 2001.

NAKASHIMA, K.; COLAMARINO, S.; GAGE, F. H. Embryonic stem cells: staying plastic on plastic. Nature Medicine, v.10, p.23-24,2004.

PAPIN, J. A. *et al.* Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v.6, p.99-111, 2005.

PARK, J. S. *et al.* Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. Frontiers in Bioscience, v.12, p. 5098-5116, 2007.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, v.284, n.5411, p.143-147, Apr. 2, 1999.

PORCIONATTO, M. A. The extracellular matrix provides directional cues for neuronal migration during cerebellar development. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.39, p.313-320, 2006.

SATO, N. *et al.* Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nature Medicine, v.10, p.55-63, 2004.

SONG, X. *et al.* Germline Stem Cells Anchored by Adherens Junctions in the Drosophila Ovary Niches. Science, v.296, n.5574, June 7, 2002, p.1855-1857. 2002.

STREULI, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation Current Opinion in Cell Biology, v.11, n.5, p.634-640,1999.

SWEATT, J. D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. Current Opinion in Neurobiology, v.14, n.3, p.311-317, 2004.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. Nature Reviews Neuroscience, v.5, p.173-183, 2004.

TONDREAU, T. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. Differentiation, v.72, n.7, p.319-326, 2004.

TRENTIN, A. G. *et al.* Thyroid hormone induces cerebellar astrocytes and C6 glioma cells to secrete mitogenic growth factors. Am J Physiol Endocrinol Metab, v.281, n.5, p.1088-1094, nov. 1, 2001.

TRENTIN, A. G. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. J Endocrinol, v.189, n.2, p.189-197, may 1, 2006.

TRENTIN, A. G.; MOURA NETO, V. T3 affects cerebellar astrocyte proliferation, GFAP and fibronectin organization. Neuroreport, v.2, p.293-296,1995.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. Neuroscience Letters, v.361, n.1-3, p.64-67, 2004.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. Cell, v.116, n.5, p. 639-648, 2004.

WANG, H.; SCOTT, R. E. Inhibition of distinct steps in the adipocyte differentiation pathway in 3T3 T mesenchymal stem cells by dimethyl sulphoxide (DMSO). Cell Proliferation, v.26, p.55-66, 1993.

WISLET-GENDEBIEN, S. *et al.* Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. Stem Cells, v.23, n.3, p.392-402, mar. 1, 2005.

WONG, W.; SCOTT, J. D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v.5, p.959-970, 2004.

WOODBURY, D.; REYNOLDS, K.; BLACK, I. B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. Journal of Neuroscience Research, v.69, n.6, p.908-917, 2002.

YEN, B. L. *et al.* Isolation of multipotent cells from human term placenta. Stem Cells, v.23, n.1, p.3-9, jan. 1, 2005.

YU, W. *et al.* Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells Molecular and Cellular Biochemistry, nov. 2007.

ZHANG, Y. *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. Chinese Medical Journal, v.117, p.882-887, 2004.

ZHAO, S. *et al.* JAK2, complemented by a second signal from c-kit or flt-3, triggers extensive self-renewal of primary multipotential hemopoietic cells. The EMBO Journal, v.21, n.9, p.2159-2167, 2002.



# 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](#)