

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-graduação em Neurociências

**EFEITO DOS FATORES FGF-2, EGF E  $\beta$ -CATENINA NO  
POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA**

TALITA DA SILVA JEREMIAS

Florianópolis  
2009

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**TALITA DA SILVA JEREMIAS**

**EFEITO DOS FATORES FGF-2, EGF E  $\beta$ -CATENINA NO  
POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Neurociências da  
Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial para obtenção do  
Grau de Mestre

**Orientador: PROF.DR. MARCIO ALVAREZ SILVA**

Florianópolis  
2009

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Dalmir e Antonia;  
Aos meus irmãos,  
Samira e Fernando;  
Ao meu noivo,  
Rafael.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Márcio, meu orientador, agradeço por todo apoio, todo ensinamento e paciência em todos estes anos de laboratório, os quais foram essenciais para meu crescimento científico e pessoal. Obrigada pela confiança e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus “co-orientadores”, Andréa, Cláudia e Ricardo, por agüentarem minhas inúmeras e incansáveis dúvidas. Pelo incentivo, conhecimento, paciência e idéias. Parte deste trabalho devo a vocês.

Ao povo do lab, que além de ótimos pesquisadores, são amigos maravilhosos. Obrigada a todos pelas risadas, ajudas, conhecimento e pelos momentos de descontração regados a muito café. Em ordem alfabética e sem esquecer de ninguém (espero): Aloísio, Beatriz, Bianca, Bi-K, Bruna, Bruno, Denise, Ezequiel, Fernanda, Gustavo, Larissa, Lucas, Maria Cecília, Mari, New, Ricardo, Rossana, Sarah, Suelen, Zucco. Trabalhar com vocês é muito bom.

À galerinha da placenta por dar continuidade a este trabalho. Vou sentir falta de esperar a lua cheia para ter parto! Podem contar comigo sempre.

À Cláudia, que apesar de ter nos abandonados, ainda é a minha mãezona. Tenho muito orgulho de ti, e sei que você vai longe. Sinto falta das conversas no corredor, dos conselhos, das reclamações, das cervejinhas, do churrasco do Lúcio. Volta!

Aos meus amigos espalhados pelo Brasil e pelo mundo. À Meline em Paris, à Pamela no Pantanal, à Luciana e à Talita, em Tuba city. Quero vocês perto de mim!

À toda minha família, todos os tios e primos, que sempre lembravam de mim quando passava alguma reportagem de célula tronco no Jornal Nacional.

À minha família Alemã, Rúbia, Nora e Rubens Kamke, por todo carinho e amizade. Um abraço da Schwarzer Kamke.

Aos meus cunhados, Renata e Daniel, pela ótima companhia, pelas risadas na praia, e claro, por fazerem meus brothers felizes.

Aos meus irmãos, Lhalha e Dede, simplesmente por serem meus irmãos. Vocês são maravilhosos. Claro que umas brigas sempre são bem vinda, afinal irmão muito amiguinho não tem graça. Sinto falta da alegria de vocês e principalmente, das confusões. Seus Confusentos!

Ao meu grande amor, Rafael, simplesmente por tudo. Continuo usando esta simples frase, pois não consigo expressar em palavras o quão importante você é na minha vida. Te amo muito.

Aos meus pais, que são tudo na minha vida, muito obrigada. Vocês me ensinaram a ter determinação, caráter e sabedoria. Agradeço do fundo do meu coração, todo amor, carinho e conselhos que vocês me deram. Vocês deixaram de construir os seus sonhos para construir o meu. Amo muito vocês.

*“Menor que meu sonho não posso ser”*

## RESUMO

As células tronco (CTs) são geralmente definidas como células indiferenciadas, com capacidade de se auto-renovar e que em condições apropriadas podem gerar diversos tipos celulares diferenciados. A medula óssea contém uma população de CTs capazes de diferenciar-se em diversas linhagens celulares, incluindo adipócitos, condrócitos e osteócitos. Estas células foram denominadas de CTs mesenquimais, e atualmente são encontradas em vários tecidos e órgãos. No presente estudo, isolamos uma população de CTMs derivadas da placenta humana, com características morfológicas, imunofenótipos e capacidade de diferenciação semelhantes as CTMs isoladas da medula óssea. As células tronco obtidas da placenta humana (CTDPs) expressam marcadores de células indiferenciadas e, mais especificamente, de CTMs. Além disso, apresentam um estado multidiferenciado, demonstrado pela expressão de marcadores de células diferenciadas, como  $\beta$ -tubulina III, NF-M, Map-2 e  $\alpha$ SMA. O potencial de diferenciação e proliferação das CTDPs foi analisado através do tratamento com os fatores de crescimento, FGF-2 e EGF. Nossos resultados demonstram que tais fatores diminuem a quantidade de células  $\alpha$ SMA, sugerindo que estes mantêm as CTDPs em um estado mais indiferenciado. Esta diminuição é resultado de uma baixa proliferação das células  $\alpha$ SMA positivas quando mantidas com os fatores de crescimento. Em relação à proliferação celular total, observamos um aumento durante o tratamento com FGF-2, apresentando um pico no terceiro dia, enquanto que com EGF observamos uma queda em relação ao controle no quinto dia de cultura. No tratamento com EGF observamos algumas células  $\beta$ -tubulina III positivas com morfologia diferente, sendo estas mais alongadas, assemelhando-se a células neurais. Analisamos também o efeito do pré-tratamento com os fatores de crescimento no potencial de diferenciação destas células. Para isso as CTDPs eram mantidas com FGF-2 e/ou EGF antes da incubação com o meio indutor contendo ATRA. O pré-tratamento das CTDPs com os fatores potencializa o efeito do ATRA, diminuindo ainda mais a expressão de  $\alpha$ SMA. O estudo do efeito da sinalização de Wnt em nossas culturas foi realizado através do cloreto de lítio, que mimetiza esta sinalização. Entretanto, não observamos a expressão de  $\beta$ -catenina nuclear após o tratamento com cloreto de lítio. Isto indica que no nosso modelo o íon lítio não foi eficiente em ocasionar a translocação da  $\beta$ -catenina citoplasmática para o núcleo, ou seja, não mimetizou a sinalização de Wnt. Os resultados obtidos até o momento, sugerem que o FGF-2 mantém as CTDPs em um estado indiferenciado e de alta proliferação, enquanto que o EGF além de manter as células em um estado mais indiferenciado, pode estar comprometendo as células para um fenótipo neural.



## ABSTRACT

Stem cells (SCs) are generally defined as undifferentiated cells with the ability to self-renew and that under appropriate conditions can generate various differentiated cell types. Bone marrow contains a population of SCs is able to differentiate into various cell lines, including adipocytes, chondrocytes and osteocytes. These cells are called mesenchymal stem cells, and currently are found in various tissues and organs. In this study, an isolated population of MSCs derived from human placenta, with morphological features, immunophenotype and differentiation capacity similar to MSCs isolated from bone marrow. The stem cells obtained from human placenta (CTDPs) expressed markers of undifferentiated cells and more specifically of MSCs. Also, have a state multidifferentiated, demonstrated by the expression of markers  $\alpha$ SMA,  $\beta$ -tubulin III, NF-M and Map-2. The potential for differentiation and proliferation of CTDPs was analyzed by treatment with growth factors, FGF-2 and EGF. Our results showed that the factors decreased the positive  $\alpha$ SMA cells, suggesting that they support the CTDPs in a more undifferentiated state. This decrease it was result of a low proliferation of positive  $\alpha$ SMA cells when maintained with growth factors. In relation to the total cell proliferation, we observed an increase during treatment with FGF-2, with a peak on the third day, while a decrease was observed with EGF on the fifth day of culture. In treatment with EGF it was observed some cells positive  $\beta$ -tubulin III with different morphology, being more elongated, similar to neural cells. Also analyzed the effect of pretreatment with the growth factor in the potential for differentiation of these cells. CTDPs were maintained with FGF-2 and/or EGF before incubation with the induction medium containing ATRA. Pre-treatment with the CTDPs factors potentiate the effect of ATRA, further decreasing the expression of  $\alpha$ SMA. The study of the effect of Wnt signaling in our cultures was performed by lithium chloride, that mimics this signaling. However, we did not observe the expression of nuclear  $\beta$ -catenin after treatment with lithium chloride. This indicates that in our model the lithium ion was not effective in causing the translocation of cytoplasmic  $\beta$ -catenin to the nucleus, ie, this means that it did not WNT signaling. The results obtained so far, suggested that FGF-2 maintain the CTDPs in an high proliferation and undifferentiated state, while EGF would maintain cells in a more undifferentiated, but committed to cells whith neural phenotype.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância  
ATRA: ácido trans-retinóico  
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina  
cDNA: DNA complementar  
CFU-F: Colony forming unit fibroblastic  
CT: Célula tronco  
CTDP: Célula tronco derivada de placenta  
CTE: Célula tronco embrionária  
CTH: Célula tronco hematopoiética  
CTM: Célula tronco mesenquimal  
CTS: Célula tronco somática  
Dapi: 4'-6-diamino-2-fenilindol  
DNA: ácido desoxiribonucleico  
dNTP: deoxi-nucleotídeos  
DVL: Disheveled  
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetracético  
EGF: Fator de crescimento epidermal  
EGFR: Receptor de EGF  
FGF: Fator de crescimento fibroblástico  
FITC: isotiocianato de fluoresceína  
GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase  
GFAP: Proteína fibrilar acídica glial  
GFP: Proteína fluorescente verde  
GSK-3 $\beta$ : quinase glicogênio sintase  
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's  
LiCl<sub>2</sub>: Cloreto de lítio  
MAP-2: proteína associada a microtubulo  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio  
NF-M: Neurofilamento médio  
PBS: salina tamponada por fosfato  
RNA: ácido ribonucleico  
RT: Transcriptase reversa

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa

$\alpha$ SMA: alfa actina de músculo liso

SBF: Soro bovino fetal

TxRd: Vermelho do Texas

rpm: Rotações por minuto

KDa: Kilo daltons

Ig: Imunoglobulina

mg: miligramas

ng: nanogramas

mM: milimolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Diagrama esquemático mostrando os possíveis mecanismos para a plasticidade de células tronco adultas.....	<b>06</b>
<b>Figura 2:</b> Ilustração Esquemática da formação da placenta.....	<b>08</b>
<b>Figura 3:</b> Ilustração esquemática das regiões da placenta humana.....	<b>09</b>
<b>Figura 4:</b> Modelo proposto do nicho das CTMs e sua contribuição na manutenção do tecido.....	<b>13</b>
<b>Figura 5:</b> Padrão de sinalização do receptor de EGF, quando este é ativado por um ligante, no caso, o fator de crescimento epidermal .....	<b>15</b>
<b>Figura 6:</b> Cascata de sinalização ativada pela ligação do FGF ao seu receptor tirosina-kinase .....	<b>18</b>
<b>Figura 7:</b> Padrão de sinalização de Wnt .....	<b>21</b>
<b>Tabela 1:</b> Anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas .....	<b>28</b>
<b>Tabela 2:</b> Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-PCR .....	<b>29</b>
<b>Figura 8:</b> Expressão dos marcadores de células indiferenciadas e de CTMs em culturas de células derivadas da placenta humana .....	<b>34</b>
<b>Figura 9:</b> Expressão de marcadores de fenótipos diferenciados nas CTDPs .....	<b>35</b>
<b>Figura 10:</b> Co-expressão de SMA e $\beta$ -tubulina III nas CTDPs .....	<b>35</b>
<b>Figura 11:</b> Morfologia das CTDPs após tratamento com FGF-2 e EGF .....	<b>36</b>
<b>Figura 12:</b> Avaliação da proliferação das CTDPs tratadas com FGF-2 e EGF ..	<b>38</b>
<b>Figura 13:</b> Análise quantitativa da proliferação das CTDPs após o tratamento com FGF-2 e EGF .....	<b>39</b>
<b>Figura 14:</b> Sub-população de células menores e arredondadas em culturas tratadas com FGF-2 e EGF .....	<b>42</b>
<b>Figura 15:</b> Mudanças morfológicas de células $\beta$ -tubulina III positivas durante o tratamento com EGF .....	<b>42</b>
<b>Figura 16:</b> Expressão de $\alpha$ SMA nas CTDPs tratadas com FGF-2 e EGF .....	<b>43</b>

<b>Figura 17:</b> Análise quantitativa da expressão de $\alpha$ SMA nas CTDPs após o tratamento com FGF-2 e EGF.....	<b>44</b>
<b>Figura 18:</b> Análise da expressão de $\alpha$ SMA nas CTDPs após o tratamento com FGF-2 e EGF juntos .....	<b>45</b>
<b>Figura 19:</b> Análise quantitativa da proliferação das células $\alpha$ SMA positivas após tratamento com EGF e FGF-2 .....	<b>46</b>
<b>Figura 20:</b> Análise quantitativa do efeito do pré-tratamento com FGF-2 e EGF nas células $\alpha$ SMA positivas .....	<b>48</b>
<b>Figura 21:</b> Efeito do FGF-2 no potencial de diferenciação das CTDPs, no decorrer da cultura .....	<b>50</b>
<b>Figura 22:</b> Análise quantitativa da expressão e proliferação das células $\alpha$ SMA positivas no decorrer do tratamento com FGF-2 .....	<b>51</b>
<b>Figura 23:</b> Localização citoplasmática da $\beta$ -catenina nas CTDPs tratadas com Cloreto de Lítio .....	<b>52</b>
<b>Figura 24:</b> Translocação da $\beta$ -catenina para o núcleo nas CTDPs após tratamento com os FGF-2 e EGF (em experimento isolado).....	<b>53</b>
<b>Figura 25:</b> Células tronco derivadas da placenta GFP positivas .....	<b>54</b>
<b>Figura 26:</b> Modelo esquemático do efeito do FGF-2 e EGF nas CTDPs.....	<b>63</b>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>01</b>
1.1 CÉLULAS TRONCO .....	01
1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL .....	02
<b>1.2.1 Características <i>in vitro</i> das CTMs</b> .....	<b>04</b>
1.3 PLACENTA HUMANA E CTMs .....	07
1.4 NICHOS DAS CTMS .....	12
1.5 FATORES DE CRESCIMENTO E CTMS .....	14
<b>1.5.1 Fator de crescimento Epidermal</b> .....	<b>15</b>
<b>1.5.2 Fator de Crescimento Fibroblástico</b> .....	<b>17</b>
1.6 PROTEÍNA Wnt E A ATIVAÇÃO DA BETA-CATENINA .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 REAGENTES .....	23
3.2 EQUIPAMENTOS .....	24
3.3 MÉTODOS .....	24
<b>3.3.1 Obtenção da Placenta Humana</b> .....	<b>24</b>
<b>3.3.2 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana</b> .....	<b>25</b>
<b>3.3.3 Tratamento com fatores de crescimento: EGF e FGF-2</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.4 Tratamento com ácido trans-retinoico (ATRA)</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.5 Tratamento com cloreto de lítio</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3.6 Avaliação da proliferação celular por incorporação com BrdU</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3.7 Análise imunocitoquímica</b> .....	<b>27</b>
<b>3.3.8 Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR)</b> .....	<b>28</b>

<b>3.3.9 Transfecção do plasmídeo GFP</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.9.1 Transfecção e Amplificação do Plasmídeo pCX-EGFP em <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>30</b>
<b>3.3.9.2 Extração do plasmídeo GFP</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.9.3 Transfecção do plasmídeo GFP em CTMs</b> .....	<b>31</b>
<b>3.3.10 Análise Estatística</b> .....	<b>32</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE PLACENTA (CTDP) .....	<b>33</b>
4.2 EFEITOS DO FGF-2 E EGF NAS CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE PLACENTA .....	<b>36</b>
<b>4.2.1 Análise da morfologia das CTDPs após tratamento com FGF-2 e EGF</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2.2 Avaliação do efeito de FGF-2 e EGF na proliferação das CTDPs</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2.3 Efeito do FGF-2 e EGF no potencial de diferenciação das CTDPs</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.4 Efeito do FGF-2 e EGF na proliferação das células de músculo liso (<math>\alpha</math>SMA positivas)</b> .....	<b>46</b>
<b>4.2.5 Análise do efeito do pré-tratamento com FGF-2 e EGF no potencial de diferenciação das CTDPs</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2.6 Efeito ao longo do tratamento do FGF-2 no potencial de diferenciação das CTDPs</b> .....	<b>48</b>
4.3 EFEITOS DA SINALIZAÇÃO DE WNT, MIMETIZADA PELO CLORETO DE LÍTIO, NAS CTs DERIVADAS DA PLACENTA .....	<b>52</b>
<b>4.3.1 Avaliação da ação do Cloreto de lítio na ativação da <math>\beta</math>-catenina nas CTDPs</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.2 Efeito da ativação da <math>\beta</math>-catenina na diferenciação as CTMs</b> ....	<b>53</b>
4.4 OBTENÇÃO DE CTs DERIVADAS DA PLACENTA “GFP” POSITIVAS .....	<b>54</b>

<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
5.1 EFEITO DO FGF-2 E EGF NAS CTDPs .....	57
5.2 EFEITOS DA SINALIZAÇÃO DE WNT, MIMETIZADA PELO CLORETO DE LÍTIO, NAS CTs DERIVADAS DA PLACENTA.....	64
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>67</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.2 CÉLULAS TRONCO

As células tronco (CTs) são geralmente definidas como células clonogênicas indiferenciadas, com capacidade de se auto-renovar e de originar um ou mais tipos de linhagens celulares diferenciadas (THOMSON *et al.*, 1998). A auto-renovação pode acontecer por divisão simétrica, onde há geração apenas de novas CTs, ou assimétrica, na qual são originadas além das CTs, células progenitoras que são parcialmente comprometidas fenotipicamente (SANDERS *et al.*, 2006). Em relação ao seu potencial de diferenciação, estas células têm sido classificadas como (1) totipotentes, sendo capazes de originar todos os tecidos embrionários e extra-embrionários; (2) pluripotentes, capazes de produzir todos os tipos celulares do embrião; (3) multipotentes, que contribuem para a produção de algumas linhagens celulares; e (4) unipotentes, que originam apenas um tipo celular maduro (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Molecularmente esta potencialidade das CTs tem sido associada com a expressão de inúmeros fatores de transcrição, destacando-se o OCT-4 e Nanog. A expressão destes fatores pode ativar ou inibir a expressão de vários genes, mantendo assim a célula em um estado indiferenciado e de auto-renovação (PAN *et al.*, 2002).

As CTs vêm sendo isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários, fetais e adultos (THOMSON *et al.*, 1998). As células tronco embrionárias (CTEs) pluripotentes, são derivadas da massa celular interna do blastocisto, e quando mantidas em culturas originam diferentes tipos de colônias de células, das quais várias possuem o fenótipo indiferenciado. Caso estas células indiferenciadas sejam cultivadas em uma camada celular alimentadora (fibroblastos, por exemplo), elas podem ser expandidas, formando assim uma linhagem de

CTEs imortais (DONOVAN; GEARHART, 2001). As células derivadas de tecidos adultos e fetais, chamadas de células tronco somáticas (CTS), foram descritas inicialmente como células tecido-específicas, sendo capazes de originar somente células progenitoras correspondentes a seu tecido de origem. Entretanto, nas últimas décadas inúmeros estudos têm demonstrado que as CTS possuem uma plasticidade maior do que aquela previamente descrita, tendo habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (multipotentes), porém com uma plasticidade menor do que as CTs embrionárias (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Os estudos e aplicações clínicas com as células embrionárias têm se mostrado desafiadores em razão de várias controvérsias éticas e políticas em torno de sua utilização, além de seu alto potencial carcinogênico. Conseqüentemente, as CTs obtidas de tecidos adultos vêm sendo amplamente estudadas (RABIE *et al.*, 2007).

## 1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

O conceito atual de células tronco mesenquimais, descrito pela primeira vez por Caplan (1991), surgiu a partir de experimentos clássicos realizados na década de 60, os quais demonstraram que transplantes de medula óssea para regiões anatomicamente heterotópicas resultavam em osso ectópico. O trabalho de Tavassoli e Crosby (1968) claramente estabeleceu provas de um potencial osteogênico inerente associado com a medula óssea, entretanto não puderam delinear a identidade dos progenitores destas células diferenciadas para osso (BIANCO, 2008).

Foram Friedenstein e colaboradores (1968), que demonstraram que o potencial osteogênico, revelado pelo transplante heterotópico de medula óssea, estava associado com uma subpopulação de células da medula. Estas células eram distinguidas da maioria das

células hematopoiéticas pela sua rápida aderência e pela aparência fibroblastóide de sua progênie em cultura, apontando para sua origem no compartimento estromal da medula óssea (DONALD, 2007; BIANCO, 2008). Além disso, eles demonstraram que estas células quando em suspensão em uma densidade clonal, resultavam na formação de colônias iniciadas por uma única célula, chamada de “colony-forming unit fibroblastic” (CFU-Fs). Transplantes *in vivo* mostraram que múltiplos tecidos esqueléticos, como osso, cartilagem, tecido adiposo e tecido fibroso, podem ser experimentalmente gerados pela progênie de uma única célula do estroma medular (BIANCO, 2008). Na década de 80, Friedenstein e Owen chamaram estas células de CT osteogênica ou CT estromal da medula óssea (FRIEDENSTEIN; OWEN, 1988).

Em resumo, estes trabalhos pioneiros de Travassoli, Friedenstein e Owen revelaram que um segundo tipo de células tronco, sendo a primeira a ser identificada a CT hematopoiética, pode estar presente na medula óssea, mais especificamente no estroma que suporta a hematopoiese.

Entretanto, o conceito de CTs não-hematopoiéticas na medula não foi bem aceito, apesar de a hipótese ser firmemente estabelecida e evidências experimentais serem publicadas e reproduzidas. Já o termo célula tronco mesenquimal (CTM), proposto previamente como uma alternativa para CTs estromais ou CTs osteogênicas, ganhou grande popularidade. O nome foi baseado na hipótese que vários tecidos de origem mesenquimal, além da linhagem esquelética, pode ser gerada através de CTMs pós-natais, incluindo músculo esquelético, miocárdio, músculo liso, tendão (CHAMBERLAIN, 2007; BIANCO, 2008). Atualmente, o conceito de CTMs, une a maioria dos conceitos previamente descritos ao longo dos anos, sendo então definida como uma população de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação em células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas (DOMINICI, 2006).

### 1.2.1 Características *in vitro* das CTMs

Em adição a medula óssea, as CTMs têm sido isoladas do músculo esquelético (WILLIAMS *et al.*, 1999), tecido adiposo (ZUK, 2001), cordão umbilical (ERICES, 2000), placenta, sistema circulatório (Kuznetsov, 2001), polpa dental (COURA *et al.*, 2008), fluido amniótico (ANKER, 2003), assim como, sangue fetal, fígado, medula óssea, e pulmão (NOORT, 2002). Na verdade, sugere-se que células com características de CTMs residem em todos órgãos e tecidos pós-natais (JAVAZON, 2004; MEIRELLES, 2006). Estas células são geralmente selecionadas em cultura pela sua característica de adesão ao plástico, sua morfologia fibroblastóide e por sua capacidade de proliferação, sendo que após uma fase inicial as células se dividem rapidamente atingindo confluência.

O aumento das CTMs, originando assim uma cultura homogênea pode ser obtida através da expansão e passagens (repiques) em meio pobre em nutrientes para evitar contaminações com outros tipos celulares (CAMPAGNOLI, 2001). Contudo, estudos clonais demonstraram que populações aderentes ao plástico isoladas da medula óssea são funcionalmente heterogêneas contendo, além de progenitores indiferenciados, precursores restritos à determinadas linhagens (MURAGLIA, 2000). Esta heterogeneidade, juntamente com os diferentes métodos de obtenção das CTMs e avaliação da sua capacidade de diferenciação torna difícil a caracterização das CTMs em relação a sua fenotipagem e potencialidade.

Fenotipicamente as CTMs expressam inúmeros marcadores, dos quais nenhum é específico. Geralmente é descrito que as CTMs adultas não expressam marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14, ou CD11. Também não expressam moléculas coestimulatórias, CD80, CD40 ou moléculas de adesão como CD31 (PECAM - Molécula de adesão de célula endotelial plaquetária), CD18 (LFA1 - antígeno 1 associado com função

leucocitária) ou CD56 (molécula de adesão de célula neuronal). Mas, podem expressar CD105, CD44, CD90 (Thy-1), e Stro-1 assim como moléculas de adesão, CD106 (VCAM - molécula de adesão de célula vascular), CD29 e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) (CHAMBERLAIN, 2007).

Geralmente é aceito que todas as CTMs são desprovidas do marcador hematopoiético CD45 e do marcador de célula endotelial CD31. Porém, é importante ressaltar que diferenças na expressão de vários marcadores pode ser influenciada pelos fatores secretados por células presentes nas passagens iniciais. Além disso, a expressão de vários marcadores *in vitro*, podem nem sempre estar correlacionado com seu padrão de expressão *in vivo* (GRONTHOS, 2001). Enfim, as CTMs podem exibir variações no seu padrão de expressão gênica entre diferentes fontes de obtenção, método de isolamento e cultura (confluência, número de passagens) e espécies (GREGORY, 2005).

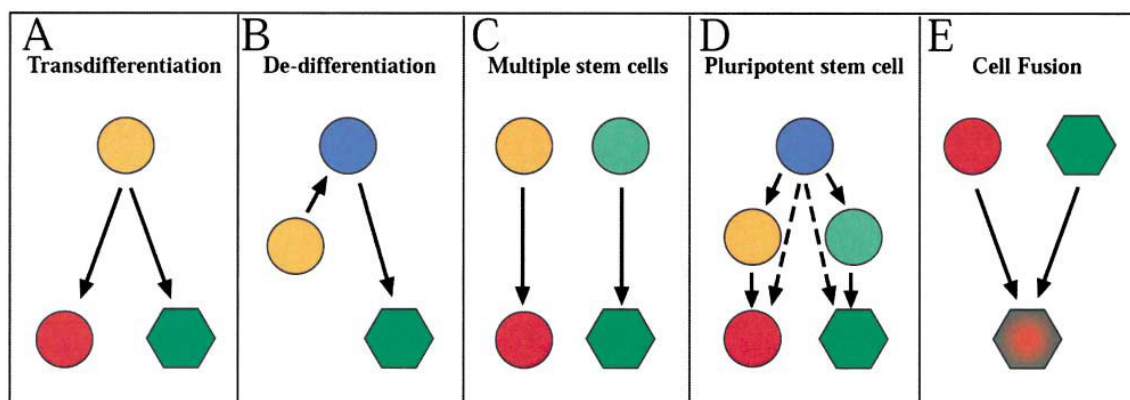
Em adição à identificação das CTMs baseadas nas suas características morfológicas e fenotípicas, outro método para identificá-las já mencionado anteriormente, é através de sua capacidade de diferenciação em osso, cartilagem, e gordura *in vitro*. Os métodos para obter tais diferenciações já são bem descritos, sendo que os meios indutivos possuem fatores como, dexametasona, indometacina, insulina, ácido ascórbico, glicerolfosfato (PITTENGER 1999; CONGET, 1999; HANADA K, 1997) e TGF- $\beta$  (MACKAY, 1998).

Os mecanismos que regulam esta diferenciação ainda não são bem conhecidos (JIN *et al.*, 2003), mas existem possíveis explicações que descrevem como esta plasticidade é obtida (Figura 1). Estas explicações são baseadas em mecanismos como a transdiferenciação, desdiferenciação e fusão celular. Na transdiferenciação a conversão de linhagem ocorre diretamente pela ativação de uma outra forma de programa de diferenciação dormente, ou seja, a célula muda seu estado padrão de expressão gênica para outro tipo celular (Figura 1A) (FILIP *et al.*, 2005; WAGERS *et al.*, 2004). A conversão de linhagem pode ocorrer também

via desdiferenciação de uma célula tecido-específica para uma mais primitiva (pluripotente), e subsequentemente há a re-diferenciação em um novo padrão de linhagem (Figura 1B) (TANAKA, 2003).

Outro mecanismo é a fusão celular, no qual duas células fenotipicamente diferentes se fundem, mudando assim sua expressão gênica. Trabalhos demonstram que CTs quando co-cultivadas com outros tipos celulares, por exemplo astrócitos, podem se fundir a eles e adquirir uma característica neural. Em transplantes de CTs em camundongos também é relatado a fusão celular, sendo que as CTs tronco adquiriram um fenótipo diferenciado em razão da expressão gênica da outra célula já diferenciada (WAGERS *et al.*,2004).

Outras explicações para a plasticidade das CTs adultas estão relacionadas com a pureza ou homogeneidade da população, ou seja, vários tipos de CTs comprometidas com linhagens celulares distintas podem contribuir para o resultado observado (Figura 1C) (WAGERS *et al.*,2004). Ou, através da ação de uma única e rara célula tronco pluripotente, que origina progenitores de linhagens celulares distintas (Figura 1D) (WAGERS *et al.*,2004).



**Figura 1. Diagrama esquemático mostrando os possíveis mecanismos para a plasticidade de células tronco adultas.** Células tronco tecido-específicas estão representadas por círculos laranjas ou verdes, células tronco pluripotentes por círculos azuis e células diferenciadas por círculos vermelhos e hexágono verde.

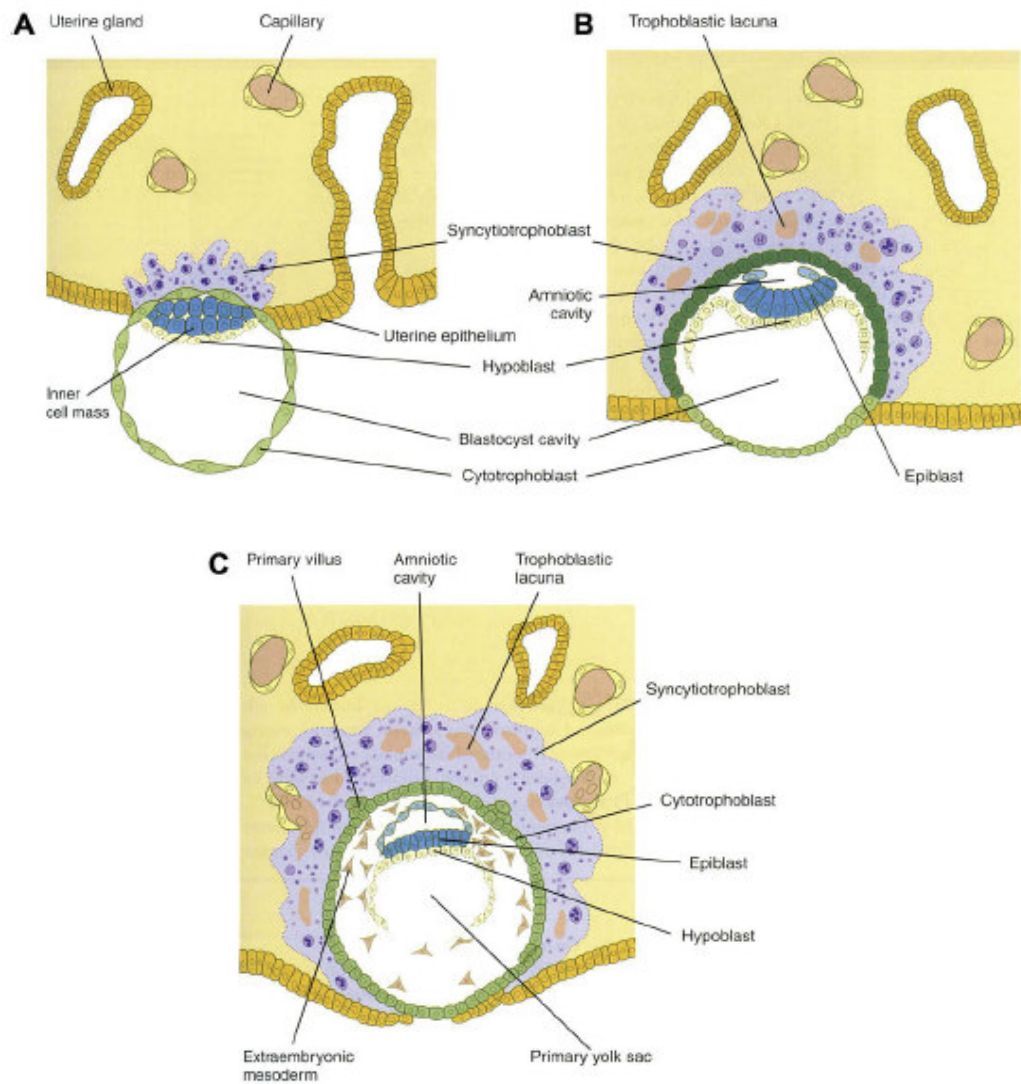
Fonte: (WAGERS *et al.*,2004).

Nos últimos anos vários grupos têm se dedicado a investigar a diferenciação das CTMs em linhagens celulares diferentes das de origem mesodérmica. Sabe-se atualmente, que as CTMs possuem potencialidade também para a diferenciação em tecidos endodérmicos e ectodérmicos (KHUU, 2007; LEE, 2004; CROFT, 2000; DENG, 2006). Campard e colaboradores (2008), demonstraram a diferenciação de CTMs obtidas de cordão umbilical em células semelhantes a hepatócitos, sugerindo grande potencial na regeneração hepática. A diferenciação para o fenótipo neural das CTMs tem gerado grande interesse principalmente para o tratamento de doenças degenerativas e auto-imunes do sistema nervoso (BRAZELTON, 2000). Inúmeros trabalhos têm relatado a diferenciação neural destas células através de sua morfologia (neuronal e glial), expressão de marcadores neurais, como nestina (precursor neural),  $\beta$ -tubulina III (neurônio) e GFAP (glia), funcionalidade (excitabilidade) e transplante no sistema nervoso (JIN, 2003; JORI, 2005; KRAMPERA, 2007). Contudo, alguns métodos usados para promover tais diferenciações e principalmente a “qualidade” destas células diferenciadas são relatados como fragmentados e inconsistentes (DONALD, 2007).

### 1.3 PLACENTA HUMANA E CTMs

Em humanos, 6-7 dias após a fertilização ocorre a implantação do blastocisto e o desenvolvimento da placenta é iniciado. Neste estágio o blastocisto é formado pela massa celular interna e pelas células trofoblásticas que circundam a cavidade blastocística (Figura 2 A). O embrião, o cordão umbilical e o epitélio amniótico são originados a partir de células da massa celular interna, enquanto que a placenta é derivada do trofoblasto. No 8º-9º dia as células trofoblásticas proliferam consideravelmente, formando uma bicamada trofoblástica: a camada externa torna-se o sinciciotrofoblasto, e a interna o citotrofoblasto (Figura 2.A e B).

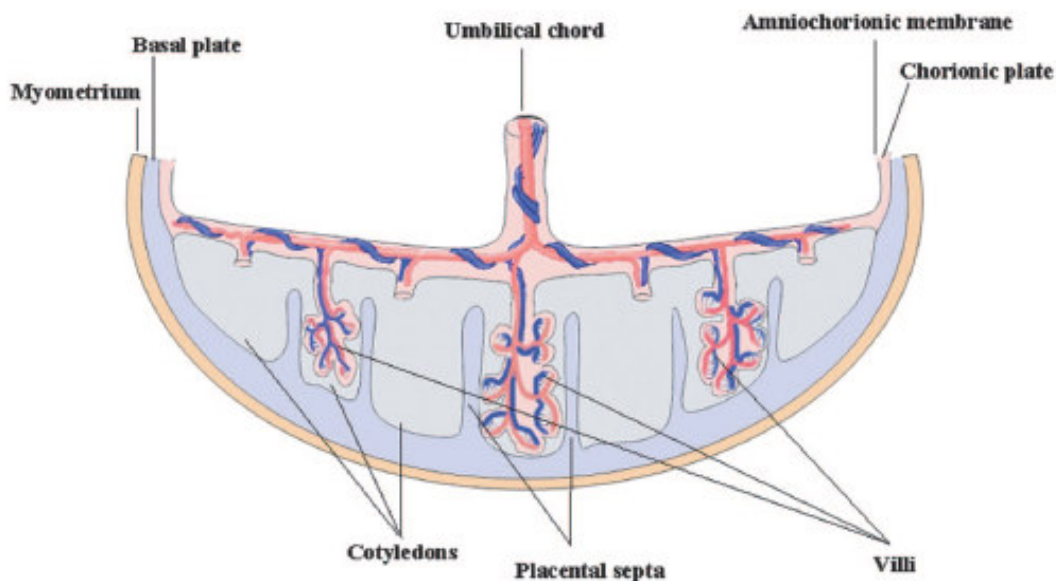
A partir da proliferação destas duas camadas celulares, juntamente com a proliferação do mesênquima extra-embriônico, são geradas as vilosidades da placenta e ao final do quarto mês de gestação a estrutura completa da placenta está formada (Figura 2.C) (JUNQUEIRA & CARNEIRO; ILANCHERAN, 2009).



**Figura 2. Ilustração Esquemática da formação da placenta.**Fonte: (ILANCHERAN, 2009)



Em relação a sua estrutura, a placenta é constituída de uma parte fetal (placa coriônica) e uma parte materna (decídua/placa basal), sendo então o único órgão formado por células de dois indivíduos (Figura 3). A placa coriônica, uma estrutura de multicamadas que envolve a cavidade amniótica, é formada por duas estruturas: a membrana amniótica (composta de epitélio, camada compacta, mesoderme amniótica e camada esponjosa) e o córion (composto de mesênquima e uma região extravilosa formada por células trofoblásticas). As vilosidades originadas da placa coriônica ancoram a placenta fixando-se a placa basal e ao endométrio materno, mas também podem ser encontrados livres no espaço intervilosos. Na região materna, protusões da placa basal próximas aos vilos coriônicos produzem os septos placentários, que dividem o parênquima em cotilédones irregulares. As trocas fisiológicas entre o sangue da mãe e do feto ocorrem entre os vilos coriônicos e os espaços intervilosos (placa basal) (JUNQUEIRA & CARNEIRO,1999).



**Figura 3. Ilustração esquemática das regiões da placenta humana.** Fonte: (PAROLINI,2008).

A placenta humana, além de possuir um papel essencial e fundamental no desenvolvimento e nutrição do feto, pode também representar uma reserva de CTs. Nos últimos anos, tem havido grande interesse na sua utilização como fonte de CTs para a medicina regenerativa, em razão da alta plasticidade fenotípica das células isoladas deste tecido, da disponibilidade e facilidade em ser adquirida sem procedimentos evasivos, e a sua utilização não ocasiona debates éticos (PAROLINI *et al.*, 2008). Além disso, considerando que parte da placenta é originada do trofoblasto do blastocisto, a presença de células progenitoras embrionárias neste tecido tem sido por muito tempo proposto, embora seja improvável que possuam um potencial de diferenciação e proliferação como os das CTEs (GUPTA, 1997).

Considerando a complexidade de sua estrutura, inúmeros estudos descrevem a presença de CTs em diferentes partes da placenta, usando numerosos métodos de obtenção e caracterização. Destas diferentes regiões as seguintes populações de CTs já foram isoladas: mesenquimais, hematopoiéticas, assim como, progenitores endodermis, células trofoblásticas coriônicas e CTs epiteliais amnióticas (ALVAREZ-SILVA, 2003; CURTIS, 2006; PAROLINI, 2008). No primeiro Workshop Internacional de Células Tronco Derivadas da Placenta (CTDP), realizado em 2007, foram definidos os seguintes critérios para definir as CTs obtidas da placenta (excluindo as CTHs): aderência ao plástico, formação de colônias (CFU-Fs), padrão de expressão de determinados marcadores de superfície (como por exemplo, CD90 positivo e CD 45 negativo), origem fetal e potencial de diferenciação em ao menos uma destas linhagens celulares: adipogênica, condrogênica, osteogênica e endotelial (PAROLINI, 2008).

As CTDPs são altamente proliferativas, podendo ser mantidas até 20 passagens e expressam marcadores de pluripotência, comuns em CTEs, como OCT-4, nanog, SSEA e nestina (MIAO, 2006;). Semelhante as CTMs da medula óssea, elas possuem

simultaneamente um “estado multidiferenciado” expressando genes ectodermiais, mesodermiais e endodermiais (AKIVA; DALE, 2008).

A utilidade clínica destas CTDPs envolve o transplante de células indiferenciadas ou pré-diferenciadas *in vitro*. Estudos pré-clínicos em modelos animais, e até mesmo em humanos, estão sendo desenvolvidos visando a possibilidade de cura de inúmeras doenças. Trabalhos sobre diferenciação hepática das CTMs obtidas da placenta tem se mostrado muito promissores para o tratamento de doenças no fígado (TAKASHIMA, 2004). Em doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio e isquemia, a terapia com CTDPs tem sido amplamente estudada. Experimentos de co-cultura com explantes de coração de rato confirmam que as CTDPs se integram ao tecido cardíaco e diferenciam em cardiomiócitos. Quando transplantadas no coração de ratos enfartados, estas células sobrevivem durante 2 meses se diferenciando em cardiomiócitos, além de liberarem fatores tróficos que podem afetar as células presentes no local da implantação (ZHAO, 2005).

A utilização das células da placenta para o tratamento de doenças neurológicas, principalmente as CTs epiteliais amnióticas, pode ser considerada tendo em vista seu potencial de expressar marcadores neuronais e gliais específicos, além da sua capacidade de produzir e secretar neurotransmissores. Têm sido descrito transplantes com sucesso destas células dentro do núcleo caudato, hipocampo e medula espinhal. Quando transplantadas no hipocampo estas células se diferenciam em células semelhantes a neurônios. Em ratos com lesão medular, o transplante resulta em benefícios, como a neuroproteção em fase aguda e a facilidade de regeneração, sendo que estes efeitos podem ser mediados através da secreção de fatores neurotróficos (PAROLINI, 2008).

A medicina regenerativa baseada nas CTs representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças, revolucionando a medicina. Embora as CTs adultas e as embrionárias exibirem grande plasticidade, parece improvável que uma única população de

CTs seja ideal para o tratamento em todos os casos clínicos. Portanto, continuar o esforço para identificar e caracterizar novas fontes de CTs é importante para o sucesso clínico. Nos últimos anos, os tecidos extra-embrionários foram adicionados à lista de possíveis populações de células progenitoras, podendo oferecer algumas vantagens como: o isolamento a partir de tecidos normalmente descartados ao nascimento, a facilidade de crescimento em cultura, e ainda, a menor probabilidade de virem a ser rejeitadas após o transplante.

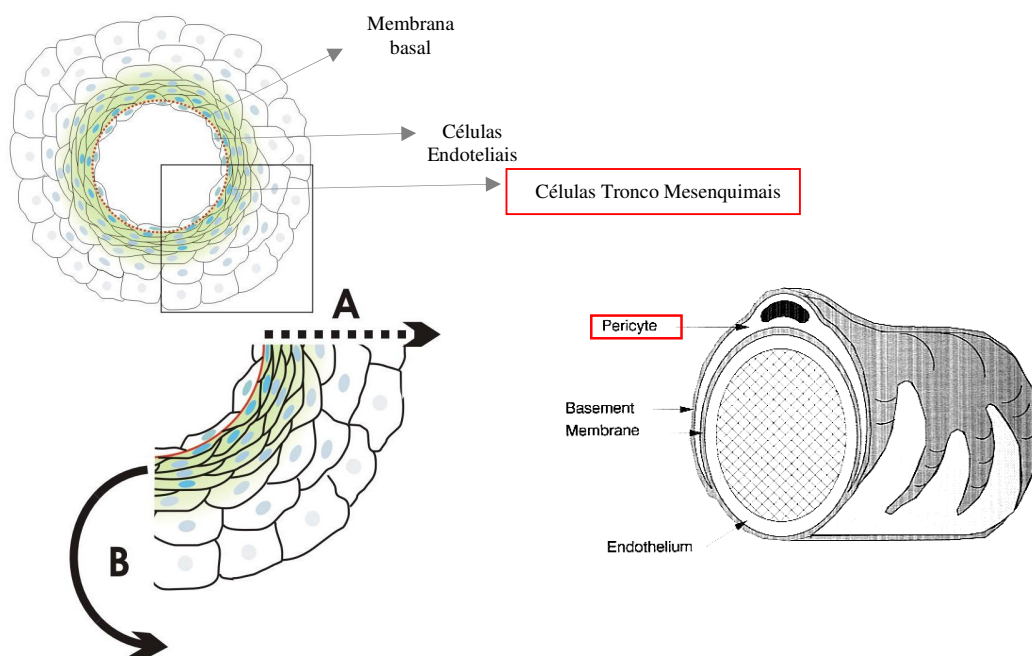
#### 1.4 NICHOS DAS CTMS

As CTs de tecidos adultos são encontradas em nichos especializados nos seus correspondentes tecidos de origem (WATT *et al.*, 2000). Por exemplo, as CTs hematopoiéticas podem ser encontradas na medula óssea (VERFAILLIE *et al.*, 2000), as CTs epidermais no folículo piloso (BRAUN *et al.*, 2003) e as CTs neurais na zona subventricular (GOULD *et al.*, 1999). Entretanto, as CTs mesenquimais não possuem um nicho especializado.

Os tipos celulares originados das CTMs, como os adipócitos, condrócitos e osteócitos estão presentes no organismo inteiro, e sendo assim, a localização destas CTs no organismo deve permitir que sua progênie atinja a maioria ou todos os tecidos e órgãos. Considerando isto, três possibilidades podem ser consideradas de acordo com Meirelles *et al.* (2008). Na primeira, as CTMs estariam localizadas em somente um tecido específico ou órgão, do qual elas sairiam e circulariam para outros locais. Isto levaria a pensar que as CTMs residem no sangue periférico, mas a considerável dificuldade de estabelecer culturas de CTMs neste tecido (utilizando diferentes metodologias) argumenta contra esta hipótese. A segunda possibilidade é baseada no fato de que as CTMs adultas têm sido isoladas de inúmeros

tecidos, sugerindo que todos eles possuem um “pool” de CTs intrínsecas que podem estar se comportando como CTM quando caracterizada *in vivo* (MEIRELLES *et al.*, 2008).

A terceira possibilidade envolve a relação entre as CTMs e as células perivasculares. Esta sugestão pode adequadamente explicar porque as CTMs podem ser isoladas de todos os tecidos. A associação destas células mesenquimais com a vasculatura permite que as CTMs funcionem como uma fonte de novas células para reposição celular e estejam disponíveis para a reparação ou regeneração de lesões locais (Figura 4). Sendo assim, os danos a qualquer tecido iriam liberar a CTM perivascular, que iria se dividir, além de secretar fatores tróficos e imunoregulatórios. O estabelecimento de culturas de CTMs de vasos sanguíneos argumenta a favor desta hipótese (MEIRELLES *et al.*, 2008).



**Figura 4. Modelo proposto do nicho das CTMs e sua contribuição na manutenção do tecido.** No esquema estão representados um corte transversal de um vaso, no qual as CTMs estão ancoradas na membrana basal (linha vermelha), opostas as células endoteliais. Sinais fornecidos pelo microambiente do tecido coordena uma transição gradual (representada pelo gradiente em verde) a partir de células indiferenciadas à progenitores e células com fenótipo maduro. Este processo pode acontecer naturalmente, como representado pela seta pontilhada. No caso lesão tecidual CTMs indiferenciadas podem ser mobilizadas diretamente sem a transição à progenitores (seta B).

Adaptado de: (MEIRELLES *et al.*, 2006).

De fato, estudos vêm demonstrando que células perivasculares, como os pericitos (Figura 4), possuem a capacidade de se diferenciarem em tipos celulares mesenquimais *in vitro* e *in vivo*, dando origem a adipócitos, condrócitos e osteócitos, além de possuírem marcadores de células mesenquimais e morfologia semelhante a estas (MEIRELLES *et al.*, 2006). Os pericitos, também chamados de células periendothelias, são células que se encontram associadas à microvasos, opostas às células endoteliais. Para ser considerada pericito, uma determinada célula precisa demonstrar ter contato físico com as células endoteliais por meio de junções gap, expressar ao menos um marcador atribuído à pericitos ( $\alpha$ SMA, nestina) e não expressar marcadores de células endoteliais (CD31). Da mesma forma, quando essa interação é interrompida e o pericito é liberado da membrana basal, sugere-se que ele seja considerado uma CTM (MEIRELLES *et al.*, 2008). Mais uma vez o termo células tronco mesenquimais parece inadequado e, possivelmente, o termo células-tronco perivascular poderia representar melhor esse tipo de célula.

### 1.5 FATORES DE CRESCIMENTO E CTMS

As CTMs, *in vivo*, residem em um complexo microambiente caracterizado pelos fatores de crescimento solúveis e componentes da matriz extracelular. Compreender como os fatores de crescimento regulam respostas comportamentais das CTMs é essencial tanto para as pesquisas básicas quanto para as aplicações tecnológicas (GENG *et al.*, 2008).

Os mecanismos moleculares que governam a diferenciação das CTMs não são completamente entendidos, mas inúmeros fatores de crescimento que medeiam padrões de sinalização vêm sendo relacionados à indução ou regulação da diferenciação das CTMs.

### 1.5.1 Fator de crescimento Epidermal

A família de fatores de crescimento epidermais compreende seis polipeptídios estruturalmente relacionados, os quais possuem uma estrutura compacta de três voltas conservada entre eles, chamada de domínio EGF. Todos os membros da família EGF se ligam e ativam um receptor tirosina quinase, conhecido como receptor de EGF ou ErbB, que é uma glicoproteína transmembranar com atividade tirosina quinase intrínseca (Figura 5). A ativação deste receptor por um ligante ocasiona sua fosforilação, resultando assim na iniciação de múltiplos padrões de sinalização, incluindo o padrão ERK, o padrão PI3-kinase-AKT e o padrão JAK/STAT (XIAN, 2007).

A ativação do receptor de EGF tem sido relacionada com o crescimento, diferenciação e migração celular, desempenhando assim um importante papel na manutenção da homeostase e na regulação da resposta à lesões em vários tecidos, incluindo sistema nervoso, glândulas mamárias e tecidos epiteliais (XIAN, 2007).

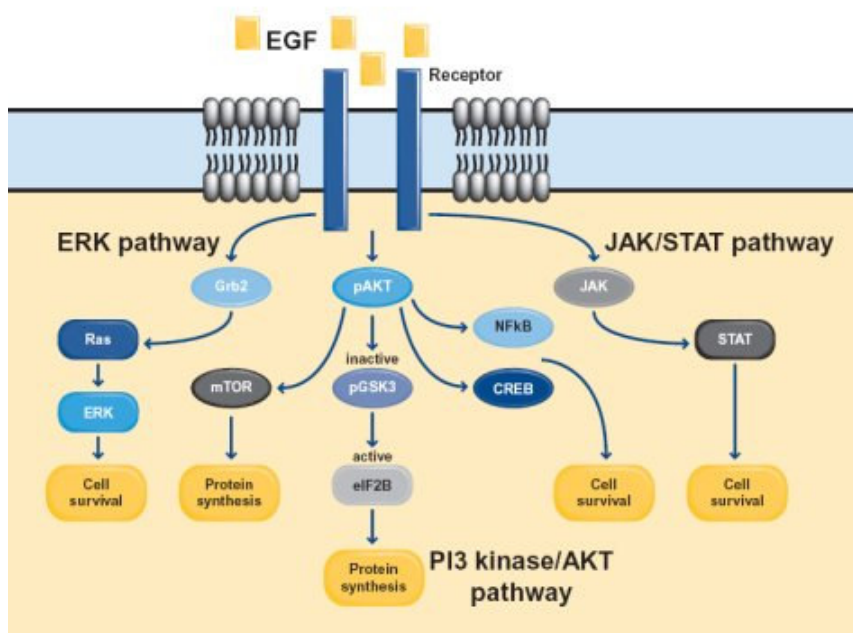


Figura 5. Padrão de sinalização do receptor de EGF, quando este é ativado por um ligante, no caso, o fator de crescimento epidermal.

As CTMs da medula óssea humana expressam receptores de EGF (EGFR), possuindo um nível elevado de ativação em resposta ao fator de crescimento EGF (NORMANNO *et al.*, 2005). Funcionalmente, estudos sugerem que os ligantes dos EGFR podem regular a proliferação e diferenciação das CTMs (GRONTHOS, 1995). Apesar do papel *in vivo* da expressão dos EGFR nas CTMs não estar claro, vários estudos têm demonstrado que estas células podem manter seu potencial de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* em resposta ao EGF (TAMAMA *et al.*, 2006). Existe ainda, uma grande produção de fatores de crescimento, incluindo o EGF, pelas CTMs da medula em resposta a lesões no microambiente, sugerindo que estas células poderiam regenerar a lesão através da secreção de fatores de crescimento (XIAN, 2007).

Os efeitos do EGF na diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das CTMs têm sido controversos. Trabalhos relatam que a presença de EGF nas culturas, inibe esta diferenciação, enquanto outros demonstram que esta não é influenciada. A adição de EGF ao meio adipogênico não promove a diferenciação para adipócitos em CTMs da medula de ratos ou humanos (KRAMPERA *et al.*, 2005). Outros dados demonstram que o EGF inibe a síntese de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina, e que a sinalização do seu receptor atua como um regulador negativo da diferenciação osteogênica (TAMAMA *et al.*, 2006). Já o pré-tratamento das CTMs com EGF parece não afetar a diferenciação, confirmando que a expansão *in vitro* destas células na presença deste fator não interfere com sua subsequente diferenciação, sendo então um ótimo candidato para a expansão destas células (TAMAMA *et al.*, 2006). A razão para este efeito controverso do EGF nas diferenciações para linhagens mesenquimais ainda não é clara e requer mais estudos sobre o efeito dos fatores de crescimento nas CTMs.

A aquisição de EGF e a ativação do seu receptor estão envolvidas também na regulação de muitos aspectos do desenvolvimento dos precursores neurais, como o potencial



de diferenciação e migração celular (CICCOLINIA *et al.*, 2005). Em razão disso, muitos estudos com CTs utilizam o EGF em meios indutivos para o fenótipo neural. Trabalhos descrevem sua atuação na diferenciação de CTs da medula óssea de camundongos, em células gliais e neurônios (BOSSOLASCO *et al.*, 2005). Em relação à diferenciação em miofibroblastos, quando há a inibição da cascata de sinalização (ERK/MAPK) promovida pela ativação do receptor de EGF, as CTMs da medula óssea se diferenciam neste fenótipo, ou seja, a presença de EGF inibe esta diferenciação (TAMAMA *et al.*, 2008).

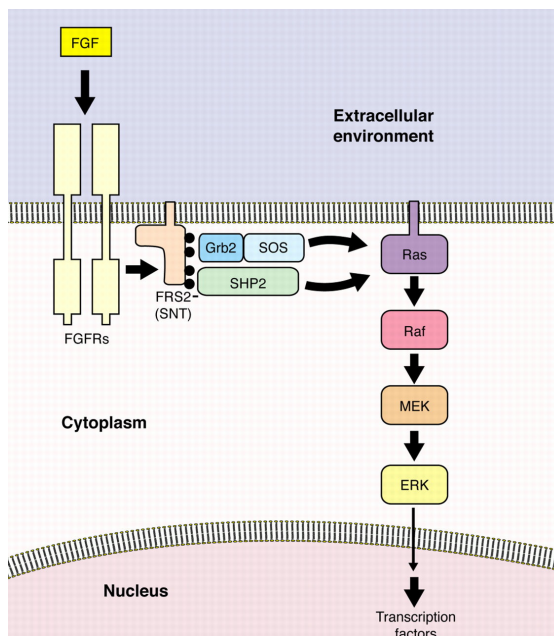
Embora os estudos acima sugerirem que o EGF seja relevante para a biologia das CTMs, mais estudos são necessários para investigar as fontes de EGF *in vivo* e se a sinalização mediada pelo seu receptor realmente contribui para a diferenciação e/ou manutenção do estado indiferenciado das CTMs (TAMAMA *et al.*, 2006).

### **1.5.2 Fator de Crescimento Fibroblástico**

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) compreendem uma grande família de moléculas sinalizadoras com inúmeras funções no desenvolvimento assim como na fisiologia e patologia do organismo adulto (DVORAK *et al.*, 2006). Já é bem descrito que os FGFs induzem atividade mitogênica, quimiotática e angiogênica em células de origem mesodermis e neuroectodermis. Até o momento, vinte FGFs foram descritos, contendo algumas distinções estruturais e funcionais entre eles (POWERS *et al.*, 2000).

O FGF-2, também chamado de FGF básico ou b-FGF, é formado por uma isoforma de massa molecular baixa (18kDa) e quatro altas, sendo que a região 18kDa possui alta afinidade ao receptor do FGF (DELRIEU, 2000). A transdução de sinal do FGF é iniciada após a ligação do FGF-2 em conjunto com moléculas de heparan-sulfato, ao seu receptor tirosina-quinase transmembranar (FGFR) (Figura 6). Esta ligação resulta na dimerização e

autofosforilação do receptor, ocasionando uma cascata de transdução de sinal, que leva ao estímulo da expressão de determinados genes através da ativação de fatores de transcrição (MOHAMMADI *et al.*, 2005).



**Figura 6. Cascata de sinalização ativada pela ligação do FGF ao seu receptor tirosina-quinase.**  
Fonte: [www.stke.sciencemag.org](http://www.stke.sciencemag.org)

O FGF-2 tem sido descrito como um importante fator de crescimento, no reparo e regeneração de diferentes tecidos, tendo em vista seu grande efeito proliferativo em células fibroblásticas e endoteliais (POWERS *et al.*, 2000). Está relacionado também a patologias, como o câncer, sendo que os estudos com CTs cancerígenas descrevem seu envolvimento com a tumorigenicidade, sobrevivência e resistência a drogas destas células (SONG *et al.*, 2000; OKADA-BAN *et al.*, 1999). Além disso, tem um importante papel na manutenção da auto-renovação e do estado indiferenciado de CTs embrionárias (DVORAK *et al.*, 2006). De fato, estudos vêm demonstrando que o FGF é necessário para induzir a quiescência nas CTs (NISHIKAWA *et al.*, 2008)

Em relação às CTMs, inúmeros trabalhos demonstram a influência do FGF-2 na expressão de marcadores neurais, e na diferenciação mesodermal. O pré-tratamento com

FGF-2 aumenta o potencial de diferenciação osteogênica e condrogênica em CTMs humanas (ITO *et al.*, 2008). Além disso a proliferação celular das CTMs aumenta em resposta ao FGF (CHOI *et al.*, 2008). A combinação de FGF com outros fatores de crescimento, como EGF e PDGF (TAO *et al.*, 2005), e moléculas indutoras, como ácido retinóico e DMSO (BERTANI *et al.*, 2005), é amplamente utilizada para induzir a diferenciação neural. CTMs obtidas de placenta cultivadas em meio sem soro e com FGF-2 originam diferentes linhagens celulares, inclusive a neural (BATTULA *et al.*, 2007).

Assim como o EGF, estudos envolvendo o FGF-2 no potencial de diferenciação e proliferação das CTs são ainda muito controversos, e inúmeros trabalhos são difíceis de reconstituir. Isto pode ser resultado das diferentes condições experimentais, como fontes de obtenção, métodos de isolamento e espécies (GREGORY, 2005).

#### 1.6 PROTEÍNA Wnt E A ATIVAÇÃO DA BETA-CATENINA

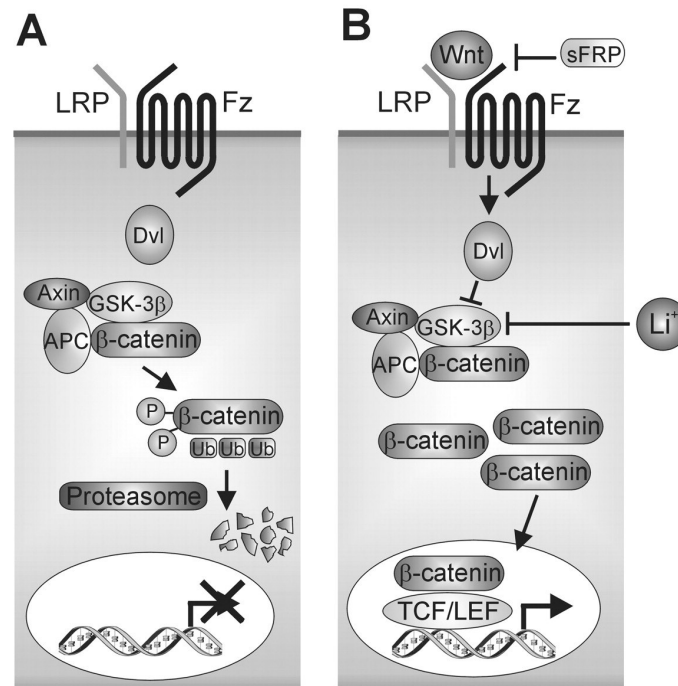
A proteína Wnt constitui uma das mais importantes famílias de moléculas sinalizadoras no desenvolvimento, exercendo também papel em tecidos adultos, como na regulação da proliferação e motilidade celular, geração de polaridade e especificação do destino celular. Recentemente, a sinalização de Wnt tem sido implicada no controle da diferenciação de células tronco hematopoiéticas e células tronco da pele, assim como na regulação miogênica, condrogênica e adipogênica. (ETHERIDGE *et al.*, 2004), além disso a molécula Wnt esta envolvida na manutenção e diferenciação das células progenitoras mesenquimais adultas (HEDGEPEETH *et al.*, 1997)

A sinalização de Wnt pode estimular quatro tipos diferentes de padrão de sinalização, sendo um deles, a que regula a estabilidade da  $\beta$ -catenina, levando a transcrição de vários genes alvos.

Na ausência da sinalização de Wnt, a  $\beta$ -catenina é fosforilada pela GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ ), o que permite que seja ubiquitinizada e subsequentemente degradada por proteosomas. Entretanto, quando o Wnt se liga ao seu receptor, a molécula frizzled, a proteína citoplasmática DVL (disheveled) é ativada, inibindo assim a fosforilação da  $\beta$ -catenina pela GSK-3 $\beta$ . Isto ocasiona a estabilização e acumulação da  $\beta$ -catenina e sua translocação para o núcleo, onde pode induzir a expressão de determinados genes (MERMELSTEIN *et al.*, 2007) (Figura 7).

A aplicação do íon lítio tem sido usada para mimetizar a sinalização de Wnt, pois inibe a GSK-3 $\beta$ , estimulando assim componentes da via de sinalização de wnt. A utilização de cloreto de lítio em CTMs de medula óssea é eficiente na inibição da GSK-3, e subsequente translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo, proporcionando evidências que a sinalização de Wnt é funcional nas CTMs, sendo requerida para sua manutenção e funcionalidade (HEDGEPEETH *et al.*, 1997; STAMBOLIC *et al.*, 1996).

Mais estudos em torno do papel da sinalização de Wnt nas CTMs são necessários para aumentar o entendimento dos mecanismos sinalizadores envolvidos na manutenção e diferenciação das CTMs. A sinalização de Wnt em CTMs obtidas da placenta envolvendo diferenciação em linhagem neural ainda é pouco conhecida.



**Figura 7. Padrão de sinalização de Wnt.** A. Na ausência de Wnt,  $\beta$ -catenina é associada com GSK-3 $\beta$ , axina e APC (adenomatous polyposis coli). A beta-catenina é fosforilada pela GSK-3 sendo marcada para ubiquitinação e subsequente degradação pelos proteossomas. B. Wnt se liga ao seu receptor Frizzled e co-receptor LRP, ativando Dvl, que inibe GSK-3. Beta-catenina é acumulada e deslocada para o núcleo, onde regula transcrição gênica. O Lítio inibe GSK-3 e pode ser usado para mimetizar a sinalização de Wnt. Fonte: ETHERIDGE *et al.*, 2004

A identificação de fatores de crescimento e vias de sinalização envolvidas na auto-renovação e diferenciação celular é importante para a concepção de estratégias, a fim de alcançar a senescência e a diferenciação direcionada para um determinado fenótipo das CTs (TAMAMA *et al.*, 2006). Tendo em vista, este argumento, nosso trabalho investigou a influência dos fatores de crescimento EGF e FGF-2, além da sinalização por lítio (mimetizando de Wnt), nos mecanismos de diferenciação e proliferação das CTMs de placenta humana *in vivo*.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as influências dos fatores de crescimento FGF-2 e EGF, e a sinalização de Wnt no mecanismo de diferenciação das células tronco mesenquimais da placenta humana *in vitro*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a influência do FGF-2 e EGF na potencialidade de diferenciação das CTMs
- 2) Avaliar a ação do cloreto de lítio na ativação de  $\beta$ -cateninas nas CTMs.
- 3) Determinar a influência da ativação da  $\beta$  catenina na diferenciação das CTMs.
- 4) Verificar a proliferação celular das CTMs tratadas com FGF-2, EGF *in vitro*.
- 5) Padronizar técnica de amplificação e transfecção do plasmídeo GFP em *Escherichia coli* e nas CTMs.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES

Fosfato de sódio dibásico, IMDM, Trizol adquiridos da **GIBCO**.

4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Ácido trans-retinóico (ATRA), Ampicilina, Anticorpo primário anti- $\alpha$ SMA, Fator de crescimento Epidermal (EGF), Fator de crescimento fibroblástico (FGF), Penicilina, streptomicina, tripsina, Triton X-100, Tween 20, Cloreto de lítio (LiCl), Pancreatina, adquiridos da **Sigma**

Anticorpo primário anti-nestina, Anticorpo primário anti-  $\beta$ -catenina adquirido da **Santa Cruz Biotechnology**

Anticorpo primário anti-BrdU adquirido da **Calbiochen**

Soro bovino fetal (SBF) adquirido da **Cultilab**

5-bromo-2-deoxiuridinina (BrdU), SYBR Safe DNA, Lipofectamina, Kit-pure link quick plasmid miniprep, adquiridos da **Invitrogen**

Ácido clorídrico adquirido da **F.Maia**

Paraformaldeído adquirido da **MERK**.

Anticorpo primário anti- $\beta$ -tubulina III, Kit máster mix, Transcriptase reversa, Oligo dT, Inibidor de RNase, dNTP, Cloreto de magnésio, Tampão 5X adquirido da **PROMEGA**

Agarose adquirida da **AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH**

Anticorpo secundário anti-IgG de coelho FITC, Anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo Txrd, Anticorpo secundário anti-IgG2a de camundongo FITC adquirido da

**Sourthen Biothec**

Iniciadores (primers) adquiridos da IDT - **Integrated DNA Technologies**

Meio LB, Agar adquiridos da **BD**

### 3.2 EQUIPAMENTOS

Banho Maria, dbm 120, BENFER

Centrífuga, Universal 32R, HETTICH

Centrífuga, Excelsa baby

Centrífuga, 5415 D, EPPENDORF

Câmara de Neubauer, HIRSCHMANN TECHCOLOR

Estufa úmida de CO<sup>2</sup>, Elite II, REVCO

Fluxo laminar, Veeco

Microscópio de contraste de fase, CK40, OLYMPUS

Microscópio epifluorescente, IX71, OLYMPUS

pHmetro, Q-400<sup>a</sup>, QUIMIS

Sistema de eletroforese, LABTRADE

Termociclador, Mastercycler gradient, EPPENDORF

### 3.3 MÉTODOS

#### **3.3.1 Obtenção da Placenta Humana**

A placenta humana foi obtida através de uma colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no qual pacientes com saúde qualificada doaram suas placentas após apresentação do termo de consentimento. Tal termo esclarece para as doadoras a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta será realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através de número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG.



Uma pequena porção da placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril, contendo PBS (tampão fosfato salino) e encaminhada para o Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, onde foi realizado o procedimento de cultura celular. Para realização das culturas, utilizamos apenas a região subjacente á placa coriônica localizada na parte fetal do anexo embrionário, próxima ao cordão umbilical.

### **3.3.2 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana**

As amostras das placentas coletadas (aproximadamente  $1\text{cm}^2$ ) foram dissociadas mecanicamente e digeridas enzimaticamente com pancreatina (6,25g/L) e solução de tripsina-EDTA (0,05%), por aproximadamente 20 minutos, em temperatura ambiente. O tecido dissociado homogeneamente foi submetido à centrifugação (500 g), durante 5 minutos e resuspenso em IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) acrescido de penicilina/streptomicina(1U/ $\mu\text{g}$ ) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de  $25\text{cm}^2$  (corning) e mantidas em estufa úmida, à  $37^\circ\text{C}$  e ar atmosférico suplementado com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 4 dias o meio foi trocado e as células não aderentes descartadas. As CTMs foram selecionadas pela adesão no plástico, sendo que as células não aderentes foram removidas com a troca periódica do meio (3-4dias).

Após três semanas de cultura, quando a monocamada atinge confluência de aproximadamente 80 a 90 % , as células foram descoladas usando solução de tripsina (0,25%) e EDTA (0,02%) em PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 10% de SBF. As células foram replaqueadas na concentração de  $10^3$  células/ml em IMDM acrescido de

penicilina/streptomicina e suplementado com 10% de SBF (passagem 1). As células foram repicadas de 7 a 12 vezes, sendo estas as passagens utilizadas para os experimentos.

### **3.3.3 Tratamento com fatores de crescimento: EGF e FGF-2**

Para os experimentos com os fatores de crescimento EGF e FGF-2, as CTMs em passagens 7-12 foram plaqueadas em placas de 96 poços (Corning), em uma densidade de 500 células por poço e incubadas durante cinco dias em IMDM suplementado com 10% de SBF e diferentes concentrações de EGF e FGF-2. Uma curva de concentrações foi realizada, utilizando-se 5, 10, 20 e 40 ng/ml de EGF ou FGF-2, separadamente. A análise da influência destes fatores juntos, foi realizada nas concentrações de 10 ng/ml e 20 ng/ml.

Após o tratamento as células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica para fenótipos específicos, conforme descrito no item 3.3.7.

### **3.3.4 Tratamento com ácido trans-retinoico (ATRA)**

Para os experimentos com o ATRA, as células foram tratadas primeiramente com os fatores EGF e FGF-2 na concentração de 20 ng/ml, como descrito acima. Após o tempo de tratamento o meio contendo os fatores foi retirado, as células foram lavadas com PBS e mantidas em IMDM suplementado com 1  $\mu$ M de ATRA e 10% de SBF durante 24 horas. As células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica.

### **3.3.5 Tratamento com cloreto de lítio**

As culturas de CTMs em passagens 7-12 foram plaqueadas em placas de 24 poços (Corning), em uma densidade de  $2,5 \times 10^4$  células por poço e incubadas durante 24 horas em

IMDM suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo 20 mM de cloreto de lítio ( $\text{LiCl}_2$ ).

Após o tratamento as células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica para  $\beta$ -catenina e fenótipos específicos, conforme descrito no item 3.3.7.

### **3.3.6 Avaliação da proliferação celular por incorporação com BrdU**

A proliferação foi avaliada por ensaio de incorporação com brdU (5-bromo-2-deoxiurina) que corresponde a um análogo da timidina, incorporando-se ao DNA das células que estão proliferando. Após 4 dias de cultura, as CTMs tratadas com EGF e FGF-2 foram incubadas com 1  $\mu\text{g/mL}$  de brdU durante 24 horas. Em outro experimento para avaliação da proliferação as células tratadas foram incubadas com brdU após 0, 2 e 4 dias de cultura.

Após o período de incubação as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 minutos. Logo após, foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com ácido clorídrico (2N) durante 30 minutos, à 37°C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e procedeu-se a reação imunocitoquímica, descrita no item 3.3.7.

### **3.3.7 Análise imunocitoquímica**

Para a realização do ensaio de imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF durante 40 minutos e em seguida, as células foram submetidas à reação imunocitoquímica, utilizando-se anticorpos primários específicos, descritos na tabela 1. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período

de 1 hora a temperatura ambiente. A seguir procederam-se as lavagens (3 lavagens com PBS-Tween 20 [0,05%]) e a nova incubação (durante 1 hora) com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado a FITC, Anti-IgG1 de camundongo conjugado a TxRd e anti-IgG2a de camundongo conjugado a FITC. Após 3 lavagens com PBS-Tween, as células foram incubadas com DAPI (50 ng/ml) durante 15 segundos, à temperatura ambiente, para análise do número total de células. As marcações fluorescentes da expressão fenotípica das CTMs foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência.

A análise imunofluorescente da localização de  $\beta$ -catenina, nuclear ou citoplasmática, foi realizada através de observação em microscópio de epifluorescência através da sobreposição da marcação de dapi (nuclear) e a de beta-catenina.

**Tabela 1. Anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas.**

<i>Fenótipo</i>	<i>Anticorpo primário</i>
Músculo liso	Anti- $\alpha$ SMA (anti alfa actina de músculo liso) – IgG2a
Neurônio	Anti- $\beta$ -tubulina III – IgG1
Precursor neural/ Célula indiferenciada	Anti-nestina – IgG1
Proliferação celular	Anti-Brdu – IgG1
$\beta$ -catenina	Anti- $\beta$ -catenina – IgG
Neurônio	Anti-NF-M (anti neurofilamento médio) - IgG

### 3.3.8 Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR)

Para a realização da RT-PCR, as células foram lavadas com PBS e a extração do RNA total foi realizada com TRIZOL, de acordo com as orientações do fabricante. Para a reação da transcriptase reversa (RT), o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se 5  $\mu$ g de RNA total em um volume final de 20  $\mu$ l de uma mistura contendo enzima transcriptase reversa, iniciador oligo-dT (0,5mg/mL), inibidor de RNAase (40U/ $\mu$ l), nucleotídeos (dNTP 10 mM),  $Mg_2Cl$  (50mM) e Tampão 5X, em termociclador, por 1 hora a

40°C. A amplificação do cDNA de interesse foi realizada com a utilização de iniciadores específicos (descritos na tabela 2) e do Kit máster mix. Os produtos das RT-PCRs foram visualizados em gel de agarose (2%) e coloração com Sybr in TAE.

**Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-PCR.**

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>	<i>Anelamento (T em °C)</i>
GAPDH	Sense: ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT Anti-sense: ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC	60
NF-M	Sense: GAG CGC AAA GAC TAC CTG AAG A Anti-sense: CAG CGA TTT CTA TAT CCA GAG CAC	56
MAP-2	Sense: CCA TTT GCA ACA GGA AGA CAC Anti-sense: CAG CTC AAA TGC TTT GCA ACT AT	54,5
β-TUBULINA III	Sense: AGA TGT ACG AAG ACG AGG AG Anti-sense: GTA TCC CCG AAA ATA TAA ACA CAA A	55
NESTINA	Sense: CAG CTG GCG CAC CTC AAG ATG Anti-sense: AGG GAA GTT GGG CTC AGG ACT GG	62
αSMA	Sense: CGA TAG AAC ACG GCA TCA TC Anti-sense: CAT CAG GCA GTT CGT AGC TC	51
NANOG	Sense: TGC AAA TGT CTT CTG CTG AGA T Anti-sense: GTT CAG GAT GTT GGA GAG TTC	54
OCT-4	Sense: CTC CTG AAG CAG AAG AGG ATC AC Anti-sense: CTT CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA	58
CD-90	Sense: GAG AAT ACC AGC AGT TCA CCC ATC Anti-sense: AGG ATC TCT GCA CTG GAA CTT GAG	58
VE-CADERINA	Sense: TTG CCC ACA TAT TCT CCT TG Anti-sense: GCA GCA GCA GGT GCT AAC C	61
CD 31	Sense: GAG TCC TGC TGA CCC TTC TG Anti-sense: ATT TTG CAC CGT CCA GTC C	61
CD 200	Sense: TCC AAT TTA ACA GCG AAA ACA A Anti-sense: CCC TGT ATA GCA GTC AGC CC	54
GFAP	Sense: GTG GGC AGG TGG GAG CTT GAT TCT Anti-sense: CTG GGG CGG CCT GGT ATG ACA	65

### 3.3.9 Transfecção do plasmídeo GFP

#### 3.3.9.1 Transfecção e Amplificação do Plasmídeo pCX-EGFP em *Escherichia coli*

O Plasmídeo pCX-EGFP utilizado foi gentilmente doado pelo Dr. Masaru Okabe, Osaka University, Japão, e foi amplificado para posterior utilização nas CTMs. Quando inseridos nas CTMs, estas passam a expressar a proteína fluorescente verde (GFP), podendo assim serem diferenciadas em relação a outras linhagens celulares.

A transfecção do plasmídeo EGFP para amplificação, foi realizada na linhagem de bactérias competentes JM-1437-*Escherichia coli*. Para isso foi colocado 1µl do plasmídeo pCX-EGFP (0,1 µg/µl) em 100µl de bactérias competentes, e após 30 minutos de incubação no gelo, foi aplicado um choque térmico de exatamente 42°C durante 45 segundos, para a incorporação dos plasmídeos nas bactérias. As bactérias foram incubadas durante 2 minutos em gelo e após este período foi acrescentado 900 µl de meio LB e transferidas para estufa a 37°C sob agitação durante 1 hora. Logo após, as bactérias já contendo o plasmídeo foram plaqueadas em placa de cultura contendo ágar e antibiótico (ampicilina) e incubadas a 37°C sob agitação *overnight*.

No dia seguinte foi selecionada, com a utilização de uma ponteira, apenas uma colônia de bactéria, e estas foram incubadas em 4 mL de meio líquido (LB) contendo ampicilina, durante 24 horas, a 37°C sob agitação. Após este período as células foram centrifugadas durante 2 minutos a 12000 rpm, e submetidas à extração dos plasmídeos GFP.

### 3.3.9.2 Extração do plasmídeo GFP

A extração do plasmídeo GFP, foi realizada através do KIT PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), e sua concentração foi observada em espectrofotômetro. O plasmídeo EGFP clonado, foi diluído em tampão eluente (do KIT) e armazenado em tubos RNAses free, a -4°C.

Todas as manipulações de transfecção do plasmídeo GFP nas bactérias competentes, foram realizadas no **Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura (LIAA) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG)**, que possui os equipamentos apropriados para a realização das técnicas propostas, e além disso, possui autorização para a manipulação de organismos geneticamente modificados.

### 3.3.9.3 Transfecção do plasmídeo GFP em CTMs

Os plasmídeos GFP foram tranfectados nas CTMs através da utilização de Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen). Para isso, foi preparado um complexo contendo o plasmídeo e Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 em uma razão de 1:3. O complexo foi adicionado nos poços contendo as CTMs em IMDM sem antibiótico e soro. As células foram incubadas durante 5 horas à 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o meio foi trocado, adicionando-se assim IMDM contendo 10% de SBF e antibióticos. Dois dias após a transfecção foi observada em microscópio de fluorescência a expressão da proteína fluorescente verde (GFP).

### **3.3.10 Análise Estatística**

A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de teste de múltipla comparação de Bonferroni pelo programa Graphpad Prism. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ .



## 4 RESULTADOS

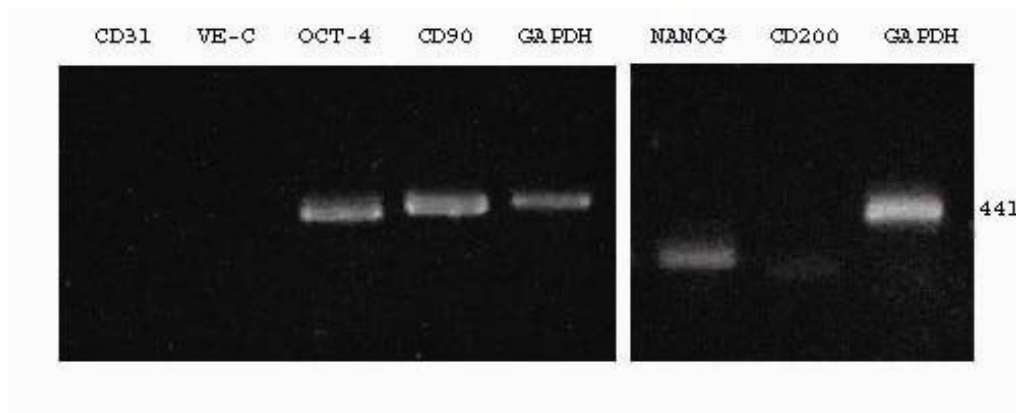
### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE PLACENTA (CTDP)

As CTMs são caracterizadas pela sua morfologia fibroblastóide, alta taxa proliferativa e potencial de diferenciação em linhagens mesodermis específicas. Analisamos a capacidade de isolamento de CTMs a partir de fragmentos da placenta humana, e observamos a expressão de marcadores de células indiferenciadas, além da expressão de marcadores de CTMs e de linhagens diferenciadas, já que é descrito que as CTMs apresentam um estado “multidiferenciado” (AKIVA; DALE, 2008).

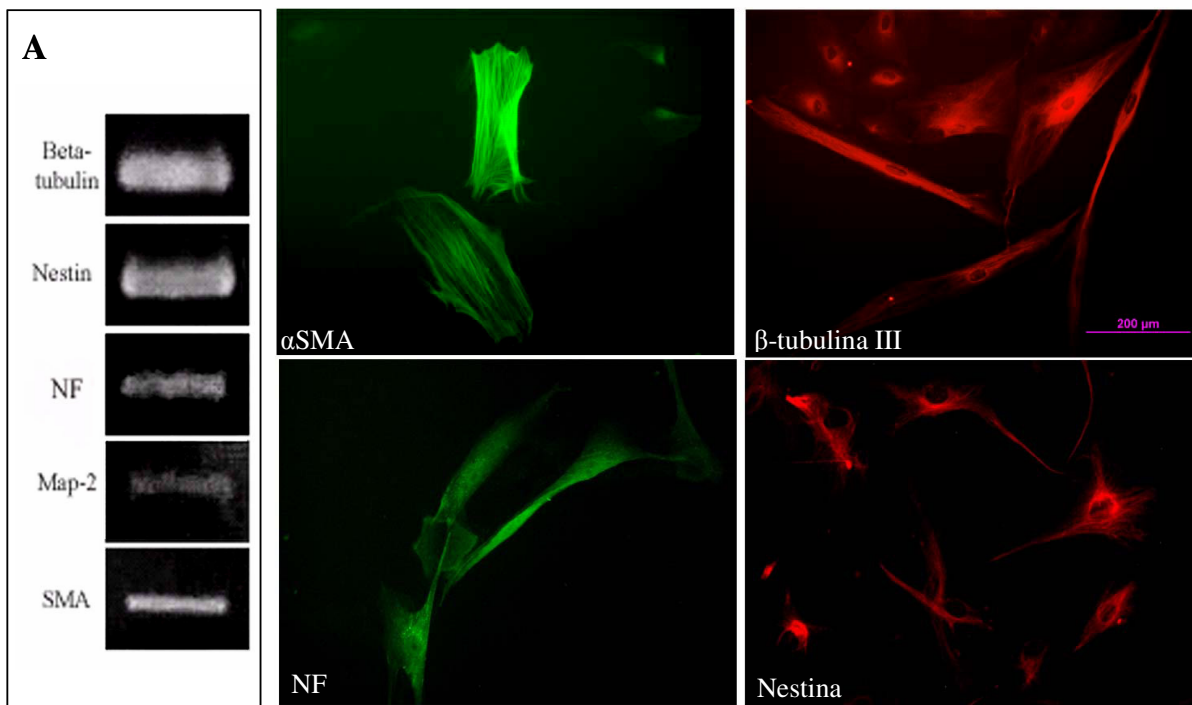
O modelo de isolamento das CTDPs por aderência ao plástico e na presença de IMDM suplementado com 10% de SBF mostrou ser eficiente em nosso estudo. As células obtidas possuem morfologia fibroblastóide, semelhante às CTMs obtidas da medula óssea, e alta taxa proliferativa, podendo ser mantidas até aproximadamente 20 passagens. Esta taxa de proliferação mostra uma tendência a diminuir progressivamente com o aumento do número de passagens. O potencial de diferenciação em osteócito, condrócito e adipócito foi descrito em trabalho submetido pelo nosso grupo de pesquisa (MARTINI *et al.*, 2008).

A análise através da RT-PCR de marcadores de CTs demonstrou que as CTDPs expressam marcadores como OCT-4 e Nanog, assim como CD90, marcador de CTM (Figura 8). Além disso, as células foram negativas para CD-31 e VE-caderina, que são encontrados em células endoteliais (e não expressos por CTMs) e CD200 (marcador de CT do folículo) (Figura 8). Foi observada a expressão de marcadores de fenótipos diferenciados (Figura 9 A) associados com a linhagem mesodermal como  $\alpha$ SMA (marcador de músculo liso), assim como de linhagem neural,  $\beta$ -tubulina III (marcador de neurônio), nestina (precursor neural

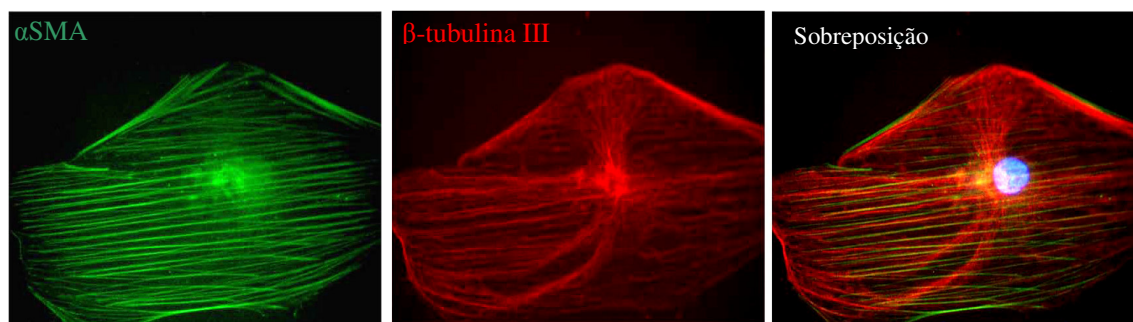
e/ou CT), NF-M (neurônio), Map-2 (neurônio). A expressão de GFAP (marcador de glia) foi negativa (dado não demonstrado). A análise da expressão de alguns marcadores de linhagens diferenciadas foi realizada também através de reação imunocitoquímica (Figura 9 B), demonstrando que as CTDP positivas para marcadores neuronais não apresentam morfologia semelhante à de um neurônio, e que as células  $\alpha$ SMA positivas co-expressam  $\beta$ -tubulina III (Figura 10).



**Figura 8. Expressão dos marcadores de células indiferenciadas e de CTMs em culturas de células derivadas da placenta humana.** Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiro em gel de agarose, demonstrando a expressão de marcadores de células indiferenciadas (OCT-4, nanog, CD200), CTMs (CD90) e células endoteliais (CD31, VE-Caderina) por RT-PCR em CTs derivadas da placenta (CTDPs). GAPDH: padrão interno.



**Figura 9. Expressão de marcadores de fenótipos diferenciados nas CTDPs.** (A e B) Fotografias representativas da expressão de marcadores de fenótipo neural,  $\beta$ -tubulina, nestina, NF, Map-2) e de células de músculo lido ( $\alpha$ SMA) por RT-PCR (A) e imunocitoquímica (B). NF: neurofilamento; Map-2: proteína do tipo 2 associada a microtúbulo;  $\alpha$ SMA: alfa actina de músculo liso.



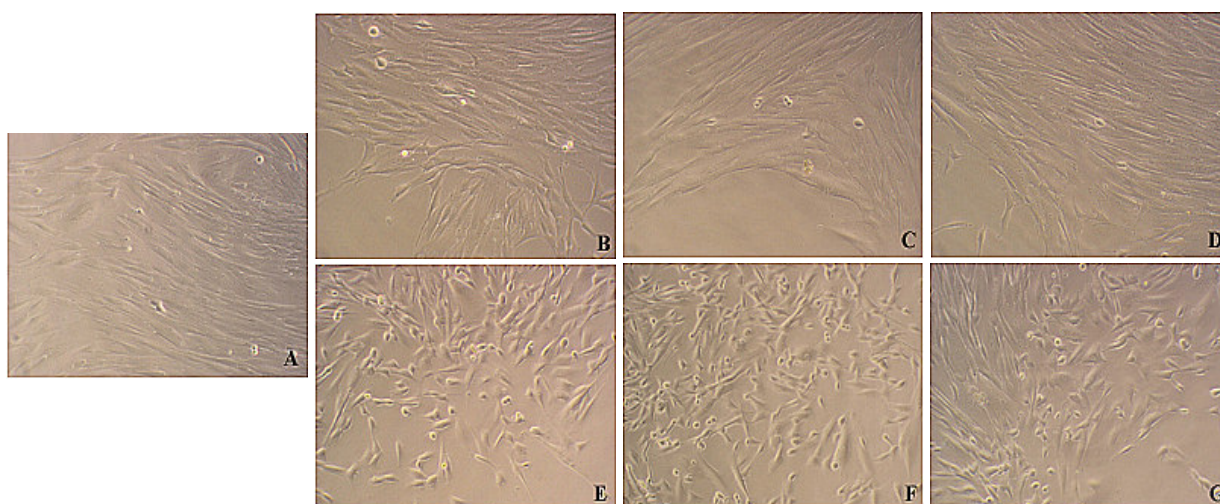
**Figura 10. Co-expressão de  $\alpha$ SMA e  $\beta$ -tubulina III nas CTDPs.** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\alpha$ SMA(A) e  $\beta$ -tubulina III (B) em CTDPs, demonstrando a co-expressão destas duas proteínas citoplasmáticas. Em azul, a coloração de núcleo com DAPI.  $\alpha$ SMA: alfa actina de músculo liso.

## 4.2 EFEITOS DO FGF-2 E EGF NAS CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE PLACENTA

### 4.2.1 Análise da morfologia das CTDPs após tratamento com FGF-2 e EGF

As CTDPs foram cultivadas na presença de FGF-2 e EGF, em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 40 ng/ml), durante cinco dias. Após este período as células foram visualizadas em microscópio de contraste de fase, a fim de observarmos possíveis diferenças morfológicas entre as diferentes condições experimentais.

Verificamos que as CTDPs apresentaram diferenças aparentes na morfologia quando tratadas com FGF-2 (Figura 11 E,F,G). As células eram menores e mais arredondadas, mostrando-se diferente do controle, e a sua adesão ao substrato parece ser focal. Entre as concentrações de FGF-2 (5,10,20,40 ng/ml) não foram observadas diferenças. Por outro lado, as CTDPs tratadas com EGF não demonstraram diferenças morfológicas, sendo semelhantes às células do controle, possuindo uma adesão fibrilar (fibroblastóide).



**Figura 11. Morfologia das CTDPs após tratamento com FGF-2 e EGF.** Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase de CTDPs cultivadas em diferentes concentrações 5, 10 e 20 ng/ml de (E,F,G) FGF-2 e (B,C,D) EGF durante 5 dias. (A) Controle.

#### 4.2.2 Avaliação do efeito de FGF-2 e EGF na proliferação das CTDPs

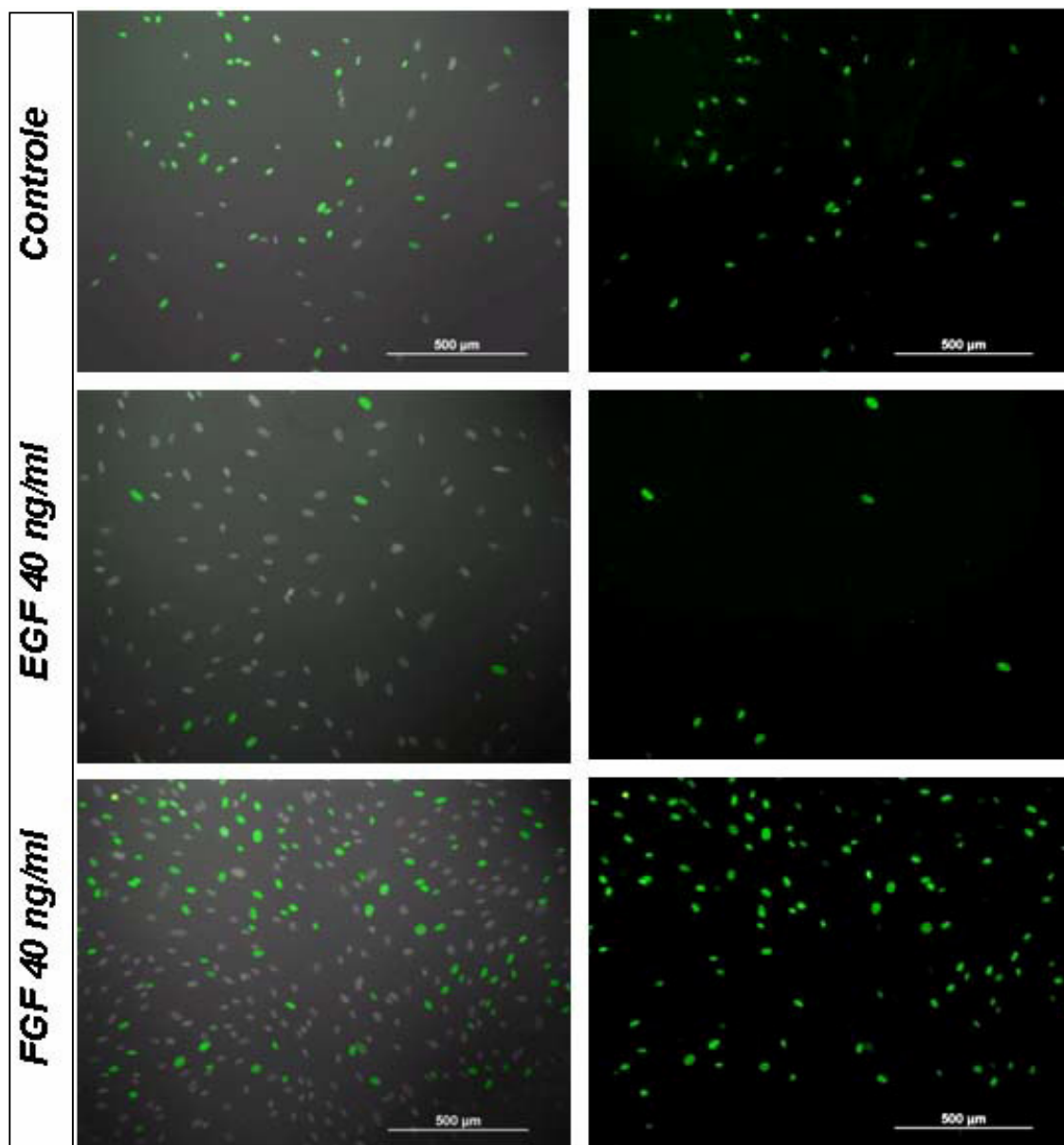
O papel dos fatores de crescimento na taxa de proliferação das CTMs de medula óssea é bastante conhecido. Para avaliar este efeito em nossos experimentos, as CTDPs foram tratadas com as diferentes concentrações de FGF-2 e EGF (5, 10, 20, 40 ng/ml) separadamente durante cinco dias, e submetidas à ensaio de incorporação de BrdU, um marcador de proliferação celular (Figura 12). Verificamos que as células tratadas com EGF diminuíram a taxa de proliferação celular (Figura 12 C-D). Quando acrescentamos 5 ng/ml de EGF nas culturas, as células diminuem em 13% a taxa de proliferação. Com o acréscimo da concentração de EGF esta diferença aumenta em relação ao controle, sendo que em 40 ng/ml a proliferação celular diminui em 20% (Figura 13 A).

Na presença de FGF-2 as CTDPs mantêm a taxa de proliferação celular. Foi observada uma diminuição (8%) na proliferação das células tratadas em relação ao controle, mas sem diferenças significativas (Figura 13 B).

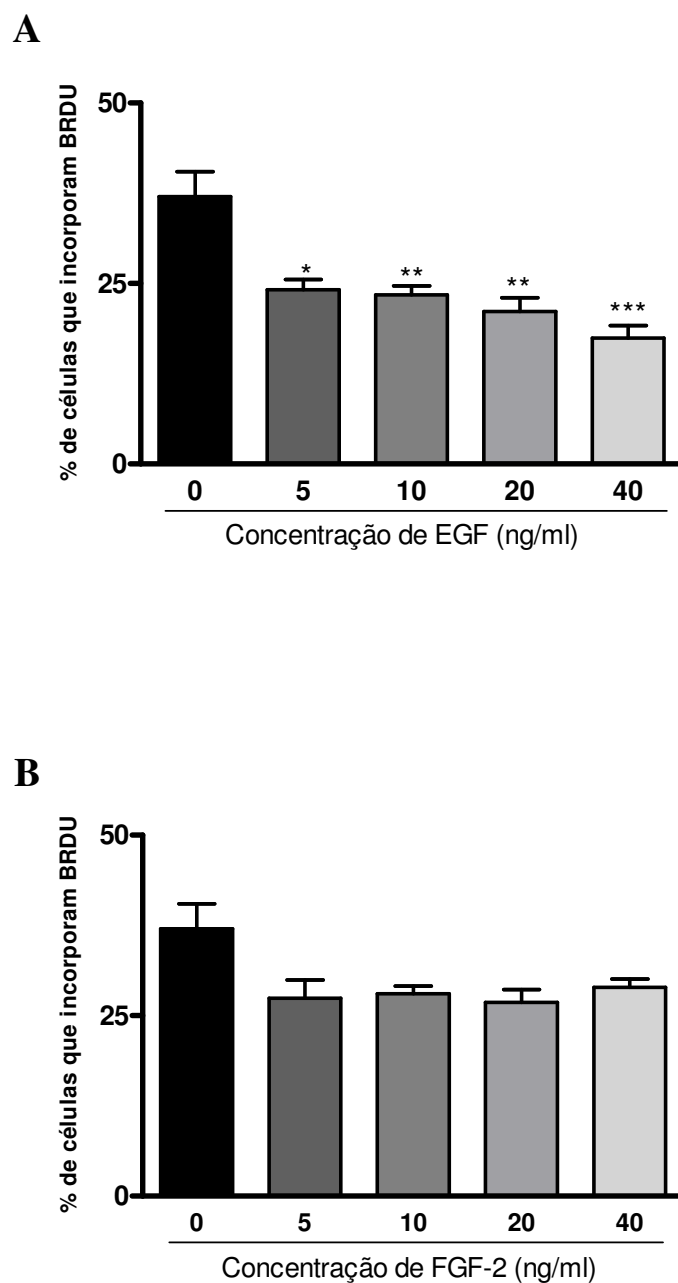
Pela análise das fotografias (Figura 12 D-F) vimos que apesar de apresentar uma taxa de proliferação semelhante ao controle no quinto dia de cultura, as células tratadas com FGF-2 possuíam uma quantidade maior de células (visualizadas pela marcação dos núcleos). Em razão disso, investigamos a influência do FGF-2 na proliferação ao longo do tratamento, através da análise da incorporação de BrdU no primeiro dia, terceiro dia e quinto dia de tratamento.

Nossos resultados mostraram que no terceiro dia de tratamento com FGF-2 há um pico na proliferação celular, apresentando uma taxa em torno de 58 % nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 ng/ml (53,1%, 61,8%, 56,8% e 59,3% respectivamente) (dados não demonstrados). O controle no terceiro dia apresenta uma taxa de proliferação celular de 35%. Já o EGF não

demonstrou um pico na proliferação, possuindo uma tendência a diminuir a proliferação celular ao longo dos cinco dias de tratamento.



**Figura 12. Avaliação da proliferação das CTDs tratadas com FGF-2 e EGF.** Fotografias representativas de imunofluorescência para Brdu, marcador de proliferação celular. Em cinza, marcação de núcleo com DAPI (coloração azul modificada para cinza em razão da sobreposição), em verde, células BrdU positivas. (A-B) Células não tratadas, (C-D) tratamento com 40 ng/ml de EGF e (E-F) 40 ng/ml de FGF-2, durante 5 dias. FGF: Fator de crescimento fibroblástico; EGF: fator de crescimento epidermal.



**Figura 13. Análise quantitativa da proliferação das CTDPs após o tratamento com FGF-2 e EGF.** Representação gráfica da quantidade de células que incorporam BrdU após tratamento com 5, 10, 20 e 40 ng/ml de (A) EGF e (B) FGF-2, respectivamente. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de cada condição de cultura em três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , por ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni.

### 4.2.3 Efeito do FGF-2 e EGF no potencial de diferenciação das CTDPs

Buscando-se avaliar a hipótese de que os fatores de crescimento podem influenciar o processo de diferenciação das CTMs, analisamos o efeito do tratamento com o FGF-2 e EGF na diferenciação das CTDPs. Para isso, as células foram cultivadas na presença de diferentes concentrações dos fatores durante cinco dias, e após este período foram submetidas à reação imunocitoquímica para os seguintes marcadores: Nestina (precursor neural/CT),  $\beta$ -tubulina III (marcador neuronal) e  $\alpha$ SMA (marcador de célula de músculo liso).

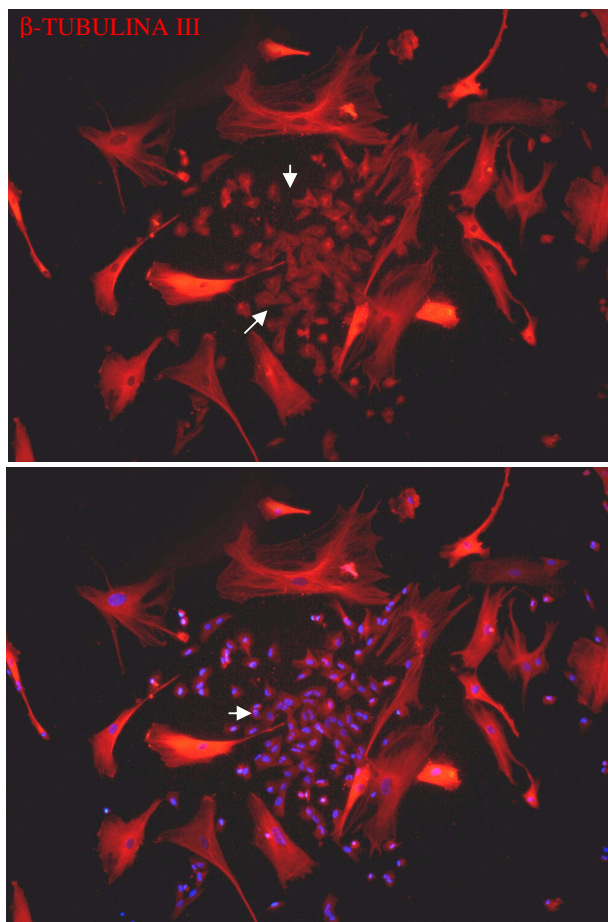
Nossos resultados demonstraram que a quantidade de CTDPs positivas para nestina e  $\beta$ -tubulina III não eram afetadas após o tratamento, tanto com FGF-2 quanto com o EGF. As CTDPs apresentaram 100% de expressão em todas as condições experimentais. Contudo, quando tratadas com os fatores, principalmente com FGF-2, as culturas apresentavam uma subpopulação de células distintas, caracterizadas por células pequenas e mais arredondadas (Figura 14). Além disso, observamos mudanças morfológicas de células  $\beta$ -tubulina III positivas no tratamento com EGF, que se tornam mais alongadas e menores, assemelhando-se a células neurais (Figura 15). Entretanto, estas células foram encontradas em baixa densidade.

A seguir, analisamos a expressão de  $\alpha$ SMA nas CTDPs e observamos que esta foi afetada com a presença de FGF-2 e EGF (Figura 16). Quando tratadas com 5 ng/ml de EGF, houve uma diminuição de 7% na expressão de  $\alpha$ SMA (Figura 17 A). Em 40 ng/ml, a população de células  $\alpha$ SMA positivas corresponde apenas a 2%, enquanto no controle é de 13%, mostrando uma diminuição de 11%. Estes resultados mostram que o aumento da concentração de EGF diminui ainda mais a expressão de células  $\alpha$ SMA positivas, ocasionando um efeito dose-dependente (Figura 17 A).

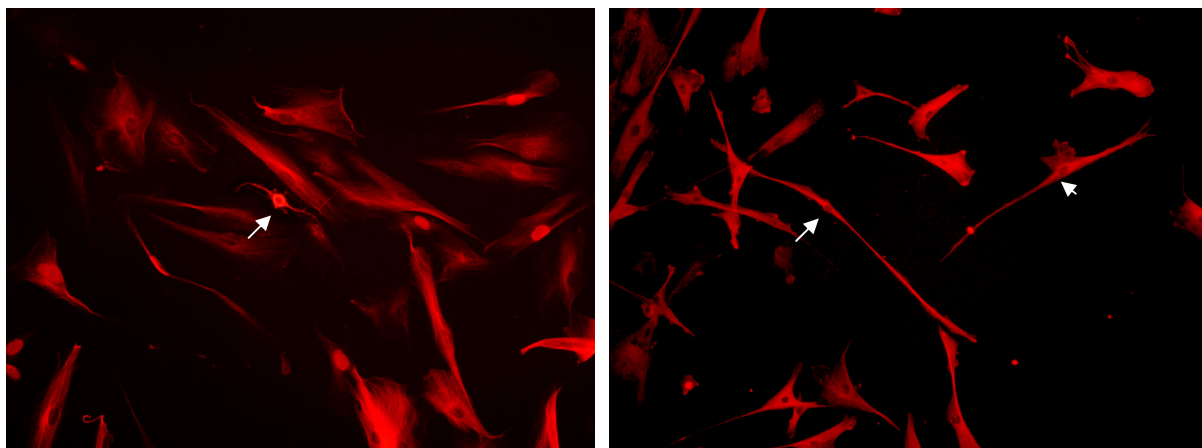


O tratamento com FGF-2 também afetou a expressão de  $\alpha$ SMA, porém com mais intensidade que o EGF. O acréscimo de apenas 5 ng/ml de FGF-2 foi eficiente para diminuir em 11,6% as células  $\alpha$ SMA positivas. Não observamos um efeito dose dependente, sendo que nas diferentes concentrações de FGF-2 a população de células  $\alpha$ SMA positivas manteve-se em torno de 1%.

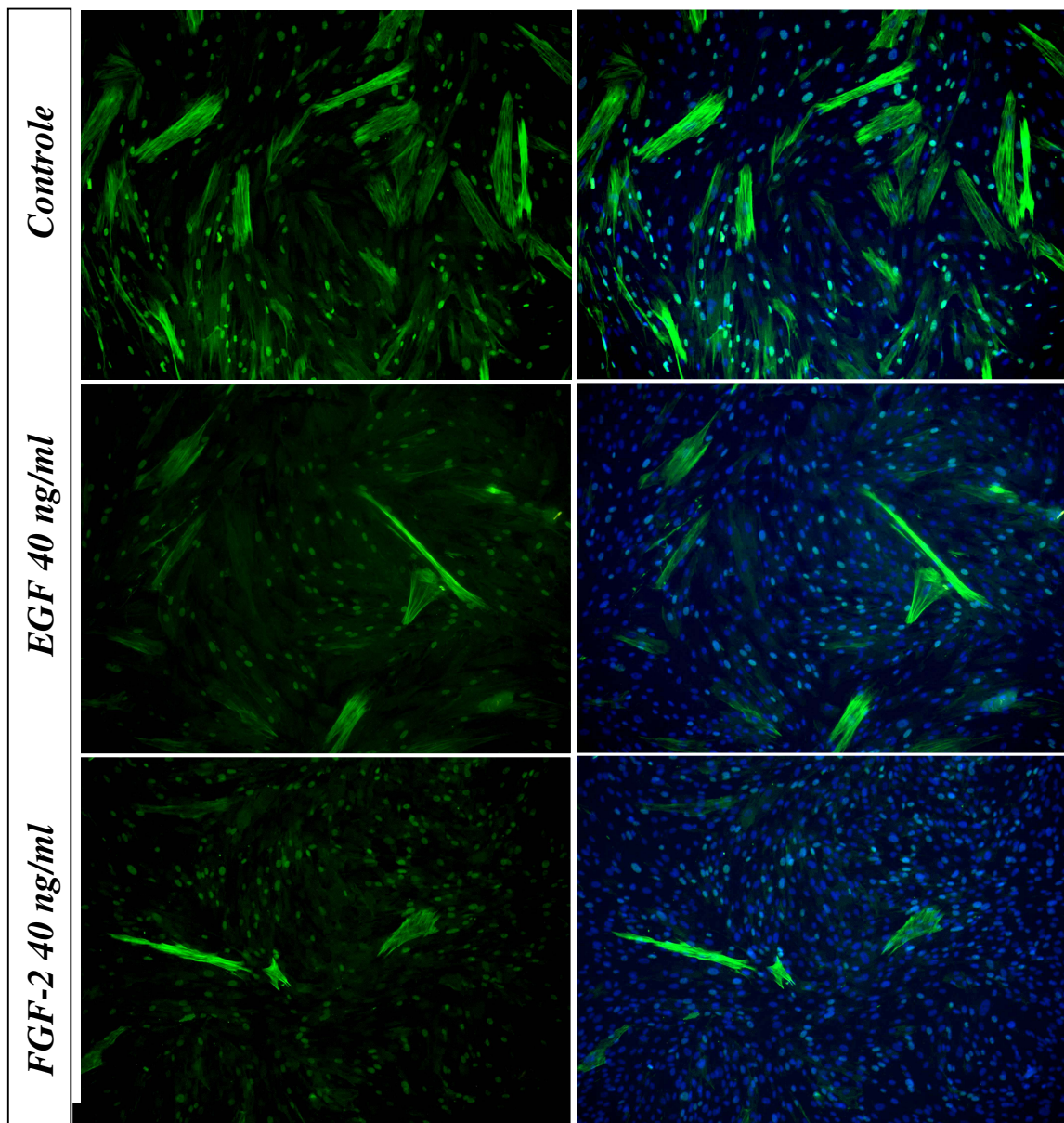
Tendo observado a influência de FGF-2 e EGF separadamente nas CTDPs, fomos investigar o efeito conjunto destes fatores. Para isso, as células foram co-tratadas com 10-20 ng/ml de EGF e 10-20 ng/ml de FGF-2, durante 5 dias. Este experimento demonstrou que a expressão de  $\alpha$ SMA diminuiu ainda mais quando as CTDPs foram cultivadas na presença dos dois fatores juntos. A diminuição em relação ao controle é de 12,7%, mostrando assim um efeito sinérgico dos fatores na população de células  $\alpha$ SMA positivas.



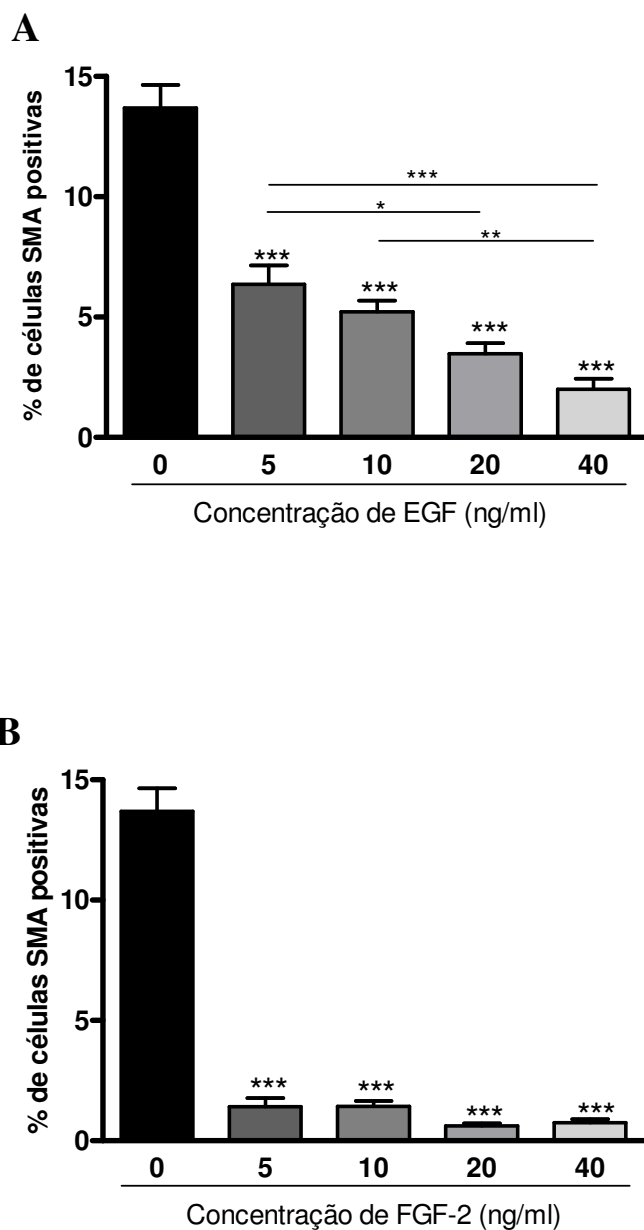
**Figura 14.** Sub-população de células menores e arredondadas em culturas tratadas com FGF-2 e EGF. Fotografias representativas de imunofluorescência para B-tubulina (A-B). As CTDPs quando tratadas com os fatores apresentavam esta subpopulação de células (seta branca). Em azul, marcação de núcleo com DAPI.



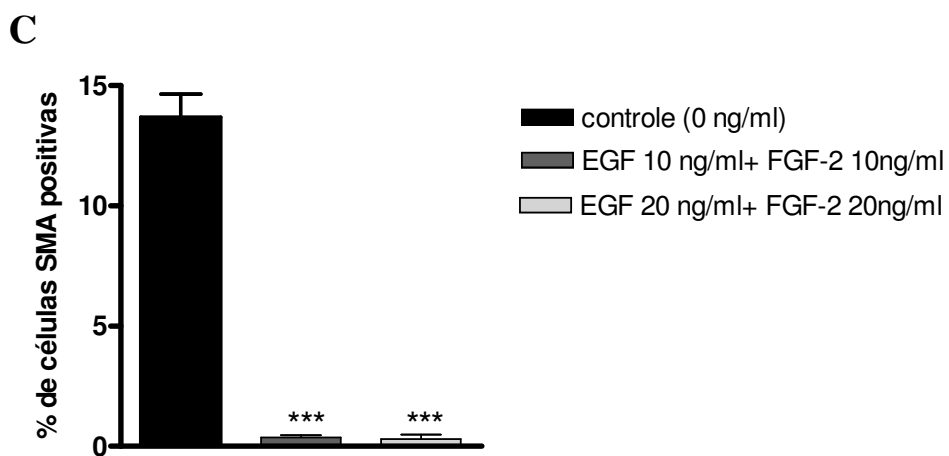
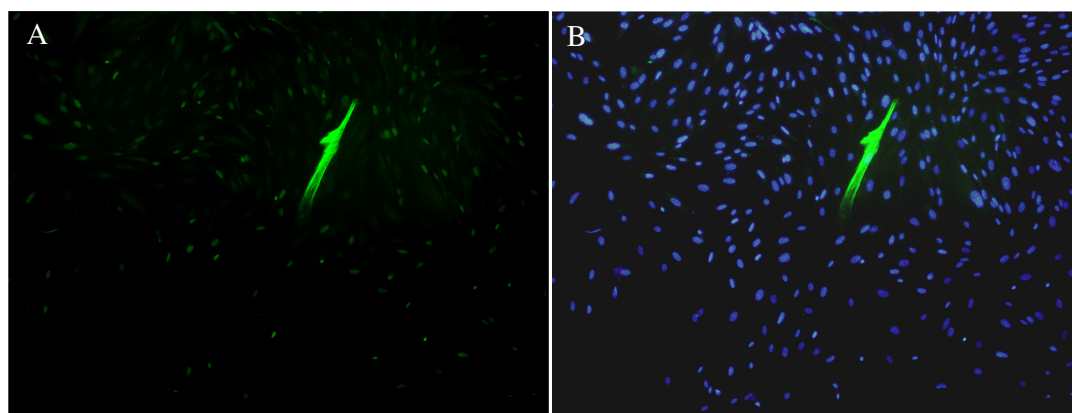
**Figura 15.** Mudanças morfológicas de células  $\beta$ -tubulina III positivas durante o tratamento com EGF. Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\beta$ -tubulina III, demonstrando que as células tornam-se mais alongadas e menores, assemelhando-se a células neurais, quando tratadas com EGF.



**Figura 16. Expressão de  $\alpha$ SMA nas CTDPs tratadas com FGF-2 e EGF.** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\alpha$ SMA, marcador de músculo liso. Em azul, marcação de núcleo com DAPI, em verde, células  $\alpha$ SMA e BrdU positivas. (A-B) Células não tratadas, (C-D) tratamento com 40 ng/ml de EGF e (E-F) 40 ng/ml de FGF-2, durante 5 dias. FGF: Fator de crescimento fibroblástico; EGF: fator de crescimento epidermal.



**Figura 17. Análise quantitativa da expressão de  $\alpha$ SMA nas CTDPs após o tratamento com FGF-2 e EGF.** (A) Representação gráfica da quantidade de células que expressaram  $\alpha$ SMA após tratamento com 5, 10, 20 e 40 ng/ml de EGF e (B) FGF-2. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de pelo menos 10 campos de cada condição de cultura em três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , por ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni.

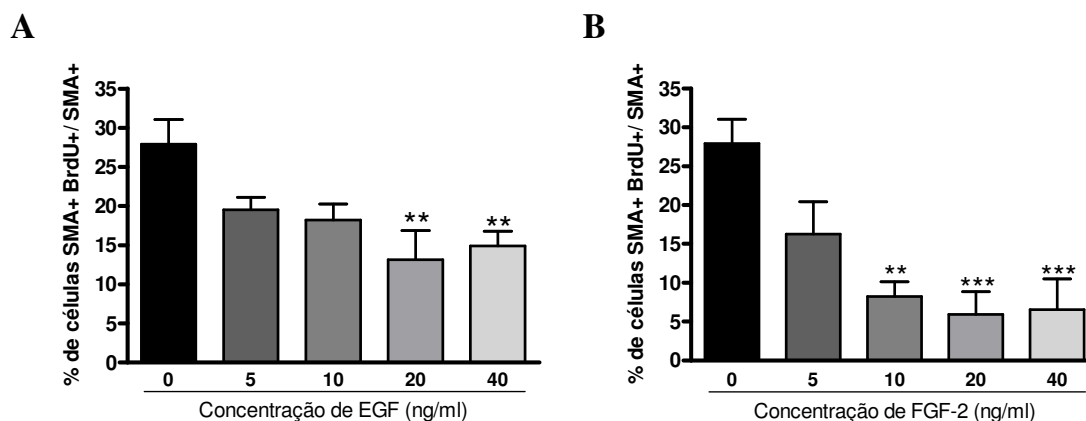


**Figura 18. Análise da expressão de  $\alpha$ SMA nas CTDs após o tratamento com FGF-2 e EGF juntos.** (A-B) Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\alpha$ SMA, marcador de músculo liso. Em azul, marcação de núcleo com DAPI, em verde, células  $\alpha$ SMA e BrdU positivas. (A-B) tratamento com 20 ng/ml de EGF + 20 ng/ml de FGF-2 durante 5 dias. (C) Representação gráfica da quantidade de células que expressaram  $\alpha$ SMA após tratamento com 10 ng/ml de EGF + FGF-2 e 20 ng/ml de EGF + EGF. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de pelo menos 10 campos de cada condição de cultura em três experimentos independentes. \*\*\* $p < 0,001$ , por ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni. FGF: Fator de crescimento fibroblástico; EGF: fator de crescimento epidermal;  $\alpha$ SMA: actina de músculo liso.

#### 4.2.4 Efeito do FGF-2 e EGF na proliferação das células de músculo liso ( $\alpha$ SMA positivas)

Tendo em vista esclarecer se o efeito do FGF-2 e EGF na expressão de células  $\alpha$ SMA positivas ocorre por meio de uma diminuição da proliferação deste fenótipo, fizemos a relação da proporção de células  $\alpha$ SMA positivas em proliferação ( $\alpha$ SMA+,BrdU+) com a proporção total deste fenótipo ( $\alpha$ SMA+) (Figura 19). Os valores obtidos revelaram que a proporção de células  $\alpha$ SMA positivas em proliferação diminui na presença dos fatores. No tratamento com o EGF houve uma diminuição, mas apenas na concentração de 20 ng/ml e 40 ng/ml houveram diferenças significativas em relação ao controle (Figura 19 A). A diminuição observada nestas duas condições foi em torno de 14%.

No tratamento com FGF-2, houve uma diminuição em torno de 20% nas culturas tratadas com 10, 20 e 40 ng/ml em relação ao controle (Figura 19 B), sendo que não observamos diferença significativa apenas na concentração de 5 ng/ml, apesar de ter ocorrido a diminuição.



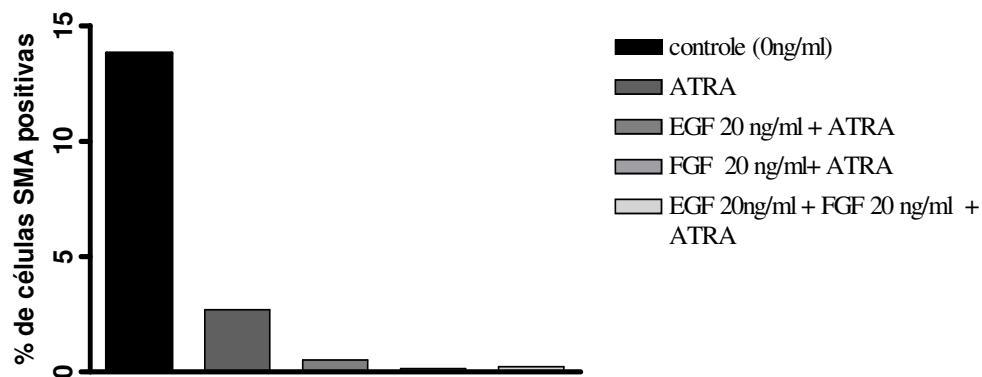
**Figura 19. Análise quantitativa da proliferação das células  $\alpha$ SMA positivas após tratamento com EGF e FGF-2 durante 5 dias.** (A) Representação gráfica da proporção de células  $\alpha$ SMA+ BrdU+ /  $\alpha$ SMA+ após tratamento com 5, 10, 20 e 40 ng/ml de EGF e (B) FGF-2. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de pelo menos 10 campos de cada condição de cultura em três experimentos independentes. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , por ANOVA de uma via seguido do teste de Bonferroni.

#### **4.2.5 Análise do efeito do pré-tratamento com FGF-2 e EGF no potencial de diferenciação das CTDPs**

Para verificar se o pré-tratamento com EGF e FGF-2 afetam o potencial de diferenciação das CTDPs, cultivamos as células durante quatro dias na presença de 20 ng/ml dos fatores separadamente e conjuntamente, e após este período o meio foi retirado e acrescentou-se meio suplementado com 1 $\mu$ M de ATRA, descrito como um indutor de diferenciação neural, durante um dia.

Nossos resultados demonstraram que em nenhuma das condições experimentais (apenas ATRA e pré-tratamento + ATRA) ocorreram mudanças em relação a expressão dos marcadores neurais,  $\beta$ -tubulina III e nestina, mantendo sempre um fenótipo 100% positivo para estes marcadores (dados não demonstrados).

Já o fenótipo de músculo liso ( $\alpha$ SMA) foi afetado pelo tratamento com ATRA, ocorrendo uma diminuição de 11% na expressão de células  $\alpha$ SMA positivas. Com o pré-tratamento com os fatores, tanto separados como juntos, houve uma diminuição maior (em torno de 13,5%), potencializando o efeito do ATRA. A proporção de células  $\alpha$ SMA positivas foi menor no pré-tratamento com FGF-2 (0,15%). Estes resultados experimentais são preliminares e foram obtidos de poucos experimentos, impossibilitando a realização de análise estatística.



**Figura 20. Análise quantitativa do efeito do pré-tratamento com FGF-2 e EGF nas células  $\alpha$ SMA positivas.** (A) Representação gráfica da quantidade de células  $\alpha$ SMA+ após o pré-tratamento com os fatores durante 4 dias, e o ATRA, durante 24 horas. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de pelo menos 10 campos de cada condição de cultura em um experimento.

#### 4.2.6 Efeito ao longo do tratamento do FGF-2 no potencial de diferenciação das CTDPs

Anteriormente demonstramos que o tratamento com FGF-2 e EGF afetou a população de células de músculo liso ( $\alpha$ SMA positivas), diminuindo a expressão deste fenótipo, assim como sua proliferação. Estes efeitos foram observados em CTDPs após cinco dias de tratamento com os fatores, sendo que o FGF-2 mostrou um efeito maior do que o EGF nesses processos. Em razão disto, investigamos a expressão dos marcadores neurais e de músculo liso em diferentes períodos das culturas tratadas com FGF-2: primeiro, terceiro e quinto dia.

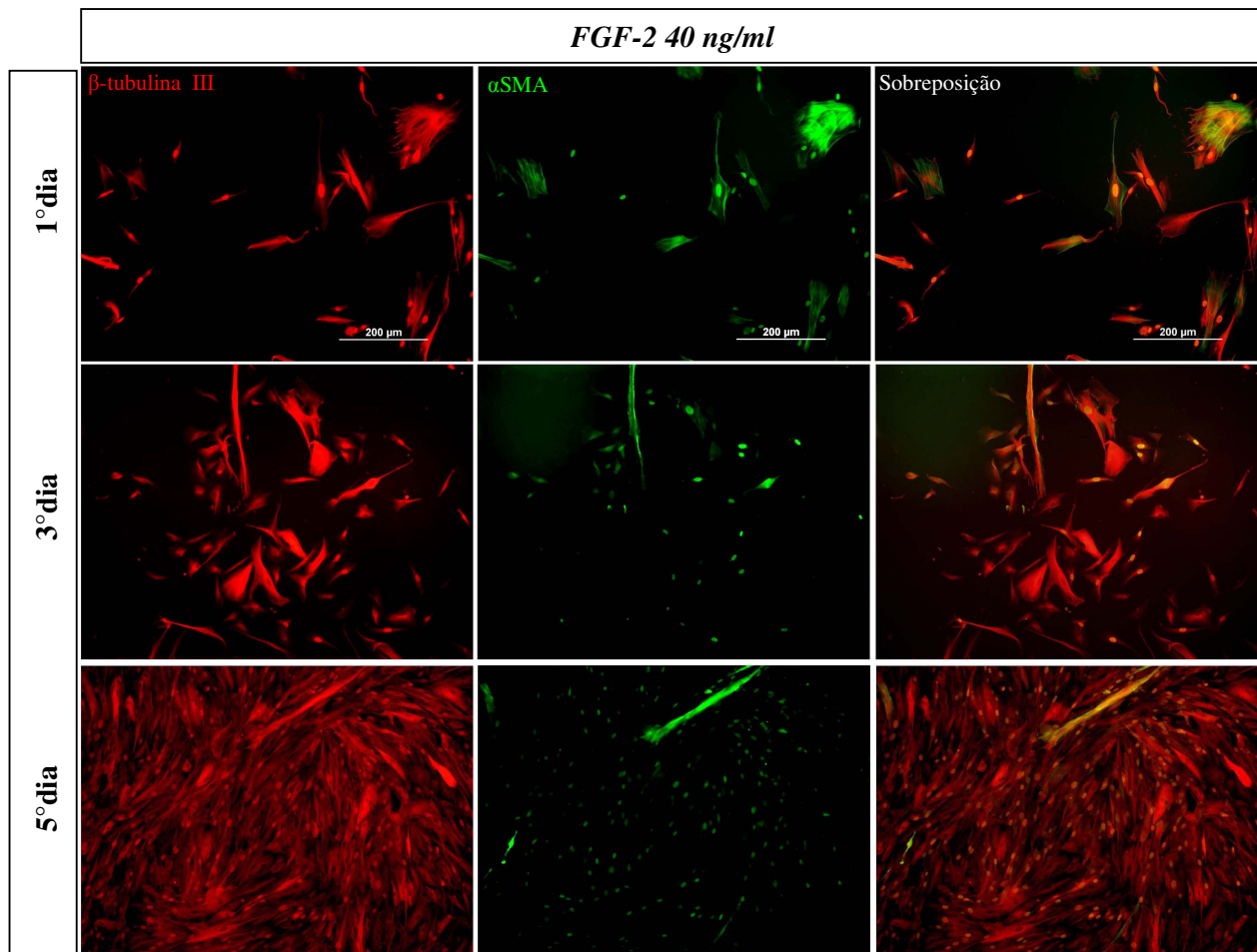
A expressão dos marcadores neurais,  $\beta$ -tubulina III e nestina, não foram afetadas ao longo do tempo, mantendo sempre 100% de células positivas para este fenótipo. No entanto, a população de células  $\alpha$ SMA positivas diminuiu no decorrer do tratamento (Figura 21). As CTDPs não tratadas com o fator de crescimento possuem uma expressão de 35,6% de células  $\alpha$ SMA positivas no primeiro dia, diminuindo essa expressão para 23% e 11,5%, no terceiro e



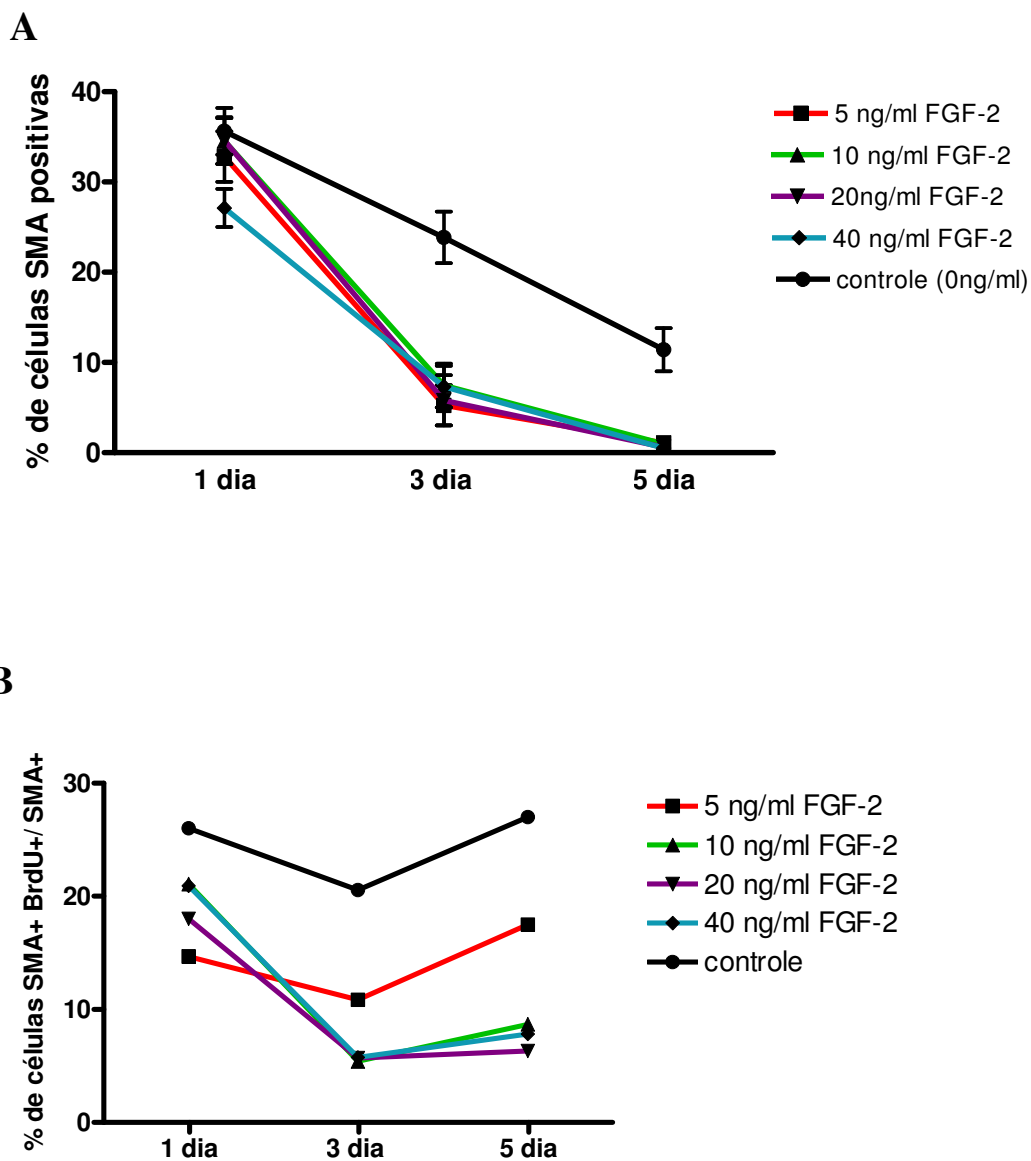
quinto dia de cultura, respectivamente (Figura 22 A). Estes resultados demonstram que mesmo na ausência dos fatores de crescimento há uma diminuição na população de células  $\alpha$ SMA positivas.

Quando tratadas com as diferentes concentrações de FGF-2, esta diminuição na expressão de  $\alpha$ SMA é potencializada (Figura 22 A). Observamos que no início da cultura (primeiro dia) as células  $\alpha$ SMA positivas correspondem a 32,5%, 34,5%, 35% e 27% após o tratamento com 5, 10, 20, 40 ng/ml de FGF-2, respectivamente. Estas populações diminuem expressivamente, abrangendo aproximadamente 1 % das células ao final do tratamento (quinto dia).

Em relação à proliferação destas células  $\alpha$ SMA positivas no decorrer da cultura, observamos que no terceiro dia houve uma diminuição em relação ao controle em todas as concentrações de FGF-2 (Figura 22 B). Os efeitos mais significativos foram observados nas células tratadas com 10, 20 e 40 ng/ml (diminuição de 15%). No quinto dia as células não tratadas e as mantidas com apenas 5 ng/ml de FGF-2 demonstram uma tendência a recuperar a proliferação celular, enquanto que o tratamento com as concentrações maiores mantém as células em um estado de baixa proliferação. Estes resultados sugerem que a proporção de células  $\alpha$ SMA positivas em proliferação no primeiro dia de cultura, sem os fatores de crescimento, é de 26% e que ao final do tratamento com 40 ng/ml de FGF-2 esta taxa diminui para 7%.



**Figura 21. Efeito do FGF-2 no potencial de diferenciação das CTDPs, no decorrer da cultura.** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\beta$ -tubulina III (vermelho),  $\alpha$ SMA (verde), BrdU (núcleos verdes) em diferentes períodos da cultura (1°, 3° e 5° dia), nas CTDPs mantidas com 40 ng/ml de FGF-2. Observa-se uma grande diminuição da quantidade de células  $\alpha$ SMA positivas ao longo do tratamento. A expressão de  $\beta$ -tubulina III não é afetada.



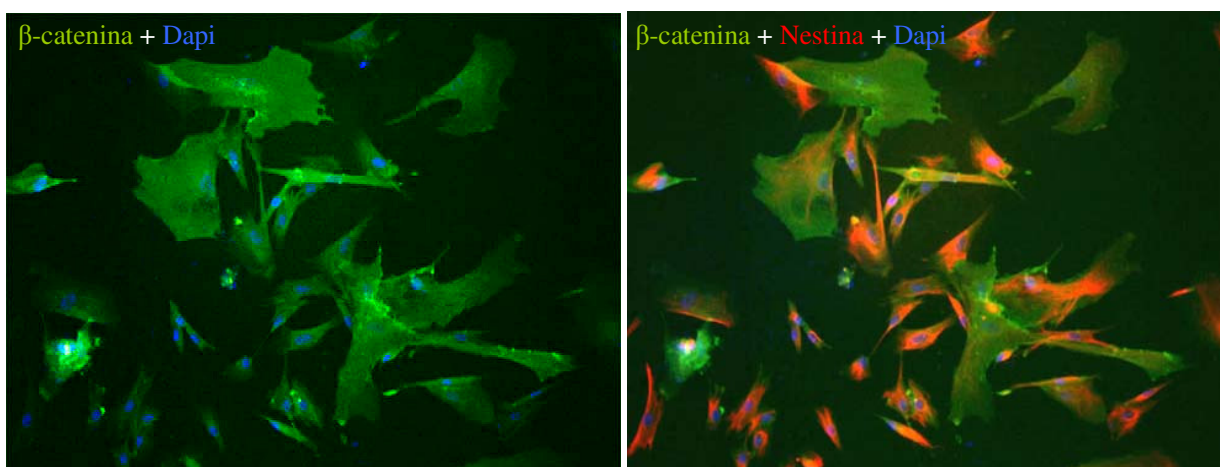
**Figura 22. Análise quantitativa da expressão e proliferação das células  $\alpha$ SMA positivas no decorrer do tratamento com FGF-2.** (A) Representação gráfica da quantidade de células  $\alpha$ SMA positivas no primeiro, terceiro e quinto dia após tratamento com 5, 10, 20 e 40 ng/ml de FGF-2. (B) Representação gráfica da proporção de células  $\alpha$ SMA+ BrdU+ /  $\alpha$ SMA+ no primeiro, terceiro e quinto após tratamento com 5, 10, 20 e 40 ng/ml de FGF-2. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de pelo menos 10 campos de cada condição de cultura em dois experimentos independentes.

### 4.3 EFEITOS DA SINALIZAÇÃO DE WNT, MIMETIZADA PELO CLORETO DE LÍTIU, NAS CTs DERIVADAS DA PLACENTA

#### 4.3.1 Avaliação da ação do Cloreto de lítio na ativação da $\beta$ -catenina nas CTDPs

Sabe-se que a aplicação do  $\text{LiCl}_2$  é usada para mimetizar a sinalização de Wnt e consequentemente promover a translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo. Para avaliar este efeito nas CTDPs, as células foram mantidas em meio contendo 20mM de  $\text{LiCl}_2$  durante 24 horas, e após este período analisamos a expressão de  $\beta$ -catenina, através de imunocitoquímica.

Nossos resultados demonstraram que a expressão da  $\beta$ -catenina após a aplicação do  $\text{LiCl}_2$  era citoplasmática, assim como no controle (células não tratadas)(Figura 23). Isso indica que o cloreto de lítio não ocasionou a translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo, ou seja, não mimetizou a sinalização de Wnt em nossas condições experimentais. Além disso, observamos que há uma redução no número de células, indicando que o cloreto de lítio pode estar induzindo a morte das CTDPs.

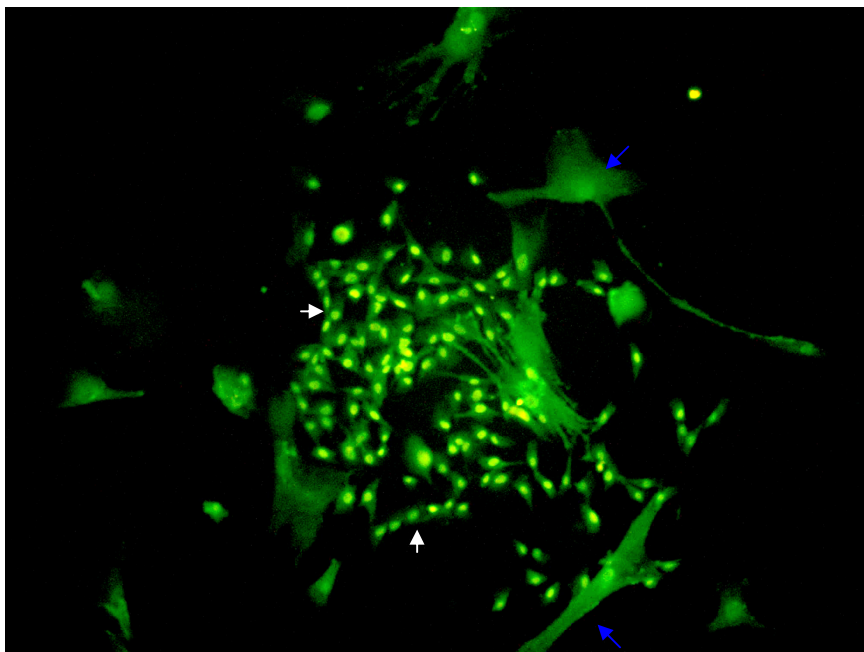


**Figura 23. Localização citoplasmática da  $\beta$ -catenina nas CTDPs tratadas com Cloreto de Lítio.** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\beta$ -catenina (verde) e nestina (vermelho) nas CTDPs tratadas com  $\text{LiCl}_2$ , durante 24 horas. As CTDPs possuem uma expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina, demonstrando que o tratamento não foi eficiente em ocasionar a translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo.

#### 4.3.2 Efeito da ativação da $\beta$ -catenina na diferenciação as CTMs

Anteriormente demonstramos que o cloreto de lítio não foi eficiente em ativar a  $\beta$ -catenina (translocação para o núcleo) nas CTDPs. Observamos então, a influência do EGF e FGF-2 separadamente neste processo.

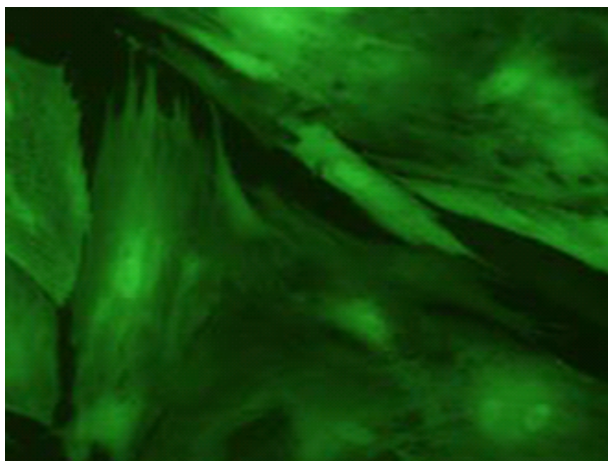
Em geral nas CTDPs tratadas com EGF e FGF-2 a expressão de  $\beta$ -catenina era citoplasmática. Entretanto, observamos em um experimento isolado que estes fatores, principalmente o EGF, foram eficientes em ativar a  $\beta$ -catenina (Figura 24). Esta translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo ocorreu apenas na subpopulação de células distintas observadas na figura 14, que são menores e mais arredondadas, e surgem quando as CTDPs são tratadas com os fatores de crescimento. Este resultado sugere que a ativação da  $\beta$ -catenina pode estar relacionada apenas com subpopulações alvo específicas de CTDP.



**Figura 24. Translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo nas CTDPs após tratamento com os FGF-2 e EGF (em experimento isolado).** Fotografias representativas de imunofluorescência para  $\beta$ -catenina (verde) em CTDPs tratadas com EGF e FGF-2 durante 5 dias. Uma subpopulação de células apresenta uma expressão nuclear de  $\beta$ -catenina (seta branca), demonstrando que o tratamento com os fatores de crescimento foi eficiente em ocasionar a translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo. Setas azuis: células com expressão citoplasmática de  $\beta$ -catenina.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE CTs DERIVADAS DA PLACENTA “GFP” POSITIVAS

Com o objetivo de obter células GFP positivas, para futuros experimentos *in vivo*, padronizamos a técnica de transfecção do plasmídeo GFP. Obtivemos células GFP positivas, entretanto o método de transfecção através de lipofectamina não foi muito eficiente, obtendo-se em torno de 30% de células GFP positivas, além de ocasionar morte celular.



**Figura 25.** Células tronco derivadas da placenta GFP positivas. Fotografia representativa de CTDPs transfectadas com o plasmídeo GFP.

## 5. DISCUSSÃO

A possibilidade de identificação de novas fontes de células tronco mesenquimais capazes de gerar diferentes tipos celulares é o interesse primário para abordagens terapêuticas que visam o reparo de lesões em diferentes tecidos (BERTANI *et al.*, 2005). A célula ideal deve exibir determinadas propriedades, incluindo: (1) um alto nível de proliferação *in vitro*, permitindo a produção de um grande número de células a partir de uma quantidade mínima do material doador; (2) um bom controle de sua atividade proliferativa *in vivo*, evitando a formação de tumores; e (3) principalmente uma plasticidade fenotípica, permitindo a diferenciação em diversas linhagens celulares (WISLET-GENDEBIEN, 2003).

Estudos recentes vêm comprovando a hipótese de que todos os tecidos e órgãos possuem CTMs (MEIRELLES L.S *et al.*, 2006; 2008). Zhang e colaboradores (2003) demonstraram que a placenta humana é uma fonte promissora de CTMs, podendo ser isoladas e expandidas facilmente *in vitro*. Nossos resultados são consistentes com as observações descritas no trabalho citado acima, demonstrando que as CTDPs possuem morfologia fibroblastóide, capacidade de manter-se em cultura por muito tempo e são facilmente isoladas pelo método de adesão ao plástico descrito por Friedenstein em 1968. Em nosso trabalho não verificamos se ocorreu contaminação com células de origem materna durante a coleta da porção da placenta localizada na região fetal. Contudo, estudos demonstram que CTMs da placenta humana têm sido isoladas tanto da região fetal como da região materna, possuindo as mesmas características e potencialidades (PIETERNELLA *et al.*, 2004).

Através de diferentes métodos de detecção baseados na morfologia e na proliferação em cultura, além da imunofenotipagem e expressão gênica, demonstramos a presença de CTMs nas culturas obtidas de placenta humana. Estas células têm sido caracterizadas como

células indiferenciadas e imaturas, mas também como células multidiferenciadas, pois expressam marcadores de diferentes tecidos (TONDREAU *et al.*, 2004). Nossos resultados são consistentes com esta caracterização, visto que observamos a expressão de marcadores de células indiferenciadas, como OCT-4 e nanog. Além disso, as CTDPs possuem expressão de CD90, marcador de CTM, e são negativas para marcadores endoteliais, como CD 31 e VE-caderina, que não são expressos em CTMs. O estado multidiferenciado das CTMs foi comprovado pela co-expressão de marcadores neurais ( $\beta$ -tubulina III, nestina, NF, Map-2) e de músculo liso ( $\alpha$ SMA) sem estimulação com fatores específicos. De fato, tem sido relatado que as CTMs da medula óssea possuem a capacidade de expressar marcadores de células diferenciadas, inclusive neural, sendo que esta pode estar associada com seu potencial de diferenciação nesta linhagem (GOODWIN *et al.*, 2001). Esta habilidade das CTMs em expressar marcadores de células indiferenciadas e diferenciadas sem indução pode explicar sua plasticidade em se diferenciar facilmente em vários tipos celulares, tanto mesodermiais quanto endodermiais e ectodermiais.

A expressão de  $\alpha$ SMA e nestina pode estar relacionada com o potencial de diferenciação das CTDPs em linhagens diferenciadas, mas pode também indicar o nicho destas CTDPs. Como relatado anteriormente, estudos vem demonstrando que as células perivasculares possuem características de CTMs, tendo capacidade de se diferenciarem em tipos celulares mesenquimais *in vitro* e *in vivo*, dando origem a adipócitos, condrócitos e osteócitos, além de possuírem marcadores de células mesenquimais e morfologia semelhante a estas. As células perivasculares, como os pericitos, expressam marcadores como nestina e  $\alpha$ SMA e não expressam CD31 (MEIRELLES *et al.*, 2008). As CTDPs obtidas em nosso estudo possuem esse fenótipo, sugerindo que a expressão destes marcadores pode estar associada com seu nicho, corroborando a hipótese de que as CTMs são células perivasculares, e por isso podem ser isoladas de todos os tecidos e órgãos.



## 5.1 EFEITO DO FGF-2 E EGF NAS CTDPs

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação das CTMs, contudo, a presença de fatores de crescimento é descrita como um fator importante neste processo. Determinados fatores de crescimento são descritos como proteínas multifuncionais que possuem um importante papel em diversos aspectos do desenvolvimento embrionário e da homeostase no organismo adulto. Esses fatores possuem várias funções em diferentes células, e um efeito diferente é obtido dependendo da concentração, do ambiente, ou do estágio celular (NARITA *et al.*, 2008). Já é bem documentado que os fatores FGF-2 e EGF estão envolvidos em inúmeros processos biológicos e afetam diversos tipos de células, entretanto, os efeitos na diferenciação e proliferação nas CTDPs ainda não são totalmente esclarecidos e consistentes.

Neste trabalho demonstramos que os fatores de crescimento FGF-2 e EGF exercem um importante papel na proliferação e diferenciação das CTDPs. O FGF-2 é um importante fator de crescimento para expansão de CTMs obtidas da medula óssea, além de CT embrionárias. A adição de FGF-2 tem demonstrado um aumento na taxa de crescimento e sobrevivência das CTMs de diferentes espécies, sendo que o bloqueio do seu receptor ocasiona a diminuição da proliferação (FELICIA *et al.*, 2008). Nossos resultados confirmam o fato de que a sinalização de FGF-2 é essencial para a proliferação das CTMs, pois demonstramos que as CTDPs aumentam a taxa de proliferação no início da cultura quando tratadas com este fator. No quinto dia de cultura esta taxa diminui, podendo ser resultado da ausência do fator no meio, já que o FGF-2 é acrescentado apenas no primeiro dia do tratamento.

Além do FGF-2, muitos estudos tem sugerido que o EGF também pode promover a proliferação celular (CÁRCAMO-ORIVE *et al.*, 2008). TAO GENG (2008) demonstrou que

o EGF tem um grande efeito no aumento da proliferação das CTMs. Considerando estes dados, o esperado em nossos resultados seria um grande aumento da proliferação das CTDPs tratadas com EGF, como ocorreu no tratamento com FGF-2. Entretanto, observamos um pequeno aumento no início da cultura, sendo que no quinto dia a proliferação das CTDPs tratadas foi menor do que no controle. De fato, trabalhos têm relatado que CTMs derivadas do tecido adiposo, mantidas em DMEN suplementado apenas com EGF, não aumentam sua taxa de proliferação em resposta a este fator de crescimento (BAER *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o EGF pode estar envolvido em outros processos, como na diferenciação celular.

Colter *et al.* (2001) demonstraram que as culturas de CTMs da medula são morfológicamente heterogêneas, contendo células extremamente pequenas que possuem um alto potencial de proliferação. Nosso estudo comprovou a presença destas células menores no tratamento com FGF-2, no qual as CTDPs mostraram mudanças morfológicas (avaliadas visualmente) resultando neste tipo celular e apresentando adesão focal ao substrato. Estas mudanças na forma da célula provavelmente são provenientes da reorganização do citoesqueleto, provocada pela cascata de sinalização decorrente da ativação do receptor (GENG *et al.* 2008). Estes resultados sugerem que estas células pequenas podem estar relacionadas com o potencial proliferativo, já que no tratamento com FGF-2 foi observado este tipo celular e uma maior taxa de proliferação.

A progressão de células indiferenciadas para células diferenciadas, e também o contrário, envolve a ativação ou supressão de determinados padrões de sinalização. Estes padrões podem ser específicos para uma linhagem ou podem ser importantes para o processo de diferenciação em geral. Em nosso estudo, o efeito do padrão de sinalização ocasionado pelo FGF-2 e EGF na diferenciação das CTDPs demonstra que estes efeitos parecem estar envolvidos principalmente com a linhagem de células  $\alpha$ SMA positivas. É importante

ressaltar que avaliamos apenas duas linhagens celulares diferenciadas (células neurais e músculo liso) e uma linhagem celular indiferenciada e/ou progenitor neural.

A expressão de nestina e  $\beta$ -tubulina III em muitos trabalhos têm sido utilizadas para demonstrar a diferenciação neural das CTMs (SANCHEZ-RAMOS *et al.*, 2002). Em nosso estudo, não relacionamos estas marcações com a diferenciação neural pelo fato de não termos avaliado a funcionalidade (exitabilidade) das células que expressaram estes marcadores e estas células não possuem, de modo geral, características morfológicas de células neurais. Contudo, relacionamos a marcação de nestina e  $\beta$ -tubulina III nas CTDPs ao seu potencial de diferenciação neste fenótipo (comprometimento). Muitos estudos têm sido contrários a afirmação de que as CT podem se diferenciar em neurônios (DONALD *et al.*, 2008). Estes criticam a análise baseada apenas na morfologia e na expressão de marcadores, já que muitos utilizam substâncias antioxidantes ou químicas, como DMSO e  $\beta$ -mercaptoetanol que, segundo Neuhuber *et al.* (2004), promovem mudanças morfológicas pela retração no citoplasma celular através da disrupção da rede de actina e não pelo crescimento de neuritos como observado em neurônios. Estas observações foram substanciadas por Lu *et al.* (2004), que demonstraram uma indução neural nas CTMs, assim como em fibroblastos e queratinócitos, quando expostos a agentes estressantes (como detergente, alto pH e alta molaridade de cloreto de sódio). Vários estudos têm utilizado métodos mais consistentes para avaliar este processo, como a expressão de receptores e transportadores de glutamato, proteínas de vesícula sináptica e receptores neurotróficos, mas evidências definitivas para a transdiferenciação das CTMs em neurônios ainda não foram determinadas (DONALD *et al.*, 2008).

Contrariamente, estudos revelaram que há uma *up-regulation* de map-2, GFAP e tirosina hidroxilase nas CTMs após 5 passagens *in vitro*, sem induções específicas, evidenciando uma diferenciação em neurônios e astrócitos (TONDREAU *et al.*, 2004). Além

disso, a expressão de nestina tem sido citada como uma evidência da existência de um “pool” de progenitores neurais dentro da medula óssea. Por exemplo, somente as células nestina positivas, quando induzidas em meios específicos, são capazes de se diferenciar em neurônios, formar agregados semelhantes à neuroesferas ou se diferenciar em neurônios após co-cultura com neurônios granulares cerebelares. Uma das dificuldades em associar a expressão de nestina com a diferenciação neural é o fato de que esta proteína não é restrita ao tecido neural, mas também é expressa em uma variedade de tipos celulares mesodermiais (DONALD *et al.*, 2008). Por exemplo, a nestina é um componente integral da rede de filamentos intermediários formado durante o desenvolvimento do músculo e copolimeriza com vimentina e desmina. Além disso, é expressa também em mioblastos esqueléticos durante a regeneração do músculo e em células endoteliais durante o desenvolvimento e em adultos. Similarmente, GFAP e NF são expressos em vários tecidos conjuntivos, incluindo cartilagem e fibroblastos. O principal questionamento em relação à expressão de nestina é se esta representa um marcador de progenitores mesodermiais ou neurais (DONALD *et al.*, 2008). Estudos futuros são necessários para revelar a verdadeira natureza da expressão de nestina, para que a avaliação da diferenciação neural possa ser realizada de forma mais segura.

Em nosso estudo observamos que o FGF-2 e o EGF nas CTDPs parecem manter as células com características mais imaturas, ou seja, mais indiferenciadas. Esta hipótese pode ser substantiada através de nossas observações, que demonstram que a quantidade de células que expressam  $\alpha$ SMA diminuem bruscamente com a presença dos fatores, sendo que em alguns experimentos abrangem menos de 1% da população. As células não tratadas com os fatores também demonstram uma queda na expressão de  $\alpha$ SMA, evidenciando que as CTDPs já possuem intrinsicamente uma tendência a diminuir a quantidade deste tipo celular. Além disso, a expressão de nestina, considerada por muitos autores como sendo marcador de

células tronco (progenitor neural ou progenitor mesodermal), é mantida durante todo o tratamento.

Determinamos algumas hipóteses que poderiam explicar a diminuição das células  $\alpha$ SMA positivas: (1) morte celular, (2) diminuição da proliferação e (3) desdiferenciação celular. Apesar da morte celular não ser avaliada quantitativamente, não observamos através da marcação nuclear com Dapi, a presença de núcleos apoptóticos nas células  $\alpha$ SMA positivas. Este dado não corrobora a hipótese da morte celular. Em relação à proliferação das células  $\alpha$ SMA positivas, observamos que esta diminui na presença dos fatores de crescimento. De forma interessante, a maior diminuição da proliferação destas células, no terceiro dia de cultura, é coincidente com o pico de proliferação da população total das CTDPs. Isto indica que a população de células negativas são estimuladas a proliferar em resposta aos fatores, enquanto que as células que expressam  $\alpha$ SMA apresentam uma taxa menor de proliferação. Estes resultados validam a hipótese da diminuição da população de células  $\alpha$ SMA positivas ser resultante de uma diminuição da proliferação destas células.

Outra hipótese é a de que as células  $\alpha$ SMA positivas entram em um processo de desdiferenciação, no qual há uma perda do estado diferenciado. Em nossas culturas as células que possuem expressão de  $\alpha$ SMA co-expressam  $\beta$ -tubulina III e nestina, sendo assim, através deste processo, as células deixariam de expressar apenas  $\alpha$ SMA e a expressão dos outros marcadores seria mantida.

Strakova *et al.* (2008), em seu recente trabalho que descreve as propriedades multipotentes de miofibroblasto derivados da placenta humana, sugere que a expressão de  $\alpha$ SMA esta relacionada com a morfologia destas células em cultura, ou seja, com mudanças no citoesqueleto. Eles não detectaram a expressão de  $\alpha$ SMA em células pequenas e alongadas, mas a expressão desta proteína aumentava e as fibras de actina apareciam quando as células adquiriam uma morfologia achatada. Em nosso estudo, as culturas tratadas com

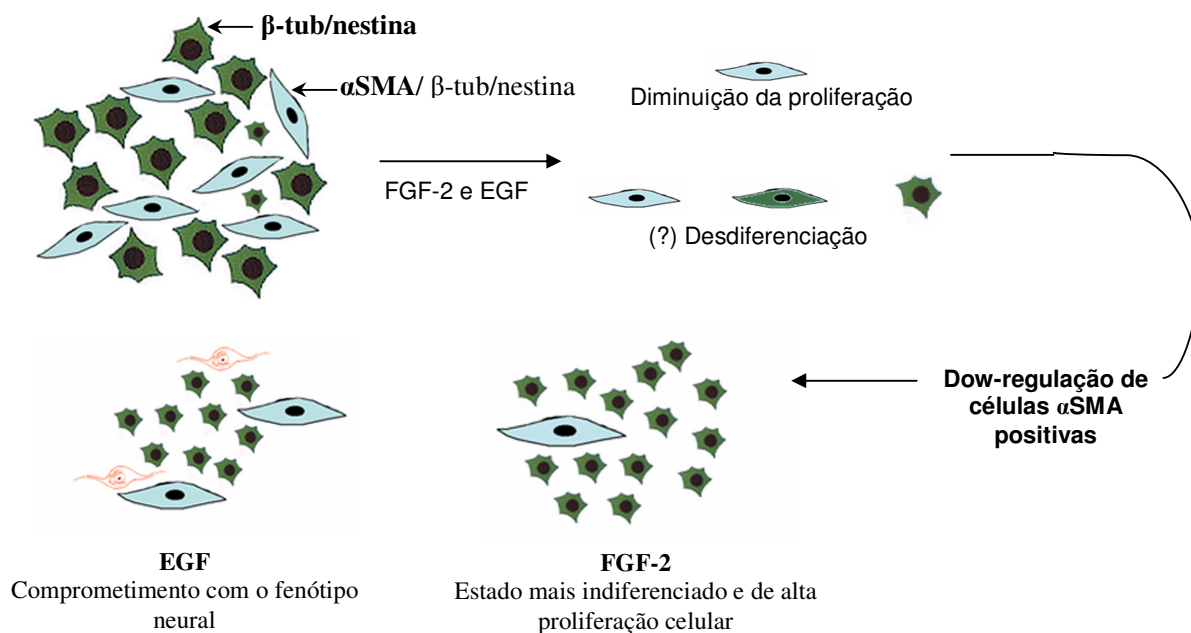
FGF-2 e EGF apresentam uma subpopulação de células pequenas que não possuem expressão de  $\alpha$ SMA. Ao contrário do trabalho citado acima, que adquire expressão de  $\alpha$ SMA com as mudanças morfológicas (quando se tornam achatadas), em nossas culturas, as células podem deixar de expressar  $\alpha$ SMA através deste mesmo mecanismo (quando se tornam pequenas e arredondadas).

Em geral, estudos tem relato que o padrão ERK-MAPK exerce um efeito anti-miogênico nas CTMs (TAMAMA *et al.*, 2008). Entretanto, estudos contrastantes sugerem que este padrão pode exercer também um efeito pró-miogênico. Por exemplo, o tratamento com PDGF promove a diferenciação de determinados progenitores em células de músculo liso, através de um padrão ERK-MAPK fortemente ativado (TAMAMA *et al.*, 2008). O TGF- $\beta$  aumenta a expressão de  $\alpha$ SMA, exercendo uma *up-regulation* deste fenótipo nas CTMs obtidas de medula óssea (NARITA *et al.*, 2008).

Nos tratamentos de CTDPs com DMSO foi descrito uma *dow-regulation* da expressão de  $\alpha$ SMA (STRAKOVA *et al.*, 2008). Uma transição similar para a perda do estado diferenciado após tratamento com DMSO já havia sido descrito em miofibroblastos originados nas CTMs obtidas de medula óssea, sugerindo sua influencia na regulação deste processo (HEGNER *et al.*, 2005). Assim como estes agentes de diferenciação, demonstramos que o ATRA também diminui a expressão de  $\alpha$ SMA, e que esta diminuição é potencializada quando há o pré-tratamento com os fatores de crescimento. Como o tratamento com o ATRA, descrito como um agente de diferenciação neural, diminui a expressão de  $\alpha$ SMA, temos que considerar também que esta diminuição pode indicar que as células estão se comprometendo com a linhagem neural.

Baseado em todos estes argumentos e na literatura, criamos um modelo para explicar os possíveis efeitos dos fatores de crescimento nas CTDPs (Figura 26). Observamos que no tratamento com FGF-2, ocorre a diminuição da expressão de um marcador de célula

diferenciada ( $\alpha$ SMA), juntamente com um aumento na proliferação celular. Estes dados são consistentes com trabalhos que afirmam que o FGF-2 é um ótimo candidato para a manutenção das CTMs, mantendo-as em um estado indiferenciado e de alta proliferação. Já o tratamento com EGF não aumentou a proliferação celular e teve um efeito menor na diminuição de  $\alpha$ SMA quando comparada ao FGF-2. Além disso, o EGF afetou algumas células tornando-as mais alongadas, com morfologia semelhante a neural. Em razão disso, sugerimos que o EGF, além de manter as células em um estado mais indiferenciado, pode estar comprometendo as células para um fenótipo neural, sendo que trabalhos relatam grande influência deste fator nesta diferenciação (BOSSOLASCO *et al.*, 2005). Precisamos considerar que, dentre a população de células tratadas com os fatores de crescimento, pode haver células comprometidas com linhagens celulares não analisadas neste trabalho.



**Figura 26.** Modelo esquemático do efeito do FGF-2 e EGF nas CTDPs.

## 5.2 EFEITOS DA SINALIZAÇÃO DE Wnt, MIMETIZADA PELO CLORETO DE LÍTIU, NAS CTs DERIVADAS DA PLACENTA

A sinalização de Wnt mimetizada pelo cloreto de lítio já é bem descrita na literatura. O lítio afeta o desenvolvimento de vários organismos, produzindo fenótipos consistentes com a estimulação da sinalização canônica de Wnt (ETHERIDGE *et al.*, 2004). Recentemente, as proteínas Wnt isoladas para estudos têm demonstrado ausência de bioatividade, e conseqüentemente, o lítio tem sido usado para mimetizar sua sinalização. Entretanto, o lítio também afeta outras vias como, por exemplo, a inibição da enzima monofosfatase inositol (IMPase), causando redução dos níveis de inositol 3-fosfato. Alguns trabalhos relatam que a inibição da IMPase pelo lítio não afeta os processos durante o desenvolvimento, mas isso ainda não está totalmente esclarecido (GREGORY *et al.*, 2005).

Gregory *et al.* (2005), demonstraram que a proliferação celular das CTMs tratadas com 10-15 mM de lítio é afetada, ocorrendo uma redução na taxa de divisão celular. Concentrações acima de 20 mM ocasionaram morte celular de toda população após 7 dias de cultura. Nossos resultados são consistentes com estes dados, já que também observamos uma redução na população de CTDPs, tratadas com 20 mM de LiCl<sub>2</sub>, o que sugere que esta concentração induz um processo de morte celular. Apesar de alguns estudos relatarem morte celular com 20 mM de LiCl<sub>2</sub>, alguns tratamentos não respondem da mesma maneira, demonstrando que as células proliferam e possuem ativação de  $\beta$ -catenina nesta concentração (ETHERIDGE *et al.*, 2004).

A utilização de LiCl<sub>2</sub> para mimetizar a sinalização de Wnt é controversa. Vários estudos relatam que o lítio é capaz de provocar a translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo, enquanto em outros tal efeito não é observado. Em nosso trabalho, além de ocasionar morte celular, o tratamento com LiCl<sub>2</sub> não translocou a  $\beta$ -catenina para o núcleo. Estes efeitos



divergentes podem ser resultados dos diferentes métodos de obtenção e manutenção das CTMs, tempo de incubação com o lítio e passagem da cultura.

É provável que os inibidores da sinalização de Wnt mantenham o estado indiferenciado das CTMs. Tem sido mostrado que a ausência desta sinalização inibe a diferenciação de precursores osteogênicos em osteoblastos em vários sistemas (GREGORY *et al.*, 2005). Sua sinalização está relacionada com a diferenciação mesenquimal, como, por exemplo, a indução miogênica (MERMELSTEIN *et al.*, 2007), além de promover proliferação e diferenciação condrogênica. A ausência de ativação da  $\beta$ -catenina demonstrada em nosso trabalho, tanto no tratamento com  $\text{LiCl}_2$ , quanto com os fatores de crescimento, pode indicar que as CTDPs permanecem em um estado indiferenciado. Em um resultado isolado, as CTDPs tratadas com os fatores de crescimento (principalmente EGF), mostraram uma translocação da  $\beta$ -catenina para o núcleo, indicando que estas células podem estar se comprometendo com alguma linhagem celular diferenciada. Como estas células expressavam nestina e  $\beta$ -tubulina III, sugerimos que este comprometimento pode estar relacionado com o fenótipo neural.

## 6. CONCLUSÕES

1) As células isoladas da placenta humana são células tronco mesenquimais. Caracterizadas pela expressão de marcadores de CTs, pelo estado multidiferenciado, morfologia e alto potencial proliferativo.

2) As CTDPs tratadas com os fatores de crescimento apresentam uma subpopulação distinta de células, relacionadas com uma alta proliferação celular. Esta subpopulação é encontrada facilmente nas células tratadas com FGF-2.

3) O FGF-2 aumenta a proliferação celular.

4) Os fatores de crescimento FGF-2 e EGF reduzem a expressão de células  $\alpha$ SMA positivas. Esta redução é resultante da diminuição da proliferação das  $\alpha$ SMA positivas.

5) O co-tratamento com FGF-2 e EGF potencializam a diminuição das células  $\alpha$ SMA positivas.

6) O pré-tratamento das CTDPs com FGF-2 e EGF parece potencializar o efeito do ATRA na diminuição das células  $\alpha$ SMA positivas.

7) As CTDPs tratadas com EGF demonstram mudanças morfológicas nas células  $\beta$ -tubulina III positivas, tornando-as mais alongadas, semelhantes a células neurais.

8) O cloreto de lítio não ocasionou a translocação da  $\beta$ -catenina do citoplasma para o núcleo.

9) Nossa hipótese é de que o FGF-2 mantém as células em um estado mais indiferenciado e com alto potencial proliferativo, enquanto o EGF estaria comprometendo as células para um fenótipo neural.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIVA, J. M., DALE, W. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **J. Cell. Mol. Méd.**, 12(3) 730-742, 2008.

ALVAREZ-SILVA, M. *et al.* Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development.**, 130(22):5437-44, 2003.

ANKER, P.S. *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, 102:1548 –1549, 2003.

BAER,P.C.*et al.*, Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. **Eur.J.CellBiol.** (2009)

BATTULA V.L. *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. **Differentiation**, 75:279–291, 2007.

BERTANI N. *et al.* Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. **Journal of cell Science**, 118: 3925-3936, 2005.

BIANCO P.; ROBEY, P.G; SIMMONS P.J. Mesenchymal Stem Cells:Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, 2: 313-319, 2008.

BOSSOLASCO *et al.* Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in Vitro. **Exp. Neurology**, 193:312-325, 2005.

BRAUN K.M. *et al.* Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: Visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. **Development**, 130:5241–5255, 2003.

BRAZELTON, T.R.; ROSSI, F.M.V.; KESHET,G.L.; BLAU, H.M. From marrow to brain: expression of neural phenotypes in adult mice. *Science* , 290:1775-1779, 2000.

CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* ,98:2396 –2402, 2001.

CAMPARD, D *et al.* Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. [Gastroenterology](#). 134(3):833-48, 2008.

CÁRCAMO-ORIVE, I. *et al.* ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Experimental Cells Research*, 314:1777 – 1788, 2008.

CETRULO, C. L.; CETRULO, K. J. Placental and Pregnancy Stem Cells Everyone Is, or Should Be, Interested in the Placenta. *Stem Cell Reviews*, 2: 79-80, 2006.

CHAMBERLAIN, G. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, 25:2739–2749, 2007.

CHOI S.C *et al.*, Fibroblast growth factor-2 an-4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells Dev*, 17(4):725-36, 2008.

CICCOLINIA *et al.* Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. *Developmental Biology*, 284:112-125, 2005.

COLTER, D.C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci*, 98:7841–7845, 2001.

CONGET, P.A.; MINGUELL J.J. Phenotypical and functional properties of

human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **J Cell Physiol**, 181:67–73, 1999.

COURA, G. S et al. Human periodontal ligament as a potential niche of neural crest stem cells. **Journal of Periodontal Research**, 435:31-36, 2008.

CROFT, A.P.; PRZYBORSKI, S.A. Formation of Neurons by Non-Neural Adult Stem Cells: Potential Mechanism Implicates an Artifact of Growth in Culture. **Stem Cells** , 24: 1841 – 1851, 2000

[DENG, J.](#) *et al.* Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. [Stem Cells](#), 4:1054-64, 2006.

DELRIEU I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): An insight into an intracrine mechanism. **FEBS Letters** . , 468: 6–10, 2000.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8:315–317, 2006.

DONOVAN, P.J.; GEARHART J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, 414:92-97, 2001.

DVORAK, P.; DVORAKOVA D.; HAMPL A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. **FEBS Letters**, 580 (12):2869-2874, 2006.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, 109:235–242, 2000.

ETHERIDGE, S.L *et al.* Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, 22:849-860, 2004.

FELICIA, N. *et al.* PDGF, TGF- $\beta$ , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. **Blood**, 112(2):295-307, 2008.

FILIP, S.; MOKRÝ, J.; ENGLISH, D.; VOJÁČEK, J. Stem Cell Plasticity and Issues of Stem Cell Therapy. **Folia Biologica (Praha)** , 51:180-187, 2005.

FRIEDENSTEIN A.J. *et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, 6(2):230-47, 1968.

GENG T. *et al.* Quantitative analysis of the responses of murine bone marrow mesenchymal stem cells to EGF, PDGF-BB and fibronectin by factorial design methodology. **Cytotechnology**, 58:93–101, 2008.

GOODWIN, H.S. *et al.* Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. **Biol Blood Marrow Transplant.**, 7(11):581-8, 2001.

GOULD E. *et al.* Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science**, 286:548–552, 1999.

GREGORY, C.A.; YLOSTAL, J.; PROCKOP, D.J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental “niches” in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. **Sci STKE**, 2005:pe37, 2005.

GREGORY, C.A. *et al.* Dkk-1-derived Synthetic Peptides and Lithium Chloride for the Control and Recovery of Adult Stem Cells from Bone Marrow. **J. Biol. Chem.**, 280(3): 2309-2323, 2005.

GRONTHOS S.; SIMMONS P.J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. **Blood**, 85:929–940, 1995.

GRONTHOS S. *et al.* Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone**, 28:174 –181, 2001.

GUPTA, P. Placenta: an alternative source of hematopoietic stem cells. **Indian Pediatr**, 34:655-656, 1997.

HANADA K.; DENNIS J.E.; CAPLAN A.I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res**, 12:1606–1614, 1997.

HEDGEPEETH, C.M. et al. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. **Development Biology**, 185:82–91, 1997.

HEGNER, B. *et al.* Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal Hypertens**, 23:1191-1202, 2005.

ILANCHERAN S.; MOODLEY Y.; MANUELPILLAI U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? **Placenta**, 30:2-10, 2009.

ITO T. *et al.* FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. **Cytotechnology**. 56(1): 1–7, 2008.

JAVAZON , E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. **Exp Hematol**, 32:414–425, 2004.

JIN, K. *et al.* Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors and patterns of intracellular expression. **Exp.Neurol.**, 184:78-89, 2003.

JORI, M.A. *et al.* Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. **J. Cell. Biochem**, 94: 645–655, 2005.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. *Histologia básica*. Nona edição, editora Guanabara Koogan, 1999.



KHUU, D.N.; NAJIMI, M.; SOKAL E.M.; Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? **World J Gastroenterol**, **13**:1554–1560, 2007.

KRAMPERA M. *et al.* Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. **Bone**, 40:382-90, 2007.

KRAMPERA M. *et al.* HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: Inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. **Blood**, 106:59–66, 2005.

KUZNETSOV, S.A. *et al.* Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol** , 153:1133–1140. 2001.

LEE, K.D. *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells, **Hepatology**, **40**:1275–1284, 2004.

LU, P.; BLESCH, A.; TUSZYNSKI, M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact. **J Neurosci. Res**, 77:174 –191, 2004.

MACKAY, A.M. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. **Tissue Eng**, 4:415– 428, 1998.

MARTINI, M.M *et al.* Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under appropriate niche conditions. **Submetido: Intern. Journal of Biochemistry & Cell Biology.**

MEIRELLES L.S.; CAPLAN A.I.; NARDI N.B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, 26(9): 2287 -2299, 2008.

MEIRELLES L.S.; CHAGASTELLES P.C.; NARDI N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, 119: 2204-2213, 2006.

MERMELSTEIN, C.S. *et al.* Wnt/  $\beta$ -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. **Differentiation**, 75:184-192, 2007.

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

MOHAMMADI M.; OLSEN S.K.; IBRAHIMI O.A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. ***Cytokine Growth Factor Rev***, 16: 107–137, 2005.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA R.; QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. ***J Cell Sci***,113:1161–1166, 2000.

NEUHUBER, B. *et al.* Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. ***J Neurosci Res***, 77:192–204, 2004.

NISHIKAWA S.I. *et al.* Niche Required for Inducing Quiescent Stem Cells. ***Cold Spring Harb Symp Quant Biol***. 2008.

NARITA *et al.* Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. ***Cell Tissue Res***, 333:449-459, 2008.

NOORT, W.A., *et al.* Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. ***Exp Hematol***, 30:870–878, 2002.

NORMANNO N. *et al.* Gefitinib inhibits the ability of human bone marrow stromal cells to induce osteoclast differentiation: implications for the pathogenesis and treatment of bone metastasis. ***Endocr Relat Cancer***, 12:471–482, 2005.

OWEN M; FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. ***Ciba Found Symp.***, 136:42-60,1988.

PAN, G.J *et al.* Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. **Cell Research**, 12(5-6):321-329, 2002.

PAROLINI, O. *et al.* Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, 26:300–311, 2008.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair.- Current Views. **Stem Cells**, 25:2896–2902, 2007

PITTENGER, M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143–147, 1999.

PIETERNELLA, S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cell**, 22:1338-1345, 2004

POWERS C.J.; MCLESKEY S.W.; WELLSTEIN A.. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-Related Cancer**, 7:165–197,2000.

RABIE, M. *et al.* Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 65(8):1640-1647, 2007.

SANCHEZ-RAMOS, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J Neurosci Res**, 69:880–893, 2002.

SANDERS, R.C. *et al.* Stem cell research. **Paediatr Respir Rev**, 7(2):135-140, 2006.

SONG S. *et al.* Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97:8658–8663, 2000.

STAMBOLIC, V.; RUEL, L.; WOODGETT JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. **Curr Biol**, 6:1664–1668, 1996.

STRAKOVA *et al.* Multipotential properties of myofibroblast cells derived from human placenta. **Cell Tissue Res.**, 332:479-488, 2008.

TAKASHIMA, S. *et al.* Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. **Cell Struct Funct**, 29:73– 84, 2004.

TAMAMA K. *et al.* Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells** , 24:686–695, 2006.

TAMAMA K. *et al.* [Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the smooth muscle lineage by blocking ERK/MAPK signaling pathway.](#) **Stem Cells Dev.**, 17(5):897-908, 2008.

TANAKA, E.M. Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. **Curr. Opin. Genet. Dev**, 13: 497-501, 2003.

TAO H. *et al.* Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. **Develop.Growth Differ.**, 47:423-433, 2005.

TAO, G. *et al.* Quantitative analysis of the responses of murine bone marrow mesenchymal stem cells to EGF, PDGF-BB and fibronectin by factorial design methodology. **Cytotechnology**, 58:93–101, 2008.

THOMSON, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, 282:1145, 1998.

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

VERFAILLIE CM. *et al.* Hematology—Basic Principles and Practice. Anatomy and physiology of hematopoiesis.. **Philadelphia: Churchill-Livingstone**, 3:139-154, 2000.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, 116:639–648, 2004.

WATT F.M; HOGAN B.L. Out of Eden: Stem cells and their niches. **Science**, 287:1427–1430, 2000.

WILLIAMS, J.T.*et al.* Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **Am Surg**, 65:22–26, 1999.

WISLET-GENDEBIEN, S *et al.* Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem cells**, 23(3):392-402, 2005.

WISLET-GENDEBIEN, S *et al.* Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, 116:3295-3302, 2003.

XIAN C.J. *et al.* Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. **Endocrine Reviews**, 28: 284-296, 2007.

ZHANG *et al.* Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. **Microbiol Immunol.**, 47(1):109-16, 2003.

ZHAO, P. *et al.* Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. **Transplantation**,79:528 –535, 2005.

ZUK, P.A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 7:211–228, 2001.



# 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](#)