

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

JAIESA ZYCH

Análise *in vitro* do potencial cardiogênico de células mesenquimais de medula óssea humana e murina: efeitos de fatores biológicos e elétricos

RIO DE JANEIRO

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Jaiesa Zych

Análise *in vitro* do potencial cardiogênico de células mesenquimais de medula óssea humana e murina: efeitos de fatores biológicos e elétricos

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Orientador: Radovan Borojevic

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Zych, Jaiesa.

Análise *in vitro* do potencial cardiogênico de células mesenquimais de medula óssea humana e murina: efeitos de fatores biológicos e elétricos / Jaiesa Zych. – 2008.

Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências
Biomédicas, Rio de Janeiro, 2008.

Orientador: Radovan Borojevic

1. Diferenciação celular. 2. Células mesenquimais da medula óssea.
3. Eletroestimulação. 4. BMP2. 5. FGF4. 6. Ácido retinóico –
Dissertações. I. Borojevic, Radovan (Orient.). II. Universidade Federal
do Rio de Janeiro. Instituto de Pós-Graduação em Ciências
Morfológicas. III. Título.

Jaiesa Zych

Análise *in vitro* do potencial cardiogênico de células mesenquimais de medula óssea humana e murina: efeitos de fatores biológicos e elétricos

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Morfológicas.

Aprovada em:

Prof. Radovan Borojevic – PCM/UFRJ

Prof^a. Cristina Maeda Takiya – PCM/UFRJ

Prof^a. Maria Isabel Doria Rossi – PCM/UFRJ

Prof. Mauro Weyne Costa – IBCCF/UFRJ

AGRADECIMENTOS

Ao grande mestre e orientador, professor Radovan Borojevic, pelo qual expresse profunda admiração. Agradeço a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa. Seu profissionalismo e sua simplicidade foram alguns dos grandes argumentos que me convenceram a vir ao Rio de Janeiro.

A todos aqueles que de algum modo foram meus orientadores, cujas “orientações” algumas vezes me desorientaram completamente! Agradeço em especial às professoras Cláudia dos Santos Mermelstein, Cristina Maeda Takiya e Márcia Cury El Cheikh, e aos professores Mauro Costa, Márcio Nogueira de Souza e Cristiano Carvalho Coutinho.

À professora Valéria de Mello Coelho, merecedora de um agradecimento mais que especial e justo. A melhor revisora que eu poderia ter escolhido! Fez muito mais do que o esperado e foi fundamental para a melhoria do trabalho.

Agradeço ao idealizador inicial do projeto, Hamilton da Silva Júnior. Sempre me ajudando, através de sua extensa “rede de contatos e de informações”, a resolver os problemas que surgiram durante a execução do trabalho.

À Luciana Garzoni (e à equipe “cardiomiócito”), Alex Balduino, Rubens Giambroni Filho e Luis Euclides de Mello.

Aos amigos e colegas de laboratório que sempre se dispuseram a me ajudar.

À minha mãe e ao meu pai. Não desmerecendo o apoio científico, o apoio emocional é crucial. De minha família felizmente pude receber além de incentivo, forças para continuar. Mãe e pai queridos, muito obrigada. Sem o apoio de vocês, certamente eu não teria conseguido!

Ao Sandro. Sempre me fazendo rir e me dando ânimo.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho e para a minha formação, sinceramente,

Muito obrigada!

“A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu tamanho
original.”

(Albert Einstein)

“Não basta conquistar a sabedoria, é
preciso usá-la.”

(Cícero)

“Não há lugar para a sabedoria onde
não há paciência.”

(Santo Agostinho)

“O conhecimento chega, mas a
sabedoria demora.”

(Alfred Tennyson)

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas da medula óssea têm se mostrado como a grande promessa no reparo tecidual. Estas células apresentam notáveis propriedades de auto-renovação e podem diferenciar em muitos tipos celulares que dependem de fatores indutores específicos do microambiente. Neste sentido, é fato que células indiferenciadas respondem a forças externas e traduzem estes sinais em respostas biológicas.

Em particular, sabe-se que uma série de fatores participa da cardiogênese embrionária e que o reparo de um coração adulto danificado requer não somente a substituição das células que foram perdidas, mas também a integração celular eletromecanicamente sincronizada.

Segundo a literatura, o potencial de diferenciação de células mesenquimais de medula óssea em cardiomiócitos (CMs) em sistema de cultura ainda é controverso. Sendo assim, neste trabalho interessamo-nos por analisar *in vitro* o potencial cardiogênico de células mesenquimais adultas de medula óssea humana e murina. Para tal, consideramos o efeito da eletroestimulação (ES) e de fatores envolvidos na cardiogênese, incluindo BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*), FGF4 (*Fibroblast Growth Factor 4*) e ácido retinóico (AR).

Utilizando um sistema de ES para mimetizar os fatores elétricos ao qual CMs são submetidos, culturas de células mesenquimais da medula óssea humana e murina foram eletroestimuladas por 14 dias. No entanto, não houve diferenciação cardiogênica. As células não se orientaram em relação ao campo elétrico, mas tiveram a expressão de proteínas juncionais alterada. A adesão célula-célula foi aumentada em culturas murinas, enquanto a adesão célula-matriz extracelular foi aumentada em culturas humanas. Ambas as culturas celulares expressaram conexina 43, envolvida em junções comunicantes. A ES ainda promoveu o aumento do crescimento celular nas culturas, como verificado com 7 e 14 dias de tratamento. Para as análises dos efeitos de citocinas, culturas murinas foram tratadas por 21 dias e humanas por 14 dias com FGF4 50 ng/mL, FGF4+BMP2 50 ng/mL ou FGF4+BMP2 100 ng/mL. Nenhum dos tratamentos promoveu a diferenciação cardiogênica. O crescimento celular foi regulado positivamente pela adição de 50 ng/mL de FGF4 e verificou-se um efeito inibitório dependente de concentração usando as combinações FGF4+BMP2 50 ng/mL e 100 ng/mL. No caso de culturas tratadas com AR 1 μ M por 45 dias, também não se observou diferenciação cardiogênica. Por outro lado, verificou-se um efeito deste fator sobre o crescimento celular de culturas murinas, mas não de humanas. O AR promoveu o acúmulo de lóculos lipídicos nas culturas murinas, o que não ocorreu nas humanas.

Nossos dados demonstram que células mesenquimais de medula óssea murina e humana adultas em cultura apresentaram diversas respostas fisiológicas aos estímulos de ES, BMP2, FGF4 e AR. No entanto, nas condições utilizadas, as células mesenquimais não foram capazes de diferenciar em linhagens cardíacas.

ABSTRACT

Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) have been shown to be promising in tissue repair. They are auto-renewable and can differentiate into many cellular types that depend upon specific inductive factors into microenvironment. The undifferentiated cells respond to external inducers and translate these signals into biological responses.

It is known that a series of factors participates in embryonic cardiogenesis and that repair of injured adult heart not only requires substitution of lost cells, but also synchronized electromechanically cellular integration.

According to the literature, the differentiation potential of bone marrow mesenchymal cells in cardiomyocytes (CMs) in culture system is still controversial. In this work our interest was to analyze *in vitro* the cardiogenic potential of human and murine adult bone marrow mesenchymal cells. Therefore, we studied the electrical stimulation (ES), and factors involved in cardiogenesis, including BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2), FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4) and retinoic acid (AR).

Using an electrical stimulation system that mimics electrical impulses to which CMs are submitted, murine and human bone marrow mesenchymal cell cultures were electrically stimulated for 14 days. However, there was no cardiogenic differentiation. Cells were not guided in relation to electric field, but they had modified expression of junctional proteins. Cell-cell adhesion was increased in murine cultures, while cell-extracellular matrix was increased in human cultures. Both cell cultures expressed connexin 43, involved in communication junctions. ES promoted the increase of cellular growth in cultures, as verified with 7 and 14 days of treatment. For analyses of cytokine effects, murine cultures were treated for 21 days and human for 14 days with cytokines FGF4 50 ng/mL, FGF4+BMP2 50 ng/mL or FGF4+BMP2 100 ng/mL. None of the treatments promoted cardiogenic differentiation. Cellular growth was positively regulated by FGF4 50 ng/mL addition and a dose dependent inhibitory effect using combinations FGF4+BMP2 50 ng/mL and 100 ng/mL was observed. In the case of cultures treated with AR 1 μ M for 45 days, we also did not observe cardiogenic differentiation. On the other hand, this factor modified cell growth in murine but not human cultures. AR promoted accumulation of lipid droplets in murine cultures, which did not occur in human cultures.

Our data demonstrate that murine and human adult bone marrow mesenchymal cell cultures present diverse physiological responses to stimulations with ES, BMP2, FGF4 and AR. However, in the used conditions, mesenchymal cells had not been able to differentiate into cardiac lineages.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-aza: 5-azacitina

5-aza-dC: 5-aza-2'-deoxicitidina

A: ampere

AC: corrente alternada

AR: ácido retinóico

bpm: batimentos por minuto

BMP: *Bone Morphogenetic Protein*

BMSC: *Bone Marrow Stem Cell*

BrdU: 5-bromo-2-deoxiuridina

CM: cardiomiócito

CRABP: *Cellular Retinoic Acid-Binding Protein*

Cx: conexina

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DC: corrente direta

ddp: diferença de potencial

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

E: dia embrionário

EB: *Embryoid Body*

EPC: *Endotelial Progenitor Cell*

ES: Eletroestimulação / Eletroestimulado

ESC: *Embryonic Stem Cell*

FABP5: *Fatty Acid-Binding Protein 5*

FAK: *Focal Adhesion Kinase*

FGF: *Fibroblast Growth Factor*

hBMSC: *Human Bone Marrow Stem Cell*

hESC: *Human Embryonic Stem Cell*

hMSC: *Human Mesenchymal Stem Cell*

HSC: *Hematopoietic stem cell*

Hz: Hertz

I: corrente

IM: infarto do miocárdio

mBMSC: *Mouse Bone Marrow Stem Cell*

MEC: matriz extracelular

mESC: *Mouse Embryonic Stem Cell*

MHC: *Myosin heavy chain*

mMSC: *Mouse Mesenchymal Stem Cell*

MSC: *Mesenchymal Stem Cell*

MTT: (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazólio

p: passagem

PA: potencial de ação

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PC: corrente pulsada

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor*

PFA: paraformaldeído

PPAR: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

R: resistência

RAR: *Retinoic Acid Receptor*

rMSC: *Rat Mesenchymal Stem Cell*

RXR: *Retinoid X Receptor*

SFB: soro fetal bovino

TA: temperatura ambiente

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

U: voltagem/tensão

V: Volt

VGCC: canais de cálcio regulados por voltagem

Z: impedância

Ω : Ohm

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O CORAÇÃO	1
1.2. COMPLICAÇÕES, REGENERAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE REPARO	6
1.2.1. AS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (MSCs) NO REPARO CARDÍACO	10
1.3. FATORES ENVOLVIDOS NA CARDIOGÊNESE	12
1.3.1. <i>BONE MORPHOGENETIC PROTEIN</i> (BMP) E <i>FIBROBLAST GROWTH FACTOR</i> (FGF)	13
1.3.2. ÁCIDO RETINÓICO (AR)	18
1.4. INDUÇÃO DA CARDIOGÊNESE EM MSCs <i>IN VITRO</i>	20
1.5. ELETROESTIMULAÇÃO (ES) EM CULTURA DE CÉLULAS	22
1.5.1. JUNÇÕES CELULARES	27
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3. METODOLOGIA	33
3.1. TIPOS CELULARES	33
3.1.1. CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA	33
3.1.2. CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA MURINA	33
3.1.3. CÉLULAS UTILIZADAS COMO CONTROLE EXPERIMENTAL	34
3.2. TRATAMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA COM CITOCINAS	34
3.3. TRATAMENTO DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA COM ALL-TRANS-ÁCIDO RETINÓICO	35
3.3.1. MARCAÇÃO COM <i>OIL RED O</i> DAS CULTURAS DE CÉLULAS TRATADAS COM AR	35
3.3.2. IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS MONOCÍTICAS	36
3.4. ELETROESTIMULAÇÃO	37
3.4.1. SISTEMA MARCAPASSO	37
3.4.2. EQUIPAMENTO ELETROESTIMULADOR	38
3.4.3. ELETROESTIMULAÇÃO DAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	40

3.5. IMUNOCITOQUÍMICA	41
3.5.1. FIXAÇÃO DAS CULTURAS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
3.5.2. IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
3.6. WESTERN BLOTTING	42
3.6.1. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS – MÉTODO DE BRADFORD	42
3.6.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	43
3.6.3. IMMUNOBLOTTING	43
3.6.4. QUANTIFICAÇÃO DE BANDAS DE IMMUNOBLOTTING	44
3.7. ESTIMATIVAS DE CRESCIMENTO CELULAR	45
3.7.1. MÉTODO DO MTT	45
3.7.2. CONTAGEM DO NÚMERO DE CÉLULAS EM CAMPOS ALEATÓRIOS	46
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
4. RESULTADOS	47
4.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DAS CITOCINAS BMP2 E FGF4 SOBRE A MORFOLOGIA DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	47
4.1.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DO FGF4 E BMP2 NO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOGÊNICO DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA	51
4.1.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DO FGF4 E BMP2 NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA EM CULTURA	54
4.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DO AR SOBRE A MORFOLOGIA DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	55
4.2.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DO AR NO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOGÊNICO DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA	61
4.2.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DO AR NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA EM CULTURA	62
4.3. ANÁLISE E CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA MARCAPASSO E DO EQUIPAMENTO ELETROESTIMULADOR UTILIZADOS NA ES DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	63
4.3.1. ANÁLISE DOS EFEITOS DA ES SOBRE A MORFOLOGIA DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	67
4.3.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DA ES NO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CARDIOGÊNICO DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA	71

4.3.3. ANÁLISE DOS EFEITOS DA ES NO CRESCIMENTO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA EM CULTURA	72
4.3.4. ANÁLISE DOS EFEITOS DA ES NA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE JUNÇÕES CELULARES DE CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	75
5. DISCUSSÃO	81
5.1. EFEITOS DAS CITOCINAS BMP2 E FGF4 E DO MEIO CONDICIONADO NAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	81
5.2. EFEITOS DO ALL-TRANS-ÁCIDO RETINÓICO NAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	88
5.3. EFEITOS DA ES NAS CULTURAS DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA	92
6. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXO I	110
ANEXO II	119
ANEXO III	122

1. INTRODUÇÃO

1.1. O coração

O coração é o primeiro órgão a se formar durante a embriogênese em vertebrados. Grande parte do seu desenvolvimento tem sido estudada através de modelos de aves, anfíbios, peixe-zebra e camundongo. Em todos estes sistemas, o coração surge de células da mesoderme anterior da placa lateral do embrião, onde elas estão arranjadas em campos bilaterais em cada lado da placa pré-cordal e notocorda rostral. Estes campos incluem os precursores tanto de células miocárdicas como endocárdicas. Em aves e mamíferos, os campos bilaterais da mesoderme cardiogênica se fundem para formar o crescente cardíaco (figura 1.1) (ZAFFRAN & FRASCH, 2002).

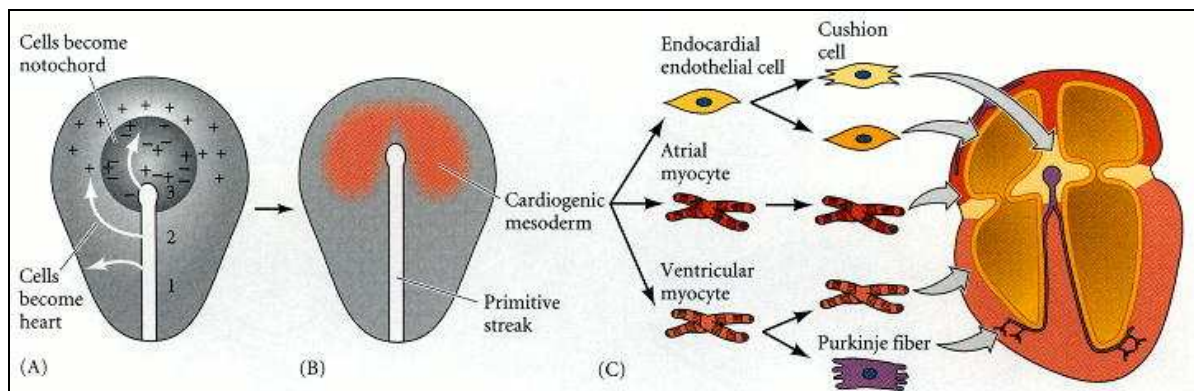


Figura 1.1. Células que originam o coração em embrião de galinha. (A) Modelo para a especificação da mesoderme cardiogênica. As rotas da migração mesodérmica de várias regiões da linha primitiva são representadas por setas. Sinais que induzem a miogênese cardíaca são representados pelo sinal positivo (+), inibidores da indução cardíaca pelo sinal negativo (-). A mesoderme migrando da região 1 não encontra indutores nem repressores. Células migrando da região 3 encontram ambos. Somente células migrando da região 2 encontram o indutor sem o inibidor. (B) Este processo produz uma região em forma de ferradura de mesoderme cardiogênica. (C) A mesoderme cardiogênica contém os precursores dos três tipos celulares do endocárdio e miocárdio. (extraído de GILBERT, 2000)

Estudos recentes identificaram um segundo tipo de campo cardíaco adjacente ao crescente cardíaco. Mostrou-se que há duas fontes distintas de células

progenitoras miocárdicas. Além do crescimento de células miocárdicas dentro do tubo cardíaco, estudos em galinha e camundongo indicaram que também ocorre o recrutamento de células progenitoras cardíacas no pólo arterial do tubo. Identificou-se na mesoderme faríngea a segunda fonte de células miocárdicas: o campo cardíaco secundário ou anterior (figura 1.2) (revisado em BUCKINGHAM *et al.*, 2005).

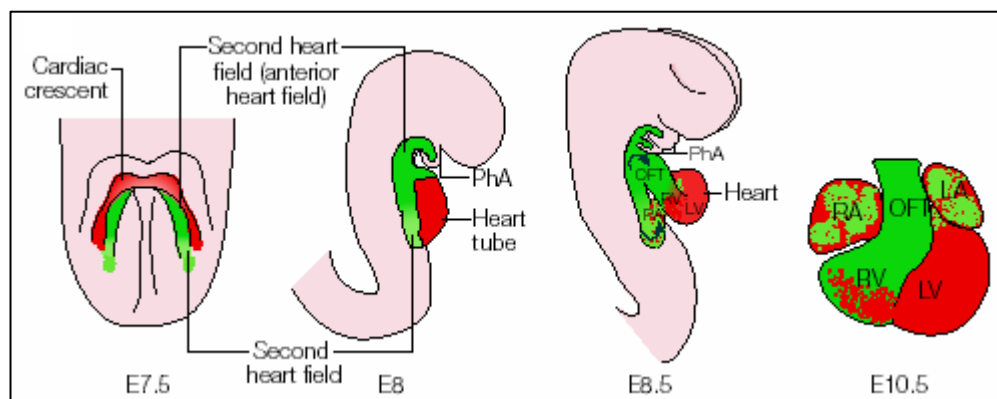


Figura 1.2. Fontes de células miocárdicas no coração de embrião de camundongo. A localização e a contribuição do campo cardíaco secundário são mostradas em verde, com o subdomínio do campo cardíaco anterior em verde escuro, e são comparadas com as células miocárdicas derivadas do campo cardíaco primário (em vermelho). E: dia embrionário. Vistas frontais (E7.5 e E10.5) e vistas laterais (E8 e E8.5). Trato de fluxo de saída (OFT) distal (DOFT) e proximal (POFT); arcos faríngeos (PhA); ventrículos esquerdo (LV) e direito (RV); átrios esquerdo (LA) e direito (RA). (extraído de BUCKINGHAM *et al.*, 2005)

Logo após a gastrulação desenvolvem-se os primórdios cardíacos paralelos que se fundem para formar o tubo cardíaco primitivo ao longo da linha média ventral do embrião. Eventos subseqüentes de torção e maturação originam o coração multi-câmaras adulto (figuras 1.3 e 1.4) (ZHENG *et al.*, 2002).

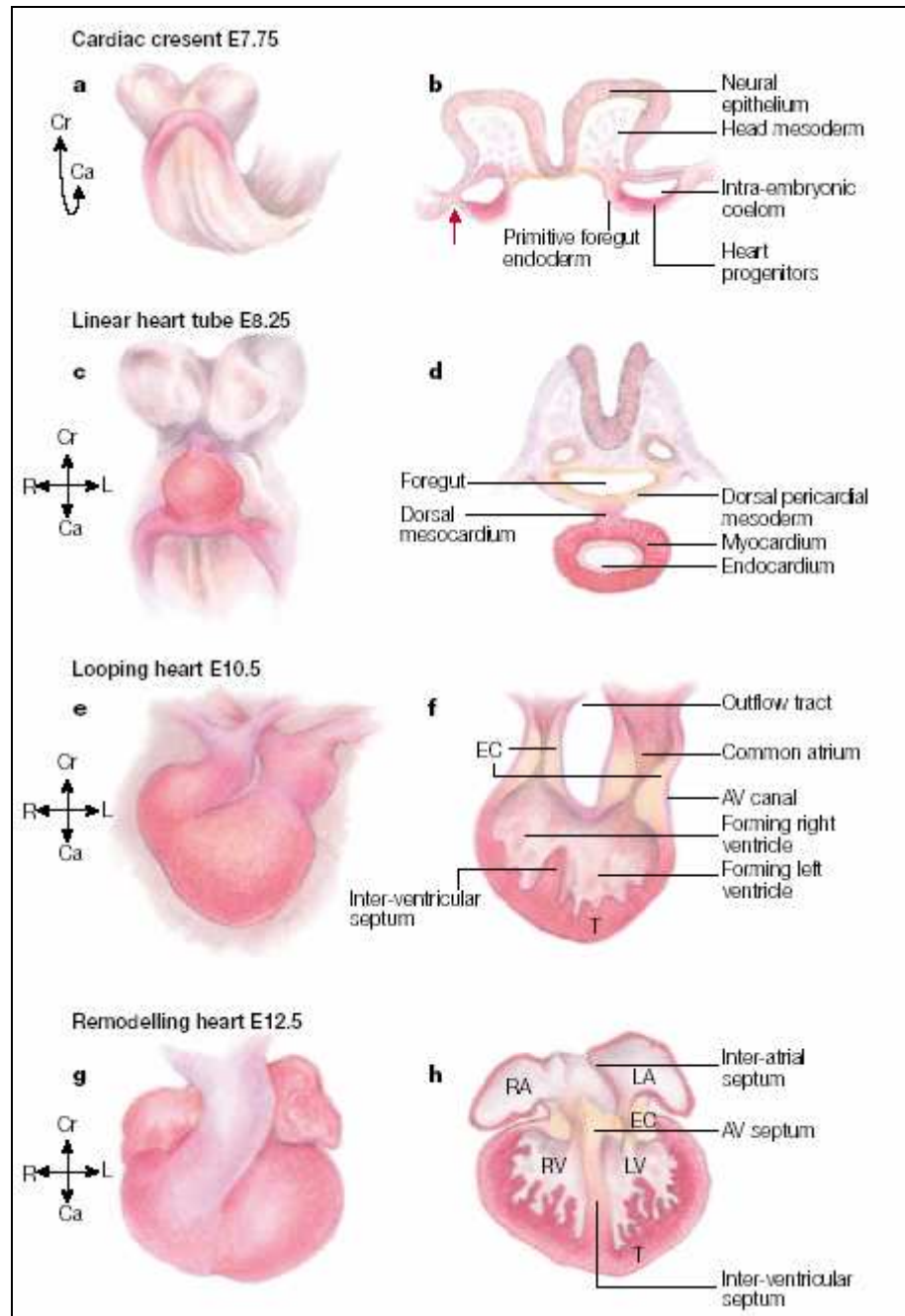


Figura 1.3. Visões ventrais das principais transições que ocorrem no desenvolvimento cardíaco precoce (eventos baseados no desenvolvimento de camundongo). E: dia embrionário. O embrião inteiro ou o coração isolado é mostrado à esquerda, enquanto à direita é mostrada uma secção representativa (transversal em b e d; longitudinal em f e h). O miocárdio e seus progenitores são indicados em vermelho. Os progenitores cardíacos surgem formando o crescente cardíaco no embrião (a, b). Em seguida, movem-se ventralmente para formar o tubo cardíaco linear (c, d). O tubo linear sofre uma torção e adota um formato de espiral (e, f). Durante a fase de remodelamento (g, h), a divisão das câmaras cardíacas é completada e os ventrículos esquerdo (LV) e direito (RV) e os átrios esquerdo (LA) e direito (RA) são evidentes. EC: câmaras endocárdicas; AV: atrioventricular; T: trabécula; Cr: cranial (superior); Ca: caudal (inferior); R: *right* (direita); L: *left* (esquerda). (extraído de HARVEY, 2002)

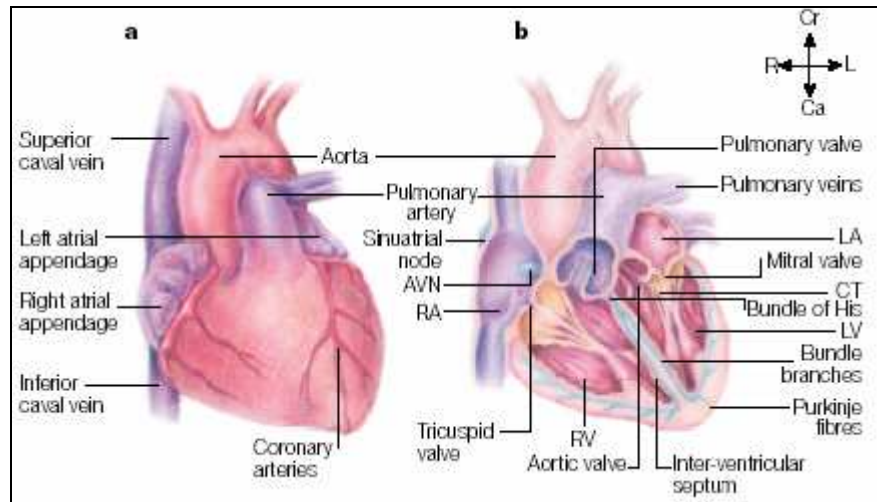


Figura 1.4. O coração adulto. O átrio direito (RA) recebe sangue venoso do corpo e passa-o através da válvula tricúspide para o ventrículo direito (RV), o qual o bombeia através da artéria pulmonar para os pulmões. O sangue oxigenado dos pulmões retorna ao átrio esquerdo (LA) através das veias pulmonares e passa para o ventrículo esquerdo (LV) através da válvula mitral. Do LV, o sangue é bombeado através da aorta para o corpo. O batimento cardíaco é controlado por células especializadas para a condução elétrica que estão organizadas em nodos ou tratos. O batimento é iniciado no nodo sinoatrial localizado na junção entre o átrio direito e a veia cava superior. O pulso elétrico é propagado através do átrio e para o nodo atrioventricular (AVN), que é o condutor para o pulso passar, após um breve atraso, para os ventrículos. Uma rápida condução ocorre ao longo do feixe de His e seu ramos para o ápice ventricular e então para os ventrículos pelas fibras de Purkinje. (extraído de HARVEY, 2002)

O coração é composto principalmente de um tecido muscular contrátil, o miocárdio, que é essencial para a sua ação como bomba. O miocárdio é um sincício funcional de fibras musculares estriadas cardíacas (atriais, ventriculares, especializadas excitatórias e condutoras). As células miocárdicas são cilíndricas, ramificadas e com um único núcleo localizado centralmente. Dentro delas estão estruturas repetitivas contráteis, os sarcômeros (figura 1.5) (KIERSZENBAUM, 2004).

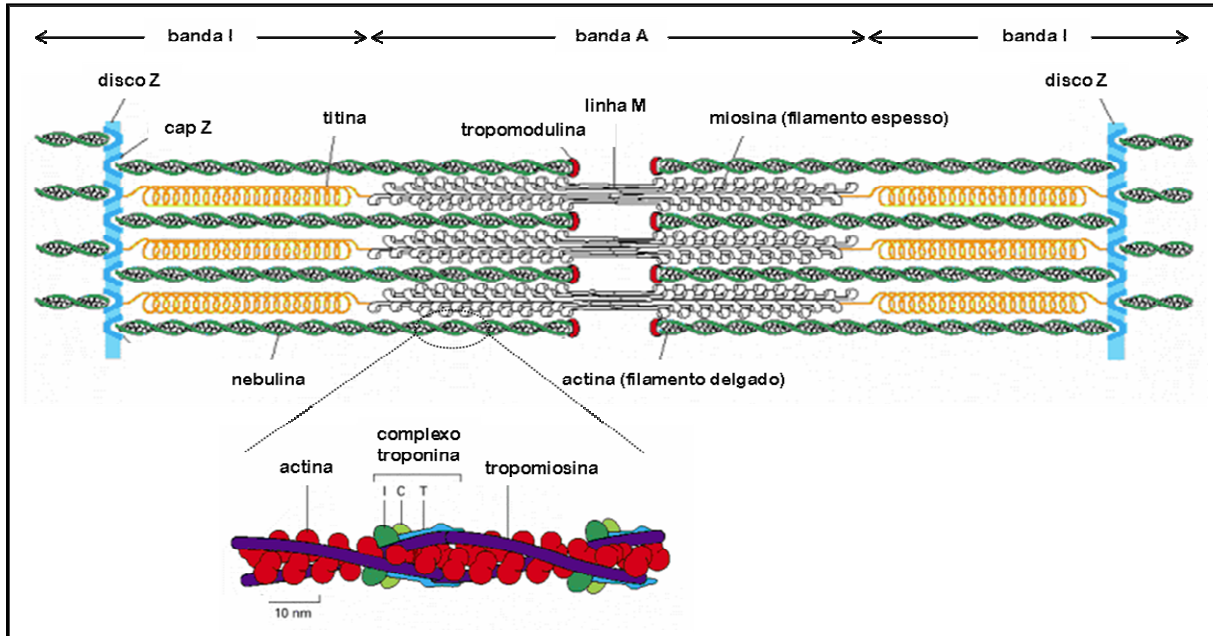


Figura 1.5. Estrutura de um sarcômero. Cada sarcômero é constituído de filamentos espessos, que formam a banda A, e filamentos delgados que formam a banda I. Os filamentos delgados contêm actina, troponina (I, C e T), tropomiosina e nebulina. Os filamentos espessos contêm miosina e titina. O sarcômero é delimitado por duas linhas ou discos Z, onde um de seus componentes, a α -actinina, ancora as extremidades dos filamentos de actina. (adaptado de ALBERTS *et al.*, 2002)

No miocárdio, as células musculares cardíacas estão unidas umas às outras através de complexos juncionais especializados, os discos intercalares. O componente transversal dos discos intercalares é constituído por desmossomos e junções aderentes. A porção longitudinal é constituída por junções comunicantes, que permitem a ligação elétrica das células (KIERSZENBAUM, 2004).

Quando um potencial de ação (PA)* inicia-se em uma única célula muscular cardíaca, ele é propagado ao longo da célula e inicia o PA na célula vizinha graças à presença dos canais comunicantes, que permitem a passagem de íons. O PA do músculo cardíaco se espalha célula a célula, levando o coração a contrair.

* PA é um fenômeno eletroquímico onde correntes iônicas são liberadas através de canais específicos, fazendo com que a célula se despolarize até perder quase totalmente a diferença de potencial elétrico entre os meios interno e externo. É desencadeado por um estímulo na membrana celular que reduz o potencial elétrico até um nível crítico chamado de potencial limiar. Atingido o potencial limiar o PA é disparado. Após a fase de despolarização a célula recupera seu potencial de repouso, fenômeno chamado de repolarização, completando o ciclo do PA.

Qualquer célula cardíaca que desencadeie um PA pode levar à contração cardíaca. No entanto, a região que exibir a maior frequência intrínseca comandará o ritmo cardíaco. No coração normal, estas células estão localizadas no nodo sinoatrial e representam o marcapasso do coração, pois iniciam o batimento cardíaco e determinam a frequência dos batimentos (figura 1.4) (PENNISI *et al.*, 2002).

O coração primordial inicia sua função logo após a mesoderme bilateral cardiogênica se fundir para formar o tubo cardíaco. Nos estágios precoces do funcionamento e desenvolvimento do coração, o sistema de condução cardíaco ainda não está desenvolvido. O coração embrionário desenvolveu estratégias para capacitar a própria condução e coordenar a contração sem um sistema condutor maduro. Deste modo, o coração tubular dispara PAs periódica e espontaneamente antes mesmo que as células miocárdicas possam contrair (PENNISI *et al.*, 2002).

1.2. Complicações, regeneração e estratégias de reparo

Danos isquêmicos ao miocárdio e suas complicações são a principal causa de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento e industrializados. Cerca de 7,2 milhões de pessoas nos EUA já sofreram de infarto do miocárdio (IM) e aproximadamente 865 mil novos casos são registrados a cada ano, sendo que a mortalidade atingiu 171 mil no ano de 2003 (American Heart Association, 2006). No Brasil, o infarto agudo do miocárdio e as doenças isquêmicas do coração ocuparam o segundo lugar no *ranking* de mortes em 2004. Foram mais de 86 mil registros (Painel de indicadores do SUS, 2006).

Um IM ocorre quando um ou mais vasos sanguíneos que suprem o coração, as artérias coronárias, são repentinamente ocluídos, levando a uma diminuição no suprimento de nutrientes e oxigênio na porção do músculo cardíaco suprido pela(s) artéria(s). Se o fluxo sanguíneo não é recuperado rapidamente, o resultado é a morte celular irreversível dentro da parte afetada do músculo cardíaco (figura 1.6).

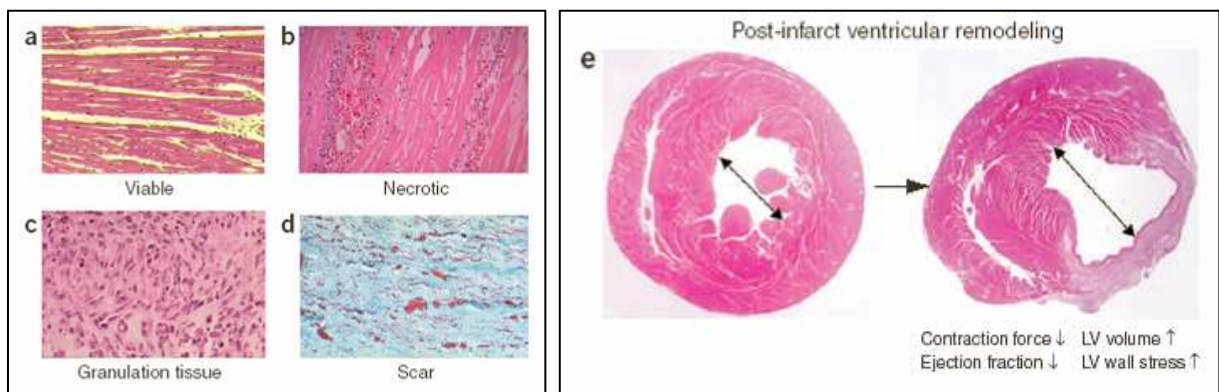


Figura 1.6. Estágios histológicos do IM. Devido a sua alta taxa metabólica, o miocárdio (a) começa a sofrer danos irreversíveis com 20 minutos de isquemia e subseqüentemente uma onda de morte celular surge das camadas miocárdicas interiores em direção às exteriores em um período de três a seis horas. Embora CMs sejam a população mais vulnerável, a isquemia também causa a morte de células vasculares, fibroblastos e nervos no tecido. A necrose miocárdica (b) desencadeia uma resposta inflamatória vigorosa. Leucócitos derivados da medula óssea, inicialmente compostos de neutrófilos e posteriormente de macrófagos, entram no infarto. Os macrófagos fagocitam os restos de células necróticas e geralmente direcionam as fases subseqüentes de cicatrização. Concomitante com a remoção do tecido morto, um tecido de reparo provisório hidrofílico rico em fibroblastos proliferantes e células endoteliais, denominado tecido de granulação (c), invade a zona do infarto a partir da área circundante. Ao longo do tempo, o tecido de granulação se remodela para formar um tecido de cicatrização densamente colagenoso (d). Na maioria dos infartos humanos, este processo de reparo requer dois meses para se completar, sendo que em animais experimentais pequenos, tais como camundongos ou ratos, completam-se mais rapidamente. No órgão, o IM resulta no afinamento da parede afetada e dilatação da cavidade ventricular, um processo denominado remodelamento ventricular (e). Estas mudanças estruturais aumentam notavelmente o estresse mecânico na parede ventricular e promovem a disfunção contrátil progressiva. A extensão de uma falha cardíaca após um IM é diretamente relacionada à quantidade de perda miocárdica (LAFLAMME & MURRY, 2005).

O coração adulto não pode reparar o tecido danificado, pois os CMs são incapazes de se dividir significativamente. Apesar de conter uma população de células precursoras, tronco ou reservas que têm capacidade de reparo endógeno, fica claro para a maioria dos casos que, após uma injúria cardíaca, qualquer demanda para o reparo excede a capacidade autógena de resposta do coração

(TAYLOR, 2004). A perda de CMs após um IM, combinada com a limitação de mecanismos endógenos de reparo, é um fator responsável pela progressão do mau funcionamento do coração (PITTENGER & MARTIN, 2004). O resultado do IM é a formação de um tecido fibroso que não tem propriedades contráteis, mecânicas e elétricas de um miocárdio normal.

As opções comuns de tratamento para corações passando por esses processos pós-infarto incluem administração de medicamentos, transplante cardíaco, equipamentos de assistência circulatória mecânica (LVADs) ou outras técnicas experimentais como a terapia gênica e os corações artificiais. Todas são tentativas de manter o miocárdio remanescente saudável ou, quando isso não é possível, substituir o órgão danificado (TAYLOR, 2004).

Tendo em vista a eficácia limitada desses tratamentos correntes, novas estratégias terapêuticas são necessárias.

A terapia ideal minimizaria a perda de CMs por reduzir a morte celular, promoveria o retorno do miocárdio bloqueado e hibernante à função normal, estimularia a revascularização da região isquêmica por aumentar a angiogênese e disponibilizaria CMs viáveis para substituir aqueles perdidos, dessa forma preservando a função contrátil e reduzindo a possibilidade de fibrose (FRASER *et al.*, 2004). Para isso, as células inseridas devem se integrar com o miocárdio circundante, expressar proteínas cardíacas e contrair em sincronia com o tecido hospedeiro.

A tabela 1.1 mostra os tipos de estratégias de engenharia tecidual utilizadas para o reparo celular cardíaco.

Tabela 1.1. Estratégias para o reparo celular cardíaco.

Estratégias para o reparo celular cardíaco
(1) Transplante direto de células no local danificado (cardiomioplastia ou cardiomiogênese celular)
(2) Técnicas de engenharia tecidual para o desenvolvimento de tecido de substituição <ul style="list-style-type: none"> • Arcabouços semeados com células • Arcabouços não semeados e recrutamento de células endógenas • Arcabouços injetáveis com ou sem células • Filme celular a partir de células cardíacas e folhas de biomateriais
(3) Terapias que levem o coração a regenerar os tecidos danificados <ul style="list-style-type: none"> • Citocinas

(adaptado de LEOR *et al.*, 2005)

A cardiomioplastia fundamenta-se no princípio de que a disponibilização de determinados tipos celulares no local da injúria cardíaca pode recuperar o fluxo sanguíneo e a contratilidade prévia ao coração infartado, fibrosado ou não-funcional.

O reparo cardíaco utilizando células começou com o transplante de mioblastos esqueléticos (revisado em LAFLAMME & MURRY, 2005), mas outros tipos celulares estão sendo explorados. Várias fontes celulares já foram transplantadas experimentalmente em miocárdio danificado: CMs embrionários, fetais e adultos, células cardiomiocíticas tumorais, CMs derivados de células-tronco embrionárias, mioblastos esqueléticos, células musculares lisas, mioblastos imortalizados, fibroblastos, células-tronco embrionárias, células-tronco mesenquimais e hematopoéticas, células estromais da medula óssea, células mononucleares, progenitores de linhagens endoteliais e mesenquimais (revisado em TAYLOR, 2004; PITTENGER & MARTIN, 2004; LEOR *et al.*, 2005; SOLLOWAY & HARVEY, 2003). Testes clínicos utilizando mioblastos esqueléticos autólogos e células da medula óssea estão em andamento (LAFLAMME & MURRY, 2005).

Em um primeiro momento, os CMs fetais parecem ser a célula ideal para a cardiomioplastia pois são proliferativos, mas devido a complicações éticas, seu uso torna-se dificultado. Os CMs adultos seriam a próxima escolha. No entanto, diversos

obstáculos inviabilizam o uso dessas células *in vivo*. Primeiro, para que os CMs sejam usados em transplante celular, devem estar disponíveis prontamente como uma fonte celular. Dada sua inabilidade de replicar em um grau significativo *in vitro* ou *in vivo*, isso permanece improvável até o presente. Segundo, para os CMs sobreviverem em um coração infartado, é necessário um suprimento vascular maior do que o requerido pelos miócitos sobreviventes e em um nível maior do que está disponível na área do infarto. Isto sugere que os CMs somente são utilizáveis se em conjunção com revascularização ou angiogênese (TAYLOR, 2004).

Diante de todas as complicações para o uso de CMs como fonte para a cardiomioplastia, a alternativa mais viável acaba sendo a aplicação de células com potencial para diferenciar em CMs mas que sejam de fácil obtenção e tenham alto grau de crescimento.

1.2.1. As células-tronco mesenquimais (MSCs) no reparo cardíaco

A medula óssea é uma das fontes mais abundantes de células-tronco adultas e células progenitoras. Células-tronco hematopoéticas (HSCs), células progenitoras endoteliais (EPCs) e células-tronco mesenquimais (MSCs) podem ser isoladas da medula óssea (PARK *et al.*, 2007). As MSCs podem também ser encontradas no sangue do cordão umbilical, sangue periférico e vários tecidos, incluindo tecido adiposo e vasos sanguíneos (PARK *et al.*, 2007).

Existem dados demonstrando que células-tronco da medula óssea (BMSCs) têm a habilidade de diferenciar em CMs e que o transplante de BMSCs no coração isquêmico poderia levar à regeneração de CMs e à recuperação do coração isquêmico (LIU *et al.*, 2004).

As MSCs derivadas da medula óssea têm se mostrado como a grande promessa no reparo tecidual. Estas células induzem pouca resposta imune, apresentam notáveis propriedades de auto-renovação e podem diferenciar em muitos tipos celulares. Evidências recentes mostram que fatores mecânicos tais como tensão de cisalhamento, elasticidade mecânica e rigidez da matriz extracelular (MEC) podem regular a proliferação e diferenciação de MSCs através de várias vias de sinalização (PARK *et al.*, 2007).

As MSCs oferecem muitas vantagens em relação às várias outras células-tronco em termos da facilidade de acesso, manuseio e potencial multilinhagem. Apesar de constituírem uma população rara de células presentes na medula óssea, representando de 0,001% a 0,01% das células nucleadas, cerca de dez vezes menos abundantes que as HSCs, as MSCs podem crescer rápida e facilmente em cultura (PITTENGER & MARTIN, 2004).

Para purificar as MSCs da medula óssea, as células são plaqueadas e as aderentes são cultivadas enquanto as não-aderentes, constituídas na maioria por células hematopoéticas, são descartadas através de repetidas lavagens (PARK *et al.*, 2007; BIANCO *et al.*, 2001). Para maior purificação, as MSCs podem ser isoladas através de centrifugação por densidade usando um gradiente de *Percoll* antes do plaqueamento. Entretanto, a adesão a uma placa de cultura é o que realmente separa as MSCs dos outros tipos celulares da medula óssea (PARK *et al.*, 2007).

Embora nenhum marcador de superfície único para MSCs exista, elas são em geral positivas para STRO-1 (um antígeno de superfície de célula estromal), CD105 (endoglina, receptor para TGF- β e integrinas), CD29 (β 1-integrina), CD44 (receptor para ácido hialurônico) e CD166 (molécula de adesão celular) e negativas para

CD14 (antígeno de superfície de monócito), CD34 (antígeno de superfície de HSC) e CD45 (antígeno de superfície de leucócito). Esses e outros marcadores celulares de superfície, embora não exclusivos de MSCs, são amplamente utilizados para isolá-las e caracterizá-las (PARK *et al.*, 2007).

As MSCs parecem possuir uma ampla capacidade de diferenciação e podem ser estimuladas a diferenciar em uma variedade de tipos celulares. A pluripotência das MSCs tem sido demonstrada por seu potencial osteogênico, condrogênico, miogênico e adipogênico em resposta a diferentes coquetéis de fatores de crescimento (PARK *et al.*, 2007). Evidências experimentais sugerem que MSCs também expressam características fenotípicas de células endoteliais, neurais, músculo liso, mioblastos esqueléticos e CMs (PITTENGER & MARTIN, 2004). MSCs ainda podem se diferenciar em componentes celulares cardíacos e se desenvolver em fenótipos funcionais de células miocárdicas dentro do microambiente do coração (XU *et al.*, 2004).

1.3. Fatores envolvidos na cardiogênese

O desenvolvimento embrionário do coração requer a coordenação de diversas vias de sinalização que atuam nos movimentos e interações célula-célula necessários para a cardiogênese propriamente dita. O crescimento e o desenvolvimento cardíaco apresentam uma seqüência de eventos altamente organizada que requer a expressão espacial e temporal correta de uma série de fatores. Muitos dos mecanismos moleculares que são necessários durante este processo podem ser considerados para análises de desenvolvimento cardiogênico *in*

in vitro a partir de células mesenquimais. Particularmente, neste trabalho, consideramos alguns desses fatores que serão descritos a seguir.

1.3.1. *Bone Morphogenetic Protein (BMP) e Fibroblast Growth Factor (FGF)*

A especificação das células mesodérmicas cardiogênicas é induzida pela endoderme adjacente ao coração, através das vias de sinalização BMP e FGF. O coração não se forma se a endoderme anterior é removida. Além disso, a mesoderme isolada dessa região formará músculo cardíaco quando combinada com a endoderme anterior, mas não formará se combinada com a endoderme posterior (figura 1.7) (GILBERT, 2000).

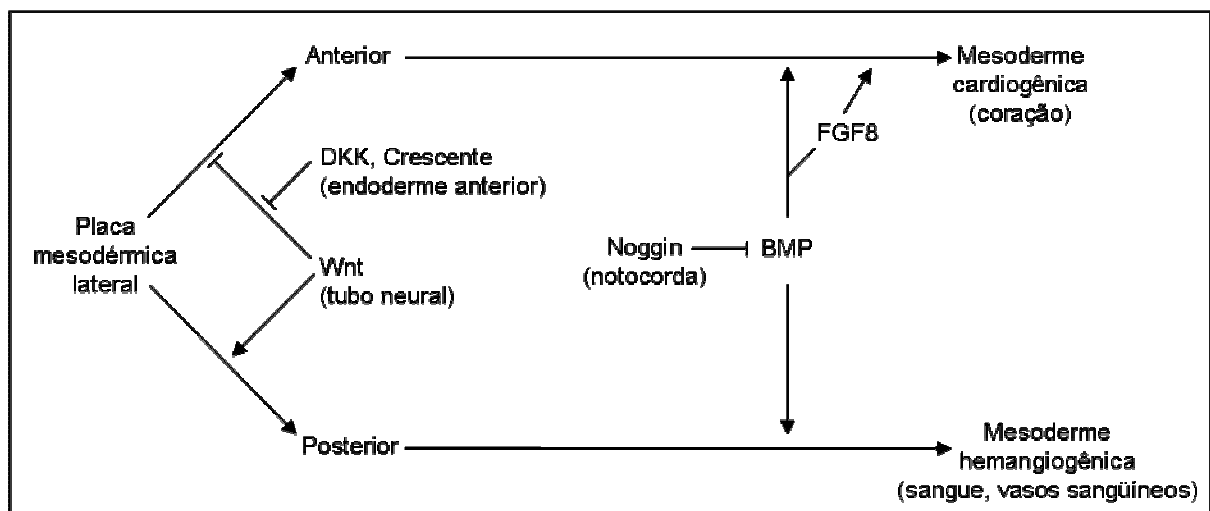


Figura 1.7. Interações que levam à geração do coração e de linhagens sanguíneas a partir da placa mesodérmica lateral. Proteínas Wnt do tubo neural inibem a formação do coração e promovem a formação sanguínea. A endoderme anterior, entretanto, produz inibidores Wnt, tais como Cerberus, Dickkopf e Crescente, que impedem as proteínas Wnt de se ligarem a seus receptores. BMPs da endoderme promovem tanto o desenvolvimento cardíaco como sanguíneo e podem ser bloqueados por Noggin e Cordina provenientes da notocorda. BMPs endodérmicos também induzem a síntese de FGF8 na endoderme diretamente através da mesoderme cardiogênica. Assim, células precursoras cardíacas são especificadas em locais onde BMPs (mesoderme lateral e endoderme) e antagonistas de Wnt (endoderme anterior) coincidem. (adaptado de GILBERT, 2000)

BMPs são membros da superfamília de *Transforming growth factor β* (TGF- β), que inclui também activinas e inibinas. A subfamília BMP exerce uma ampla faixa de

respostas biológicas com efeitos diretos no crescimento celular, proliferação, diferenciação e apoptose (MARTINOVIC *et al.*, 2004). Cerca de vinte membros da família BMP já foram identificados e caracterizados, e pelo menos seis BMPs são expressos no coração (2, 4, 5, 6, 7 e 10), com distribuições distintas mas parcialmente sobrepostas (CHEN *et al.*, 2004; SCHNEIDER *et al.*, 2003).

FGFs constituem uma grande família de fatores de crescimento polipeptídicos. Vinte e dois FGFs já foram identificados e a maioria deles é expressa ubiquamente. Durante o desenvolvimento embrionário, FGFs têm diversas funções na regulação da proliferação, migração e diferenciação celular. No organismo adulto, FGFs são fatores homeostáticos e funcionam no reparo tecidual e resposta à injúria (ORNITZ & ITOH, 2001).

Experimentos realizados *in vitro* em explantes de galinha sugerem que a sinalização BMP é requerida para a especificação cardíaca e formação do coração durante estágios de gastrulação cardíaca ou nêurula precoce (LOUGH *et al.*, 1996; SCHULTHEISS *et al.*, 1997). No momento em que células cardiogênicas de galinha tornam-se comprometidas para a linhagem muscular cardíaca, elas estão em contato com tecidos expressando BMP2, BMP4 e BMP7. A aplicação de BMP2 *in vivo* promove a expressão ectópica dos fatores de transcrição cardíacos Nkx2-5 e GATA-4. Além disso, a administração de BMP2 ou BMP4 solúveis em culturas de explantes induz a completa diferenciação cardíaca na mesoderme medial anterior, um tecido que é normalmente não-cardiogênico. A competência em sofrer cardiogênese em resposta a BMPs é restrita à mesoderme localizada na região anterior dos estágios gástrula a nêurula do embrião (SCHULTHEISS *et al.*, 1997).

A proteína secretada Noggin, que se liga a BMPs e antagoniza a atividade BMP, inibe completamente a diferenciação da mesoderme pré-cardíaca, indicando

que a atividade BMP é requerida para a diferenciação miocárdica nesse tecido (SCHULTHEISS *et al.*, 1997). Também já se demonstrou que o bloqueio da sinalização BMP regula negativamente a expressão de Nkx2-5 (SHI *et al.*, 2000).

Juntos, esses dados sugerem que um campo cardiogênico existe na mesoderme anterior e que a expressão localizada de BMPs seleciona quais células nesse campo entram na linhagem cardiomiocítica.

Assim, a via BMP, na ausência de sinais Wnt, é crítica em induzir a síntese do fator de transcrição Nkx2-5 na mesoderme cardiogênica. Nkx2-5 é o mais precoce marcador do desenvolvimento do coração de vertebrados conhecido, expresso muito cedo no desenvolvimento, precedendo os outros genes cardíacos específicos (ZHENG *et al.*, 2002). Nkx2-5 é crítico em instruir a mesoderme a se tornar tecido cardíaco e ativar a síntese de outros fatores de transcrição (especialmente membros da família GATA-4 e MEF2). Trabalhando juntos, estes fatores de transcrição ativam a expressão de genes codificadores de proteínas específicas do músculo cardíaco (figura 1.8) (GILBERT, 2000).

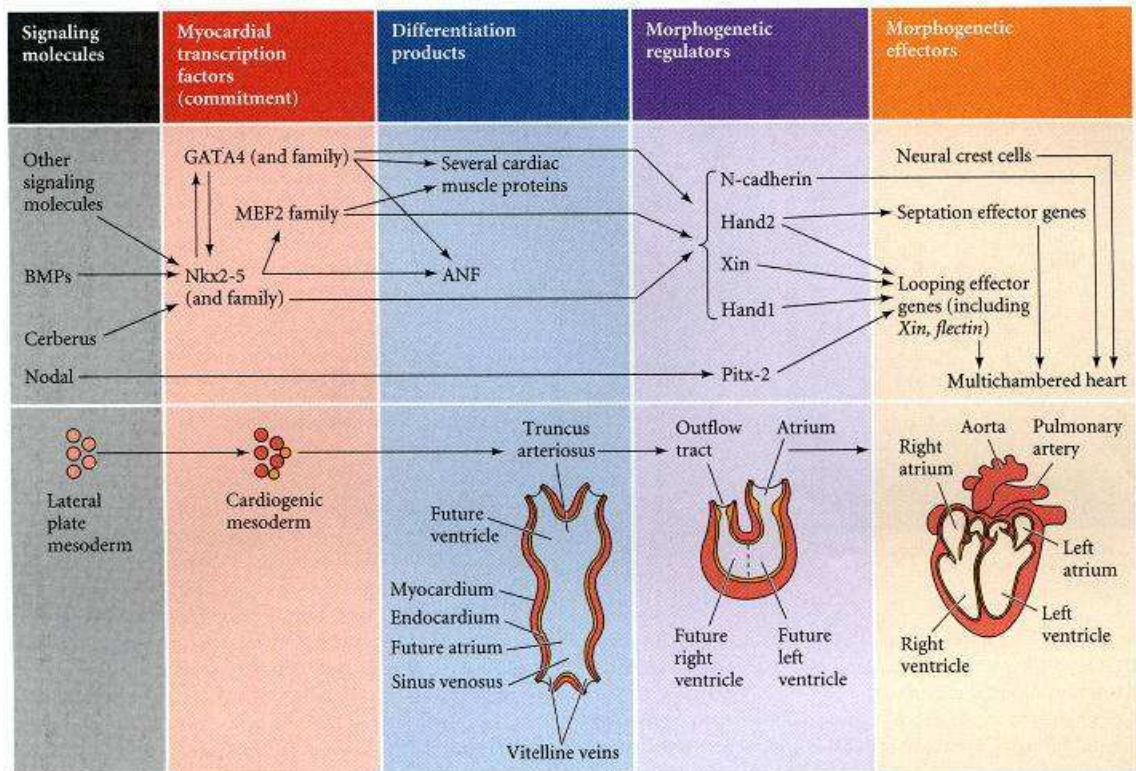


Figura 1.8. Cascata do desenvolvimento cardíaco. Uma correlação é feita entre o estágio morfológico e os fatores de transcrição presentes no núcleo das células precursoras cardíacas. (extraído de GILBERT, 2000)

Como se tem sugerido que a endoderme secreta fatores indutores cardíacos, diversos grupos têm utilizado células endodérmicas em suas condições de culturas para direcionar a cardiogênese. Estudos foram realizados com células P19 (uma linhagem de carcinoma embrionário utilizada como modelo para estudo da cardiogênese) co-cultivadas com linhagens celulares endodérmicas viscerais. Esse sistema de cultura levou à agregação espontânea de células precursoras pluripotentes, as quais diferenciaram em CMs contráteis. O mesmo efeito foi observado usando mESCs (célula-tronco embrionária murina) nesse sistema de co-cultivo. Co-culturas utilizando uma linhagem celular visceral endodérmica também aumentaram a diferenciação cardíaca de hESCs (célula-tronco embrionária humana) (revisado em PANDUR, 2005).

Mais recentemente, células endodérmicas pré-cardíacas dissecadas de embriões de galinha foram utilizadas simultaneamente como *feed layer* para mESCs

e como indutoras do programa de diferenciação cardíaca. Isto levou à ocorrência de aproximadamente 65% de CMs contráteis. Quando a mesoderme cardiogênica foi incluída na *feed layer*, todos os EBs (*Embryoid Body*) tornaram-se contráteis. Além disso, cultivar mESCs em meio condicionado por culturas de tecido pré-cardíaco endodérmico/mesodérmico foi suficiente para induzir a cardiogênese, o que aponta para a presença de fatores cardiogênicos secretados (revisado em PANDUR, 2005).

O efeito combinado do BMP2 e FGF4 na indução cardíaca da mesoderme embrionária não-cardiogênica de galinha foi mostrado por LOUGH *et al.* (1996). Quando presente como o único suplemento no meio, o BMP2 não promoveu a viabilidade da mesoderme cardiogênica nem da não-cardiogênica. Enquanto o FGF4 pôde conduzir a cardiogênese em mesoderme cardiogênica, o fator não induziu a cardiogênese em mesoderme não-cardiogênica, embora o crescimento do explante tenha sido mantido. Entretanto, o tratamento de mesoderme não-cardiogênica com a combinação de FGF4 e BMP2 induziu a cardiogênese, indicando que esta combinação de fatores de crescimento é capaz de redirecionar células embrionárias para linhagens cardíacas.

Similarmente aos achados em modelos animais, em mESCs os FGFs também cooperam com BMPs em aumentar a diferenciação cardíaca. Um estudo detalhado foi realizado por KAWAY *et al.* (2004), que tratou mESCs com concentrações definidas de FGF2 e BMP2 em diferentes tempos durante a fase de diferenciação. A indução de CMs mais eficiente foi atingida através da adição dos fatores de crescimento durante os três primeiros dias de diferenciação quando as células ainda eram cultivadas em suspensão, como agregados. Esse é o período que as células começam a diferenciar nas três camadas germinativas. Quando o BMP2 foi adicionalmente acrescentado nos estágios tardios, apresentou um efeito inibitório na

diferenciação cardíaca. Embora cada fator separadamente tenha aumentado a diferenciação cardíaca, o efeito mais proeminente foi atingido pela ação combinada.

A partir destes estudos tem-se sugerido que a sinalização BMP e FGF exerce múltiplas funções na indução mesodérmica e diferenciação órgão-específica e que suas expressões temporais e espaciais são críticas na indução cardiomiogênica.

1.3.2. Ácido Retinóico (AR)

Evidências da função de retinóides no desenvolvimento cardíaco vêm inicialmente de estudos dos efeitos de dietas deficientes em vitamina A em filhotes de ratas grávidas descritos por WILSON & WARKANY em 1949, que relataram a hipoplasia ventricular após a dieta deficiente.

Os retinóides possuem uma ampla função em direcionar a morfogênese cardiovascular normal. O desenvolvimento do coração é extremamente sensível à perturbação da sinalização por retinóides, seja excessiva ou restritiva.

As pró-vitaminas A e o retinol da dieta são convertidos e estocados como ésteres de retinila. O retinol possui essencialmente a função de precursor metabólico. Reações sucessivas oxidativas convertem retinol a retinaldeído e então a AR (KUBALAK & SUCOV, 1999). Sob circunstâncias normais, tecidos embrionários sintetizam AR endógeno a partir do metabolismo da vitamina A (WOBUS *et al.*, 1997). Tem-se demonstrado que o AR é crítico na modelagem e desenvolvimento do coração (COLLOP *et al.*, 2006).

O AR liga-se aos receptores de AR ($RAR\alpha$, β e γ , *Retinoic Acid Receptor*) que, por sua vez, associam-se aos receptores X de retinóides ($RXR\alpha$, β e γ , *Retinoid X Receptor*) para formar heterodímeros. Este complexo age como um fator de

transcrição ativado por ligante, acoplando-se aos elementos responsivos a AR (RAREs) de genes alvos, sendo essencial para muitos aspectos do desenvolvimento embrionário. No coração embrionário, a sinalização por AR é mediada primariamente por receptores RAR α , com um componente menor de sinal proveniente do receptor RAR β . A enzima responsável primariamente pela síntese de AR, a retinaldeído dehidrogenase 2 (RALDH2), é expressa adjacente à região sinoatrial em desenvolvimento durante a cardiogênese precoce, sugerindo que um gradiente de AR deva ser gerado ao longo do eixo anterior-posterior do tubo cardíaco (COLLOP *et al.*, 2006).

O AR se liga com alta afinidade em outro receptor nuclear expresso quase que ubiquamente, chamado PPAR β/δ (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*), membro de uma subclasse de receptores, que também funciona como um heterodímero com RXR. Assim, em algumas células o AR pode ativar a transcrição não somente através de RAR, mas também através de PPAR β/δ (SCHUG *et al.*, 2007).

Há consideráveis evidências de que o AR é crítico na diversificação inicial da linhagem cardíaca em fenótipos atriais e ventriculares. Em galinha e camundongo, o excesso de AR leva câmaras ventriculares a adquirirem características atriais. Este efeito ocorre somente se o AR é administrado muito cedo no desenvolvimento do coração, sugerindo uma função para o AR nos estágios mais precoces da modelagem do tubo cardíaco (revisado em SOLLOWAY & HARVEY, 2003).

Estudos *in vitro* utilizando AR como agente indutor da diferenciação cardiogênica têm sido realizados em ESCs e P19. Trabalhos utilizando estes modelos demonstraram que o *all-trans*-AR influencia a eficiência da diferenciação cardiogênica de uma maneira dependente de tempo e concentração. O tratamento

com altas concentrações de AR (10^{-7} e 10^{-8} M) durante os dois primeiros dias ou entre o dia 2 e 5 da formação de EBs derivados de ESCs inibiu significativamente a cardiogênese, enquanto o tratamento entre os dia 5 e 7 resultou em uma diferenciação cardiomiogênica aumentada (WOBUS *et al.*, 1997).

Posteriormente, WOBUS *et al.* (1997) mostraram que o tratamento de EBs derivados de ESCs com *all-trans*-AR e *9-cis*-AR, tanto na concentração de 10^{-7} como 10^{-8} M, acelerou a diferenciação de ESCs em CMs e aumentou o desenvolvimento de CMs ventriculares.

1.4. Indução da cardiogênese em MSCs *in vitro*

Tem-se mostrado que diversas moléculas regulam os processos de cardiogênese. Os efeitos atribuídos às moléculas com potencial cardiogênico já foi demonstrado ser estritamente dependente de sua concentração, tempo de exposição e, em alguns casos, do sinergismo com outros fatores.

Tendo em vista o potencial cardiogênico das MSCs, além do uso na cardiomioplastia, estas células podem também ser utilizadas nas construções teciduais de substituição (figura 1.9). Neste sentido, estudos indicam que as MSCs respondem a sinais do microambiente do tecido hospedeiro e se diferenciam em células maduras, o que deve contribuir para a regeneração do IM.

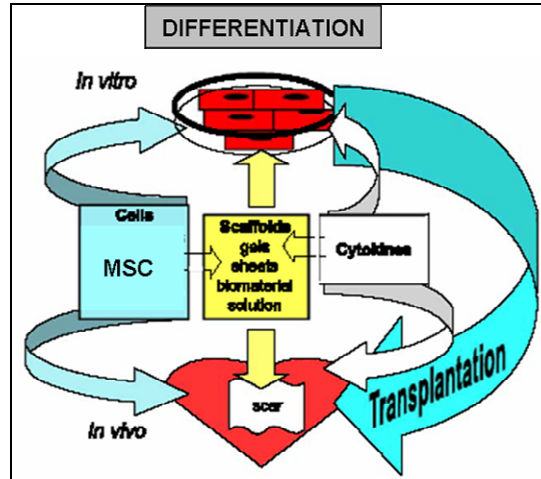


Figura 1.9. Estratégias para o uso de MSCs no reparo celular cardíaco (adaptado de LEOR *et al.*, 2005).

A pré-diferenciação para uma linhagem cardíaca definida previamente ao transplante pode ser mais vantajosa que transplantar células não comprometidas que podem não diferenciar ou seguir outra via de diferenciação não-cardiogênica. Para isso, as MSCs podem ser corretamente pré-induzidas para a via cardiogênica através de fatores específicos.

O primeiro relato que MSCs podem diferenciar *in vitro* em CMs foi de MAKINO *et al.* (1999). Em seus estudos, uma linhagem celular cardiomiogênica foi estabelecida a partir de MSCs imortalizadas por repetidos tratamentos com 5-azacitidina (um análogo de citosina capaz de alterar a expressão de certos genes que devem regular a diferenciação) e seleção de colônias com células espontaneamente contráteis. Em seguida, TOMITA *et al.* (1999) mostraram que após a exposição à 5-aza por 24h, culturas primárias de MSCs também podiam diferenciar em CMs. Entretanto, essa conversão *in vitro* não pôde ser confirmada nos estudos de LIU *et al.* (2003) sendo que, posteriormente, ZHANG *et al.* (2005) mostraram uma restrição na diferenciação de MSCs em CMs dependente da passagem.

Recentemente SHIOTA *et al.* (2007) demonstraram que mMSCs derivadas de esferóides e tratadas com 5-aza-dC por 24h originavam CMs espontaneamente contráteis, embora a porcentagem de CMs formados tenha sido extremamente baixa.

Também já se demonstrou que o PDGF-AB (*Platelet-Derived Growth Factor*) aumenta a diferenciação cardiogênica *in vitro* de mMSCs em culturas que promovem a geração espontânea de CMs funcionais (XAYMARDAN *et al.*, 2004).

No entanto, para nosso conhecimento não existem estudos publicados utilizando AR, BMPs ou FGFs para a indução cardiogênica em MSCs, apesar de já ter sido demonstrado que esses fatores afetam a cardiogênese.

Embora seja provável que um conjunto adequado de fatores e/ou condições de cultura promovam a diferenciação cardíaca de MSCs *in vitro* de uma maneira ótima, tal receita até o momento não existe.

1.5. Eletroestimulação (ES) * em cultura de células

O sucesso do reparo de um coração danificado requer não somente a substituição das células que foram perdidas, mas também a integração eletromecanicamente sincronizada *in situ*. Para melhorar a contratilidade do coração infartado, as células implantadas devem sobreviver e contrair ou relaxar em sincronia, ou seja, devem acoplar com o tecido. Neste sentido, estudos de ES em culturas de MSCs seriam importantes.

O comportamento de uma membrana celular pode ser modificado pela aplicação de corrente elétrica através de dois eletrodos. No caso de membranas

* Vide anexo I – Fundamentos da Eletroestimulação

excitáveis, como de células musculares e nervosas, a passagem de corrente entre os eletrodos pode causar uma despolarização da membrana se o limiar de excitabilidade for atingido, desencadeando um PA.

Como a estimulação elétrica induz a hiperpolarização da terminação anódica e despolarização da extremidade catódica da célula, as células alinhadas com as linhas do campo elétrico são sujeitas à maior diferença de voltagem e são freqüentemente as primeiras a gerar PA e contrair (RADISIC *et al.*, 2004).

Se a amplitude de um estímulo elétrico é fraca demais para produzir uma despolarização limiar, um PA não ocorrerá. Se a corrente aplicada despolariza a membrana até o limiar, um PA será desencadeado. A membrana atinge o limiar dependendo da amplitude do estímulo, e isso varia de membrana para membrana e mesmo de minuto para minuto na mesma membrana. Uma célula exposta a um nível contínuo de despolarização pode eventualmente se acomodar ao estímulo e se tornar inexcitável a menos que a amplitude do estímulo seja aumentada (DACKO, 1999).

A duração do pulso de estímulo também determina se a membrana atinge o limiar. O tempo que a corrente leva para mudar a voltagem da membrana celular é diretamente relacionado à capacitância e resistência da membrana. Membranas com capacitância maior levam mais tempo do que as com menor capacitância. Se a duração do estímulo é curta demais, a voltagem de membrana não atingirá o limiar, não importa quão alta seja a amplitude do estímulo (DACKO, 1999).

Mesmo se os estímulos são de duração e amplitude suficientes, a membrana pode não descarregar em um segundo estímulo se ele ocorrer muito em seguida ao primeiro estímulo. A membrana necessita de aproximadamente 0,5ms para recuperar sua excitabilidade após um PA. Este tempo de recuperação é chamado de

período refratário absoluto. Um estímulo de maior amplitude pode ser necessário para a membrana possa descarregar novamente em um período de tempo entre 0,5 e 1ms após ter desencatilhado um PA (DACKO, 1999).

Além disso, se o limiar de despolarização exceder certos valores (amplitude de pulso muito alta ou duração de pulso muito longa), as células são irreversivelmente permeabilizadas e perdem sua viabilidade.

Portanto, a eficácia do uso da corrente elétrica e suas aplicações dependem de muitos parâmetros que podem ser divididos em parâmetros de força elétrica (amplitude, duração, frequência de repetição, formato e intervalo de pulso) e parâmetros que definem o estado da célula, seus arredores e sua geometria (temperatura, pressão osmótica, tamanho e formato celular) (PUC, *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos *in vitro* realizando a ES de células animais em cultura envolve CMs e células musculares esqueléticas. O uso de outros tipos celulares ainda é pouco explorado. Muitos desses estudos analisam as conseqüências do estímulo elétrico nas culturas enquanto outros analisam o desempenho dos equipamentos eletroestimuladores desenvolvidos. Os parâmetros e a metodologia utilizados são muito diversificados e, muitas vezes, não são completamente especificados (tabela 1.2).

Tabela 1.2. Estudos envolvendo a ES de culturas celulares e seus respectivos parâmetros.

	Tipo celular/cultivo	Voltagem ou Campo elétrico ou Corrente	Frequência de repetição (Hz)	Duração de pulso (ms)	Duração máxima da ES
JOHNSON <i>et al.</i> (1994)	CM ventricular de rato neonatal - monocamada	50V (<8V/cm)	3	5	4 dias
KATO <i>et al.</i> (1995)	CM adultos de felino - monocamada	4V/cm	1	5	7 dias
HOLT <i>et al.</i> (1997)	CM ventricular de rato adulto - monocamada	5V/cm	1	5	24h
YONEMOCHI <i>et al.</i> (2000)	CM de rato neonatal - monocamada	50V (<8V/cm)	2 a 3,3	---	24h
KUBIS <i>et al.</i> (2002)	Células musculares de coelho - microcarreador	Ajuste visual até atingir a contração (PC)	1,5 ou 10	2,5	7 ou 14dias
MAROTTA <i>et al.</i> (2004)	Células musculares esqueléticas C2C12 - monocamada	50V	3	30	90min
RADISIC <i>et al.</i> (2004)	CM ventricular de rato neonatal - arcabouços de esponjas <i>Ultrafoam</i> de colágeno e matrigel	5V/cm (PC)	1	2	5 dias
PEDROTTY <i>et al.</i> (2004)	Mioblastos esqueléticos adultos de coelho - arcabouços de PGA	1,56mA	---	1	14 dias
BOKENES <i>et al.</i> (2005)	CM ventricular de rato - monocamada	---	1	5	---
STERN-STRAETER <i>et al.</i> (2005)	Mioblastos de rato - arcabouços de fibrina	6,8mA (PC)	---	250	8 dias
SUN <i>et al.</i> (2006)	MSC da medula óssea x fibroblastos de rato	10V/cm (DC)	---	---	60min

CM: cardiomiócito; MSC: célula-tronco mesenquimal; ES: eletroestimulação; PC: corrente pulsada; DC: corrente direta; ---: não especificado.

Em alguns dos estudos que têm investigado como as células respondem ao serem expostas a correntes elétricas foram observados efeitos migratórios (galvanotaxia).

A galvanotaxia é a migração de células em direção ao cátodo ou ânodo. Na maioria dos casos, a célula se move em direção ao cátodo, por exemplo, células epiteliais da córnea bovinas, células endoteliais vasculares aórticas bovinas, células epiteliais pigmentadas da retina humanas, células da crista neural de anfíbios,

fibroblastos de embrião murino, células epidérmicas de peixe, células de câncer de próstata metastáticas humanas, neutrófilos ativados, miofibroblastos, queratinócitos e leucócitos. Entretanto, alguns tipos celulares se movem em direção ao ânodo, por exemplo, granulócitos humanos, células endoteliais da córnea de coelho, células endoteliais vasculares humanas (HUVECs), células de câncer de mama metastáticas humanas, macrófagos e neutrófilos. A diferença entre espécies e/ou subtipos celulares pode alterar a galvanotaxia. Por exemplo, HUVECs movem-se em direção ao ânodo, enquanto células endoteliais vasculares bovinas movem-se em direção ao cátodo (MYCIELSKA & DJAMGOZ, 2004; KLOTH, 2005).

Atribui-se à ES uma variedade de efeitos benéficos que induzem o crescimento (JOHNSON *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 1995), a diferenciação e o acoplamento de CMs (RADISIC *et al.*, 2004).

JOHNSON *et al.* (1994) mostraram que a ES, através da contração mecânica, acelera o crescimento de CMs e o acúmulo de RNA e que a geração de tensão durante a contração é provavelmente mais relevante para estimular o crescimento de CMs do que a frequência de contração. A importância do estabelecimento dos contatos intercelulares foi verificada, pois CMs cultivados em baixa densidade por períodos prolongados exigiram um limiar de voltagem significativamente maior para desencadear a contração, já que estes contatos estavam minimizados.

RADISIC *et al.* (2004) aplicaram pulsos elétricos característicos de miocárdio nativo por 5 dias em construções 3D semeadas com CMs. Verificaram que o estímulo induziu o alinhamento e acoplamento celular, aumentou a amplitude de contrações sincronizadas das construções e promoveu um notável nível de organização ultraestrutural. Interessantemente, as miofibras alinharam-se na direção das linhas do campo elétrico. A ES proporcionou um progressivo desenvolvimento

das propriedades condutivas e contráteis nas construções cardíacas com forte dependência do início e duração do estímulo elétrico aplicado. Além disso, a melhora das propriedades contráteis não foi refletida em qualquer diferença aparente na celularização da construção, dano ou metabolismo celular, mas, ao contrário, foi relacionada à diferenciação celular, sugerindo a maturação dos CMs.

Estudos mostram que células pluripotentes inseridas no coração são capazes de adquirir um fenótipo cardíaco (possivelmente em resposta a estímulos do meio) e que CMs se encontram em um ambiente sujeito a estímulos elétricos. Baseado nisso, perguntamos se seria possível o estímulo elétrico afetar o processo de diferenciação de células pluripotentes para um fenótipo cardíaco.

Embora os resultados de RADISIC *et al.* (2004) tenham apontado para a maturação dos CMs submetidos à ES, estudos da ES de mioblastos constataram a ausência da diferenciação para linhagens esqueléticas (PEDROTTY *et al.*, 2005 e STERN-STRAETER *et al.*, 2005) ou cardíacas (PEDROTTY *et al.*, 2005).

Para nosso conhecimento, existe somente um trabalho publicado envolvendo a ES de MSCs. SUN *et al.* (2006) estudaram os efeitos da ES na adesão e orientação de rMSCs (célula-tronco mesenquimal de rato) em arcabouços de colágeno. Entretanto, os autores não analisaram a diferenciação celular das células submetidas à ES.

1.5.1. Junções celulares

Considerando que as junções celulares são importantes no acoplamento cardíaco mecânico e elétrico e também que são, entre outros mecanismos, os sensores da célula em relação ao meio circundante, é de interesse saber quais os

efeitos de fatores externos (neste trabalho, da ES) sobre a expressão de proteínas juncionais e se estes afetam a orientação e a adesão celular.

As junções ancoradoras conectam mecanicamente as células e os seus citoesqueletos às células adjacentes ou à MEC. São amplamente distribuídas em tecidos animais e são mais abundantes em tecidos que estão sujeitos a diversos estresses mecânicos, tais como cardíaco, muscular e epidérmico. A tabela 1.3 resume os tipos de junções ancoradoras (ALBERTS *et al.*, 2002).

Tabela 1.3. Tipos de junções ancoradoras.

Junção	Proteína de ligação transmembrana	Ligante extracelular	Fixação intracelular do citoesqueleto	Proteínas de ligação intracelular
<i>Ligação célula-célula</i>				
Aderente (figura 1.10A)	Caderina (E-caderina)	Caderina na célula vizinha	Filamentos de actina	α - e β -cateninas, vinculina, α -actinina, placoglobina (γ -catenina)
Desmossomo	Caderina (desmogleína e desmocolina)	Desmogleínas e desmocolinas na célula vizinha	Filamentos intermediários	Desmoplaquinas, placoglobina (γ -catenina)
<i>Ligação célula-MEC</i>				
Adesão/contato focal (figura 1.10B)	Integrina	Proteínas da MEC	Filamentos de actina	Talina, vinculina, α -actinina, paxilina, filamina, FAK
Hemidesmossomo	Integrina $\alpha_6\beta_4$, BP180	Proteínas da MEC	Filamentos intermediários	Plectina, BP230

(adaptado de ALBERTS *et al.*, 2002)

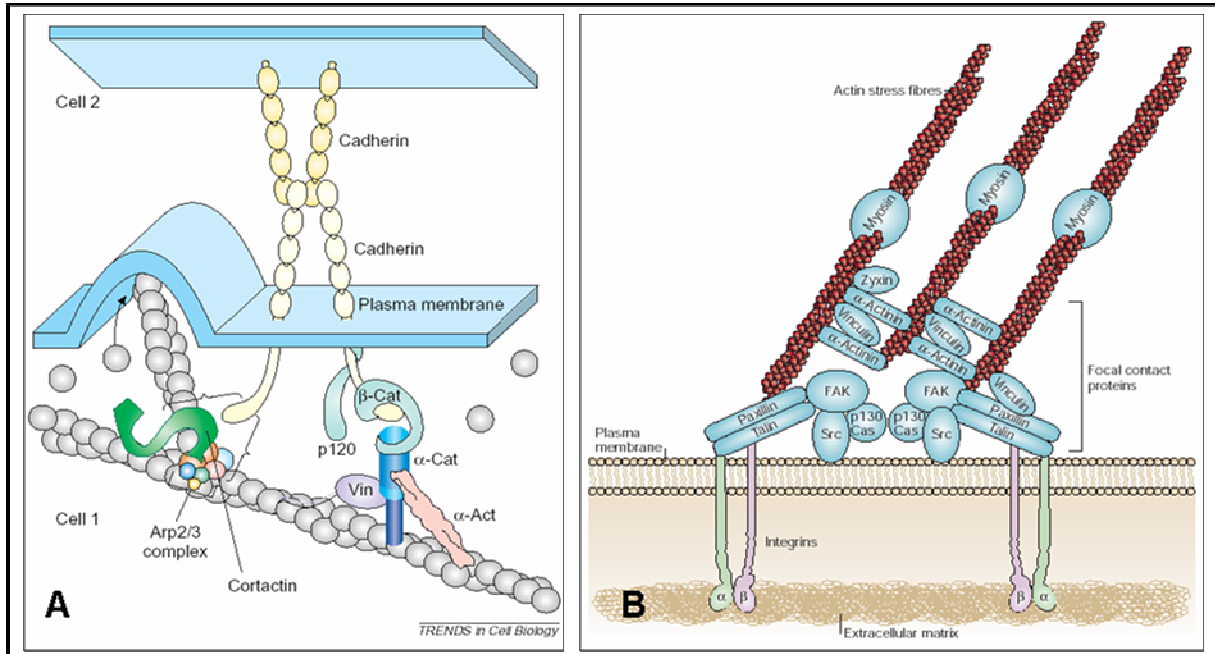


Figura 1.10. (A) Junção aderente. Partes extracelulares de caderinas da membrana plasmática da célula 1 interagem de uma maneira homofílica com as caderinas da vizinhança da célula 2. O domínio citoplasmático de uma molécula de caderina se liga à β-catenina, que por sua vez se liga à α-catenina. A α-catenina interage com filamentos de actina, ou diretamente, ou através de vinculina ou α-actinina. (B) Contatos focais. As proteínas ligantes de integrina - paxilina e talina - recrutam a FAK e a vinculina para os contatos focais. A α-actinina é fosforilada pela FAK, liga-se à vinculina e faz a ligação cruzada de fibras de estresse actina-miosina, prendendo-as nos contatos focais. Assim, um recrutamento hierárquico altamente ordenado de componentes de adesão focal ocorre durante a formação do complexo focal. As proteínas mencionadas são encontradas na maioria dos contatos focais. A ativação de FAK mediada por integrina é em parte mediada pela ligação à MEC ou por mudanças dependentes de força nas ligações do citoesqueleto. A composição de um contato focal, portanto, varia constantemente dependendo de estímulos externos e de respostas celulares (A: extraído de BERSHADSKY, 2004; B: MITRA *et al.*, 2005).

As células formam junções, mas não são necessariamente estáticas, sendo capazes de se movimentar. A migração celular é um processo coordenado que envolve mudanças rápidas na dinâmica dos filamentos de actina, junto com a formação e a desmontagem de sítios de adesão celular. Uma interação complexa entre o citoesqueleto de actina e os sítios de adesão celular leva à geração de protrusões de membrana e forças de tração (MITRA *et al.*, 2005).

Estímulos externos que controlam a migração celular são transduzidos em sinais bioquímicos através: da interação de integrinas que se ligam a proteínas da MEC; de fatores de crescimento que se ligam a seus receptores de superfície celular

cognatos; ou estímulos mecânicos tais como tensão de cisalhamento que promovem a deformação do citoesqueleto de actina (MITRA *et al.*, 2005).

Imagina-se que as integrinas sejam os sensores primários para transmitir sinais físicos ou mecânicos do meio circundante para o interior da célula, que levam, então, à resposta celular apropriada (CARSON & WEI, 2000). Durante a adesão celular à MEC, as integrinas se tornam ativadas e se aglomeram na membrana plasmática (CARRAGHER & FRAME, 2004).

As integrinas compreendem uma grande família de receptores transmembrana que funcionam como heterodímeros, consistindo de subunidades α e β distintas que são ligadas não-covalentemente para formar sítios de ligação para componentes específicos da MEC. A combinação das subunidades α e β altera tanto a afinidade da integrina por proteínas de MEC como quais cascatas internas de sinalização são ativadas. O domínio citoplasmático da subunidade β , em vez da subunidade α , é requerido primariamente para a interação com o citoesqueleto (CARSON & WEI, 2000). As cadeias $\beta 1$ -integrina, que formam dímeros com no mínimo 9 cadeias α , são encontradas em quase todas as células de vertebrados (ALBERTS *et al.*, 2002).

Junções comunicantes medeiam a passagem de sinais elétricos ou químicos de uma célula a outra em interação. Exercem funções regulatórias importantes no desenvolvimento embrionário, acoplamento elétrico, transporte de metabólitos, apoptose, diferenciação, homeostasia tecidual e carcinogênese (KING & LAMPE, 2005). A maioria das células em tecidos animais estão em comunicação com as vizinhas via junções comunicantes do tipo fenda (figura 1.11).

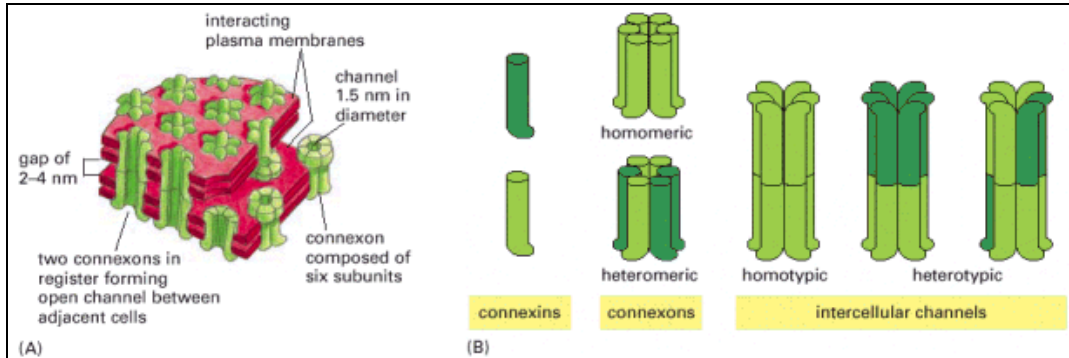


Figura 1.11. (A) Junções do tipo fenda. Constituídas por estruturas denominadas connexons ou hemicanais, formam um canal aquoso contínuo conectando os dois interiores celulares. Cada connexon é formado por seis subunidades de conexina. Dois connexons se ligam para formar um canal aquoso. (B) Cada connexon é composto por seis subunidades protéicas, as conexinas. Estas são proteínas transmembranares com 25 a 62kDa (a diferença de tamanho é usada para nomeá-las). Os connexons podem ser homoméricos ou heteroméricos e os canais intercelulares podem ser homotípicos ou heterotípicos, de acordo com a capacidade de oligomerização das conexinas. Tais junções permitem a passagem de pequenas moléculas citoplasmáticas de até 1kDa (ALBERTS *et al.*, 2002; EVANS *et al.*, 2006).

As conexinas são expressas diferentemente em tecidos, com algumas sendo expressas significativamente em somente determinados tecidos e outras, como a conexina 43 (Cx43), sendo mais amplamente distribuídas. A maioria dos tipos celulares expressa mais que um tipo de conexina. Entre as diversas conexinas expressas no tecido cardíaco está a Cx40, Cx45 e, a mais abundante, Cx43, que é altamente expressa nos estágios embrionários e continua a ser expressa no tecido adulto (KING & LAMPE, 2005). Até 200 mil connexons se organizam em placas nos discos intercalares cardíacos (KOVAL, 2006).

Os connexons na membrana plasmática estão fechados sob condições de repouso, mas podem ser ativados para abrir sob a influência de estímulos tais como concentração de Ca^{2+} extracelular baixa, despolarização da membrana, estresse mecânico da membrana e inibição metabólica. Além disso, os connexons são influenciados por numerosos outros fatores, tais como pH extra e intracelular, estado de fosforilação e estado redox (EVANS *et al.*, 2006).

2. OBJETIVOS

Considerando os efeitos conhecidos de FGF4, BMP2 e AR e a relevância da ES na cardiogênese embrionária, interessamo-nos por analisar a possível atividade desses fatores como indutores da diferenciação cardiogênica de culturas de células mesenquimais humanas e murinas de medula óssea adulta em cultura.

2.1. Objetivos específicos

Investigar os efeitos de FGF4, FGF4 conjuntamente com BMP2, AR e ES sobre:

- A morfologia de células mesenquimais em cultura;
- A capacidade de promover a diferenciação cardiogênica em células mesenquimais pela verificação da presença de marcadores característicos de CMs;
- O crescimento de células mesenquimais em cultura;
- A expressão de proteínas de junções celulares em células mesenquimais em cultura.

3. METODOLOGIA

A lista de soluções e meios de cultura utilizados encontra-se em anexo (Anexo II)

3.1. Tipos celulares

3.1.1. Células mesenquimais de medula óssea humana

Foram utilizadas células mesenquimais de medula óssea humana, gentilmente cedidas pelo Dr. Alex Balduino do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO).

3.1.2. Células mesenquimais de medula óssea murina

Foram utilizados de 4 a 6 camundongos BALB/c adultos (3 a 4 meses de idade). Os animais foram sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ seguida de deslocamento cervical, conforme os manuais nacionais e internacionais para utilização de animais para fins experimentais.

Fêmures e tíbias foram coletados, o tecido conjuntivo foi removido, deixando apenas os ossos. As epífises foram então cortadas e, utilizando uma seringa de 10mL conectada a uma agulha de 0,70x25mm com salina, foi feita a extração, empurrando a medula óssea para dentro de um tubo de 15mL contendo meio de cultura suplementado com SFB. A medula foi dissociada utilizando uma pipeta Pasteur. Centrifugou-se a suspensão a 1500rpm durante 5 minutos a 10°C.

Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 10mL de meio. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer utilizando líquido de Turk.

Foram plaqueadas 2.10^7 células em garrafas de 25cm². Após três dias, a cultura foi lavada três vezes com salina para a retirada da fração não aderente. A tripsinização foi realizada antes de se iniciar a confluência, sendo o meio trocado a cada três dias.

3.1.3. Células utilizadas como controle experimental

Culturas primárias de CMs murinos, gentilmente cedidas pela Dra. Luciana Garzoni, foram utilizadas como controle positivo para proteínas cardíacas nas imunomarcações. A linhagem celular A549 (ATCC CCL185), isolada de um carcinoma pulmonar humano, foi utilizada como controle positivo para a análise da expressão de Nkx2-5. Fibroblastos de pele humana foram utilizados como controle negativo.

3.2. Tratamento das culturas de células mesenquimais da medula óssea com citocinas

As combinações de citocinas recombinantes humanas (R&D Systems) testadas foram:

- FGF4 50ng/mL;
- FGF4 50ng/mL + BMP2 50ng/mL
- FGF4 100ng/mL + BMP2 100ng/mL

Foram plaqueadas 2.10^4 células/poço em placa de 24 poços. Após 24h as células foram lavadas com salina e o meio (OPTIMEM suplementado com SFB 2% e PSA 1X com ou sem citocinas) adicionado. Trocou-se metade do meio três vezes por semana durante 14-21 dias.

3.3. Tratamento das culturas de células mesenquimais da medula óssea com all-*trans*-ácido retinóico

Uma solução-estoque foi constituída dissolvendo-se o all-*trans*-ácido retinóico (Sigma) em etanol absoluto na concentração de 1mM, armazenada no escuro a -20°C. A determinação da concentração foi realizada utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda de 350nm.

As células foram plaqueadas em DMEM suplementado com 10% SFB e PSA 1X. Após 24h as culturas foram lavadas com salina e os meios (controle ou com AR) foram, então, adicionados. Inicialmente foram testadas algumas concentrações de AR, mas na maioria dos experimentos a concentração utilizada foi de 1µM. A cultura controle foi realizada adicionando-se somente etanol na maior quantidade entre as utilizadas na diluição do AR.

Metade do meio de cultura foi trocada três vezes por semana durante o período da cultura.

3.3.1. Marcação com *Oil Red O* das culturas de células tratadas com AR

Para a identificação de lóculos lipídicos nas culturas tratadas com AR foi usada a marcação com *Oil Red O*.

As células cultivadas em lamínulas foram fixadas com formalina 10% por 10 minutos. Após, foram lavadas com água destilada três vezes, retirou-se o excesso para colocar propileno glicol, duas trocas de 5 minutos cada e então a solução de *Oil Red O* por uma hora sob suave agitação. Após esse tempo, retirou-se a solução e colocou-se propileno glicol 85% por três minutos. As lamínulas foram enxaguadas

em água destilada, coradas com hematoxilina por 30 segundos, lavadas em água corrente e em seguida com água destilada. O corante *Oil Red O* tem afinidade por compostos lipídicos corando-os de vermelho.

3.3.2. Identificação de linhagens monocíticas

Utilizou-se um kit (91A-KT, Sigma-Aldrich) para a identificação da α -naftil acetato esterase, que é encontrada em células da linhagem monocítica. Para a realização do teste, as preparações foram incubadas com o substrato enzimático o α -naftil acetato na presença do sal diazonium. A hidrólise enzimática das ligações ésteres libera compostos de naftol livres, os quais se ligam ao sal diazonium formando depósitos coloridos no local de atividade enzimática. A enzima é detectada primariamente em monócitos e macrófagos. Monócitos apresentam coloração escura. Linfócitos e granulócitos podem ocasionalmente exibir atividade enzimática.

As lamínulas foram fixadas por 30 segundos em solução fixadora de citrato-acetona-formaldeído (CAF) à temperatura ambiente (TA). Para o preparo da solução CAF, 5mL de solução citrato (ácido cítrico 18mM, citrato de sódio 9mM, cloreto de sódio 12mM, pH 3,6) foram adicionados à 13mL de acetona e 1,6mL de formaldeído 37%.

Após a fixação, as lamínulas foram enxaguadas em água destilada por 45-60 segundos, colocadas na solução de reação e incubadas por 1h a 37°C, protegidas da luz. Para o preparo da solução de reação, inicialmente diluiu-se 250 μ L de nitrito de sódio 0,1M em 250 μ L de Fast blue BB base (15mg/mL de Fast blue BB base em 0,4 mol/L de ácido hidrolórico). Em seguida, misturou-se a solução e após 2 minutos a coloração mudou de marrom escuro para amarelo escuro. Adicionou-se a solução em 10mL de água destilada pré-aquecida a 37°C. A esta última, foi

adicionado 1,25mL de tampão Trizmal (maleato trizma 1M, pH 7,6) e 250 μ L da solução de α -naftil acetato. A solução tornou-se esverdeada. Misturou-se bem e colocou-se no banho a 37°C.

Após o período de reação, as lamínulas foram enxaguadas por 2 minutos em água destilada antes de serem contrastadas por 2 minutos em solução de hematoxilina de Gill e enxaguadas em água destilada. Utilizou-se meio aquoso *Aquatec* para montagem em lâminas.

3.4. Eletroestimulação

3.4.1. Sistema marcapasso

Inicialmente o sistema utilizado para a ES consistiu de um marcapasso externo de demanda VVI (*Med-100*, Cardio System). O marcapasso permitia regulagem de frequência de repetição (40 a 120 bpm) e voltagem (5 ou 9V). Como parâmetros nominais de saída foram utilizados: frequência de repetição de 120bpm (equivalente a 2Hz) e amplitude de voltagem de 9V.

Dois fios de marcapasso descartáveis de aço (*Ethicon*, Johnson&Johnson), utilizados como eletrodos, foram colocados dentro de uma placa de Petri de poliestireno (60x15mm, Corning), arranjados conforme a figura 3.1 e conectados ao marcapasso.

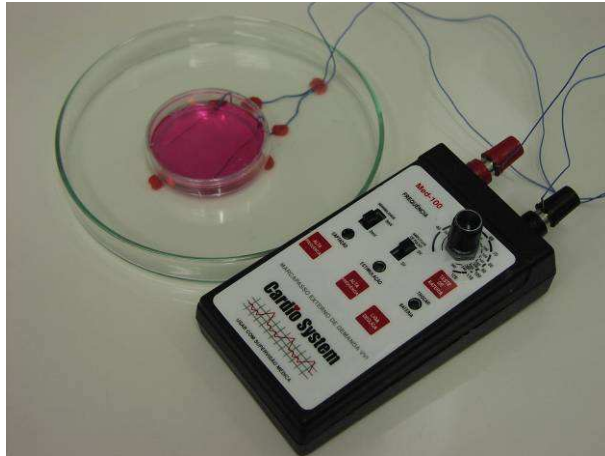


Figura 3.1. Sistema marcapasso.

3.4.2. Equipamento eletroestimulador

Tentando mimetizar o ambiente cardíaco e eliminar possíveis distorções inerentes ao sistema marcapasso, um equipamento (figura 3.2) foi especialmente construído para o processo de ES pelo Laboratório de Instrumentação Biomédica (LIB)/COPPE-UFRJ, sob orientação do Dr. Márcio Nogueira de Souza.

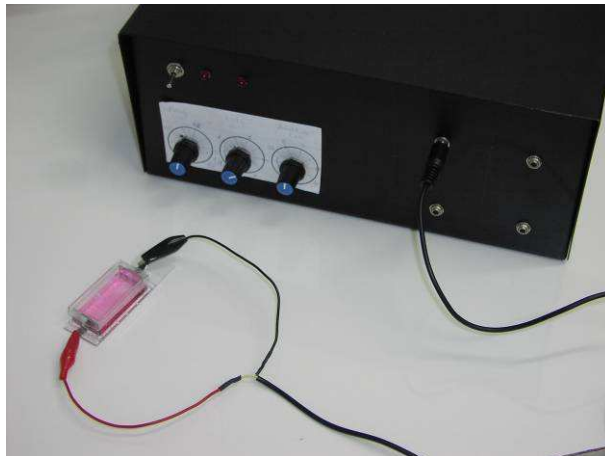


Figura 3.2. Equipamento eletroestimulador com uma câmara *Lab-Tek* acoplada.

O equipamento permite regulagem de amplitude de corrente (0,2 a 22 mA), frequência de repetição (0,1 a 7,5 Hz) e duração de pulso (1 a 7 ms), possuindo quatro saídas independentes, mas com controle único. O tipo de corrente produzido

pelo eletroestimulador é alternado com pulso bifásico balanceado a fim de impedir a eletrólise.

Como parâmetros de ES foram utilizados: frequência de repetição de 2Hz, corrente de 16 ou 22mA e duração de pulso de 1ms.

O funcionamento do equipamento foi monitorado através de um *led* que, conectado aos cabos, acendia quando havia passagem de corrente elétrica.

Foram utilizadas câmaras de poliestireno com dimensões de 43x19x9mm (*Lab-Tek Chamber Slide*, Nunc). Cada câmara possuía dois eletrodos localizados em extremidades opostas, conectados através de fios ao eletroestimulador. Como o campo elétrico é uma função do formato do eletrodo, para torná-lo homogêneo foram utilizadas chapas de aço inoxidável 304, recortadas conforme a Figura 3.3A e dobradas para se adaptarem às placas de modo que formassem duas placas paralelas em cada extremidade da placa de cultura (figuras 3.3B e 3.3C).

A disposição final das culturas ES é mostrada na figura 3.4, onde quatro câmaras *Lab-Tek* estão arranjadas duas a duas dentro de placas de Petri.

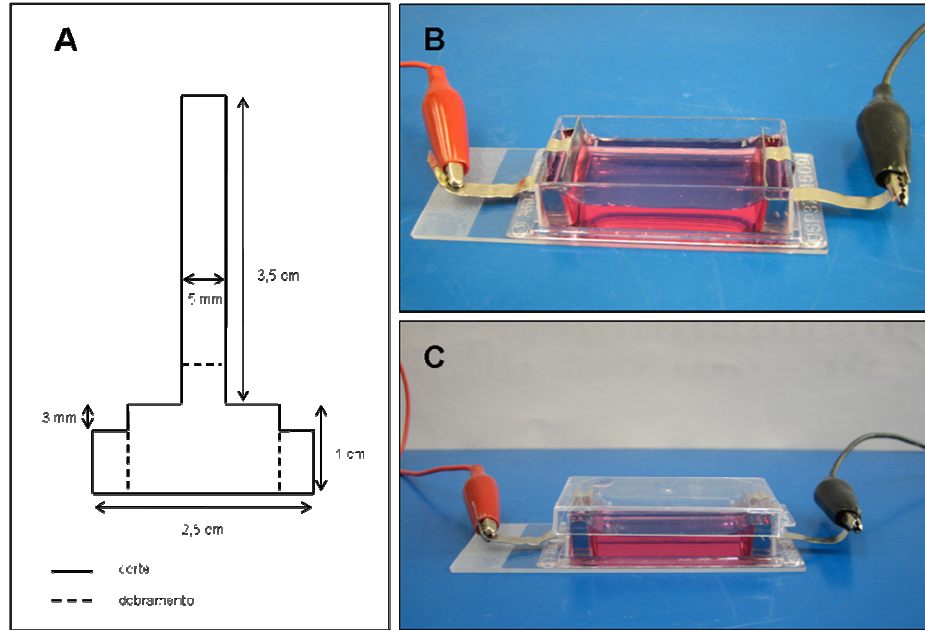


Figura 3.3. (A) Dimensões do eletrodo de aço inoxidável. (B) e (C) Disposição dos eletrodos na câmara *Lab-Tek* e a conexão com os fios.

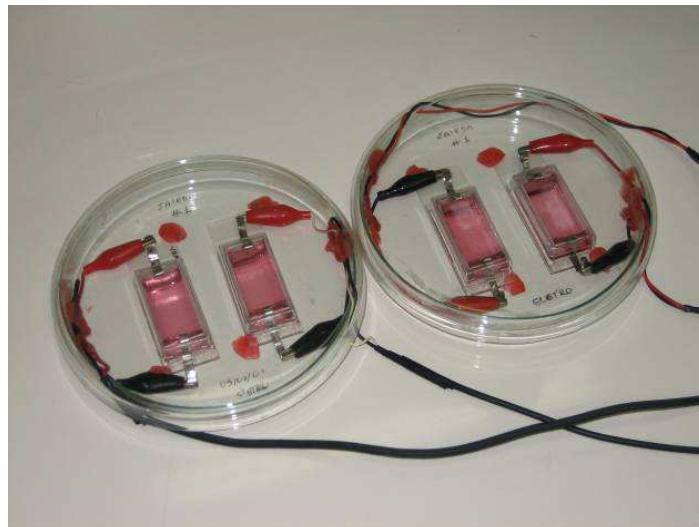


Figura 3.4. Disposição das câmaras *Lab-Tek* em placas de Petri.

3.4.3. Eletroestimulação das culturas de células mesenquimais de medula óssea

Foram plaqueadas de 1 a $2 \cdot 10^5$ células mesenquimais murinas ou 4 a $6 \cdot 10^4$ células mesenquimais humanas em cada placa *Lab-Tek*. Após 24h, a cultura foi lavada com salina e, nas culturas ES, os eletrodos foram adaptados e conectados

ao eletroestimulador, iniciando-se, assim, a ES. Para cada experimento foram realizadas culturas controle nas mesmas condições, não havendo ES. A duração padrão dos experimentos foi de 14 dias, a 37°C em 5 % de CO₂, sendo o meio de cultura trocado duas vezes por semana. O meio utilizado foi DMEM suplementado com 10% de SFB e PSA1X.

3.5. Imunocitoquímica

3.5.1. Fixação das culturas para imunofluorescência

As culturas foram primeiramente lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos cada, sempre sob suave agitação. Fixou-se com paraformaldeído (PFA) 4%, deixando agir durante 15 minutos. Seguiram-se três lavagens com PBS de 5 minutos cada. A cultura fixada foi mantida em PBS a 4°C até a realização da imunoreação.

3.5.2. Imunofluorescência

A cultura fixada foi lavada duas vezes com PBS e incubada com PBS/triton 0,5% por 30 minutos à TA, sem agitar. Em seguida, lavou-se três vezes com PBS, agitando-se suavemente por 5 minutos.

O bloqueio foi feito com PBS/BSA 5% ou PBS/BSA 5% + leite em pó desnatado Molico 5% por 1h à TA agitando-se suavemente. A cultura foi então lavada duas vezes com PBS a TA agitando-se suavemente por 5 minutos.

Em seguida, a cultura foi incubada com o anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1% por 1h a 37°C, em câmara úmida. Lavou-se três vezes com PBS à TA agitando-se levemente por 5 minutos.

Incubou-se com o anticorpo secundário diluído em PBS/BSA 1% por 1h a 37°C. Lavou-se três vezes com PBS à TA agitando-se levemente por 5 minutos.

Quando se realizou a marcação de filamentos de actina, incubou-se com faloidina diluída em PBS durante 30 minutos, a 37°C. Lavou-se três vezes com PBS à TA agitando-se levemente por 5 minutos;

Para a marcação dos núcleos, a cultura de células foi incubada com DAPI diluído em PBS durante 5 minutos à TA. Lavou-se três vezes com PBS à TA agitando-se levemente por 5 minutos.

O excesso de líquido foi retirado e as lamínulas foram montadas sobre lâminas com o auxílio do meio de montagem *Vectashield*.

A lista de anticorpos e marcadores utilizados encontra-se em anexo (Anexo III).

3.6. Western Blotting

3.6.1. Dosagem de proteínas totais – Método de Bradford

O método de Bradford é um dos mais sensíveis e usados para dosagem de proteínas totais. A intensidade da cor, medida através da absorbância em espectrofotômetro, varia entre soluções com diferentes concentrações, mas com as mesmas proteínas.

Uma curva de calibração de absorbância a 595nm *versus* concentração de proteína padrão em mg/mL foi construída reagindo diferentes concentrações de soroalbumina bovina (BSA) com o reagente de Bradford.

O resultado da absorbância a 595nm gerado pela amostra analisada foi convertido em concentração utilizando como referência a curva de calibração.

3.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As culturas foram lavadas três vezes com PBS e depois tratadas com 1 volume de tampão de amostras para eletroforese (SDS 4%, Tris-HCl 125mM pH 6.8, glicerol 20% e DTT 0,2M) e fervidas por 5 minutos a 100°C. Géis de corrida desnaturantes de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) foram preparados e as amostras, com a mesma quantidade de proteínas (60µg), foram aplicadas nos poços de eletroforese. As eletroforeses foram realizadas à corrente constante (cerca de 25mA).

3.6.3. Immunoblotting

A revelação imunológica da transferência eletroforética de proteínas em gel desnaturante de poliacrilamida para folha de PVDF (*Millipore*, São Paulo, Brasil), ou *immunoblotting*, foi feita de acordo com o descrito por TOWBIN *et al.* (1979), com modificações.

Ao final da eletroforese, o gel foi colocado no tampão de transferência (Tris 25mM, glicina 191mM e metanol 20%), por 20 minutos. A folha de PVDF foi lavada por 10 segundos em metanol absoluto, colocada em água destilada por 5 minutos (sob agitação) e depois por 10 minutos em tampão de transferência. A seguir, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para esta folha, durante 19 horas, a 25mA e a 4°C. A PVDF foi, então, corada pela solução de Vermelho Ponceau VP (VP 0,1% e ácido acético 5%) para se analisar a eficiência da transferência.

As proteínas imobilizadas na membrana foram bloqueadas com uma solução de 5 % de leite em pó desnatado Molico em tampão TBS/Tween 0,001% por 1 hora a TA e em seguida a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos cada com TBS/Tween. A PVDF foi, então, incubada com o anticorpo primário, diluído adequadamente neste mesmo tampão, durante a noite, a 4°C e sob agitação. Após

a incubação, a PVDF foi lavada mais 5 vezes, por 3 minutos cada, com TBS/Tween. A seguir, incubou-se com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase devidamente diluído, por 1h, a TA e sob agitação. Após 4 lavagens de 10 minutos cada, com TBS/Tween, a PVDF foi submetida à revelação pelo Kit ECL (*Amersham*, Buckinghamshire, UK).

Para verificar a presença de outra proteína na mesma folha de PVDF, esta foi tratada com tampão de *Striping* (SDS 2%, 2-mercaptoetanol 100mM e Tris 62,5mM pH 6.7) por 40 minutos à 60°C, lavada 4 vezes em TBS-Tween e bloqueada novamente. Depois a PVDF foi incubada com anticorpo primário devidamente diluído em TBS/Tween e o procedimento seguiu a forma descrita anteriormente.

A lista de anticorpos e marcadores utilizados encontra-se em anexo (Anexo III).

3.6.4. Quantificação de bandas de *immunoblotting*

O programa *Image J* foi utilizado para a quantificação da densidade das bandas. Foram utilizadas imagens escaneadas do gel. Os valores de cinza das bandas foram checados para confirmar se estavam maiores que os do fundo e, caso necessário, invertidos através do comando `<lookup tables>`, `<invert LUT>` e então `<edit>`, `<invert>`. As imagens foram coloridas de vermelho através do comando `<image>`, `<ajust>` e `<threshold>`. Na janela `<threshold>` ajustou-se de forma que somente as bandas ficassem vermelhas e o fundo do gel não, mexendo com a seta de cima, mas deixando a seta de baixo no valor máximo (255) e então `<apply>`.

Para a obtenção dos valores da quantificação, clicou-se em `<set measurements>` e marcaram-se os parâmetros de interesse (integrated density). Em `<set scale>` foi definido o valor de distância para 1 e a unidade em pixels.

Em <analyze>, <analyze particles> foi gerada uma tabela com os valores de densidade integrada correspondentes a cada uma das bandas a partir da qual foram construídos os gráficos apresentados.

3.7. Estimativas de crescimento celular

Os métodos utilizados para a estimativa de proliferação celular foram: método do MTT e contagem do número de células em campos aleatórios.

3.7.1. Método do MTT

O método do MTT envolve a conversão, por enzimas mitocondriais, do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil brometo tetrazólio) solúvel em água em formazan insolúvel. O formazan é então solubilizado, e a concentração determinada por densidade ótica a 570nm. Quanto maior é a quantidade de células (ou de mitocôndrias), maior a conversão e maior a absorbância a 570nm.

O meio de cultura foi substituído por meio fresco sem vermelho de fenol - 2mL nas placas de ES ou 400µL nas placas de 24 poços - e adicionou-se 200µL ou 40µL, respectivamente, de uma solução estoque de 12mM de MTT ao meio. Foi incluído um controle negativo de somente meio com a solução de MTT.

As culturas foram incubadas à 37°C por 2h. Em seguida, adicionou-se a solução de SDS-HCl (2mL ou 400µL) e misturou-se completamente. Incubou-se à 37°C por 4h. Posteriormente, misturou-se e efetuou-se a leitura de absorbância a 570nm.

3.7.2. Contagem do número de células em campos aleatórios

Imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência, quando se realizou a marcação com DAPI, ou em microscópio ótico, quando se realizou marcação com hematoxilina. DAPI é um marcador azul fluorescente de bases nitrogenadas AT ou AU de ácidos nucleicos. Hematoxilina é um corante que tem afinidade por moléculas carregadas negativamente revelando, portanto, a distribuição de DNA, RNA e proteínas ácidas na célula. Vinte campos aleatórios foram fotografados com objetivas no aumento de 10x ou 20x. A cada núcleo marcado com DAPI ou hematoxilina foi associada a existência de uma célula.

3.8. Análise estatística

Os dados, a não ser quando explicitado, foram apresentados como média \pm desvio padrão. A significância das diferenças experimentais foi determinada usando o teste ANOVA (Teste de Tukey) quando eram comparadas mais de duas situações e o *Student's t-test* não-pareado através do software GraphPad Prism 4.02. A significância foi definida como $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Análise dos efeitos das citocinas BMP2 e FGF4 sobre a morfologia de culturas de células mesenquimais de medula óssea

Atribui-se a suplementos para o meio de cultura sinais que determinam a diferenciação de células multipotentes em linhagens específicas. Assim, estudamos o efeito da adição das citocinas BMP2 e FGF4 na indução cardiogênica de culturas de células mesenquimais humanas e murinas.

Considerando que a combinação de BMP2 e FGF4 favorece a indução cardíaca, foram analisadas culturas de células mesenquimais murinas tratadas durante 21 dias e humanas tratadas durante 14 dias com FGF4 50ng/mL, FGF4+BMP2 50ng/mL ou FGF4+BMP2 100ng/mL.

Nas culturas de células mesenquimais murinas que receberam qualquer um dos tratamentos com citocinas houve um aumento no crescimento de células arredondadas que se destacavam das placas de cultura, como verificado visualmente por microscopia de contraste de fase (figura 4.1).

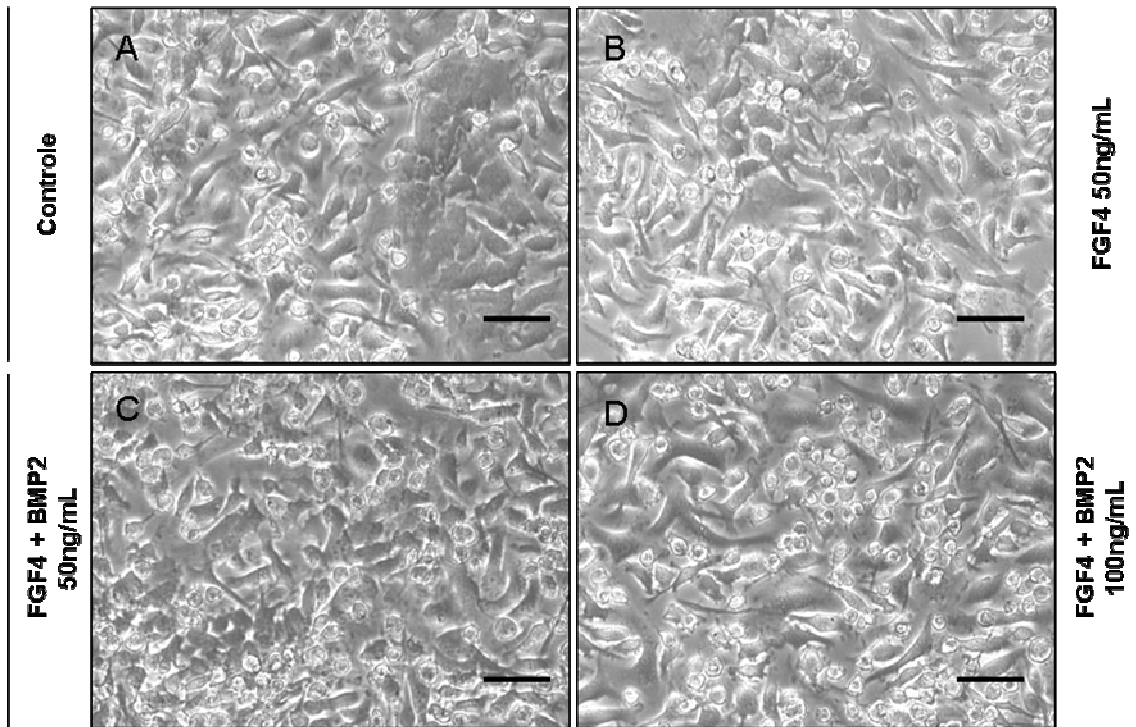


Figura 4.1. Aspectos morfológicos de células mesenquimais murinas em cultura tratadas com FGF4 ou FGF4+BMP2. As imagens observadas por microscopia de contraste de fase foram obtidas de culturas de células mesenquimais murinas após 21 dias de tratamento com as citocinas. (A) Controle. (B) FGF4 50ng/mL. (C) FGF4+BMP2 50ng/mL. (D) FGF4+BMP2 100ng/mL. Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 50µm.

Nas culturas de células mesenquimais humanas, com poucos dias já se constatou visualmente por microscopia de contraste de fase que as tratadas com citocina apresentavam um maior crescimento quando comparadas às controles. Enquanto as culturas controles apresentavam muitos fragmentos celulares, as tratadas com citocinas apresentavam um melhor aspecto (figuras 4.2 e 4.3).

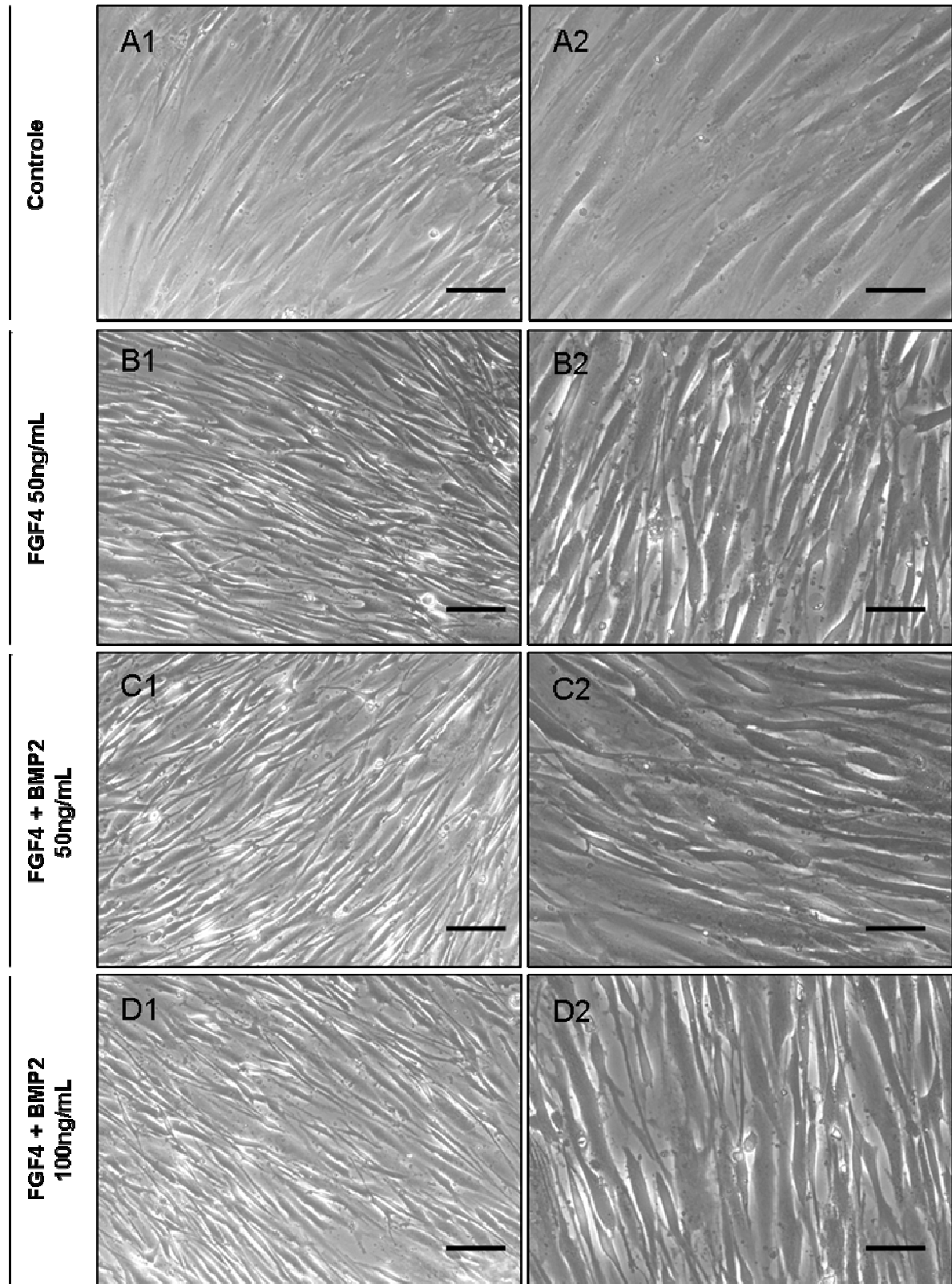


Figura 4.2. Aspectos morfológicos de células mesenquimais humanas em cultura tratadas com FGF4 ou FGF4+BMP2. As imagens observadas por microscopia de contraste de fase foram obtidas de culturas de células mesenquimais humanas após 4 dias de tratamento com as citocinas. (A) Cultura controle. (B) Cultura tratada com FGF4 50ng/mL. (C) Cultura tratada com FGF4+BMP2 50ng/mL. (D) Cultura tratada com FGF4+BMP2 100ng/mL. (1) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 10x; (2) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 100µm em 1 e 50µm em 2.

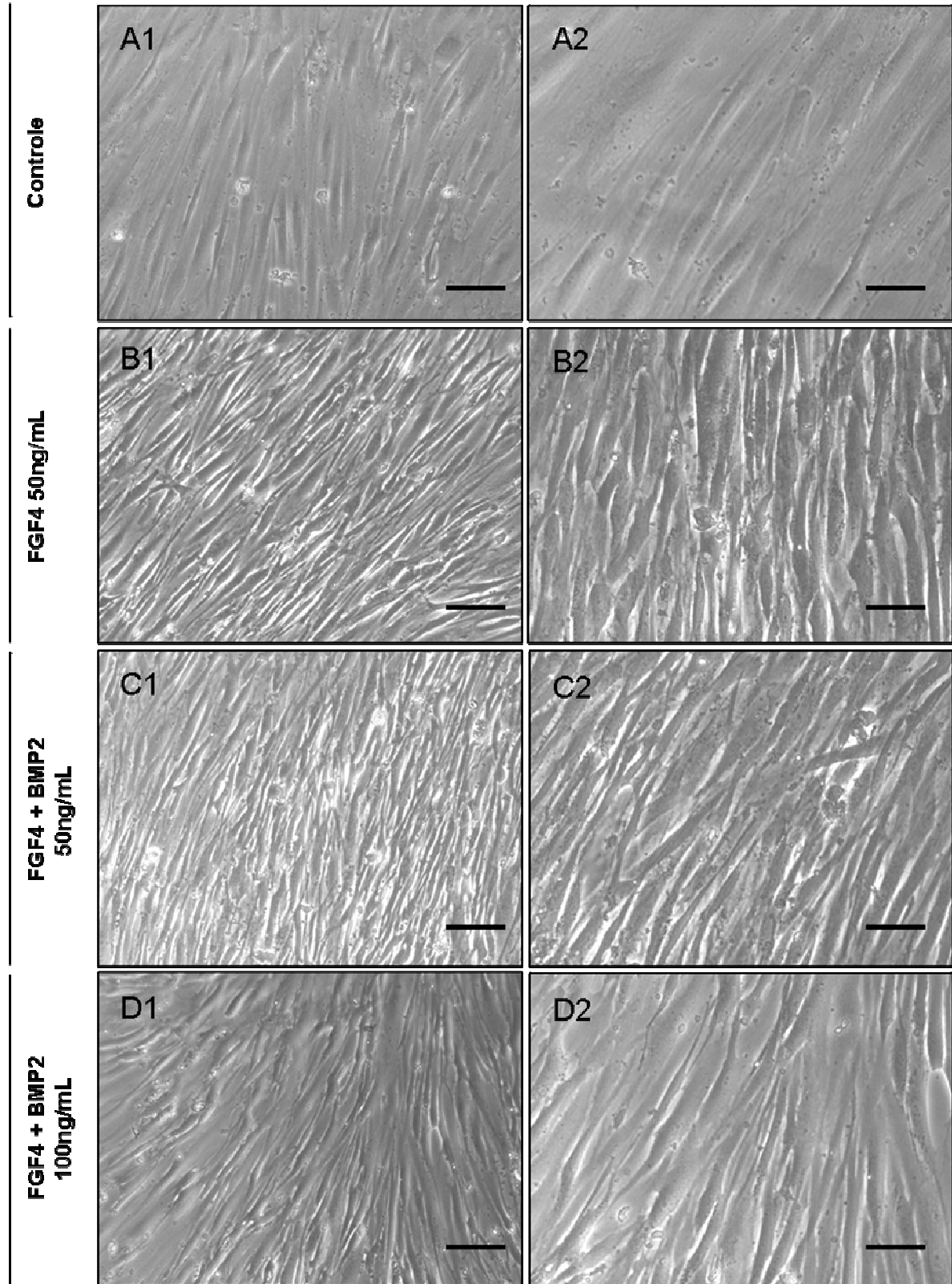


Figura 4.3. Aspectos morfológicos de células mesenquimais humanas em cultura tratadas com FGF4 ou FGF4+BMP2. As imagens observadas por microscopia de contraste de fase foram obtidas de culturas de células mesenquimais humanas após 14 dias de tratamento com as citocinas. (A) Cultura controle. (B) Cultura tratada com FGF4 50ng/mL. (C) Cultura tratada com FGF4+BMP2 50ng/mL. (D) Cultura tratada com FGF4+BMP2 100ng/mL. (1) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 10x; (2) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 100 μ m em 1 e 50 μ m em 2.

4.1.1. Análise dos efeitos do FGF4 e BMP2 no potencial de diferenciação cardiogênico de culturas de células mesenquimais da medula óssea

Para análise da diferenciação cardiomiocítica, culturas de células mesenquimais humanas e murinas tratadas com as citocinas FGF4 50ng/mL, FGF4+BMP2 50ng/mL ou FGF4+BMP2 100ng/mL foram submetidas à imunofluorescência com os anticorpos anti-Nkx2-5 (figura 4.4) ou anti-troponina I (imagens não mostradas) após o período de tratamento. Não houve marcação positiva em nenhum dos grupos. Por outro lado, como esperado, foi possível observar marcação positiva para α -actinina sarcomérica, troponina I e Nkx2-5 em culturas primárias de CMs. A expressão de Nkx2-5 também foi observada em células da linhagem A549 (figura 4.5).

Foi testado o efeito do uso de 10% de meio condicionado por CM humano no cultivo de células mesenquimais humanas na indução cardiogênica, ainda utilizando o sistema marcapasso. No entanto, as culturas não apresentaram indicações de diferenciação cardiomiocítica (dados não mostrados).

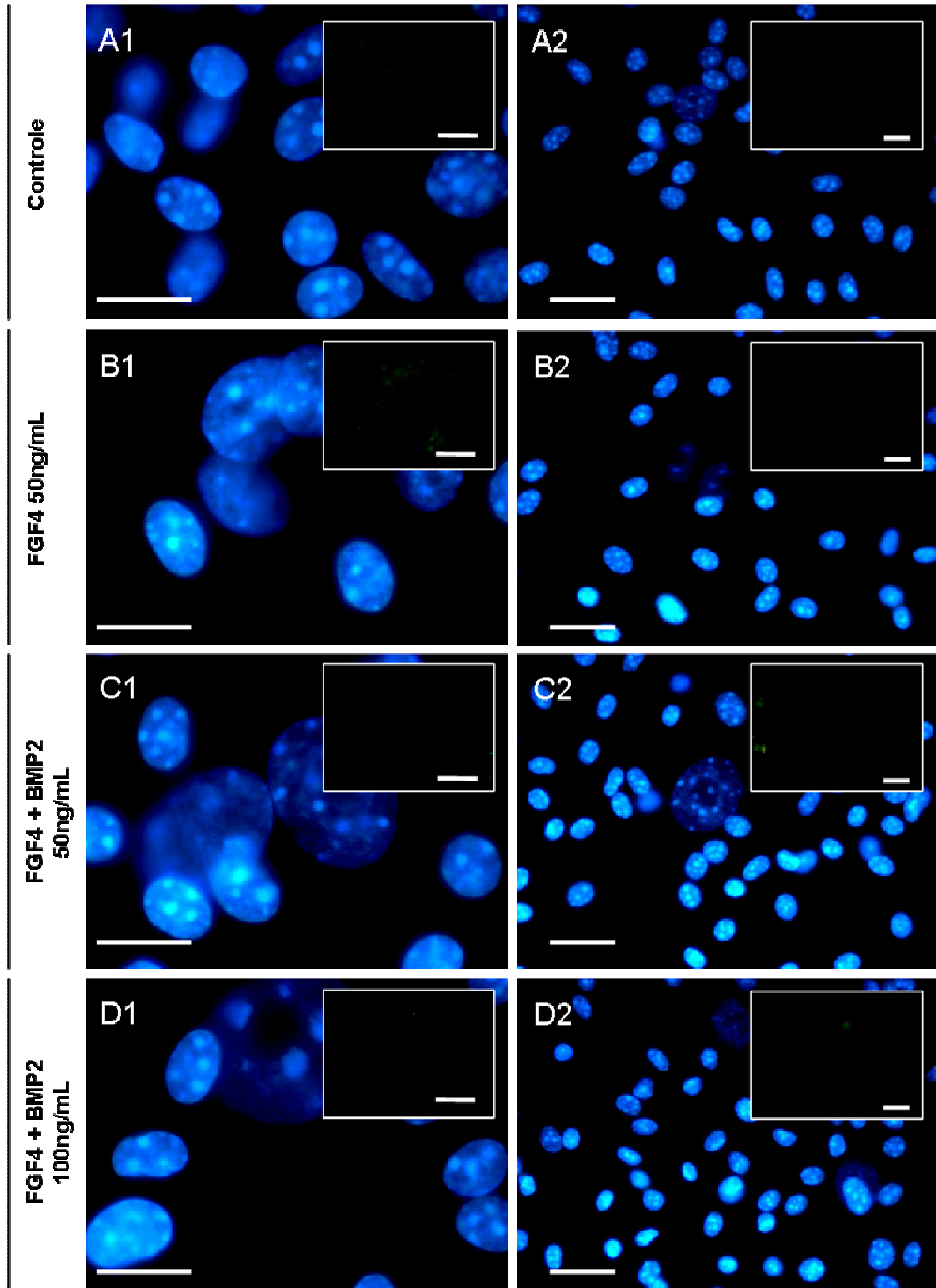


Figura 4.4. Análise da expressão de Nkx2-5 em células mesenquimais murinas cultivadas por 14 dias na presença de FGF4 ou FGF4+BMP2. Imagens das imunofluorescências com anticorpo anti-Nkx2-5 em células mesenquimais murinas cultivadas por 14 dias. Nas figuras maiores observa-se a presença de células através da marcação com DAPI e nos insertos são mostradas as negatividades das reações com anti-Nkx2-5. (A) Controle. (B) FGF4 50ng/mL. (C) FGF4+BMP2 50ng/mL. (D) FGF4+BMP2 100ng/mL. Barra = 15µm em 1 e 25µm em 2.

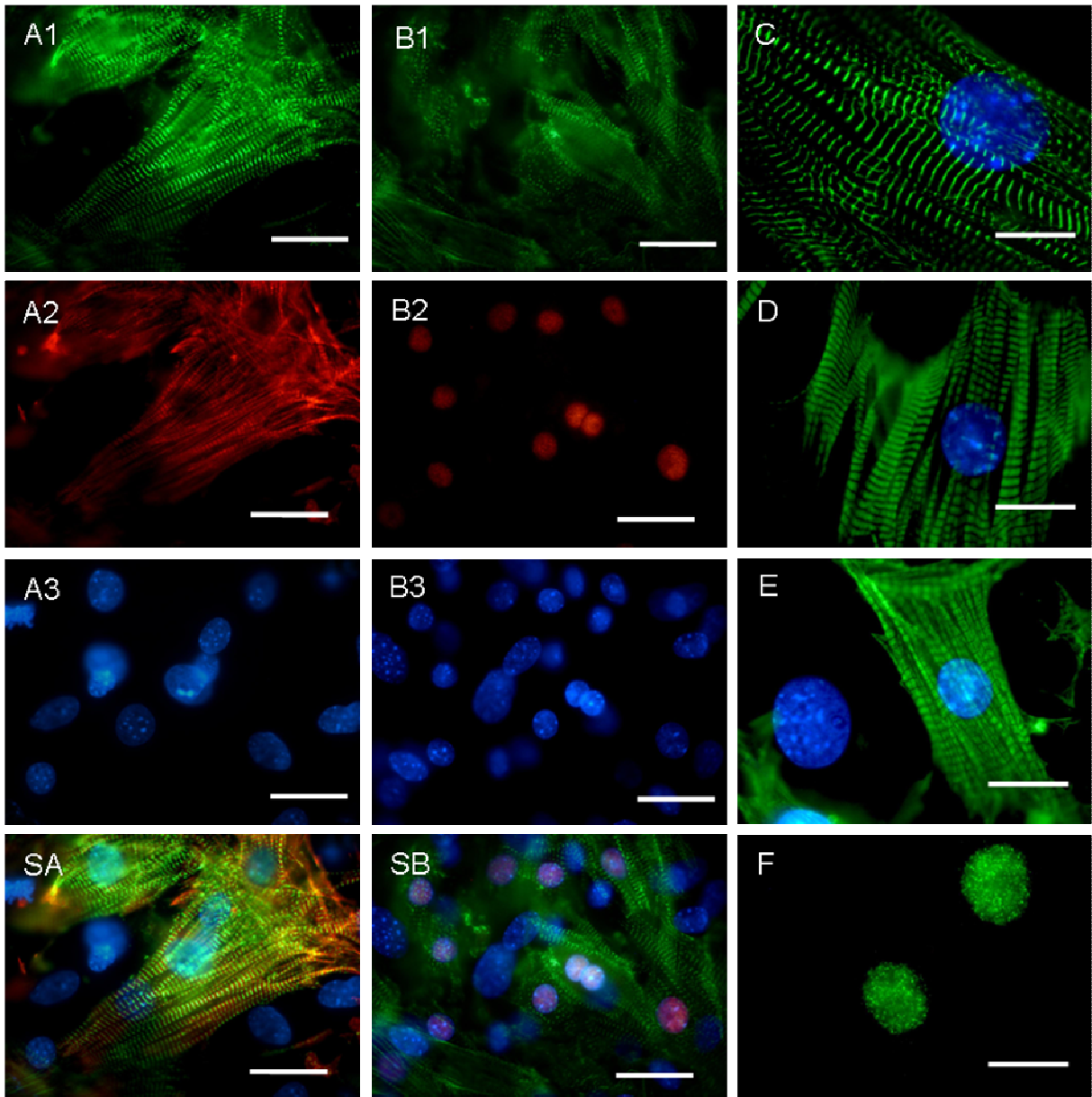


Figura 4.5. Expressão de Nkx2-5, α -actinina-sarcomérica e troponina I em culturas primárias de CMs murinos e de Nkx2-5 na linhagem A549. Estas células foram utilizadas como controles positivos para as análises realizadas nas células mesenquimais em cultura. (A1, A2, A3 e SA) CMs marcados com anti- α -actinina-sarcomérica (A1), anti-troponina I (A2), DAPI (A3) e a sobreposição das três imagens em SA. (B1, B2, B3 e SB) CMs marcados com anti- α -actinina-sarcomérica (B1), anti-Nkx2-5 (B2), DAPI (B3) e a sobreposição das três imagens em SB. (C-E) CMs marcados com anti- α -actinina-sarcomérica em verde e DAPI em azul (C); anti-troponina I em verde e DAPI em azul (D e E). (F) Linhagem A549 marcada com anti-Nkx2-5. Barra = 30 μ m em A1, A2, A3, AS, B1, B2, B3 e SB; e 15 μ m em C, D, E e F.

4.1.2. Análise dos efeitos do FGF4 e BMP2 no crescimento de células mesenquimais da medula óssea em cultura

O aumento do crescimento celular dos grupos tratados com citocinas era perceptível. Para confirmação, foi realizada a contagem de campos aleatórios de células marcadas com DAPI.

Culturas de células mesenquimais humanas foram analisadas após 14 dias de tratamento com as citocinas FGF4 50ng/mL, FGF4+BMP2 50ng/mL ou FGF4+BMP2 100ng/mL. O número de células foi significativamente maior nas culturas tratadas, sendo 128% maior na cultura tratada com FGF4 50ng/mL, 112,7% maior na tratada com FGF4+BMP2 50ng/mL e 63,4% maior na tratada com FGF4+BMP2 100ng/mL em comparação à cultura controle (figura 4.6A). O aumento na dose de FGF4+BMP2 de 50 para 100ng/mL diminuiu de modo significativo o número de células, o que sugere um efeito inibitório dose-dependente.

Nas culturas de células mesenquimais murinas que receberam qualquer um dos tratamentos com citocinas foi verificado um aumento no crescimento de células arredondadas, que se destacavam da placa (ver figura 4.1). Quando foram analisadas e comparadas às culturas controles, culturas tratadas com FGF4 50ng/mL apresentaram um número de células 13,5% menor, no entanto, a diferença não foi significativa; nas tratadas com FGF4+BMP2 50ng/mL foi 21,3% maior e 8,5% maior nas tratadas com FGF4+BMP2 100ng/mL (figura 4.6B).

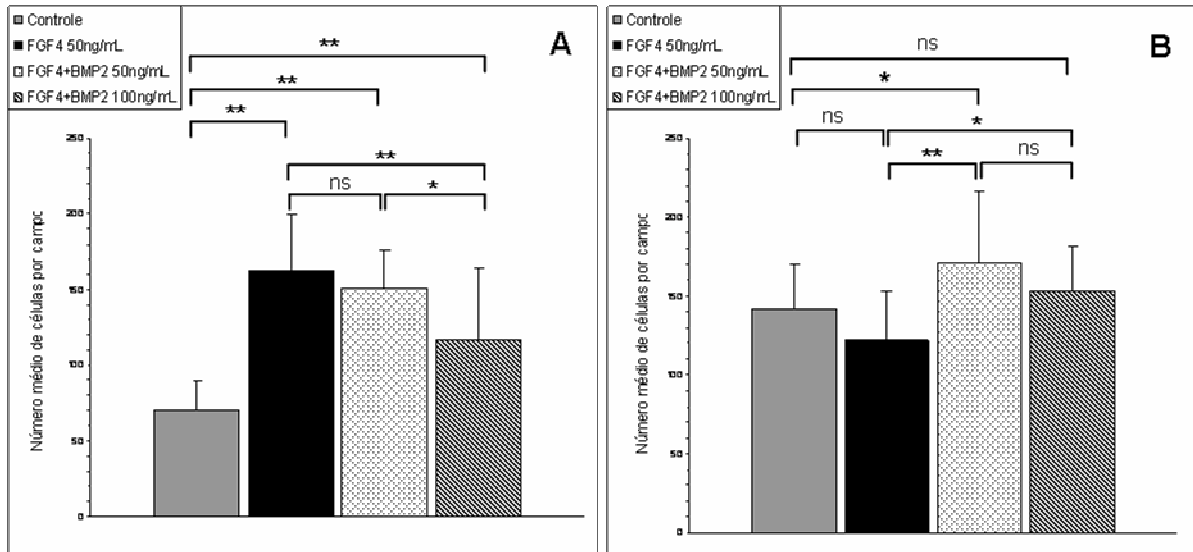


Figura 4.6. Crescimento celular de culturas de células mesenquimais humanas e murinas tratadas com FGF4 ou FGF4+BMP2. (A) Células mesenquimais humanas tratadas por 14 dias com citocinas foram fixadas e marcadas com DAPI. Vinte campos aleatórios (n=3) foram fotografados com a objetiva no aumento de 10x e contados (* P<0,01; ** P<0,001). (B) Células mesenquimais murinas tratadas por 21 dias com citocinas foram fixadas e marcadas com DAPI. Vinte campos aleatórios (n=3) foram fotografados com a objetiva no aumento de 20x e contados (* P<0,05; ** P<0,001).

4.2. Análise dos efeitos do AR sobre a morfologia de culturas de células mesenquimais de medula óssea

Como se têm demonstrado que o AR influencia o desenvolvimento do coração e favorece a diferenciação de ESCs em CMs, analisamos o efeito dessa molécula em culturas de células mesenquimais humanas e murinas.

Um experimento foi realizado para determinar qual seria a concentração máxima suportada pelas células. Verificou-se que, entre as concentrações testadas - 3, 6, 12, 24 e 48 μ M - as células mesenquimais murinas suportaram uma concentração de até 24 μ M, mas não resistiram à concentração de 48 μ M, o que corrobora com informações prévias que estimam em 50 μ M a concentração máxima suportada por qualquer célula.

Em paralelo foi realizado um experimento para avaliar o possível efeito dependente de concentração do AR sobre as culturas. Com base em dados da

literatura, foram testadas as concentrações de 1 μ M, 0,1 μ M, 10nM e 1nM em células mesenquimais murinas. Como não se observou diferença morfológica nas culturas tratadas com as diferentes concentrações, adotou-se a maior dentre elas, ou seja, 1 μ M.

As culturas de células mesenquimais humanas mostraram-se homogêneas no decorrer do experimento. Tanto o grupo controle quanto o tratado com AR 1 μ M apresentaram células morfológicamente semelhantes, com formato fibroblastóide (figura 4.7).

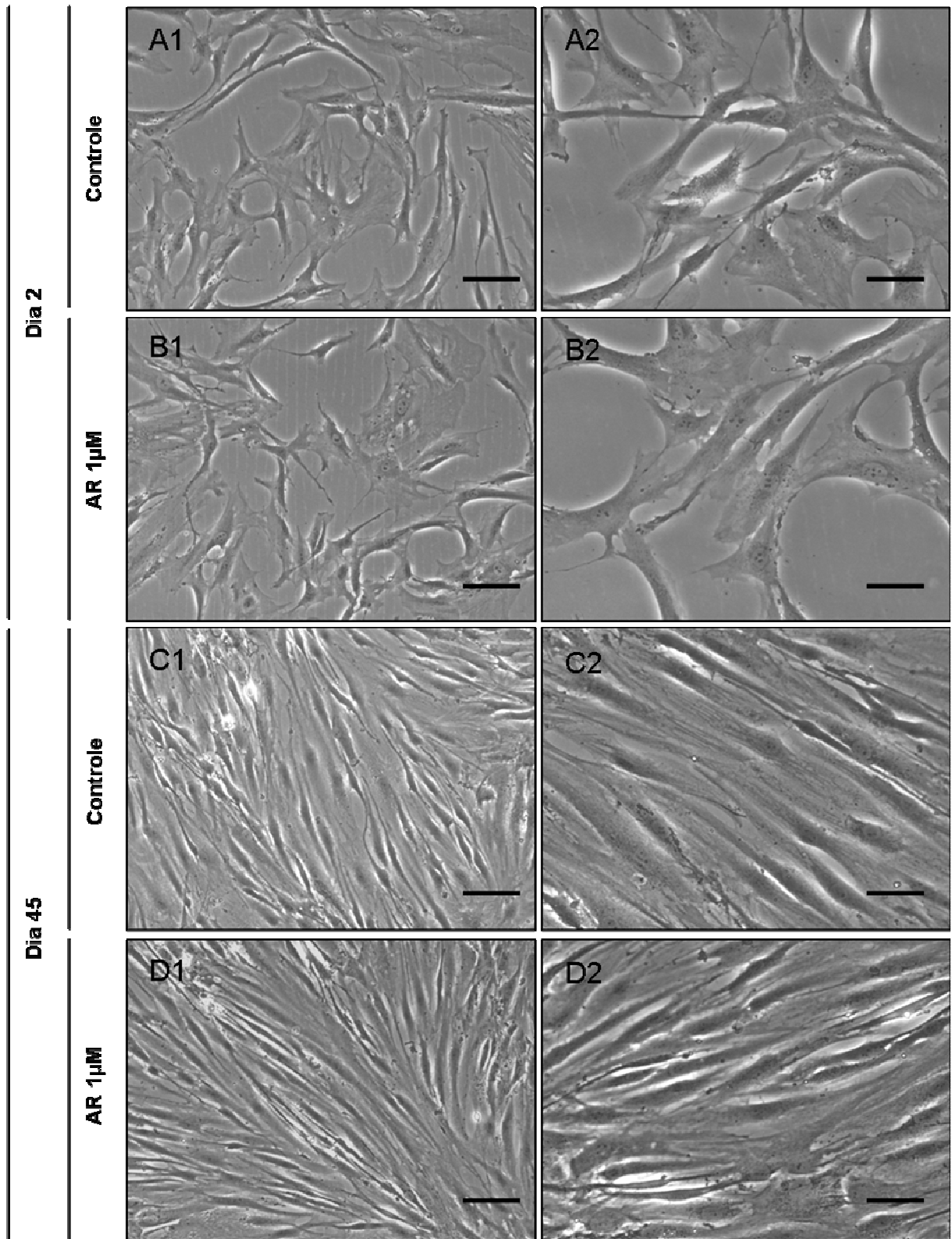


Figura 4.7. Aspectos morfológicos de células mesenquimais humanas em cultura tratadas com AR. As imagens observadas por microscopia de contraste de fase foram obtidas de culturas de células mesenquimais humanas após 2 dias (A e B) e 45 dias (C e D) de tratamento na ausência ou presença de AR. (A e C) Cultura controle. (B e D) Cultura tratada com AR 1 μ M. (1) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 10x; (2) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 100 μ m em 1 e 50 μ m em 2.

A morfologia das culturas de células mesenquimais murinas foi muito variada, com células fibroblastóides, arredondadas, ramificadas, bipolares ou espreiadas. Uma análise realizada em culturas murinas tratadas com AR foi a marcação de α -naftil acetato esterase para a identificação de linhagem monocítica. Verificou-se que na passagem 3 (p3), com 23 dias de tratamento, havia muitas células marcadas. Outra reação foi realizada com a mesma cultura na p5, com 38 dias e a presença de monócitos/macrófagos foi rara (dados não mostrados). Assim, verificou-se que a presença de linhagem monocítica diminui com as passagens, o que está de acordo com dados prévios publicados na literatura.

Com 14 dias de tratamento com AR $1\mu\text{M}$ foi observado o surgimento de lóculos no citoplasma de células mesenquimais murinas em cultura (figura 4.8A). Houve um pequeno aumento dessas células com o passar do tempo. Na maioria das células o acúmulo de lóculos aumentou progressivamente, no entanto, não foi observada a fusão em um único lóculo, como ocorre na diferenciação adipocítica. Para analisar a composição destes lóculos, foi realizada a marcação com *Oil Red O*, que tem afinidade por compostos lipídicos neutros corando-os de vermelho (figura 4.8B-D).

Em culturas de células mesenquimais humanas não foi observado o surgimento de células com lóculos lipídicos durante o período de cultura, exceto com 45 dias de tratamento quando se detectou a presença de raras células marcadas com *Oil Red O* (figura 4.8F,G). A proporção de células *Oil Red O* positivas foi semelhante entre os grupos controle e tratado com AR $1\mu\text{M}$. Nas poucas células marcadas, a distribuição das gotas lipídicas foi diferente daquela observada nas células murinas. Enquanto nas culturas murinas as gotas formavam aglomerados no citoplasma, nas humanas estavam dispersas e mais próximas da membrana plasmática.

Nas culturas de células mesenquimais murinas verificou-se que com 21 dias havia um número baixo de células marcadas com o corante (dados não mostrados). Já em culturas mantidas sob tratamento por 45 dias houve marcação positiva significativa, ressaltando que foram realizadas passagens ao longo desse período, pois as culturas entraram em confluência e estavam se destacando das placas de cultura. O número de células contendo gotas lipídicas foi 4,4% significativamente maior ($P=0,0136$) no grupo tratado com AR $1\mu\text{M}$ (figura 4.8E).

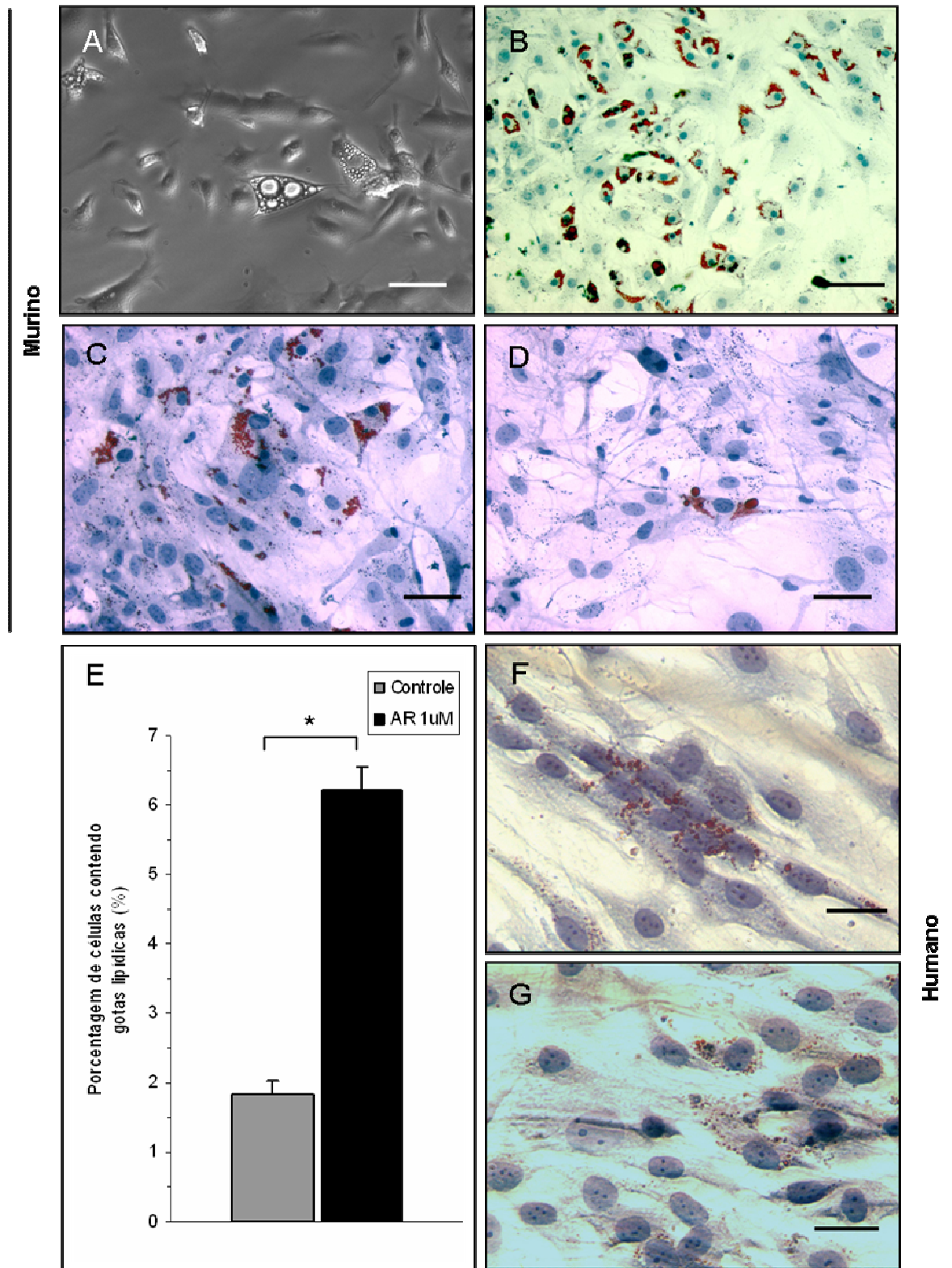


Figura 4.8. AR induz células mesenquimais de medula óssea a acumular lipídios. Culturas de células mesenquimais murinas (A-D) e humanas (F-G). (A) Imagem em contraste de fase de células mesenquimais murinas em cultura após 14 dias de tratamento com AR 1 μ M. Marcação com *Oil Red O* de culturas mesenquimais murinas (B-D) e humanas (F e G) tratadas na ausência ou presença de AR 1 μ M por 45 dias. (B e C) Culturas murinas tratadas com AR 1 μ M. (D) Culturas murinas controle. (E) Gráfico da porcentagem de células contendo gotas lipídicas em culturas mesenquimais murinas com 45 dias de tratamento com AR 1 μ M (* P=0,0136). (F) Culturas humanas tratadas com AR 1 μ M. (G) Culturas humanas controle. Barra = 50 μ m em A, C e D; 100 μ m em B e 25 μ m em F e G.

4.2.1. Análise dos efeitos do AR no potencial de diferenciação cardiogênico de culturas de células mesenquimais da medula óssea

Para análise da diferenciação cardiomiocítica, culturas de células mesenquimais humanas e murinas tratadas com AR 1 μ M foram submetidas à imunofluorescência com anticorpo anti-Nkx2-5 (figura 4.9) ou anti-troponina I (dados não mostrados) após o período de tratamento de 45 dias. Não houve marcação positiva em nenhum dos grupos, mas a eficiência da reação foi comprovada através dos controles positivos, já mostrados de forma representativa na figura 4.5.

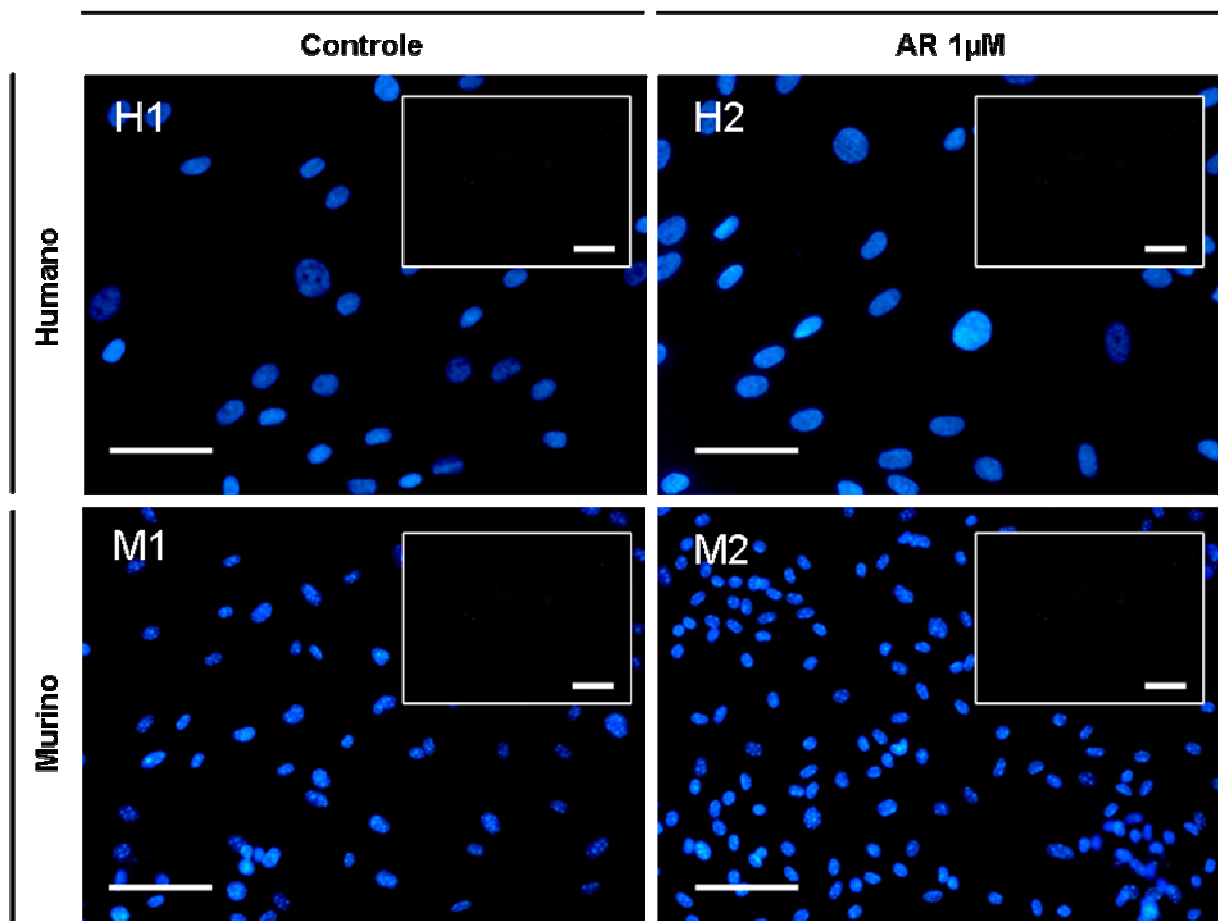


Figura 4.9. Análise da expressão de Nkx2-5 em células mesenquimais humanas e murinas na ausência ou presença de AR. Células mesenquimais humanas (H) e murinas (M) tratadas ou não com AR por 45 dias foram marcadas com anticorpo anti-Nkx2-5. (1) Culturas controle. (2) Culturas tratadas com AR 1 μ M. Nas figuras maiores observa-se a presença de células através da marcação com DAPI e nos inserts são mostradas as negatividades das reações com anti-Nkx2-5. Barra = 60 μ m.

4.2.2. Análise dos efeitos do AR no crescimento de células mesenquimais da medula óssea em cultura

A análise do efeito do AR no crescimento celular de culturas de células mesenquimais humanas e murinas foi realizada através do método de MTT ou da contagem de campos aleatórios.

As culturas de células mesenquimais murinas tratadas com AR 1 μ M por 45 dias analisadas pelo método de MTT apresentaram 35,5% mais células do que a cultura controle, sendo a diferença significativa ($P < 0,0001$) (figura 4.10A). Através da contagem de campos aleatórios (figura 4.10B), também se verificou que a quantidade de células mesenquimais murinas foi maior na cultura tratada com AR 1 μ M por 45 dias, sendo 58,7% maior em relação à controle, com diferença significativa ($P = 0,0058$).

Para células mesenquimais humanas, apesar do crescimento ter sido 7,7% menor nas culturas ES, a diferença não foi significativa ($P = 0,1705$) após 45 dias de tratamento com AR 1 μ M (figura 4.10C).

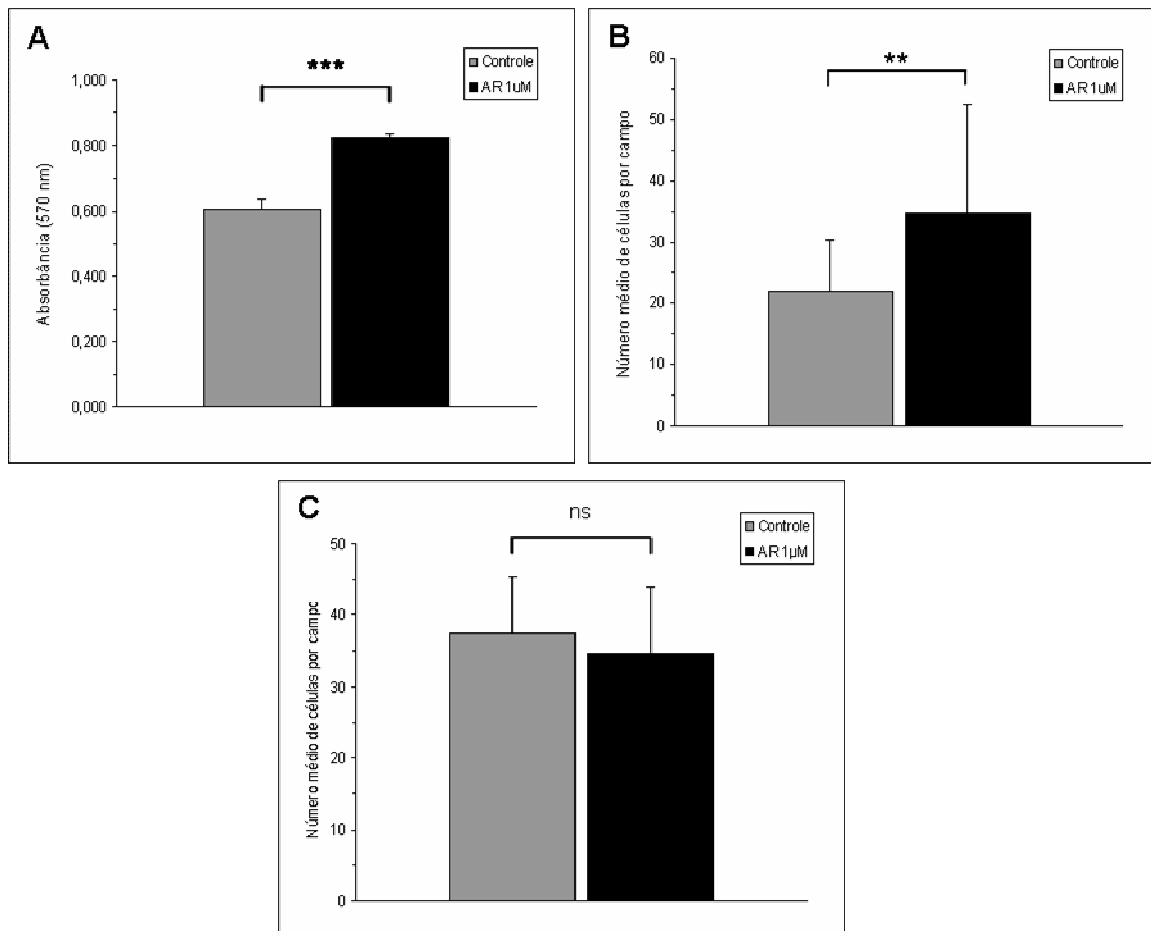


Figura 4.10. Crescimento celular de células mesenquimais de medula óssea murina ou humana na presença de AR. Células mesenquimais murinas (A e B) e humanas (C) após 45 dias de tratamento com AR 1 μM. (A) Crescimento celular de culturas mesenquimais murinas analisado através do método de MTT (**P<0,0001). (B) Crescimento celular de culturas mesenquimais murinas analisado através de contagem de campos aleatórios. Vinte campos de culturas coradas com hematoxilina (n=3) foram fotografados com a objetiva no aumento de 20x e contados (**P=0,0058). (C) Crescimento celular de culturas mesenquimais humanas analisado através de contagem de campos aleatórios. Vinte campos aleatórios de culturas marcadas com DAPI (n=3) foram fotografados com a objetiva no aumento de 20x e contados (ns: não significativo; P=0,1705).

4.3. Análise e caracterização do sistema marcapasso e do equipamento eletroestimulador utilizados na ES de culturas de células mesenquimais de medula óssea

O ambiente físico que a célula se encontra é um dos fatores que interferem no comportamento e na diferenciação celular. Assim, estudamos o efeito da ES, que consistiu em uma reprodução aproximada do ambiente cardíaco em relação aos

estímulos elétricos ali presentes, e a influência que as células mesenquimais humanas e murinas sofrem quando submetidas a esse estímulo.

Para a realização da ES foram utilizados sistemas que produzissem pulsos elétricos, que no caso consistiram de um marcapasso externo ou um equipamento eletroestimulador (ver figuras 3.1 e 3.2). Análises foram efetuadas através de osciloscópio para a caracterização dos sistemas.

O marcapasso possuía saída de voltagem, ou seja, a voltagem (U) era a variável independente e a corrente (I) variava em função da voltagem: $I = f(U)$.

Os parâmetros nominais selecionados no marcapasso para a ES das culturas foram: frequência de repetição de 120bpm (o que equivale a 2Hz) e amplitude de pulso de 9V. No entanto, para verificar os parâmetros reais, foram realizadas análises no marcapasso utilizando um osciloscópio. Com carga, ou seja, com o meio de cultura (DMEM 10%) e os fios de marcapasso, a frequência de repetição foi de 1,35Hz e o intervalo interpulso foi de 750ms (figura 4.11A). O pulso de voltagem foi monofásico, com duração de pulso de aproximadamente 0,5ms e amplitude de voltagem de 3,88V (figura 4.11B).

Como o marcapasso tem saída de voltagem e o osciloscópio mostra o pulso de voltagem, não se conhece a real corrente aplicada, não sendo possível calcular a impedância do sistema.

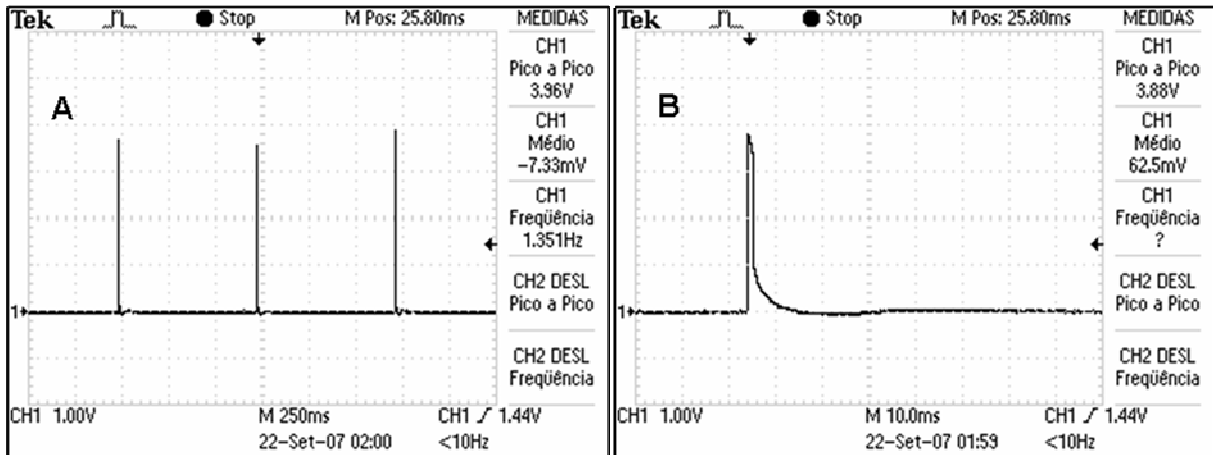


Figura 4.11. Caracterização do sistema marcapasso. Medições obtidas em osciloscópio quando a carga consistiu dos fios de marcapasso e da placa com meio de cultura. (A) Pulsos de voltagem do marcapasso. (B) Detalhe do pulso de voltagem do marcapasso.

Como já mencionado anteriormente, visando melhorar o sistema de ES, um equipamento eletroestimulador foi construído.

Enquanto o marcapasso possuía saída de voltagem, o equipamento eletroestimulador foi projetado com saída de corrente, ou seja, a corrente era a variável independente e a voltagem variava em função da corrente: $U = f(I)$. Assim, a corrente utilizada nos experimentos foi mantida constante e ficou entre 16 e 22mA.

Os parâmetros nominais selecionados no equipamento para a eletroestimulação das culturas foram frequência de repetição de 2Hz, corrente de 16-22mA e duração de pulso de 1ms.

Com carga, ou seja, eletrodos e meio de cultura, a frequência de repetição foi de 1,43 Hz e o intervalo interpulso foi pouco maior que 500ms (figura 4.12A). O pulso de voltagem (figura 4.12B) era bifásico, assimétrico e balanceado. Sendo o pulso bifásico e balanceado, não havia a polarização permanente do sistema, evitando-se assim a eletrólise. Verificou-se que a amplitude foi de 5,76V e a duração de pulso de 1ms.

A partir da lei de Ohm ($Z = U / I$), calcula-se a impedância a partir da voltagem (5,76V) e da corrente (22mA), obtendo-se uma resistência de $\approx 262\Omega$.

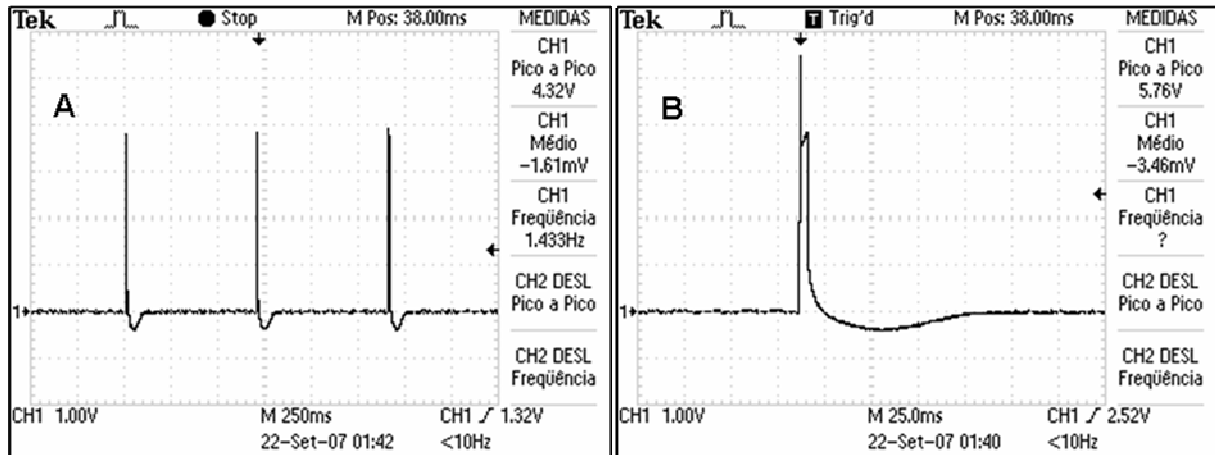


Figura 4.12. Caracterização do equipamento eletroestimulador. Medições obtidas em osciloscópio quando a carga consistiu do par de eletrodos e da placa com meio de cultura. Pulsos de voltagem do equipamento eletroestimulador. (B) Detalhe do pulso de voltagem do equipamento eletroestimulador.

Alguns dados foram obtidos para a caracterização do equipamento eletroestimulador (figura 4.13). A frequência foi plotada em função da resistência de uma placa redonda de 35mm contendo 8mL de DMEM com 10% de SFB (figura 4.13A) ou em função da resistência de uma câmara *Lab-Tek* 43x19x9mm contendo 3mL de DMEM com 10% de SFB (figura 4.13B) em junção ao par de eletrodos de aço inox. Os gráficos demonstram que em faixas de frequência acima de 2kHz a resistência permanece praticamente constante.

Os gráficos também mostraram que a resistência diminui conforme se aumenta a frequência e que quanto menor a área (área da placa retangular menor que a da placa redonda) maior a resistência. Estes resultados já eram esperados e corroboram com as medições técnicas, realizadas na placa redonda na presença de cultura celular, que apontaram uma resistência média de 290-322 Ω (frequência=1/período, no caso, 1/0,5ms=200Hz).

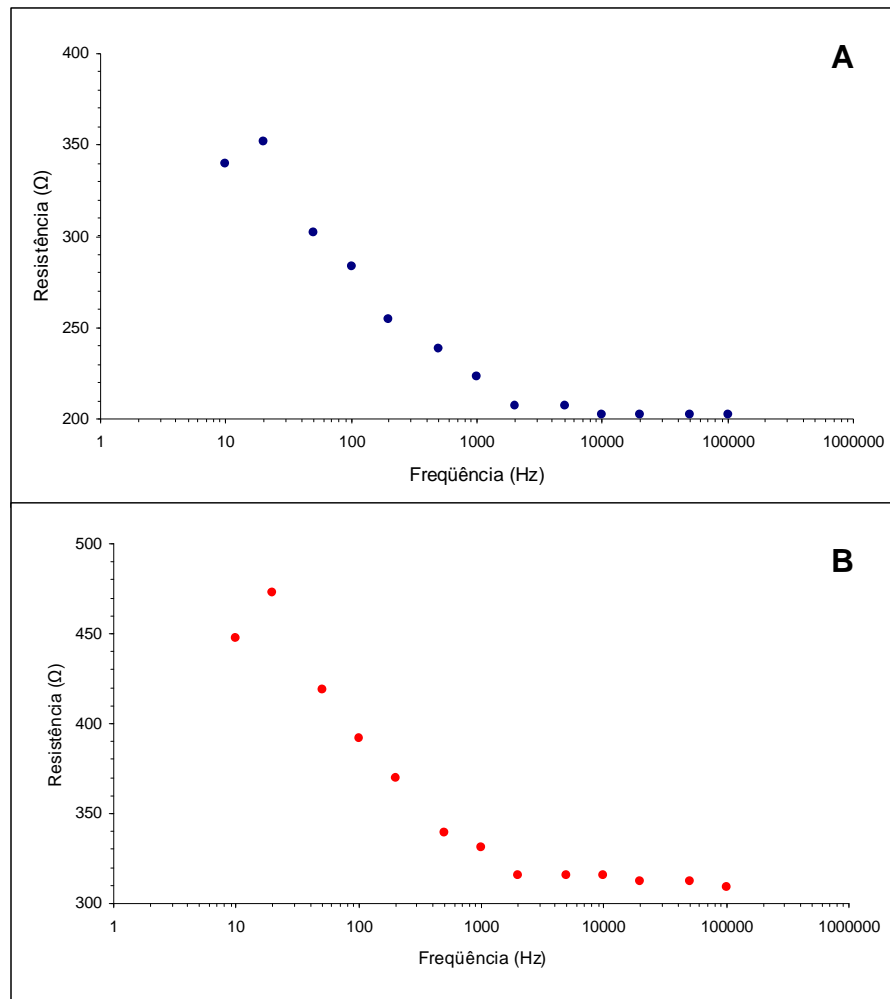


Figura 4.13. Comportamento da resistência em função da frequência do equipamento eletroestimulador. (A) Dados obtidos utilizando uma placa redonda de 35mm de diâmetro contendo 8mL de DMEM 10%. (B) Dados obtidos em placa *Lab-Tek* de 43x19x9mm contendo 3mL de DMEM 10%.

4.3.1. Análise dos efeitos da ES sobre a morfologia de culturas de células mesenquimais de medula óssea

Devido às vantagens já apresentadas (ver item 4.3), bem como a possibilidade de várias culturas serem realizadas simultaneamente, assim que construído, o equipamento eletroestimulador foi adotado para a realização dos experimentos e o sistema marcapasso foi completamente abandonado. Nos resultados mostrados na seqüência, quando não explicitado, utilizou-se o equipamento eletroestimulador.

Como mudanças de pH podem causar o aquecimento eletroquímico indesejado, o pH das culturas foi verificado a cada 2 ou 3 dias, antes da nova troca

de meio. Não houve variação notável do pH durante o período de tratamento (14 dias) quando se comparou o meio de culturas ES e controle (não mostrado). Deste modo, a aplicação do estímulo elétrico permitiu o desenvolvimento normal das culturas celulares, não sendo observada, através de análise visual em microscópio de contraste de fase, morte celular exarcebada nas culturas ES em relação às controles.

A figura 4.14 mostra imagens representativas de culturas de células mesenquimais humanas, ES ou não, após 1 dia (A e B) e 14 dias (C e D). Ambos os grupos apresentaram um aspecto fibroblastóide típico. Durante o período de tratamento, que consistiu geralmente de 14 dias, tanto o grupo controle quanto o ES apresentaram células morfológicamente semelhantes. A aplicação da ES não provocou mudanças na orientação das células mesenquimais.

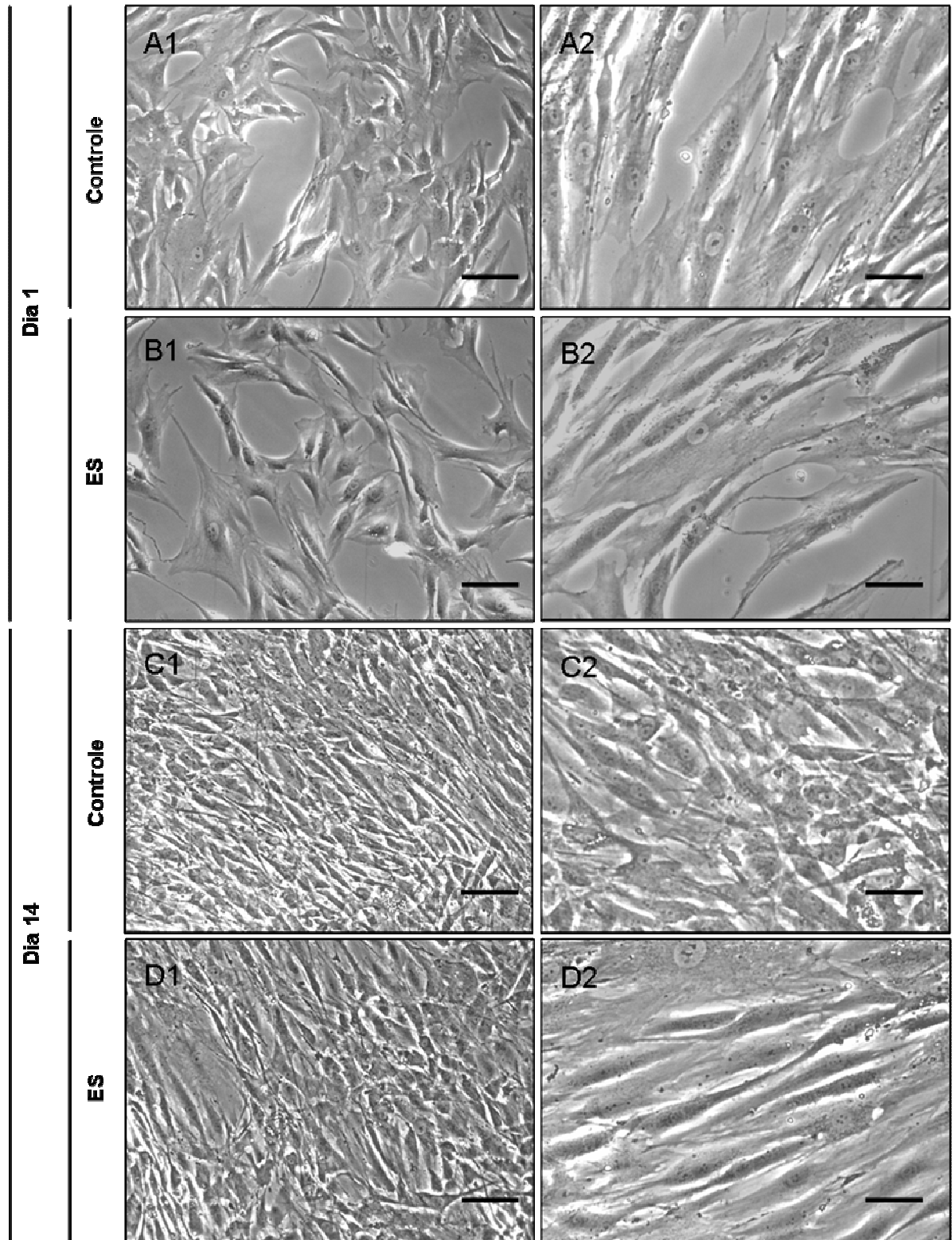


Figura 4.14. Aspecto morfológico de células mesenquimais humanas em cultura. Por imagens de microscopia de contraste de fase observam-se culturas mesenquimais humanas controle (A e C) ou ES (B e D). As imagens foram obtidas de culturas mesenquimais humanas com 1 e 14 dias de tratamento. (A) e (B): 1 dia de cultura; (C) e (D) 14 dias de cultura. (1) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 10x; (2) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 100 μ m em 1 e 50 μ m em 2.

A morfologia das culturas de células mesenquimais murinas foi muito variada (figura 4.15), apresentando formato fibroblastóide, arredondado, ramificado, bipolar ou espalhado. Em ambos os grupos houve a formação de colônias celulares, como apontado na figura 4.15B1. Um aspecto típico das culturas era a presença de uma célula maior se sobrepondo a várias menores (figura 4.15B2). As células murinas também não mostraram diferença de aspectos morfológicos ou de orientação quando submetidas à ES. Este mesmo comportamento foi observado nas células mesenquimais humanas (figura 4.14).

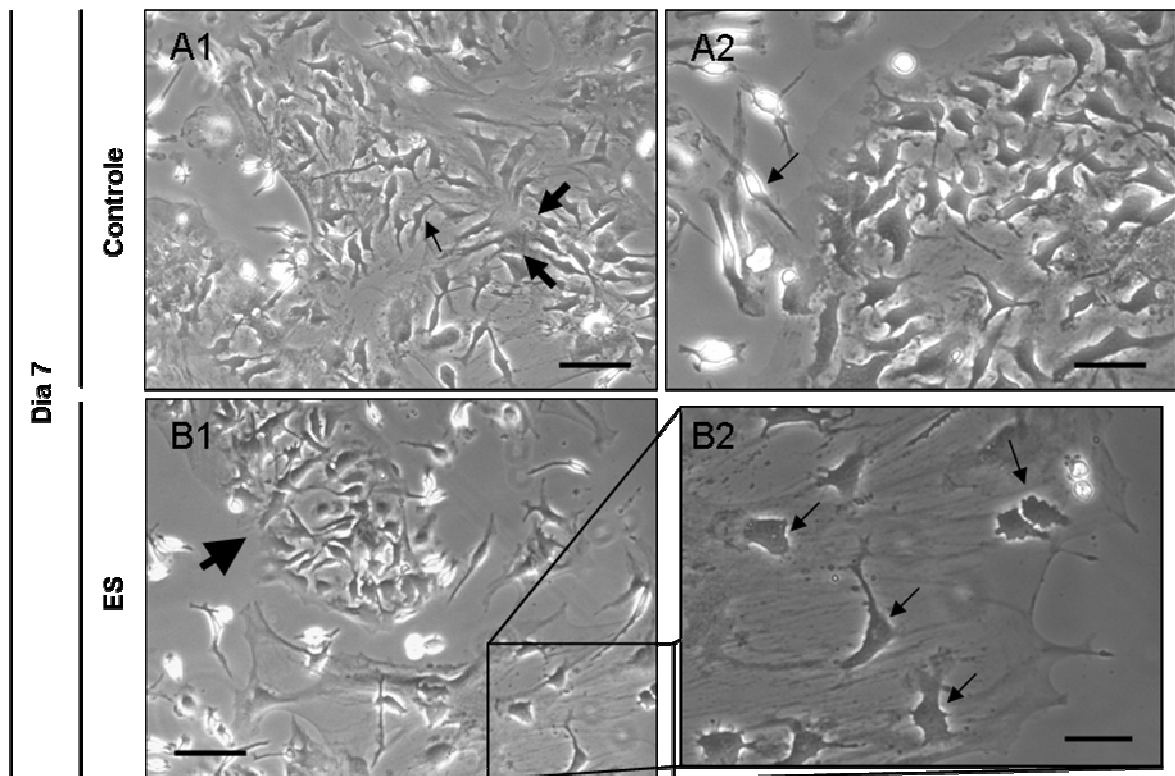


Figura 4.15. Aspectos morfológicos de células mesenquimais murinas em cultura. Imagens obtidas por microscopia de contraste de fase de culturas mesenquimais murinas após 7 dias. As culturas, controle (A) ou ES (B), foram heterogêneas. A morfologia fibroblastóide é mostrada em A1 e A2 pelas setas menores. As células com morfologia grande e achatada, apontadas pelas setas maiores em A1, comumente se sobrepunham às células menores, como apontado pelas setas em B2. Uma colônia é apontada em B1. (1) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 10x; (2) Imagens obtidas com objetiva no aumento de 20x. Barra = 100 μ m em 1 e 50 μ m em 2.

4.3.2. Análise dos efeitos da ES no potencial de diferenciação cardiogênico de culturas de células mesenquimais da medula óssea

O efeito da ES na diferenciação das células mesenquimais para linhagens cardíacas foi analisado verificando-se a expressão do fator de transcrição Nkx2-5, um dos fatores precoces que direcionam a diferenciação cardiogênica, e a presença de proteínas características de CMs, como a troponina I e a α -actinina sarcomérica.

Culturas de células mesenquimais humanas e murinas ES foram submetidas à imunofluorescência com os anticorpos anti-Nkx2-5 (figura 4.16), anti-troponina I e/ou anti- α -actinina sarcomérica (imagens não mostradas) após o período de tratamento, que geralmente consistiu de 14 dias, mas em alguns experimentos chegou a 21 dias. Não houve marcação positiva no grupo ES ou no controle, mas a eficiência da reação foi comprovada através dos controles positivos, já mostrados de forma representativa na figura 4.5.

Estes dados sugerem que a ES não é capaz de induzir a expressão de marcadores de linhagem cardiogênica em células mesenquimais adultas mantidas em cultura.

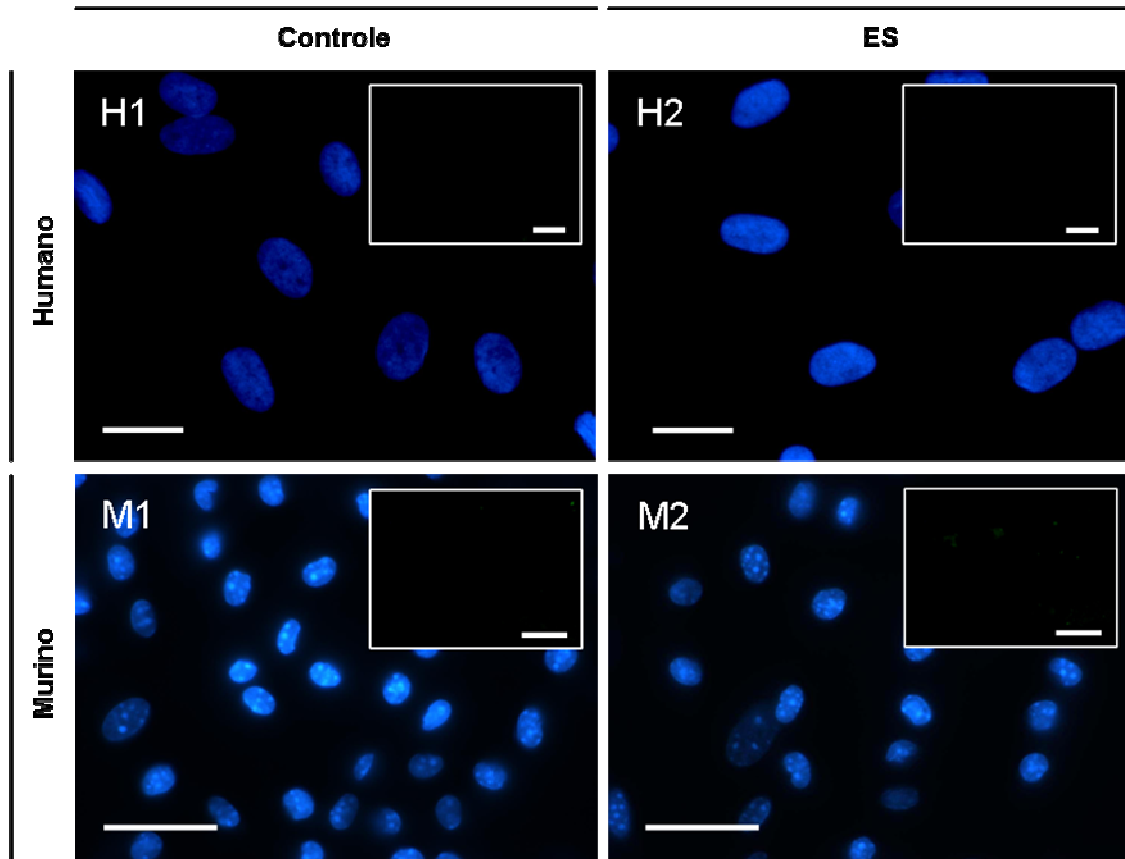


Figura 4.16. Análise da expressão de Nkx2-5 em células mesenquimais humanas e murinas. Imagens das imunofluorescências com anticorpo anti-Nkx2-5 em células mesenquimais humanas (H) e murinas (M) cultivadas por 14 dias. (1) Grupo controle. (2) Grupo ES. Nas figuras maiores observa-se a presença de células através da marcação com DAPI e nos inserts são mostradas as negatividades da expressão de Nkx2-5 nestas células. Barra = 25µm em H e 30µm em M.

4.3.3. Análise dos efeitos da ES no crescimento de células mesenquimais de medula óssea em cultura

Através da análise do crescimento em células mesenquimais humanas pelo método MTT, o qual avalia através da medida de absorvância a capacidade de conversão mitocondrial de células vivas, constatou-se que a aplicação da ES promoveu maior crescimento celular (figura 4.17). Como mostrado na figura 4.17A, com 1 dia de tratamento não houve diferença significativa no crescimento celular de culturas ES em relação às controles, considerando que a mesma quantidade de células foi plaqueada nos grupos ES e controle. Com 14 dias, o crescimento celular

foi 12,5% maior e significativo ($P < 0,001$) na cultura ES em comparação à cultura controle. Como mostrado na curva de crescimento de culturas mesenquimais humanas (figura 4.17B), não houve diferença significativa ($P = 0,7166$) no crescimento entre os grupos controle e ES após 1 dia de cultivo. No entanto, constatou-se que no dia 7 e no dia 14 o crescimento foi significativamente maior nas culturas ES em comparação às controles, com $P < 0,0001$ em ambos os dias, sendo que o crescimento celular foi 13% maior com 7 dias e 18,4% maior com 14 dias no grupo ES em relação ao grupo controle. O crescimento celular foi praticamente estabilizado entre os dias 7 e 14, tanto para o grupo controle como para o grupo ES.

Conclui-se, então, que a aplicação da ES em culturas mesenquimais humanas promoveu um maior aumento do crescimento celular.

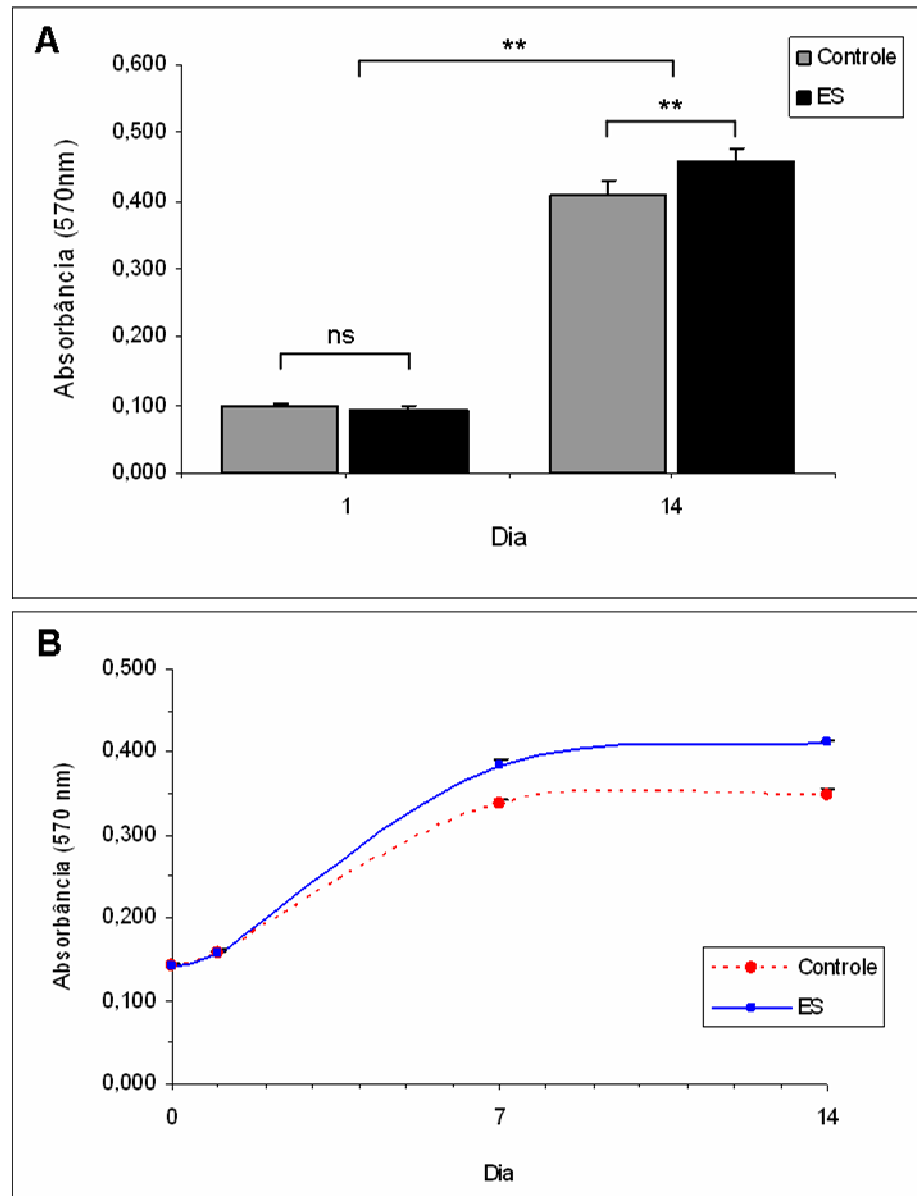


Figura 4.17. Análise do crescimento celular pelo método de MTT de culturas mesenquimais humanas submetidas ou não à ES. (A) Gráfico do crescimento celular de culturas mesenquimais humanas com 1 e 14 dias. (B) Curva do crescimento celular de culturas mesenquimais humanas com 0, 1, 7 e 14 dias, ES ou não. Dados apresentados como a média \pm desvio padrão. (ns: não significativo; ** $P < 0,001$).

4.3.4. Análise dos efeitos da ES na expressão de proteínas de junções celulares de culturas de células mesenquimais de medula óssea

É fato que as células respondem a forças externas e traduzem estes sinais em respostas biológicas. Uma das maneiras que as células captam e transformam essas forças físicas em sinais bioquímicos é através das interações das células com a MEC, envolvendo também mudanças nas interações entre as células.

Assim, analisamos os efeitos da ES na expressão de proteínas constituintes de junções celulares ancoradoras, através de *immunoblotting*. Foi analisada a expressão de β 1-integrina, paxilina, FAK, vinculina e α -actinina em culturas de células mesenquimais murinas cultivadas durante 14 dias, e a expressão de β 1-integrina, FAK e vinculina em culturas de células mesenquimais humanas, também cultivadas por 14 dias (figura 4.18).

A β 1-integrina, um receptor transmembrana de 125kDa, medeia a adesão célula-MEC. As culturas mesenquimais murinas ES expressaram 34% menos β 1-integrina do que as culturas controle (figura 4.18A). A presença de duas bandas é devido provavelmente à ação de alguma protease que resultou em uma segunda banda a partir da molécula original. De modo divergente, em culturas mesenquimais humanas somente culturas ES marcaram para β 1-integrina, como mostrado na figura 4.18G. Como a β 1-integrina não foi detectada por *immunoblotting* nas culturas controle, não se realizou a quantificação relativa.

A paxilina é uma fosfoproteína de 68kDa localizada em adesões focais. Em culturas mesenquimais murinas, a expressão de paxilina foi cerca de 11,1% menor no grupo ES em relação ao controle (figura 4.18B).

A FAK, uma proteína de 125kDa, também está localizada em adesões focais. Sua atividade é regulada pela quantidade de tensão no sítio de adesão celular. A expressão de FAK em culturas mesenquimais murinas foi 80,6% menor na cultura ES em relação à cultura controle (figura 4.18C). A FAK não foi detectada através de *immunoblotting* em culturas mesenquimais humanas controle ou ES cultivadas por 14 dias. O anticorpo tem reatividade para FAK de origem humana, portanto, provavelmente a proteína não foi detectada por estar em concentração muito baixa ou estar defosforilada, já que o anticorpo marca preferencialmente FAK fosforilada.

A vinculina é uma proteína de 130kDa que está presente tanto em junções célula-célula como célula-MEC. Em culturas murinas, a expressão de vinculina foi 153% maior no grupo ES em relação ao grupo controle (figura 4.18D). Em culturas mesenquimais humanas, não houve marcação para vinculina nas culturas controle, somente nas culturas ES, como mostrado na figura 4.18H. Como a vinculina não foi detectada por *immunoblotting* nas culturas controle, não realizamos a quantificação relativa.

A α -actinina, uma proteína de 100kDa, medeia tanto ligações célula-célula como célula-MEC. Em culturas mesenquimais murinas, a expressão de anti- α -actinina foi 180% maior no grupo ES do que no grupo controle (figura 4.18E).

Na figura 4.18F é mostrada a dupla marcação com faloidina (em vermelho) para os filamentos de actina e vinculina (em verde) em uma célula mesenquimal murina em cultura após 14 dias de ES. Os filamentos de actina apresentam suas extremidades terminando na membrana plasmática, onde se sobrepõem à vinculina, dispostas na periferia celular.

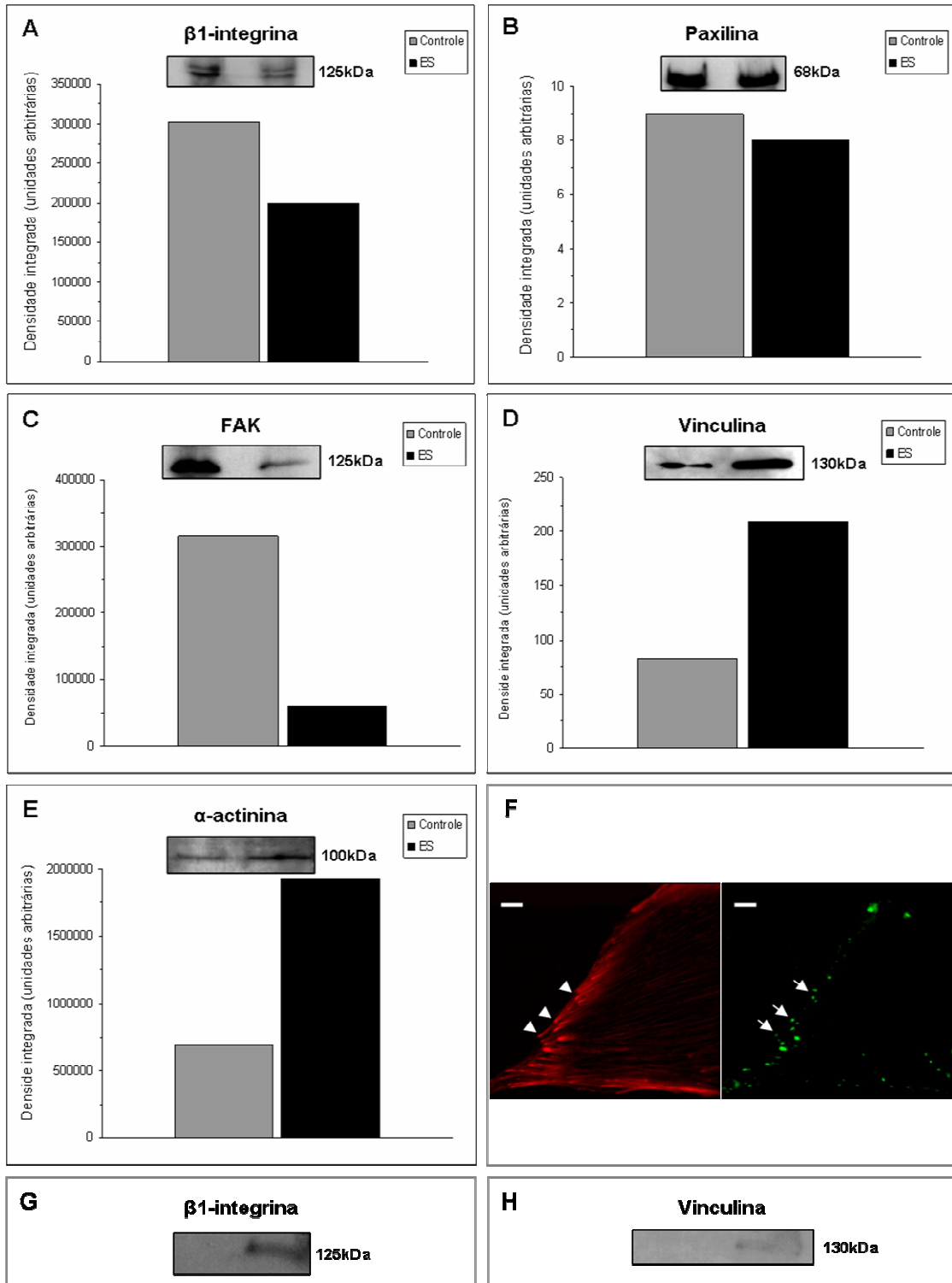


Figura 4.18. Efeito da ES na expressão de proteínas de junções celulares ancoradoras de células mesenquimais humanas e murinas. (A-E) *Immunoblotting* e gráfico comparativo de densidade integrada das bandas de *immunoblotting*, obtido através do programa *Image J*, de culturas mesenquimais murinas cultivadas por 14 dias. Expressão de (A) β 1-integrina, (B) paxilina, (C) FAK, (D) vinculina, (E) α -actinina. (F) Marcação de uma célula mesenquimal murina em cultura com faloidina (em vermelho) e anti-vinculina (em verde) após 14 dias de ES. Na figura à esquerda, as setas apontam para as terminações dos filamentos de actina, que se sobrepõem à marcação para vinculina apontada pelas setas na figura à direita. Observar que a vinculina está localizada preferencialmente na periferia da célula. Barra = 10 μ m. Expressão de (G) β 1-integrina e (H) vinculina em culturas mesenquimais humanas cultivadas por 14 dias. (n = 1, logo, não foi possível o cálculo do desvio padrão).

Os dados dos *immunoblottings* estão resumidos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Expressão de proteínas de junções ancoradoras em células mesenquimais de medula óssea humana e murina em cultura analisada por *immunoblotting*.

	Murino		Humano		Presença em junções:	
	Controle	ES	Controle	ES	Célula-célula	Célula-MEC
β1-integrina	++++	++	0	+	N	S
Paxilina	++++	+++	NR	NR	N	S
FAK	+++++	+	0	0	N	S
Vinculina	++	+++++	0	+	S	S
α-actinina	++	+++++	NR	NR	S	S

Diferenças:

+* positivo, mas não quantificado

0 marcação nula

NR não realizado

S sim (presente)

N não (ausente)

Entre outros efeitos já descritos provocados pela ES está a alteração no acoplamento celular, determinado pelas junções comunicantes. A análise de junções comunicantes em culturas de células mesenquimais murinas e humanas, ES ou controle, foi realizada através de reações de imunofluorescência com anticorpo anti-Cx43. Ambos os grupos ES e controle de culturas de células mesenquimais humanas e murinas foram positivos para Cx43 (figura 4.19). A figura 4.19C mostra células mesenquimais humanas em cultura com 14 dias marcadas com anticorpo anti-Cx43. Nela podem ser vistas duas células grandes espalhadas, com núcleos maiores (apontadas pelas setas largas), uma delas mais ramificada, com aspecto estrelado, com múltiplos prolongamentos citoplasmáticos aderidos ao vidro, outra mais alongada, com aspecto fibroblastóide, e outras células com dimensões e núcleos menores (apontadas pelas setas estreitas).

Sendo assim, pode-se afirmar que Cx43 está presente nas células e estas possivelmente devam formar junções comunicantes. No entanto, não se pode afirmar que os canais são funcionais somente através destes resultados.

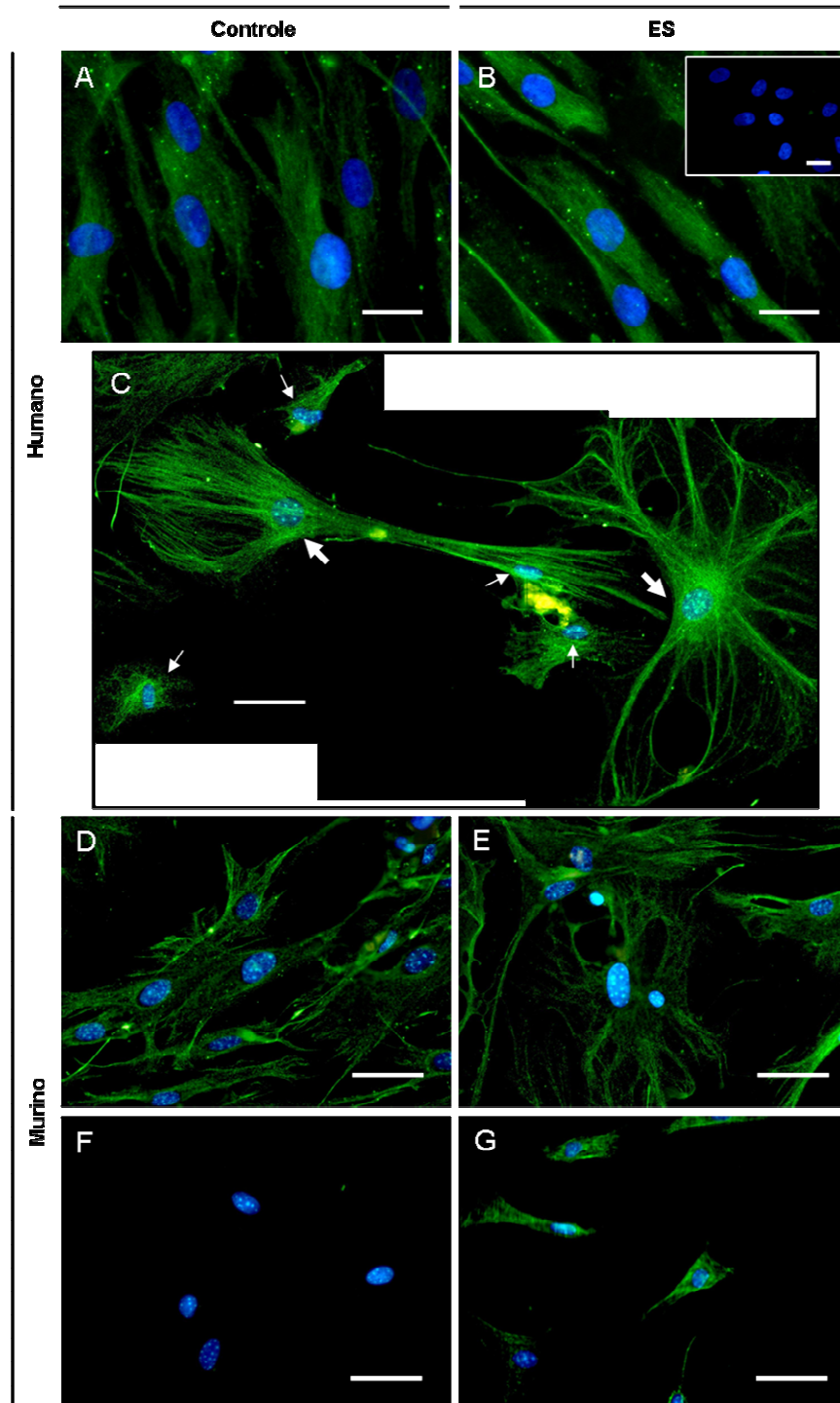


Figura 4.19. Expressão de Cx43 por células mesenquimais humanas e murinas em cultura. Imagens de imunofluorescências de culturas de células mesenquimais humanas e murinas, ES ou não, com anticorpo anti-Cx43 foram obtidas após 14 dias de tratamento. (A-C) Culturas de células mesenquimais humanas controle (A) ou ES (B e C); em B o inserto mostra o controle de marcação inespecífica nas células mesenquimais humanas. (C) Na figura, duas células grandes espalhadas, com núcleos maiores são apontadas pelas setas largas, enquanto as setas estreitas apontam para células de menor tamanho (D-F) Culturas de células mesenquimais murinas controle (D) ou ES (E); (F) Controle de marcação inespecífica nas células mesenquimais murinas. (G) CMs, utilizados como controle positivo, marcados com anticorpo anti-Cx43. Barra = 25 μ m em A-C e 60 μ m em C-G.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos das citocinas BMP2 e FGF4 e do meio condicionado nas culturas de células mesenquimais de medula óssea

- **O meio condicionado por CMs não foi capaz de promover a diferenciação cardiogênica de células mesenquimais em cultura.**

O uso de 10% de meio condicionado por CMs humano não ocasionou a diferenciação das células mesenquimais humanas em CMs. Isso está de acordo com o observado por PEDROTTY *et al.* (2005), que utilizaram 80% de meio condicionado por CM em suas culturas de mioblastos, ES ou não ES, e verificaram que não houve diferenciação dos mioblastos em células cardíacas.

Alguns estudos demonstraram a insuficiência do meio condicionado em induzir a diferenciação celular. De modo similar, FUKUHARA *et al.* (2003) e XU *et al.* (2004) mostraram que somente a presença de fatores solúveis não foi suficiente para a transdiferenciação de MSCs da medula óssea em CMs. Quando cultivadas com CMs em um sistema de cultura de câmara dupla separado por uma membrana semipermeável, as MSCs permaneceram inalteradas, mesmo com o meio contendo fatores solúveis liberados pelos CMs. Quando co-cultivadas com CMs, as MSCs diferenciaram para fenótipos cardíacos e formaram junções comunicantes com os CMs. Ou seja, a comunicação entre MSCs e CMs era requerida para a transdiferenciação.

Assim, os nossos dados conjuntamente com outros estudos mostram que os fatores solúveis dos CMs não são suficientes para induzir a transdiferenciação dos

MSCs em CMs. Estes resultados estão também de acordo com diversos estudos *in vivo* de cardiomioplastia celular, onde a conversão para um fenótipo cardíaco não foi claramente demonstrada.

- **As citocinas BMP2 e FGF4 não foram capazes de promover a diferenciação cardiogênica de células mesenquimais em cultura.**

Nenhuma das combinações e concentrações analisadas (FGF4 50ng/mL, FGF4+BMP2 50ng/mL ou FGF4+BMP2 100ng/mL) foi capaz de promover a diferenciação cardiogênica das células mesenquimais humanas ou murinas.

Como, em geral, o efeito das citocinas é dependente da concentração, do tempo de aplicação e, em certos casos, do sinergismo entre as citocinas, seria interessante a realização futura de um *screening* apurado que considerasse todas estas variáveis.

Alguns estudos demonstraram que diferentes concentrações de BMP e FGF podem ocasionar efeitos variados, muitas vezes diminuindo a cardiogênese.

BARRON *et al.* (2000), ao estudarem os efeitos cardiogênicos do BMP2/4 e do FGF2/4 em explantes não pré-cardíacos de galinha, mostraram que a concentração ótima de BMP2 entre as testadas (0-500ng/mL) ficou em 50ng/mL. Quando os níveis foram aumentados para 100-500ng/mL, a porcentagem de explantes cardiogênicos declinou. Determinações similares para o FGF4, na presença de um nível constante de 50ng/mL de BMP2 revelaram resultados essencialmente idênticos. Concentrações de 250ng/mL de BMP2 levavam à osteogênese (BARRON *et al.*, 2000).

Além do efeito da concentração, o efeito sinérgico do FGF e do BMP foi demonstrado. Utilizando explantes de galinha, LOUGH *et al.* (1996), partindo de resultados obtidos em estudos prévios de seu grupo, mostraram que a proteína BMP2 (200ng/mL) não promove a sobrevivência nem de mesoderme pré-cardíaca nem de mesoderme não pré-cardíaca. Já o FGF4 (200ng/mL) provoca a cardiogênese em mesoderme pré-cardíaca, mas não induz a cardiogênese em mesoderme não pré-cardíaca, embora a viabilidade do explante fosse mantida. Ao contrário dos efeitos isolados dos fatores de crescimento, o tratamento de mesoderme não pré-cardíaca com a combinação BMP2 e FGF4 (100ng/mL cada) induziu a cardiogênese na maioria dos explantes. Sugeriram, então, que o BMP2 e o FGF4 possuem respectivas atividades diferenciativas e proliferativas, sendo que a combinação induz a cardiogênese em células que não são direcionadas para a linhagem cardíaca. Em seus experimentos, o meio foi trocado diariamente e a cultura teve duração de 48 horas.

Foi demonstrado também que uma breve exposição de 15 minutos ao BMP2 no início da cultura, enquanto o FGF2 estava sempre presente, foi suficiente para induzir a cardiogênese nos explantes e que, aumentando a duração da exposição, aumentava-se a incidência de diferenciação. Similarmente, mantendo o BMP2 sempre presente na cultura, foi constatado que, para o FGF2, 15 minutos de exposição já foram suficientes para a cardiogênese, mas 30 minutos levaram à diferenciação 100% dos explantes. Verificou-se também que a exposição ao FGF2 e ao BMP2 por somente 30 minutos na cultura levou a incidência cardiogênica de somente 40%, sugerindo que o tratamento prolongado com BMP era requerido para atingir 100% de explantes cardiogênicos (BARRON *et al.*, 2000).

Um estudo realizado por BEHFAR, *et al.* (2002) mostrou que o tratamento com 5ng/mL de BMP2 por 24h promoveu a cardiogênese em mESCs.

KAWAI *et al.* (2004) utilizaram mESC como modelo de estudo dos efeitos de FGF2 e BMP2 na diferenciação cardiogênica. Inicialmente foram testadas concentrações de 0,2, 1,0, 5,0 e 20ng/mL de FGF2 ou 0,04, 0,2, 1,0 e 5,0ng/mL de BMP2, cada fator em separado. As concentrações ótimas entre as testadas foram 1ng/mL de FGF2 e 0,2ng/mL de BMP2, e levaram à regulação positiva de Nkx2-5 tanto no 7^o como no 14^o dia de tratamento. Isso foi contrário ao relatado por BARRON *et al.* (2000) em embriões de galinha, onde o FGF2 ou o BMP2 administrados sozinhos falharam na indução do desenvolvimento cardíaco, sugerindo um efeito cooperativo necessário.

Ainda, ao analisarem os receptores para FGF2 e BMP2, KAWAI *et al.* (2004) verificaram que a adição destes fatores em concentrações mais baixas aumentou a expressão dos receptores, enquanto que em concentrações mais altas diminuíram, implicando em uma possível relação com seus efeitos reduzidos na diferenciação cardiogênica. Em uma etapa seguinte, os autores analisaram a eficácia do uso combinado comparado ao uso isolado dos fatores por 7 e/ou 14 dias, a partir das concentrações ótimas determinadas (1ng/mL de FGF2 e 0,2ng/mL de BMP2). Verificaram então que o aumento da expressão de Nkx2-5 (no 7^o e 14^o dia) e α -MHC (7^o dia) foi 1,5 a 2 vezes maior no grupo combinado que no grupo com cada fator isolado, exceto o menor aumento no Nkx2-5 no caso da adição de ambos os fatores em cada um dos 14 dias. Portanto, parece que o tempo de adição do FGF2 e/ou BMP2 após a formação de EB não foi o fator definitivo para a efetividade deles. Também testaram se a indução cardiogênica era maior quando os fatores eram aplicados somente nos três primeiros dias de formação dos EBs ou também após o

plaqueamento (3+14 dias). Verificaram que a melhor condição foi a aplicação de ambos os fatores nos três primeiros dias, o que sugere que o BMP2 e o FGF2 são cruciais no estágio precoce de diferenciação cardiomiogênica de ESCs, mas não através de todos os estágios. Houve um aumento de 1,5 vezes de células positivas para miosina sarcomérica em relação ao grupo não tratado. Isso foi similar ao relatado em embrião de galinha por BARRON *et al.* (2000), onde a exposição à FGF2 e BMP2 por somente 30 min foi suficiente para induzir o desenvolvimento cardíaco.

No entanto, YUASA *et al.* (2005) relataram que a simples estimulação com BMP2/BMP4 não aumentou ou suprimiu a indução cardiomiocítica de ESCs (dados não foram mostrados) e, contrariamente, ao estimularem culturas de mESCs com Noggin, um antagonista de BMP, desenvolveram um protocolo que otimiza a diferenciação cardiomiogênica. Também verificaram que o uso de outros fatores de crescimento, entre eles o FGF2, usando o mesmo protocolo não fez aumentar a indução cardiomiogênica. Sugeriram a partir destes resultados que a inibição da sinalização BMP na fase indiferenciada ou imediatamente precoce da diferenciação de ESC é crucial para a diferenciação cardiomiocítica.

As concentrações ótimas dos fatores FGF e BMP que promovem a cardiogênese são muito diferentes entre os estudos existentes. Isto pode ser devido à diferença entre os modelos e as espécies utilizados ou mesmo às citocinas usadas, que muitas vezes são recombinantes ou diferentes das encontradas na espécie utilizada como modelo de estudo. Enquanto no modelo de explante de galinha de BARRON *et al.* (2000) a concentração ótima foi de 50ng/mL de BMP2 e FGF2, no modelo de EBs de KAWAI *et al.* (2004) as concentrações ótimas foram de 1ng/mL de FGF2 e 0,2ng/mL de BMP2, muito inferiores às previamente relatadas.

Uma técnica muito interessante desenvolvida recentemente para direcionar a diferenciação de hESCs em CMs envolve o tratamento seqüencial de culturas não diferenciadas em monocamada de alta densidade com activina A e BMP4. No estudo, foi suposto que a activina induziria a mesendoderme específica e o BMP4 especificaria o alvo cardíaco e, assim, o meio foi suplementado com 100ng/mL de activina A por 24h e em seguida com 10ng/mL de BMP4 durante 4 dias. Este protocolo rendeu mais de 30% de CMs (LAFLAMME *et al.*, 2007).

Verifica-se que existem controvérsias entre os resultados disponíveis na literatura, o que pode ser devido às diferenças entre os modelos. Apesar do potencial cardiogênico já descrito nestes modelos, o BMP2 e o FGF4 não promoveram a diferenciação cardiogênica em células mesenquimais murinas e humanas em cultura.

- **As citocinas BMP2 e FGF4 influenciaram o crescimento celular de células mesenquimais em cultura.**

Houve diferença no comportamento frente à aplicação de citocinas entre as células mesenquimais humanas e murinas. Nas culturas humanas, as tratadas com FGF4 50ng/mL aumentaram significativamente em número quando comparadas às controles, enquanto que nas culturas murinas, houve uma diminuição, embora não significativa.

Como foi sugerido por LOUGH *et al.* (1996), o BMP2 parece ter uma atividade diferenciadora enquanto o FGF4 possui atividade proliferativa. Explantes cultivados somente com o BMP2 se destacaram da placa de cultura e não sobreviveram; e,

embora o tratamento com somente FGF4 mantivesse o crescimento celular, a diferenciação não foi observada.

Portanto, em nosso estudo, o aumento significativo no crescimento celular observado nas culturas mesenquimais humanas tratadas com FGF4 50ng/mL, FGF4+BMP2 50ng/mL e FGF4+BMP2 100ng/mL quando comparadas às culturas controle está de acordo com a função proliferativa do FGF4 sugerida por LOUGH *et al.* (1996). Em nosso caso, a presença do BMP2 no meio de cultura parece não ter favorecido o crescimento celular. Quando se dobrou a concentração das citocinas FGF4+BMP2 de 50 para 100ng/mL, o aumento no crescimento caiu de 112,7% para 63,4%. Assim, pode-se sugerir um efeito inibitório dependente de concentração.

Entretanto, ao se analisar o efeito das citocinas nas culturas mesenquimais murinas, a cultura tratada com somente FGF4 50ng/mL parece ter tido uma diminuição no crescimento celular. Uma possível explicação está na metodologia utilizada que consistiu na contagem de campos aleatórios, onde somente são consideradas células aderidas. Como houve aumento das células arredondadas que estavam se destacando da placa de cultura e como também visualmente se constatava o aumento do número de células em todas as culturas tratadas com citocinas em relação às controles, a cultura tratada com somente FGF4 pode na realidade ter apresentado um aumento no crescimento celular.

Além disso, o fato de células arredondadas estarem se destacando da placa pode ser comprovado pelo menor crescimento das culturas murinas quando comparadas às humanas. Nas humanas, as culturas tratadas com FGF4+BMP2 50ng/mL e FGF4+BMP2 100ng/mL apresentaram um aumento de 112,7% e 63,4% respectivamente, enquanto as murinas, 21,3% e 8,5% respectivamente.

Assim como nas culturas humanas, as culturas murinas parecem ter apresentado um aumento no crescimento celular na presença de FGF4, enquanto a presença de BMP2 parece não ter favorecido o crescimento celular. Também parecem ter apresentado um efeito inibitório dependente de concentração quanto ao tratamento com FGF4+BMP2, onde se verificou que o aumento de crescimento caiu de 21,3% para 8,5% quando a concentração dobrou de 50 para 100ng/mL.

5.2. Efeitos do all-*trans*-ácido retinóico nas culturas de células mesenquimais de medula óssea

- **O AR promoveu o acúmulo de lóculos lipídicos nas culturas de células mesenquimais murinas, mas não nas humanas.**

Interessantemente, o AR promoveu o acúmulo de lipídios nas culturas mesenquimais murinas, mas não nas mesenquimais humanas, o que sugere uma diferença relacionada às espécies frente ao AR. As células mesenquimais murinas estavam acumulando lipídios e, na maioria delas, o acúmulo aumentou progressivamente, no entanto, em nenhuma houve fusão em um único lóculo, como ocorre na diferenciação adipocítica.

A lipogênese envolve o processo de síntese de ácidos graxos e triglicerídeos por induzir proteínas que transportam e acumulam ácidos graxos. A adipogênese corresponde à diferenciação de células adiposas pela expressão de genes adipocíticos específicos (GUIMARÃES *et al.*, 2007). O retinol induz um fenótipo lipocítico *in vitro* na linhagem GRX de células estreladas hepáticas, com uma diminuição na proliferação e acúmulo progressivo de gotas lipídicas (GUIMARÃES *et*

al., 2007). Também já foi demonstrado que o AR induz a formação de gotas lipídicas em uma linhagem celular humana mielocítica com somente 3 dias de cultura, levando à diferenciação mielóide (INAZAWA *et al.*, 2003).

No grupo de células mesenquimais murinas tratado com AR, o número de células contendo lóculos foi baixo, aproximadamente 6%, e o tratamento aumentou em somente 4,4% o número de células positivas no grupo tratado em comparação ao controle (ver figura 4.8). Considerando que o período de tratamento foi longo, de 45 dias, pode-se atribuir este acúmulo a alguma população específica presente na cultura e não por todas as células ali presentes. Estes resultados requerem maior investigação para a identificação dos processos envolvidos nesse acúmulo de lipídios.

- **O AR não foi capaz de promover a diferenciação cardiogênica de células mesenquimais humanas e murinas em cultura.**

Em nossos estudos o uso de AR na concentração de 1 μ M não ocasionou a diferenciação cardiogênica das células mesenquimais humanas ou murinas em cultura.

Apesar de WOBUS *et al.* (1997) terem mostrado que o tratamento com AR durante a diferenciação de mESCs aumenta o número de CMs de uma maneira dependente de tempo e concentração, nossos resultados foram contrários. No entanto, estudos realizados por XU *et al.* (2002) com hESCs onde foi analisado o efeito do AR, entre outras moléculas, na indução da diferenciação cardiomiogênica, também demonstraram a ineficiência do AR. Assim, verifica-se uma contradição entre os resultados obtidos nestes dois estudos, WOBUS *et al.*, (1997) e XU *et al.*

(2002), a qual pode ser atribuída à diferença entre os tipos celulares (murino *versus* humano, respectivamente).

- **O AR aumentou o crescimento celular de células mesenquimais murinas em cultura, mas não de humanas.**

O AR provocou aumento no crescimento celular de células mesenquimais murinas com 45 dias. Quando a metodologia utilizada foi o MTT, verificou-se um aumento de 35,5% nas culturas tratadas com AR 1 μ M; quando foi realizada contagem de campos aleatórios, a diferença subiu para 58,7%. Contrariamente, não houve diferença significativa entre grupos tratado e controle de células mesenquimais humanas. Essa diferença de comportamento pode ser relacionada aos efeitos que o AR provoca em relação ao crescimento celular dependendo da via de sinalização envolvida e que parecem ser intrínsecos ao tipo celular.

Como foi descrito no item 1.3.2, o AR pode se ligar tanto ao RAR como ao PPAR β/δ . A ligação do AR com as suas proteínas ligantes intracelulares cognatas regula a ativação de seus receptores: CRABP-II (*Celular Retinoic Acid-Binding Protein II*) se liga ao AR e então ao RAR enquanto FABP5 (*Fatty Acid-Binding Protein 5*) encaminha o AR ao PPAR β/δ . Enquanto o AR inibe o crescimento celular pela sinalização através de RAR, as atividades favorecendo a proliferação parecem ser mediadas pelo PPAR β/δ (figura 5.1) (SCHUG *et al.*, 2007).

A afinidade da via CRABP-II/RAR por AR excede a da via FAB5/PPAR β/δ . Pode-se prever que na maioria das células, a sinalização por AR através do RAR predominará. Em células que expressam muito mais CRABP-II do que FABP5, o AR tende a se ligar ao RAR, frequentemente resultando em inibição do crescimento

celular através da interrupção do ciclo celular. A ativação de PPAR β/δ se tornará aparente somente em células que exibam muito mais FABP5 que CRABP-II, o AR é, então, direcionado para PPAR β/δ , regulando positivamente as vias de sobrevivência (SCHUG *et al.*, 2007).

Em nossos estudos, o AR favoreceu o crescimento de células mesenquimais murinas. Sugere-se que este efeito possa estar relacionado com a maior expressão de FABP5, que ligaria o AR ao PPAR β/δ . Já nas mesenquimais humanas, como não houve crescimento celular significativo, o AR tenderia a se ligar ao RAR através do CRABP-II, levando à inibição do crescimento celular.

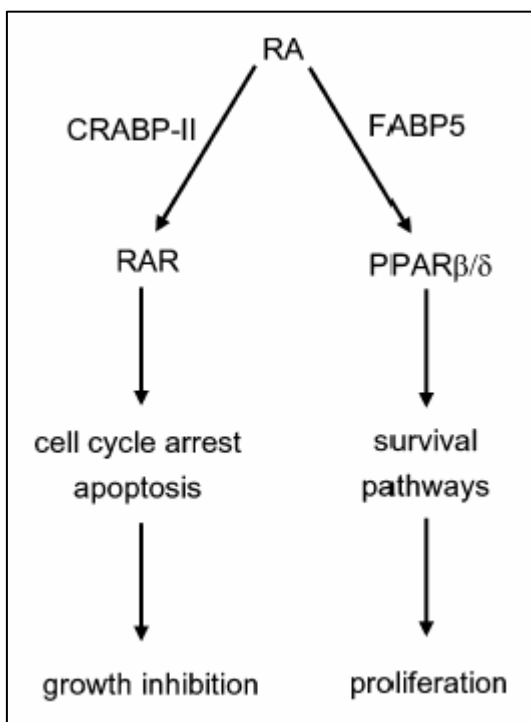


Figura 5.1. Efeitos opostos do AR no crescimento celular dependentes de vias de sinalização distintas (extraído de SCHUG *et al.*, 2007).

5.3. Efeitos da ES nas culturas de células mesenquimais de medula óssea

- **A ES não foi capaz de promover a diferenciação cardiogênica de células mesenquimais em cultura.**

O uso da ES não promoveu a diferenciação celular de células mesenquimais humanas ou murinas em CMs sob as condições testadas, como foi verificado pela análise do fator Nkx2-5 e de proteínas características de CMs nas culturas tratadas.

A diferenciação *in vitro* de MSCs da medula óssea de adultos em CMs tem sido demonstrada através de tratamentos com 5-aza (MAKINO *et al.*, 1999; TOMITA *et al.*, 1999). No entanto estes resultados não puderam ser repetidos posteriormente (LIU *et al.*, 2003).

O potencial de diferenciação de MSCs parece ser restrito à passagem das células em cultura. ZHANG *et al.* (2005) mostrou que após o tratamento com 5-aza de rMSCs, somente a p4, e não a p1 ou p8 formaram miotubos e expressaram marcadores cardiomiocíticos. A p4 possuía crescimento lento, enquanto p1 e p8 possuíam um modelo de crescimento exponencial. Quando a proliferação de rMSCs p1 e p8 foi inibida com BrdU, um inibidor de mitose, somente p1, mas não p8 diferenciaram em CMs após o tratamento com 5-aza. Estes resultados demonstram que, ao menos em rMSCs, o potencial de diferenciação em CMs é relacionado à capacidade de proliferação e restrito à passagem.

Nossos resultados mostrando que a ES não promoveu a diferenciação cardiogênica estão de acordo com outros estudos de diferenciação utilizando a ES. Neles foi demonstrado que a ES não afeta a diferenciação dos mioblastos para a linhagem esquelética (PEDROTTY *et al.*, 2005 e STERN-STRAETER *et al.*, 2005)

nem estimula a diferenciação dos mioblastos para linhagens cardíacas (PEDROTTY *et al.*, 2005).

O período de 14 dias foi escolhido como padrão para a análise das culturas pois foi o tempo utilizado e demonstrado satisfatório para a diferenciação celular em diversos outros estudos, sendo que no nosso caso, foram observadas culturas com até 21 dias. Especialmente em relação à ES é válido considerar ainda que períodos curtos de poucos minutos envolvendo a aplicação de estímulo elétrico já são suficientes para provocar mudanças, como foi demonstrado por SUN *et al.* (2006) onde 60 minutos de ES foram suficientes para 80% de fibroblastos cultivados em 3D se alinharem perpendicularmente ao campo elétrico, ou por MAROTTA *et al.* (2004), que relataram mudanças no metabolismo celular após estimular por 90 minutos uma cultura muscular esquelética. Além desses, outros estudos demonstraram efeitos positivos da ES em pouco tempo, variando de 24h a 14 dias, como foi exemplificado na tabela 1.3.

- **A ES estimulou o crescimento celular de células mesenquimais em cultura.**

Como foi demonstrado na figura 4.17, a ES estimulou o crescimento celular quando se analisou o 7^o e o 14^o dias de cultura ES e controle, mas não houve diferença significativa com somente 1 dia. Estes resultados estão de acordo com dados similares obtidos através de técnicas diferentes por PEDROTTY *et al.* (2005), onde mioblastos esqueléticos foram ES e comparados a culturas controle. Verificaram que após 14 dias de crescimento o número de células aumentou significativamente nas culturas ES em relação às controles, correspondendo a um aumento de duas vezes no número de células. Apesar de também terem encontrado

aumento após 1 dia, a diferença não foi significativa. Em seus estudos, PEDROTTY *et al.* também verificaram que essa diferença se deveu ao aumento da proliferação celular, e não a uma possível diminuição da morte celular ou apoptose. SUN *et al.* (2007) também relataram um aumento de quase três vezes no crescimento celular de hMSC em experimentos de osteodiferenciação quando foram ES.

Como existem evidências que a proliferação e a diferenciação são eventos mutuamente exclusivos, os resultados obtidos em nossos experimentos, onde se verificou que as células aumentaram em número, mas não diferenciaram, estão de acordo com este princípio.

- **A ES não afetou a orientação celular, mas modificou as junções celulares das células mesenquimais em cultura.**

Já se sabe que as atividades elétricas fisiológicas geradas em processos biológicos, tais como o desenvolvimento embrionário e a cicatrização, influenciam esses processos por guiar a direção do movimento e o alinhamento da célula. Muitos tipos celulares, incluindo fibroblastos, osteoblastos, mioblastos e células da crista neural são capazes de se reorientar em resposta ao estímulo elétrico (SUN *et al.*, 2006).

Em nossos estudos monitoramos se as células mesenquimais apresentavam uma reorientação quando ES. No entanto, não houve uma aparente reorientação das células ES, o que também pode ser atribuído ao tipo de corrente utilizada, isto é, PC bifásica balanceada, que não permite a polarização do sistema nem o eventual rearranjo das células submetidas ao pulso elétrico.

Essa reorientação parece depender também do tipo celular. SUN *et al.* (2006) ao eletroestimularem fibroblastos e MSCs de rato mostraram que em resposta a um estímulo elétrico de 7V/cm (DC), os fibroblastos que inicialmente estavam orientados ao acaso, tornaram-se alongados. Tais células mostraram uma clara reorientação, em sua maioria perpendicular ao campo. Ao contrário, as MSCs resistiram a mudanças físicas e mantiveram a orientação celular original mesmo com estímulos maiores que 10V/cm. Somente uma pequena fração menor que 10% se tornou contraída, reorientada e demonstrou mudanças na morfologia em resposta ao estímulo elétrico.

Além disso, deve-se ter em mente que os parâmetros utilizados em nosso trabalho podem não ter sido suficientes para que uma reorientação fosse desencadeada. SUN *et al.* (2006) também demonstraram que fibroblastos expostos a uma força elétrica de 2 ou 4V/cm não apresentaram uma reorientação significativa, sendo necessário um estímulo maior que 7V/cm para induzir uma reorientação notável.

Os fatores do estímulo elétrico (amplitude, duração, frequência de repetição, formato e intervalo de pulso) aos quais a célula está submetida podem influenciar a resposta celular. No entanto, em nossos experimentos, os parâmetros (tipo de corrente, frequência de repetição e duração de pulso) foram pré-determinados e fixados. Um possível estudo comparativo onde os parâmetros pudessem variar iria requerer um equipamento mais sofisticado e sensível, e em nosso modelo foi utilizado um protótipo com limitações destes parâmetros.

A adesão celular é afetada por mudanças na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Para se mover, a célula deve aderir onde ela está se projetando e se destacar de onde ela está retraindo. Mudanças na $[Ca^{2+}]_i$ podem causar estes

efeitos. Assim, deve haver uma tendência para a célula se destacar onde a $[Ca^{2+}]_i$ aumenta e aderir onde ela diminui. A sensibilidade ao Ca^{2+} sugere um mecanismo potencial galvanotático na maioria das células onde ela é evidente (MYCIELSKA *et al.*, 2004).

A aplicação de campo elétrico causa a hiperpolarização da face da membrana voltada para o ânodo. Em células com poucos ou nenhum canal iônico regulado por voltagem, ocorre um influxo passivo de Ca^{2+} para dentro da célula na parte hiperpolarizada e uma conseqüente contração, levando ao movimento em direção ao cátodo, como mostrado na figura 5.2A,B (MYCIELSKA *et al.*, 2004).

Se canais de Ca^{2+} regulados por voltagem (VGCCs) estão presentes, a despolarização da membrana (no lado catódico) deve abri-los e permitir o influxo de Ca^{2+} , que então tenderia a causar o movimento da célula em direção ao ânodo, na direção oposta do efeito passivo do Ca^{2+} . O movimento final, se houver, dependeria então do balanço entre as duas forças opostas (figura 5.2C) (MYCIELSKA *et al.*, 2004).

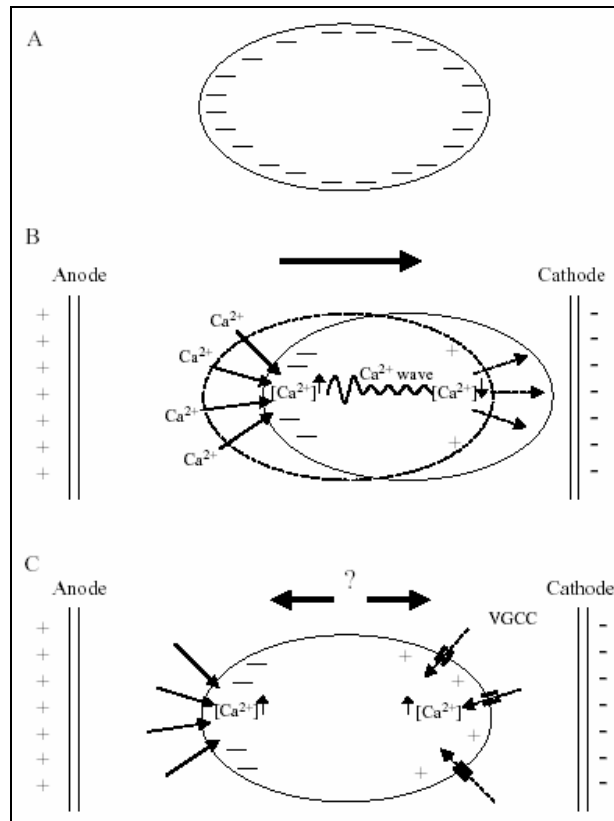


Figura 5.2. (A) Uma célula no estado de repouso tem potencial de membrana negativo. (B) Uma célula com quantidade negligenciável de canais iônicos regulados por voltagem exposta a um campo elétrico. (C) Uma célula com canais de Ca^{2+} regulados por voltagem. (extraído de MYCIELSKA *et al.*, 2004)

Em fibroblastos, a reorganização induzida por campo elétrico parece ser mediada pela ativação de VGCCs e aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (CHO *et al.*, 1996). Como o canal de cálcio do tipo L, um VGCCs, já foi identificado em hMSC (HEUBACH *et al.*, 2004), o mecanismo descrito acima (figura 5.2C) poderia ser aplicável às células mesenquimais utilizadas neste trabalho. No entanto, como demonstrado por SUN *et al.* (2006), as MSCs não alteraram sua orientação quando submetidas à DC. Em nosso caso, por se tratar de PC bifásica balanceada, não há polarização do sistema nem a eventual reorientação das células.

Embora mecanismos de eletroacoplamento responsáveis por mudanças na adesão celular e reorientação celular precisem ainda ser completamente elucidados, diversos fatores são freqüentemente considerados. Primeiro, imagina-se que as

respostas galvanotáticas são responsáveis por tais ações celulares. Geralmente, a reorientação celular perpendicular é comum para minimizar o efeito perturbante de um estímulo elétrico no potencial de membrana. Segundo, como se sabe que o Ca^{2+} está envolvido na resposta das células ao estímulo elétrico, mudanças no potencial de membrana devem regular a $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Assim, estímulos suficientes ativam VGCCs e regulam processo subcelulares dependentes de Ca^{2+} , incluindo a reorganização do citoesqueleto que freqüentemente provoca mudanças na morfologia celular e vias de reorientação celular (SUN *et al.*, 2006).

A elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativa proteínas ligantes de actina, tais como α -actinina e vinculina, e assim causa mudanças na estrutura do microfilamento (CHO *et al.*, 1996).

Neste sentido, como a presença de canais VGCCs, que permitem o influxo de Ca^{2+} , já foi identificada ao menos em hMSCs e como a elevação da $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ativa proteínas ligantes de actina, ao considerar os resultados encontrados, onde vinculina e α -actinina foram superexpressas nas culturas de células mesenquimais murinas ES, supõe-se que a elevação $[\text{Ca}^{2+}]_i$ seja a responsável por esta mudança. Como se atribui o destacamento da célula da MEC à elevação do $[\text{Ca}^{2+}]_i$, também se sugere que as células mesenquimais murinas ES estejam menos aderidas à MEC e formando menos contatos focais que as células não ES.

De acordo com a suposição, em células mesenquimais murinas ES, a vinculina e a α -actinina, presentes em junções célula-célula e célula-MEC, foram superexpressas. Contudo, a β 1-integrina, paxilina e FAK, presentes em junções célula-MEC, tiveram sua expressão diminuída com a ES. Pode-se sugerir, então, que a aplicação da ES promoveu o aumento da adesão entre as células mesenquimais murinas, e diminuiu a interação das células com a MEC.

A superexpressão de vinculina reduz a migração celular, enquanto a sua diminuição aumenta a motilidade celular. Além disso, células que não expressam vinculina são menos aderentes, menos espalhadas, mais móveis e têm poucas e menores adesões focais do que as células normais, e a sinalização tanto através da FAK como da paxilina são elevadas, uma característica de células móveis (ZIEGLER *et al.*, 2006). Em nossos estudos, verificamos que as células mesenquimais não se orientaram, e, como tanto as mesenquimais humanas como as murinas superexpressaram vinculina, isto poderia sugerir que essas células sejam menos móveis. Além disso, FAK e paxilina foram menos expressas em células mesenquimais murinas ES.

Como a vinculina está presente tanto em junções célula-célula como célula-MEC, a superexpressão da vinculina pode também estar relacionada ao aumento das ligações entre as células. Na figura 4.18F verifica-se a presença de vinculina nas extremidades celulares, o que pode ser mais um indicativo do aumento da adesão célula-célula.

Ao monitorar a formação de contatos focais, descobriu-se que a FAK era uma das primeiras proteínas sinalizadoras a ser recrutada para estes sítios. Embora o recrutamento da FAK para os contatos focais esteja associado com aumento da fosforilação da tirosina da FAK, os contatos focais se formam prontamente em fibroblastos que não expressam FAK, o que indica que a atividade FAK não é essencial para o processo de formação de adesão focal (MITRA *et al.*, 2005). Deste modo, o fato das células mesenquimais humanas não terem expressado FAK não significa que não sejam capazes de formar contatos focais.

De acordo com a maioria dos relatos que atribuem à FAK e à paxilina uma regulação positiva da mobilidade celular (SCHALLER, 2004), nossos resultados

sugerem que a menor expressão de FAK e paxilina em células mesenquimais murinas ES pode levar à menor mobilidade celular.

No entanto, nossos resultados relativos ao comportamento das células mesenquimais murinas ES parecem ser contrários aos de SUN *et al.* (2006), que, baseados em imagens, mostraram uma adesão forte incomum entre rMSCs e fibras de colágeno, aglomeração de integrinas e falta de adesão em resposta ao tratamento com anticorpo anti-integrina, sugerindo que as adesões mediadas por integrina encontradas em MSCs diferem daquelas tipicamente observadas em células diferenciadas.

Interessantemente, em nossos experimentos, a β 1-integrina foi a única proteína que apresentou níveis de expressão contrastantes quando se compararam as culturas de células mesenquimais humanas e murinas submetidas à ES. Sua expressão diminuiu em culturas de células mesenquimais murinas ES em relação às culturas controle. Já em culturas de células humanas, foi expressa nas ES, mas não foi detectada nas controle. No caso das culturas de células humanas, como houve a expressão de vinculina e β 1-integrina somente nas culturas ES, sendo que a vinculina é encontrada tanto em adesões célula-célula como célula-MEC e que a β 1-integrina é encontrada somente em adesões célula-MEC, sugere-se que a aplicação da ES possa estar promovendo um aumento da adesão célula-MEC em humanas. Assim, o efeito da ES na expressão de proteínas de junções aderentes é diferente nas culturas mesenquimais humanas e murinas. Portanto, nossos resultados obtidos com culturas de células mesenquimais humanas, estariam de acordo com os de SUN *et al.* (2006).

Outros achados de SUN *et al.* (2006) sugerem que a membrana de rMSC pode não estar firmemente acoplada ao citoesqueleto. Este postulado oferece uma

explicação que, como uma íntima interação entre a organização da membrana e do citoesqueleto é requerida para mediar mudanças na morfologia e reorientação celular, a conexão frouxa entre a membrana e o citoesqueleto observadas nas rMSCs, mas não nos fibroblastos, pode impedir respostas celulares induzidas eletricamente. Os autores sugeriram que, devido à forte adesão mediada por integrina e às fracas propriedades de membrana, os mecanismos comuns de eletroacoplamento que são suficientes para explicar as respostas galvanotáticas de células completamente diferenciadas teriam que ser modificados para a adesão e reorientação das MSCs.

A Cx43, presente nas junções comunicantes, foi detectada tanto no grupo controle como no ES de células mesenquimais murinas e humanas após 14 dias de tratamento. Contrariamente, FUKUHARA *et al.* (2003) não detectou a presença da Cx43 em suas culturas de mMSCs, embora a marcação tenha sido realizada com somente 5 dias de cultura. Em nossos estudos, embora a Cx43 estivesse presente nas células mesenquimais de medula óssea, não é possível afirmar que as células estavam acopladas funcionalmente, o que futuramente poderia ser confirmado através de microinjeção de corante.

A importância do estabelecimento de junções comunicantes em culturas ES foi demonstrada por RADISIC *et al.* (2004). A ES de construções de CMs iniciada muito cedo substancialmente diminuiu a quantidade de Cx43 e α -MHC (*α -myosin heavy chain*) e as construções não puderam ser induzidas a contrair sincronicamente durante a cultura. A ES tardia permitiu o estabelecimento de junções comunicantes, mas falhou em aumentar a organização funcional do aparato contrátil de modo que a atividade contrátil pôde ser induzida somente em pequenas áreas. Isso ocorre, pois durante o isolamento a partir do tecido cardíaco, as células perdem muitos dos seus

canais e receptores de superfície desmontando seu aparato miofibrilar e adquirindo um formato arredondado. A Cx43, inicialmente, está presente somente no citosol, sugerindo a ausência de conexons funcionais. Durante a pré-cultura, as células rearranjam as proteínas condutivas e contráteis. Quando aplicada cedo, a ES inibe o acúmulo de proteínas cardíacas e rende um baixo comportamento contrátil. Se aplicada tarde, a ES tem menos efeito devido às quantidades reduzidas de Cx43 e proteínas contráteis disponíveis nas células (RADISIC *et al.*, 2004).

A ES em CMs, mesmo sem atividade contrátil (bloqueada pelo uso de drogas) estabeleceu e manteve junções comunicantes funcionais, mas as células não estavam nem alinhadas nem alongadas, achados estes consistentes com a falta de atividade contrátil (RADISIC *et al.*, 2004). Portanto, em nossos experimentos, apesar de não se ter observado atividade contrátil das células em cultura submetidas à ES, pode ter existido a formação de junções comunicantes funcionais.

Levando em consideração dados prévios e de outros tipos celulares, os mecanismos moleculares específicos que estão envolvidos na regulação da adesão e orientação de células mesenquimais em resposta ao estímulo elétrico precisam ser identificados pois parecem diferir dos demais tipos celulares já estudados.

6. CONCLUSÕES

Apesar dos dados relatados na literatura científica, nenhum dos fatores por nós investigados (citocinas FGF4 e BMP2, meio condicionado por CMs, AR ou ES,) foi capaz de induzir a diferenciação das células mesenquimais da medula óssea humana ou murina em linhagens cardíacas.

O crescimento de células mesenquimais em cultura foi influenciado positivamente pelos tratamentos com as citocinas FGF4, FGF4+BMP2 50ng/mL ou FGF4+BMP2 100ng/mL e pela ES. O AR 1 μ M também aumentou o crescimento celular nas culturas de células mesenquimais murinas, mas não influenciou o de culturas de células mesenquimais humanas. Além disso, o tratamento com AR 1 μ M promoveu o acúmulo de lóculos lipídicos em culturas de células mesenquimais murinas, o que não ocorreu em humanas.

A ES não modificou a orientação celular, mas alterou a expressão de proteínas de junções celulares. Nas culturas de células mesenquimais murinas ES, a adesão das células com a MEC foi diminuída e a adesão entre as células foi aumentada. Já nas culturas de células mesenquimais humanas, sugere-se um aumento da adesão célula-MEC proporcionado pela ES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WATSON, J.D. Molecular biology of the cell. 4ª ed, Academic Press, New York, 2002:1616p.
2. American Heart Association (2006) Heart Disease and Stroke Statistics - 2006 Update. Dallas, Texas: American Heart Association, 2006.
3. BARRON, M.; GAO, M. e LOUGH, J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. *Developmental Dynamics* 218: 383-393, 2000.
4. BEHFAR, A.; ZINGMAN, L.V.; HODGSON, D.M.; RAUZIER, J.M.; KANE, G.C.; TERZIC, A. e PUCÉAT, M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 16: 1558-1566, 2002.
5. BERSHADSKY, A. Magic touch: how does cell–cell adhesion trigger actin assembly? *Trends in Cell Biology* 14(11): 589-593, 2004.
6. BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S. e ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19: 180-192, 2001.
7. BOKENES, J.; SJAASTAD, I. e SEJERSTED, O. Artifactual contractions triggered by field stimulation of cardiomyocytes. *J Appl Physiol* 98: 1712-1719, 2005.
8. BUCKINGHAM, M.; MEILHAC, S. e ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6 (11): 826-835, 2005.
9. CARRANGHER, N.O. & FRAME, M.C. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends in Cell Biology* 14(5): 241-249, 2004.
10. CARSON, J.A. e WEI, L. Integrin signaling's potential for mediating gene expression in hypertrophying skeletal muscle. *J Appl Physiol* 88: 337-343, 2000.
11. CHEN, D.; ZHAO, M. e MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(4): 233-241, 2004.
12. CHO, M.R.; THATTE, H.S.; LEE, R.C. e GOLAN, D.E. Reorganization of microfilament structure induces by ac electric fields. *FASEB J* 10: 1552-1558, 1996.
13. COLLOP, A.H.; BROOMFIELD, J.A.S.; CHANDRARATNA, R.A.S.; YONG, A.; DEIMLING, S.J.; KOLKER, S.J.; WEEKS, D.L. e DRYSDALE, T.A. Retinoic acid signaling is essential for formation of the heart tube in *Xenopus*. *Developmental Biology* 291: 96-109, 2006.
14. DACKO, S. Review of Physiology, *in Clinical Electrotherapy*. p.3-13. NELSON, R.M.; HAYES, K.W. e CURRIER, D.P., Editors. 3ªed, Appleton & Lange, EUA: 1999: 579p.
15. EVANS, W.H.; DE VUYS, E. e LEYBAERT, L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochemistry Journal* 397: 1-14, 2006.

16. FRASER, J.K.; SCHREIBER, R.E.; ZUK, P.A. e HEDRICK, M.H. Adult stem cell therapy for the heart. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 658-666, 2004.
17. FUKUHARA, S.; TOMITA, S.; YAMASHIRO, S.; MORISAKI, T.; YUTANI, C.; KITAMURA, S. e NAKATANI, T. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage *in vitro*. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 125: 1470-1480, 2003.
18. GERLEMAN, D.G. e BARR, J.O. Instrumentation and Product Safety, *in Clinical Electrotherapy*. p.15-53. NELSON, R.M.; HAYES, K.W. e CURRIER, D.P. (Ed.). 3 ed, Appleton & Lange, EUA: 1999: 579p.
19. GUIMARÃES, E.L.M.; FRANCESCHI, M.F.S.; ANDRADE, C.M.B.; GUARAGNA, R.M.; BOROJEVIC, R.; MARGIS, R.; BERNARD, E.A. e GUMA, F.C.R. Hepatic stellate cell line modulates lipogenic transcription factors. *Liver International* 27(9): 1255-1264, 2007.
20. GILBERT, S.F. *Developmental Biology*. 6ª ed, Sinuaer Associates Inc., Sunderland, 2000:695p.
21. HARVEY, R.P. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 3: 544-556, 2002.
22. HEUBACH, J.F.; GRAF, E.M.; LEUTHEUSER, J.; BOCK, M.; BALANA, B.; ZAHANICH, I.; CHRIST, T.; BOXBERGER, S.; WETTWER, E. e RAVENS, U. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. *J Physiol* 554: 659-672, 2004.
23. HOLT, E.; LUNDE, P.K.; SEJERSTED, O.M. e CHRISTENSEN, G. Electrical stimulation of adult rat cardiomyocytes in culture improves contractile properties and is associated with altered calcium handling. *Basic Res Cardiol* 92: 289-297, 1997.
24. INAZAWA, Y.; NAKATSU, M.; YASUGI, E.; SAEKI, K. e YUO, A. Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferators-activated receptor γ . *Cell Structure and Function* 28: 487-493, 2003.
25. JOHNSON, T.B.; KENT, R.L.; BUBOLZ, B.A. e McDERMOTT, P.J. Electrical stimulation of contractile activity accelerates growth of cultured neonatal cardiocytes. *Circulation Research* 74(3): 448-59, 1994.
26. KATO, S.; IVESTER, C.T.; IV, G.C.; ZILE, M.R. e McDERMOTT, P.J. Growth effects of electrically stimulated contraction on adult feline cardiocytes in primary culture. *Am J Physiol* 268: H2495-2504, 1995.
27. KAWAY, T.; TAKAHASHI, T.; ESAKI, M.; USHIKOSHI, H.; NAGANO, S.; FUJIWARA, H. e KOSAI, K. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circulation Journal* 68: 691-702, 2004.
28. KIERSZENBAUM, A.L. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. 1ª ed, Elsevier, Rio de Janeiro, 2004:654p.
29. KING, T.J. e LAMPE, P.D. Temporal Regulation of Connexin Phosphorylation in Embryonic and Adult Tissues. *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2): 24-35, 2005.

30. KLOTH, C.L. Electrical stimulation for wound healing: a review of evidence from *in vitro* studies, animal experiments, and clinical trials. *Lower Extremity Wounds* 4(1), 23-44, 2005.
31. KOVAL, M. Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends in Cell Biology* 16(3): 159-166, 2006.
32. KUBALAK, S.W. e SUCOV, H.M. Retinoids in Heart Development, in *Heart Development*. p. 209-219. HARVEY, P.R. e ROSENTHAL, N., Editors. 1^aed, Academic Press, Canadá, 1999: 530p.
33. KUBIS, H.P.; SCHEIBE, R.J.; MEIBNER, J.D.; HORNING, G. e GROS, G. Fast-to-slow transformation and nuclear import/export kinetics of transcription factor NFATc1 during electrostimulation of rabbit muscle cells in culture. *Journal of Physiology* 541.3: 835-847, 2002.
34. LAFLAMME, M.A. e MURRY, C.E. Regenerating the heart. *Nature Biotechnology* 23(7): 845-856, 2005.
35. LAFLAMME, M.A.; CHEN, K.Y.; NAUMOVA, A.V.; MUSKHELI, V.; FUGATE, J.A.; DUPRAS, S.K.; REINECKE, H.; XU, C.; HASSANIPOUR, M.; POLICE, S.; O'SULLIVAN, C.; COLLINS, L.; CHEN, Y.; MINAMI, E.; GILL, E.A.; UENO, S.; YUAN, C.; GOLD, J. e MURRY, C.E. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology* 25(9): 1015-1024, 2007.
36. LEOR, J.; YORAM, A. e COHEN, S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacology & Therapeutics* 105: 151-163, 2005.
37. LIU, Y.; GUO, J.; ZHANG, P.; ZHANG, S.; CHEN, P.; MA, K. e ZHOU, C. Bone marrow mononuclear cell transplantation into heart elevates the expression of angiogenic factors. *Microvascular Research* 68: 156-160, 2004.
38. LIU, Y.; SONG, J.; LIU, W.; WAN, Y.; CHEN, X.; HU, C. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? *Cardiovascular Research* 58: 460-468, 2003.
39. LOUGH, J.; BARRON, M.; BROGLEY, M.; SUGI, Y.; BOLENDER, D.L. e ZHU, X. Combined BMP-2 and FGF-4, but neither factor alone, induces cardiogenesis in non-precardiac embryonic mesoderm. *Developmental Biology* 178: 198-202, 1996.
40. MAKINO, S.; FUKUDA, K.; MIYOSHI, S.; KONISHI, F.; KODAMA, H.; PAN, J.; SANO, M.; TAKAHASHI, T.; HORI, S.; ABE, H.; HATA, J.; UMEZAWA, A. e OGAWA, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *The Journal of Clinical Investigation* 103(5): 697-705, 1999.
41. MAROTTA, M.; BRAGÓS, R. e GÓMEZ-FOIX, A. Design and performance of an electrical stimulator for long-term contraction of cultured muscle cells. *BioTechniques* 36: 68-73, 2004.
42. MARTINOVIC, S.; MAZIC, S.; KISIC, V.; BASIC, N.; JAKIC-RAZUMOVIC, J.; BOROVECKI, F.; BATINIC, D.; SIMIC, P.; GRGUREVIC, L.; LABAR, B. e VUKICEVIC, S. Expression of bone morphogenetic proteins in stromal cells from human bone marrow long-term culture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 52(9): 1159-1167, 2004.

43. MITRA, S.K.; HANSON, D.A. e SCHLAEPFER, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 56-68, 2005.
44. MYCIELSKA, M.E. e DJAMGOZ, M.B.A. Cellular mechanisms of direct-current electric field effects: galvanotaxis and metastatic disease. *Journal of Cell Science* 117, 1631-1639, 2004.
45. ORNITZ, D.M e ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2 (3): 3005.1-3005.12, 2001.
46. Painel de indicadores do SUS. Ano I, nº 1, agosto de 2006.
47. PANDUR, P. What does it take to make a heart? *Biol. Cell* 97: 197-210, 2005.
48. PARK, J.S.; HUANG, N.F.; KURPINSKI, K.T.; PATEL, S.; HSU, S. e LI, S. Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. *Frontiers in Bioscience* 12: 5098-5116, 2007.
49. PEDROTTY, D.M.; KOH, J.; DAVIS, B.H.; TAYLOR, D.A.; WOLF, P. e NIKLASON, L.E. Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H1620-H1626, 2005.
50. PENNISI, D.J.; RENTSCHLER, S.; GOURDIE, R.G.; FISHMAN, G.I. e MIKAWA, T, Induction and Patterning of the Cardiac Conduction System. *Int J Dev Biol* 46: 765-775, 2002.
51. PITTENGER, M. e MARTIN, B. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circulation Research* 95: 9-20, 2004.
52. PUC, M.; COROVIC, S.; FLISAR, K.; PETKOVSEK, M.; NASTRAN, J. e MIKLAVCIC, D. Techniques of signal generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices. *Bioelectrochemistry* 64: 113-124, 2004.
53. RADISIC, M.; PARK, H.; SHING, H.; CONSI, T.; SCHOEN, F.J.; LANGER, R.; FREED, L.E. e VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *PNAS* 101(52): 18129-18134, 2004.
54. SCHALLER, M.D. FAK and paxillin: regulators of N-cadherin adhesion and inhibitors of cell migration? *The Journal of Cell Biology* 166 (2): 157-159, 2004.
55. SCHNEIDER, M.D.; GAUSSIN, V. e LYONS, K.M. Tempting fate: BMP signals for cardiac morphogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14: 1-4, 2003.
56. SCHUG, T.T; BERRY, D.C.; SHAW, N.S.; TRAVIS, S.N. e NOY, N. Opposing Effects of Retinoic Acid on Cell Growth Result from Alternate Activation of Two Different Nuclear Receptors. *Cell* 129: 723-733, 2007.
57. SCHULTHEISS, T.M.; BURCH, J.B.E. e LASSAR, A.B. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes & Development* 11:451-462, 1997.
58. SHI, Y.; KATSEV, S.; CAI, C. e EVANS, S. BMP signaling is required for heart formation in vertebrates. *Development Biology* 224(2): 226-37, 2000.
59. SHIOTA, M.; HEIKE, T.; HARUYAMA, M.; BABA, S.; TSUCHIYA, A.; FUJINO, H.; KOBAYASHI, H.; KATO, T.; UMEDA, K.; YOSHIMOTO, M. e NAKAHATA, T.

- Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Experimental Cell Research* 313: 1008-1023, 2007.
60. SOLLOWAY, M.J. e HARVEY, R.P. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovascular Research* 58(2): 264-77, 2003.
 61. STERN-STRAETER, J.; BACH, A.D.; STANGERNBERG, L.; FOERSTER, V.T.; HORCH, R.E.; STARK, G.B. e BEIER, J.P. Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures – a real-time RT-PCR study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 9 (4): 883-892, 2005.
 62. SUN, S.; TITUSHKIN, I. e CHO, M. Regulation of mesenchymal stem cell adhesion and orientation in 3D collagen scaffold by electrical stimulus. *Bioelectrochemistry* 69: 133-141, 2006.
 63. SUN, S.; LIU, Y.; LIPSKY, S. e CHO, M. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *FASEB J.* 21: 1472–1480, 2007.
 64. TAYLOR, D.A. Cell-based myocardial repair: how should we proceed? *International Journal of Cardiology* 95(1): S8-S12, 2004.
 65. TOMITA, S.; LI, R.K.; WEISEL, R.D.; MICKLE, D.A.; KIM, E.J.; SAKAI, T. e JIA, Z.Q. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 100:247-256, 1999.
 66. TOWBIN, H.; STAEHELIN, T. e GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS USA* 76(9): 4350-4354, 1979.
 67. WILSON, J.G. e WARKANY, J. Aortic arch and cardiac anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats. *American Journal of Anatomy* 85: 113-155, 1949.
 68. WOBUS, A.M.; KAOMEI, G.; SHAN, J.; WELLNER, M.C.; ROHWEDDEL, J.; GUANJU, J.; FLEISCHMANN, B.; KATUS, H.A.; HESCHELER, J. e FRANZ, W.M. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1525-1539, 1997.
 69. XAYMARDAN, M.; TANG, L.; ZAGREDA, L.; PALLANTE, B.; ZHENG, J.; CHAZEN, J.L.; CHIN, A.; DUIGNAN, I.; NAHIRNEY, P.; RAFII, S.; MIKAWA, T. e EDELBERG, J.M. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circulation Research*, 94(5): e39-e45, 2004.
 70. XU, C.; POLICE, S.; RAO, N. e CARPENTER, M.K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation Research* 91: 501-508, 2002.
 71. XU, M.; WANI, M.; DAI, Y.S.; WANG, J.; YAN, M.; AYUB, A. e ASHRAF, M. Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation* 110: 2658-2665, 2004.
 72. YONEMOCHI, H.; YASUNAGA, S.; TESHIMA, Y.; NAOHIKO, T.; NAKAGAWA, M.; ITO, M. e SAIKAWA, T. Rapid electrical stimulation of contraction reduces the

- density of β -adrenergic receptors and responsiveness of cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 101: 2625-2630, 2000.
73. YUASA, S.; ITABASHI, Y.; KOSHIMIZU, U.; TANAKA, T.; SUGIMURA, K.; KINOSHITA, M.; HATTORI, F.; FUKAMI, S.; SHIMAZAKI, T.; OKANO, H.; OGAWA, S e FUKUDA, K. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 23 (5): 607-611, 2005.
74. ZAFFRAN, S. e FRASCH, M. Early signals in cardiac development. *Circulation Research* 91(6): 457-469, 2002.
75. ZHANG, F.B.; LI, L.; FANG, B.; ZHU, D.L.; YANG, H.T. e GAO, P.J. Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336: 784-792, 2005.
76. ZHENG, B.; WEN, J.K. e HAN, M. Regulatory factors involved in cardiogenesis. *Biochemistry (Moscou)* 68 (6): 650-657, 2003.
77. ZIEGLER, W.H.; LIDDINGTON, R.C. e CRITCHLEY, D.R. The structure and regulation of Vinculin. *Trends in Cell Biology* 16(9): 453-460, 2006.

ANEXO I

Fundamentos da eletroestimulação

Ao realizar a eletroestimulação, deve-se entender o mecanismo pelo qual o estímulo elétrico afeta o sistema biológico, seja ele uma célula, um tecido ou um indivíduo. Assim, a compreensão de determinadas propriedades torna-se necessária tanto para a correta aplicação do estímulo, como para o entendimento dos equipamentos utilizados com este objetivo. As informações seguintes foram transcritas ou adaptadas de: DACKO (1999); GERLEMAN & BARR (1999) e KLOTH (2005).

Carga

A carga elétrica é uma propriedade fundamental da matéria. Quando dois objetos que têm cargas similares são aproximados, eles se repelem; dois objetos com cargas opostas se atraem quando se aproximam. Os dois tipos de carga são chamados de positivo e negativo.

Elétrons e íons

Todo material é feito de átomos contendo núcleos carregados positivamente e elétrons carregados negativamente dispostos em orbitais ao redor deles. Um átomo é eletricamente neutro quando há uma igualdade de carga entre o núcleo e os elétrons nos orbitais. Quando influenciado por uma força externa (tal como reações químicas, campos eletrostáticos, calor, luz e campos magnéticos), um átomo pode perder ou ganhar elétrons, alterando, desta maneira, sua carga neutra e levando-o a adquirir propriedades elétricas. Um átomo que não está mais no seu estado neutro original é chamado de **íon**, e o processo de mudança de estado elétrico de um átomo é chamado **ionização**.

Um íon negativo é um átomo que ganhou um ou mais elétrons, adquirindo carga negativa; um íon positivo é um átomo que perdeu um ou mais elétrons, resultando em carga positiva. Os íons estão presentes em soluções eletrolíticas de ácidos, bases e sais tais como as que compõem as células e tecidos biológicos. Radicais ácidos tendem a formar íons negativos, enquanto alcalóides, bases e metais tendem a formar íons positivos. Um íon tem o mesmo núcleo que o átomo tinha antes da adição ou perda de elétrons e assim ele possui as características básicas do átomo original. A carga de um elétron isolado é definida como: $-e = 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ coulombs}$

Assim, a carga de um objeto é uma medida do número de elétrons livres que ele perdeu ou ganhou e é expresso como coulombs de carga. Um coulomb (C) de carga (q) é igual a carga combinada de $6,25 \cdot 10^{18}$ elétrons.

Corrente

O taxa de fluxo direcionado de carga (elétrons livres ou íons) de um lugar para outro na matéria constitui a corrente. Materiais (principalmente metais) com somente um ou dois elétrons de valência tendem a doar seus elétrons muito facilmente (condutores) e prontamente permitem o movimento de elétrons, ou fluxo, através deles. Soluções eletrolíticas permitem o movimento livre de íons positivos e negativos, bem como o movimento livre de elétrons.

A fim de produzir um fluxo de corrente direcionado, deve haver uma fonte de elétrons livres e íons positivos, um material condutivo que permita o fluxo de carga e uma força eletromotriz (FEM) que provoque o movimento ou a concentração da carga.

A unidade de corrente (I) é o ampere (A), que representa o movimento de 1 coulomb de carga por segundo. Coulombs indicam o número de elétrons; amperes indicam a taxa de fluxo de elétrons. Um ampere é uma unidade grande de corrente no contexto de estimulação elétrica, unidades menores são comumente usadas (miliampere (mA) e microampere (μ A)).

Quando um fluxo de corrente unidirecional flui em um circuito, cargas positivas (Na^+ , K^+ ou H^+) e células (fibroblastos e neutrófilos ativados) migram em direção ao cátodo enquanto cargas negativas (Cl^- , HCO_3^- ou P^-) e células (epidermal, macrófago, neutrófilo) migram em direção ao ânodo.

Densidade de corrente

Densidade de corrente é a quantidade de fluxo de corrente por unidade de área, ou seja, é a medida da quantidade de íons carregados movendo-se através de uma área seccionada transversalmente e é expressa em unidades de mA/cm² ou mA/in².

Voltagem

A força elétrica capaz de mover elétrons ou íons entre dois pontos de um condutor é a voltagem ou diferença de potencial (ddp) entre os dois pontos. A voltagem entre os dois pontos - por exemplo, dois eletrodos em solução - é criada pela separação de cargas entre eles, tais que um eletrodo tem um excesso de elétrons ou íons carregados negativamente em comparação ao outro. Os dois eletrodos são polarizados em relação ao outro, um sendo negativo e o outro positivo.

A unidade de voltagem ou ddp é o volt (V), definido como joule/coulomb.

Resistência

Resistência é a propriedade de um material resistir ou se opor ao fluxo de corrente através dele. Os materiais têm diferentes resistividades intrínsecas baseadas na sua química.

A resistência de um material agindo como um condutor de corrente direta pode ser calculada a partir da lei de Ohm, que relaciona as propriedades de corrente, resistência e voltagem. Se um volt de ddp leva uma corrente de um ampere a fluir em um circuito elétrico, pela lei de Ohm, a resistência limitante é igual a um ohm (Ω).

$$Resistência(\Omega) = \frac{Voltagem(V)}{Corrente(A)}$$

Freqüência e Fase

Toda forma de onda de voltagem que varia com o tempo pode ser descrita como sendo composta de uma série de senóides periódicos de diferente amplitude, fase e freqüência, que juntos definem a forma de onda. A freqüência de um único senóide é definida pelo seu período ou a quantidade de tempo que ele leva para completar um ciclo do senóide, onde:

$$Freqüência(Hz) = \frac{1}{Período(s)}$$

Neste contexto, fase se refere à fração do ciclo fundamental que o ponto de referência zero de cada componente senoidal é disposto a partir do ponto zero de referência da freqüência fundamental. Há 360 graus elétricos em um ciclo de uma onda, começando com o ponto de referência zero e retornando ao mesmo ponto após uma excursão positiva ou negativa de voltagem. Se dois senóides não começam da voltagem de referência zero juntos no mesmo ponto de tempo, os senóides são ditos fora de fase. A diferença de fase é medida em graus elétricos. Juntos, os componentes senoidais de qualquer forma de onda de voltagem constituem o espectro de freqüência da forma de onda, desde a mais baixa freqüência senoidal, a fundamental, até o mais alto componente de freqüência. O fluxo de corrente que não varia ou alterna a polaridade é referido como corrente direta (DC) e lhe é atribuída freqüência zero (0 Hz).

Impedância

Em um circuito elétrico, o caminho pelo qual íons carregados ou elétrons fluem consiste de uma combinação complexa de elementos resistivos, capacitivos e indutivos. Capacitores e indutores oferecem oposição ou **reatância** ao fluxo de corrente que é dependente de freqüência. A impedância é definida como a oposição total dependente da

freqüência do fluxo elétrico e envolve tanto a reatância como a resistência, sendo também expressa em ohms. Devido à natureza complexa das propriedades envolvidas, a impedância é um vetor quantitativo. Este vetor resulta em uma diferença de fase entre a voltagem aplicada e corrente resultante em um circuito contendo componentes reativos.

O circuito composto de um estimulador elétrico e sistemas biológicos é complexo e contém componentes resistivos e reativos. A impedância do biosistema estimulado tem elementos resistivos e capacitivos, enquanto a impedância do circuito de saída do estimulador pode incluir todos os três elementos (resistivo, capacitivo e indutivo). Assim, é comum o circuito resultante variar de biosistema para biosistema.

Distinção de correntes

Começa com a simples divisão de todas as correntes em: corrente direta (DC), corrente alternada (AC) e corrente pulsada (PC) (figura 1).

DC é o fluxo contínuo de partículas carregadas em uma direção, sendo a direção dependente da polaridade da FEM aplicada.

AC é o fluxo contínuo bidirecional de partículas carregadas. Inclui tanto a AC simétrica clássica, na qual o fluxo de corrente em cada direção é igual, e a AC assimétrica, na qual o fluxo de corrente em cada direção é desigual. Diferente da PC, AC não tem intervalo de tempo entre as fases de ciclos adjacentes.

PC é definida como o fluxo não contínuo de corrente direta ou alternada. Cada pulso é um evento elétrico discreto, separado dos outros pulsos por um período de tempo durante o qual não existe atividade elétrica.

PC pode ter dois formatos de onda: monofásico ou bifásico. Um pulso monofásico representa um breve movimento dos elétrons ou íons a partir da linha isoeletrica retornando à linha zero após um período finito de tempo. Já o pulso bifásico é bidirecional e consiste de duas fases. Uma fase parte da linha isoeletrica e após um breve tempo retorna à linha de base e, na seqüência, a segunda fase deixa a linha isoeletrica na direção oposta e também após um breve período retorna à linha de base.

O formato da onda bifásica pode ser simétrico ou assimétrico em relação à linha isoeletrica. No simétrico, as cargas de cada fase são eletricamente iguais ou balanceadas, assim, não há polaridade. O assimétrico pode ser balanceado ou não balanceado eletricamente.

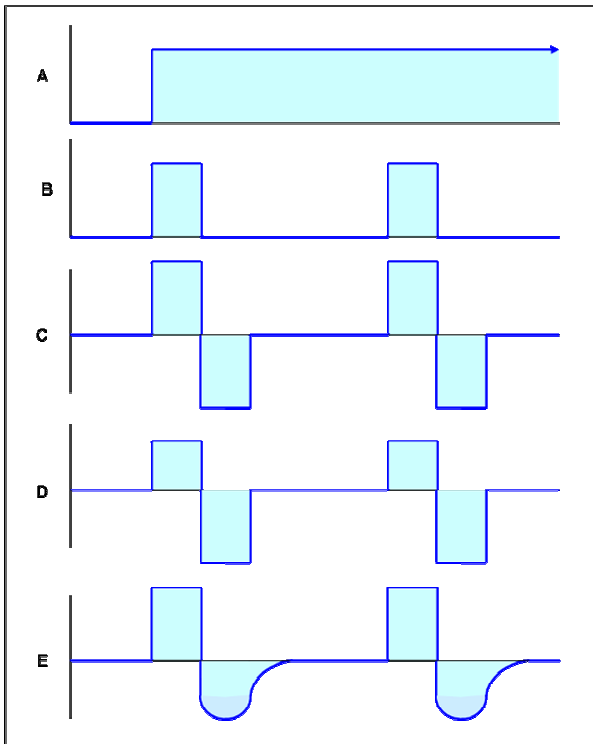


Figura 1. Exemplos de (A) corrente direta; (B) corrente pulsada monofásica; (C) corrente pulsada simétrica, bifásica, balanceada; (D) corrente pulsada simétrica, bifásica, não balanceada; e (E) corrente pulsada assimétrica, bifásica, não balanceada.

Polaridade

Polaridade é a propriedade de ter dois pólos ou eletrodos carregados opostamente. Em qualquer momento enquanto a corrente está fluindo, um eletrodo é relativamente mais positivo enquanto o outro é relativamente mais negativo. Quando o cátodo e o ânodo têm carga suficiente, eles podem causar aquecimento eletroquímico indesejado devido a mudanças do pH.

Com AC, cada eletrodo é alternadamente o cátodo e o ânodo. Se a forma de onda é simetricamente bifásica, a percepção do estímulo é igual em ambos os eletrodos. No caso de formas de onda não-balanceadas, a quantidade de carga liberada é desigual para as fases negativa e positiva do sinal. Como resultado, com eletrodos idênticos, a estimulação pode ser sentida mais fortemente em um dos eletrodos.

Amplitude

A amplitude de um estímulo em forma de onda é uma das diversas medidas da magnitude do estímulo de corrente (ou voltagem) com referência à linha de base zero.

A amplitude de pico é a corrente máxima (ou voltagem) durante uma fase. Para uma onda bifásica não balanceada, a amplitude de pico é diferente para cada fase e deve ser especificada separadamente.

A amplitude pico-a-pico é a soma dos valores absolutos da corrente máxima (ou voltagem) durante as duas fases de uma AC.

Duração

A duração de um estímulo é dividida em um número de períodos de tempo inter-relacionados, que juntos fazem o tempo total entre o início e o fim de um pulso de estímulo.

A duração de fase é o período de tempo do início de uma fase de um pulso ou de um ciclo de AC. Durações de fase típicas são curtas para impedir o aquecimento significativo de sistemas biológicos e são, portanto, expressas em frações de segundos (ms ou μ s).

Duração de pulso, intervalo interfase e intervalo interpulso referem-se a características de tempo de PC. Duração de pulso é o tempo total do início ao final de um pulso e inclui a duração de fase de todas as fases mais o intervalo interfase. O intervalo interfase é o período de nenhuma atividade elétrica entre duas fases sucessivas de um pulso. O intervalo interpulso é o período de nenhuma atividade entre dois pulsos sucessivos. O intervalo interfase não pode exceder o intervalo interpulso. (figura 2)

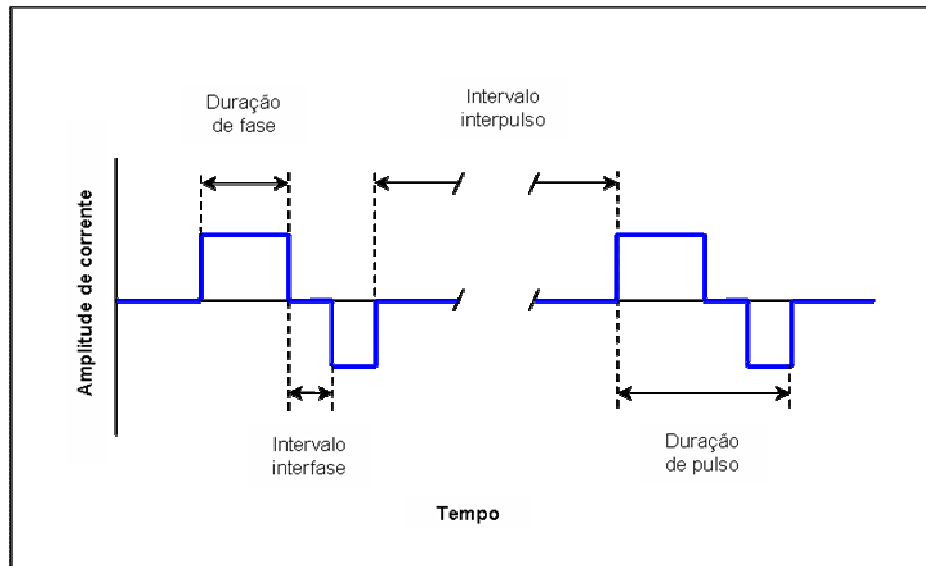


Figura 2. Características tempo-dependente de PC.

Frequência de repetição

AC ou PC na qual a forma de onda se repete a intervalos regulares são descritas como tendo uma frequência de repetição, taxa de repetição de pulso ou frequência de pulso. A frequência de repetição é o número de vezes por segundo que a forma de onda se repete. A unidade de medida para PC é pulsos por segundo (pps) e é hertz (Hz) ou ciclos por segundo (cps) para AC. O recíproco de frequência de repetição é o período. O **período** é definido como o tempo a partir de um ponto de referência arbitrário de um pulso (ou ciclo) ao ponto idêntico do pulso seguinte (ou ciclo). Com referência à figura 2, o período de uma PC é igual à duração de pulso mais o intervalo interpulso. Para AC, a duração de um ciclo é igual ao período.

A frequência de repetição é capaz de influenciar a impedância do sistema biológico. Em geral, verifica-se que quanto maior a frequência, menor é a impedância ao fluxo de corrente.

Eletrodos

Eletrodos são os elementos condutivos de um circuito elétrico que são utilizados com o propósito de transferir carga elétrica para o sistema. No caso, os eletrodos são os meios pelo qual o fluxo de elétron do circuito eletroestimulador é convertido em corrente iônica no meio de cultura. Um mínimo de dois eletrodos é requerido para direcionar a corrente estimuladora no sistema e completar o circuito elétrico. O eletrodo negativo ou cátodo (-) atrai íons positivos (cátions), enquanto o eletrodo positivo ou ânodo (+) atrai íons negativos (ânions).

Uma variedade de materiais é utilizada para a construção de eletrodos. A segurança do material deve ser considerada. A maioria dos eletrodos metálicos forma sais metálicos solúveis que são tóxicos. Entre os materiais metálicos que provocam a menor resposta tecidual está o ouro e o aço inoxidável.

O tamanho e o formato de um eletrodo afetam a distribuição de carga no sistema estimulado. A densidade de corrente é muito maior no perímetro do eletrodo do que no seu centro. A corrente tende a se espalhar a partir do perímetro do eletrodo. Portanto, a configuração geométrica do eletrodo determina a intensidade e a uniformidade da densidade de corrente. Em geral, quanto maior a densidade de corrente, maior é o efeito sobre o sistema que está no caminho da corrente. Os determinantes da densidade de corrente são o fluxo total de corrente no circuito de saída do estimulador e o tamanho da área de sua aplicação.

A área de um eletrodo afeta a densidade de corrente de duas formas relevantes. Aumentando a área de superfície de um eletrodo diminui-se a impedância eletrodo-biosistema. Assim, para qualquer nível dado de corrente, a voltagem de polarização no eletrodo será menor para um eletrodo de maior área de superfície. Além disso, eletrodos maiores exibirão médias de densidades de corrente mais baixas do que eletrodos menores, pois, para uma dada corrente, a corrente será dispersada por uma maior área.

Equipamentos estimuladores

Sob o ponto de vista elétrico, existem dois tipos de equipamentos estimuladores, onde o controle do estímulo pode ser com saída de voltagem ou saída de corrente. Isto significa que a voltagem ou corrente de saída é diretamente proporcional ao sinal de entrada e não é afetada por mudanças na impedância do circuito eletrodo-sistema ao qual está conectada. Ou seja, para equipamentos com saída de voltagem, se a impedância é alterada, a corrente

também mudará, mas a voltagem permanecerá constante. Do mesmo modo, para equipamentos com saída de corrente, qualquer mudança da impedância durante a aplicação de estimulação mudará a saída de voltagem, mas não afetará a corrente.

Se a impedância eletrodo-sistema fosse puramente resistiva, não haveria diferença entre a forma de onda da voltagem e da corrente. Entretanto, tanto a interface eletrólito-eletródo e o sistema biológico têm componentes capacitivos e resistivos. O resultado desta impedância complexa é que para qualquer estímulo em forma de onda, exceto a onda seno, o formato de onda da corrente e da voltagem não será o mesmo.

Assim, para um equipamento com circuito de saída de voltagem, a forma de onda de voltagem de saída é idêntica ao formato de onda da fonte. Para um equipamento com saída de corrente, a forma de onda de corrente de saída é idêntica ao formato de onda da fonte (figura 3).

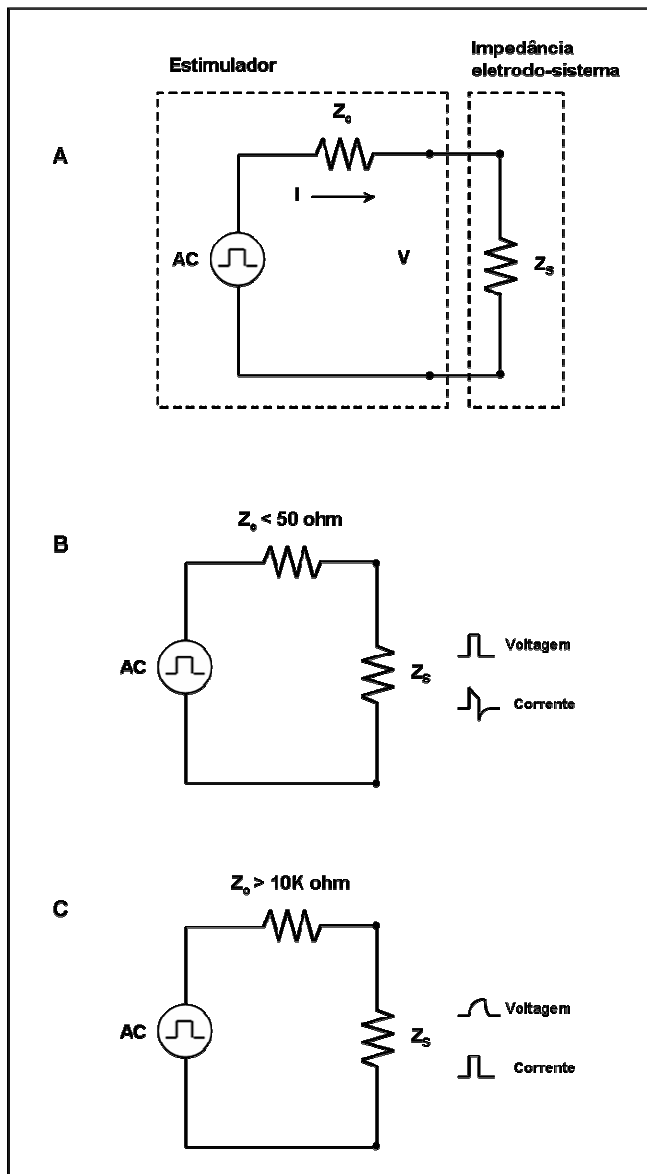


Figura 3. (A) Representação de um circuito de um estimulador conectado à carga eletrodo-sistema de impedância Z_s . (B) Formato de onda de voltagem e corrente para um circuito com saída de voltagem. (C) Formato de onda de voltagem e corrente para um circuito com saída de corrente.

Estimuladores de ambos os tipos são amplamente utilizados tendo suas vantagens e desvantagens. Como o limite de sensibilidade e segurança na aplicação de pulsos elétricos é definido por corrente, em nosso modelo de estudo utilizamos um eletroestimulador com saída de corrente.

Provavelmente o maior problema no *design* de um eletroestimulador é a caracterização da impedância, que a princípio tem um componente resistivo e capacitivo. O valor de cada componente é definido pela geometria e material dos eletrodos e pelas propriedades químicas e elétricas da amostra tratada. (PUC *et al.*, 2004). *In vitro*, entre os parâmetros que influenciam a carga de impedância estão os eletrodos (material e geometria), o meio de cultura (composição e volume) e a própria cultura (tipo celular e densidade).

ANEXO II

Meios e Soluções

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM	10g
NaHCO ₃	2,2g
HEPES	2g
Água tridestilada	qsp 1L

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Opti-MEM I

Opti-MEM I	13,6g
NaHCO ₃	2,4g
Água tridestilada	qsp 1L

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

	1X	5X	10X
NaCl	8g	40g	80g
KCl	0,2g	1g	2g
Na ₂ HPO ₄	1,2g	6g	12g
KH ₂ PO ₄	0,2g	1g	2g
Água tridestilada	qsp 1L	qsp 1L	qsp 1L

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Balanced Saline Solution (BSS)

NaCl	8g
KCl	0,4g
CaCl ₂	0,012g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,154g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	0,39g
Glicose	1,1g

Phenol red 0,0025g

Água tridestilada qsp 1L

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Balanced Saline Solution Calcium e Magnesium Free (BSS.CMF)

NaCl 8g

KCl 0,4g

Na₂HPO₄.12H₂O 0,39g

Na₂SO₄ 0,1g

Glicose 1,1g

Phenol red 0,0025g

Água tridestilada qsp 1L

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Tris Base Solution (TBS)

Tris base 20mM

Na Cl 155mM

EGTA 2mM

MgCl₂ 2mM

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e filtrar em filtro de celulose. Manter a 4°C.

Solução de Tripsina

Tripsina 0,125g

EDTA 0,02g

BSS.CMF qsp 100mL

Ajustar pH para 7,8 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Manter a 4°C.

Paraformaldeído (PFA) 4%

Aquecer 20mL de água destilada até 65°C, adicionar 2g de PFA à água aquecida, sob agitação. Adicionar 1mL de NaOH 0,5M. A solução se torna transparente. Deixar o PFA dissolver completamente sob agitação. Resfriar à TA e filtrar se ainda existirem partículas.

Adicionar 5mL de PBS 10X, ajustar pH para 7,2 se necessário e completar com água destilada até 50mL. Manter a 4°C.

Penicilina/Estreptomicina (PS) 1000X

Penicilina G potássica ou sódica	1 000 000 U
Sulfato de estreptomicina	1g
BSS.CMF	qsp 100mL

Ajustar pH para 7,4 com NaOH 1M ou HCl 1M. Avolumar e esterilizar por filtração em sistema Millipore com poro de membrana de 0,22µm. Armazenar a 4°C e estocar a -20°C.

Anfotericina (A) 1000X

Ressuspender 50mg em 5mL de CMF em condições estéreis. Armazenar a 4°C e estocar a -20°C.

Trypan Blue Solution

Azul de tripan	400mg
PBS	qsp 100mL

Ajustar pH para 7,2 com NaOH 1M ou HCl 1M.

ANEXO III

Anticorpos e marcadores utilizados

Anticorpos Primários		
Anticorpo	Fabricante/código	Diluição utilizada
Anti-Nkx2-5 (policlonal, rabbit)	Santa Cruz (sc4033)	1:200
Anti- α -actinina sarcomérica (monoclonal, mouse)	Sigma (A7811)	1:800
Anti-troponina I (policlonal, rabbit)	Santa Cruz (sc15368)	1:400
Anti-conexina 43 (monoclonal, mouse)	Zymed (13-8300)	1:100
Anti- β 1-integrina (monoclonal, mouse)	BD Transduction (610467)	1:3000
Anti-paxilina (monoclonal, mouse)	BD Transduction (610051)	1:3000
Anti-FAK fosfo-específica (monoclonal, mouse)	BD Transduction (611722)	1:500
Anti-vinculina (monoclonal, mouse)	Sigma (V4505)	1:3000
Anti- α -actinina (antiserum, rabbit)	Sigma (A2543)	1:3000
Anticorpos Secundários		
Anticorpo	Fabricante/código	Diluição utilizada
Alexa fluor 555 goat anti rabbit IgG	Invitrogen (A21430)	1:400
Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG	Invitrogen (A11070)	1:400
Alexa fluor 555 goat anti mouse IgG	Invitrogen (A21425)	1:400
Alexa fluor 488 goat anti mouse IgG	Invitrogen (A11017)	1:400
Alexa fluor 555 donkey anti goat IgG	Invitrogen (A21432)	1:400
Alexa fluor 488 donkey anti goat IgG	Invitrogen (A11055)	1:400
Peroxidase goat anti mouse IgG	Amersham	1:7500
Peroxidase goat anti rabbit IgG	Amersham	1:7500
Outros marcadores		
DAPI dilactate	Invitrogen (D3571)	1:18000
Faloidina		1:400

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](#)