

LEILA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DO CO-CULTIVO
DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E CÉLULAS
TRONCO-MESENQUIMAIS PARA REGENERAÇÃO
MIOCÁRDICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade
Católica do Paraná.

CURITIBA

2006

LEILA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DO CO-CULTIVO
DE CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS E CÉLULAS
TRONCO-MESENQUIMAIS PARA REGENERAÇÃO
MIOCÁRDICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Orientador: Prof. Doutor Luiz César Guarita Souza.
Diretor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Prof. Doutor Waldemiro Gremski.

CURITIBA

2006

O48a
2006

Oliveira, Leila de
Análise por citometria de fluxo do co-cultivo de células musculares esqueléticas e células tronco-mesenquimais para regeneração miocárdica / Leila de Oliveira ; orientador, Luiz César Guarita Souza. – 2006.
81 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2006
Inclui bibliografia

1. Células-tronco. 2. Células musculares. 3. Transplante de células.
4. Citometria de fluxo. 5. Miocárdio – Regeneração. I. Souza, Luiz César Guarita. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 22. ed. – 616.02774

**À minha família: meu Pai, minha Mãe e minha irmã.
Por todo amor, carinho e apoio que sempre recebi.**

Por tudo.

Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao **Professor Doutor Luiz César Guarita Souza**, meu orientador, por ceder seu tempo valioso e por seu inestimável auxílio.

Às Dr^{as}: **Prof^a. Mariester Malvezzi** e **Prof^a. Katherine Athayde T. Carvalho**, co-orientadoras, por compartilharem seus conhecimentos e por sábios conselhos.

À **Prof^a Márcia Olandoski**, por seu auxílio generoso e apoio sem preço.

Às minhas colegas do **Setor de Imunofenotipagem**, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, por seu auxílio, compreensão e paciência.

Aos meus colegas do Laboratório de Sorologia do Instituto de Hematologia e Hemoterapia do Paraná - **Hemepar**, por seu apoio e boa vontade inesgotáveis.

À equipe do **Laboratório Experimental de Cultivo Celular**, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por seu auxílio em vários aspectos deste projeto.

Aos colegas **Rossana Baggio Simeoni** e **Julio César Francisco**, por sua colaboração técnica imprescindível na realização deste projeto.

A **CAPES** e ao **SETI-PR**, agradeço pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

À **AMBRIEX S/A**, pela doação de anticorpo monoclonal, meu agradecimento.

Ao **Decano Prof. Alberto Accioly Veiga**, por possibilitar e incentivar a pesquisa científica na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, meus sinceros agradecimentos.

Aos **meus amigos**: próximos ou distantes estão sempre presentes em minha vida. Obrigada por todo carinho, apoio, compreensão e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

Deus os abençoe.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
SUMMARY	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	26
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5. RESULTADOS	34
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO 01 - ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	69
a. Células-tronco mononucleares	69
b. Células musculares esqueléticas:.....	73
c. Células obtidas no co-cultivo	76
ANEXO 02 – PERFIL GERAL DE CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	80
ANEXO 03 – CLASSIFICAÇÃO MODAL: INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS:.....	81
ANEXO 04 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AcMo: Anticorpos Monoclonais.

ATB: Antibiótico.

CD: *Cluster of Differentiation* - sistema de nomenclatura uniforme.

CÉLULAS RS: *Recycling Stem cells*. Sub-população de células pequenas, agranulares, presentes em cultivo de células-tronco mesenquimais.

CÉLULAS SP: *Side Population cells*. População lateral de células, que se apresentam negativas com o corante Hoechst, específico para identificar células-tronco hematopoéticas.

CFU-F: *Colony Forming Unit-fibroblasts*. Unidade formadora de colônia-fibroblastos.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Meio de cultivo celular.

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*. Meio de cultivo celular.

FACS: *Fluorescence Activated Cell Sorting*. Separação de células ativadas por fluorescência.

FH: Ficoll-Hypaque, densidade 1,077.

FLT-1: *Fms Like Tyrosine kinase-1*. Relacionado aos fatores de crescimento de células endoteliais vasculares.

FSC: *Forward Scatter*. Dispersão frontal de luz.

G-CSF: *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*. Fator de estimulação de colônias de granulócitos.

GM-CSF: *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*. Fator de estimulação de colônias de granulócitos macrófagos.

ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule-1*. Molécula 1 de adesão intercelular.

KDR: *Kinase inserts Domain-containing Receptor*. Marcador para células progenitoras endoteliais

LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*. Amplificação de luz estimulada por emissão de radiação.

MRF *Myogenic regulatory factor*. Fator regulatório miogênico.

PBS: *Phosphate Buffered Saline*. Solução salina tamponada.

PECAM-1: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*. Molécula 1 de adesão celular em plaquetas e endotélio.

SBF: Soro Bovino Fetal.

Sca-1: Expresso em células-tronco hematopoéticas de camundongos.

SCF: *Stem Cell Factor*. Fator de células tronco.

SSC: *Side scatter*. Dispersão lateral de luz.

TGF- β : *Tumor Growth Factor β* . Fator beta de crescimento tumoral.

VCAM-1: *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*. Molécula de adesão vascular transmembrana.

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*. Fator de crescimento de célula endotelial vascular.

VEGFR-2: receptor-2 para VEGF.

Wnts: Amálgama de *Wingless* e *Int*, dois dos primeiros membros desta família de genes, envolvidos na regulação dos sistemas de adesão celular.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Perfil geral da caracterização por citometria de fluxo.....	22
Tabela 2: Painel de AcMo e suas características.....	30
Tabela 3: Painel de AcMo utilizados.....	31
Tabela 4: Painel de AcMo utilizados para células satélites.....	32
Tabela 5: Desenho do experimento.....	32
Tabela 6: Percentual de positividade dos AcMo.....	34
Tabela 7: Valores de p em comparações das populações celulares.....	35
Tabela 8: Dados de idade <i>versus</i> número total de células isoladas.....	37
Tabela 9: Associação de idade <i>versus</i> número total de células isoladas.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diferenciação dos tecidos humanos.....	7
Figura 2: Diferenciação das células mesenquimais.....	13
Figura 3: Representação esquemática do FACS.....	19
Figura 4: Gráficos: valores de medianas de células mononucleares.....	35
Figura 5: Gráficos: valores de medianas de células satélites.....	36
Figura 6: Gráficos: valores de medianas de células de co-cultivo.....	36
Figura 7: Gráfico comparativo das populações celulares.....	37
Figura 8: Histogramas de resultados: CD45.....	39
Figura 9: Histogramas de resultados: CD73.....	40
Figura 10: Histogramas de resultados: CD90.....	41
Figura 11: Histogramas de resultados: CD105.....	42
Figura 12: Histogramas de resultados: M-Caderina.....	43
Figura 13: Histogramas de resultados: Conexina-43.....	44

RESUMO

INTRODUÇÃO: O modelo de co-cultivo de células musculares esqueléticas e de células-tronco mesenquimais no transplante em miocárdio demonstrou efetividade funcional e regeneração angio-muscular nas Miocardiopatias: Isquêmica Crônica e Chagásica em roedores.

OBJETIVO: analisar por citometria de fluxo, a imunofenotipagem das células-tronco mononucleares e das células musculares esqueléticas pré-cultivo e pós seu co-cultivo.

MÉTODOS: seis experimentos, em ratos Wistar, machos, consistindo do isolamento de células musculares esqueléticas (Delaporte, 1994) e de células-tronco mononucleares de medula óssea (Boyum, 1968). Seguindo-se do co-cultivo por 21 dias (Carvalho, 2004). As três populações celulares foram submetidas à análise imunofenotípica por citometria de fluxo (MMWR, 1997) para os marcadores de superfície: CD31, CD44H, CD45, CD49d, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, Myo-D, M-Caderina e Conexina-43. A análise estatística dos percentuais marcados nas três populações celulares foi realizada através de testes não-paramétricos: Friedman e Wilcoxon.

RESULTADOS: CD31($p=0,2489$), CD34($p=0,3114$), CD44H($p=0,1730$), CD45($p=0,094$), CD49d($p=0,4631$), CD54($p=0,5488$), CD73($p=0,0277$), CD90($p=0,0422$), CD105($p=0,0277$), CD106($p=0,3114$), Myo-D($p=0,0695$), M-Caderina ($p=0,0302$) e Conexina-43($p=0,0150$). Observou-se grande variabilidade entre os três grupos celulares quanto à interpretação dos resultados da intensidade de expressão, comprometendo o real valor deste parâmetro. Os grupos celulares mostraram significância estatística para: CD73, CD90, CD45, CD105, M-Caderina e Conexina-43 ($p<0,05$).

CONCLUSÕES: A população celular obtida no co-cultivo sugeriu ser heterogênea, sobretudo de células aderentes, com interação celular e diferenciação, caracterizando mudança do perfil imunofenotípico inicial ao produto final.

Descritores: Célula-tronco mesenquimal. Células musculares esqueléticas. Co-cultivo. Cardiomioplastia. Citometria de fluxo.

SUMMARY

INTRODUCTION: The co-culture of bone marrow mesenchymal stem cells and skeletal muscle cells showed improvement of heart function and induced both angiogenesis and myogenesis when transplanted in injured heart tissue, using murine models of ischemic cardiomyopathy and Chagas's disease.

OBJECTIVE: To analyse the immunophenotype profile of cellular subsets of bone marrow mononuclear stem cells and skeletal muscle cells after isolation and the product of co-culture by flow cytometry.

MATERIALS AND METHODS: Six experiments were done, in Wistar male rats; bone marrow mononuclear stem cells and muscle skeletal cells were isolated (Boyum, 1968 and Delaporte, 1994, respectively), then co-cultured for 21 days (Carvalho, 2004). We performed flow cytometry analysis (MMWR, 1997) before and after co-culture, in order to characterize the immunophenotypic profile of cellular subsets, using the surface markers: CD31, CD34, CD44H, CD45, CD49d, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, Myo-D, M-Cadherin and Connexin-43. The three cellular groups utilized Friedman and Wilcoxon's tests to statistical analysis.

RESULTS: CD31($p=0,2489$), CD34($p=0,3114$), CD44H($p=0,1730$), CD45($p=0,094$), CD49d($p=0,4631$), CD54($p=0,5488$), CD73($p=0,0277$), CD90($p=0,0422$), CD105($p=0,0277$), CD106($p=0,3114$), Myo-D($p=0,0695$), M-Cadherin($p=0,0302$) and Connexin-43($p=0,0150$). The cellular subsets showed statistically significance for: CD73, CD90, CD45, CD105, M-Cadherin and Connexin-43 ($p<0,05$). The results of intensity fluorescence showed a great variability between cell subsets, compromising the real value of this parameter.

CONCLUSION: The product of co-culture showed a heterogeneous cell population, suggesting similarity to adherent cells. We have demonstrated immunophenotypic differences between cell subsets prior to and after co-culture, suggesting cellular differentiation and interaction.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell, skeletal muscle cells, co-culture, cardiomyoplasty, flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

As doenças cardíacas são importante causa de morbi-mortalidade em todo mundo e com o aumento da longevidade da população, a expectativa é que as doenças cardiovasculares tornem-se dominantes neste século. É estimado que no Brasil 350.000 pacientes sofram infarto agudo do miocárdio ao ano ¹.

O principal objetivo do tratamento, durante um infarto agudo do miocárdio, é restabelecer a perfusão e recuperação do tecido o mais rápido possível. Se a reperfusão não for obtida da forma adequada, ocorrerá perda de cardiomiócitos e, eventualmente, resultando em disfunção sistólica ventricular esquerda, remodelamento ventricular e insuficiência cardíaca congestiva, elevação do stress sistólico e diastólico e liberação de mediadores e neuro-hormônios deletérios ².

Apesar das técnicas mecânicas e farmacológicas de revascularização, não há terapia efetiva que restaure a região infartada do miocárdio (cicatriz miocárdica) com tecido funcional e viável ³. Os tratamentos cirúrgicos visam a recuperação da função ventricular esquerda através da reconstrução geométrica do coração para sua forma elíptica, o que pode favorecer a melhora de sua função, porém existem algumas limitações inerentes ao procedimento, além de não tratar a causa básica, que é a perda dos cardiomiócitos adultos. Deve-se considerar também o fato de que este tipo de tratamento não pode ser proposto a todos os potenciais candidatos ^{4,5}.

O desenvolvimento de novas e efetivas opções de tratamento para pacientes com insuficiência cardíaca congestiva é imperativo, dado o aumento de casos e seu impacto social e econômico na saúde mundial ^{2,6}.

O dogma de que o coração é um órgão pós-mitótico diferenciado, incapaz de auto-regeneração tem sido atualmente questionado ^{7, 8, 9}. Em estudos recentes ^{10, 11}, observaram-se evidências de proliferação de cardiomiócitos onde células precursoras musculares quiescentes são ativadas, proliferam, diferenciam-se e dão origem a cardiomiócitos jovens. Estes sofrem diferenciação e quando maduros, formam fibras musculares funcionais.

Porém, esta capacidade regenerativa é limitada para repopular a área lesada. Também a angiogênese normal é insuficiente para suprir a grande demanda por oxigênio e nutrientes e para prevenir a apoptose de cardiomiócitos hipertrofiados e o remodelamento ventricular ^{10, 12}.

Estudo pré-clínico em modelo animal sugeriu que a transferência de células-tronco aumentou a regeneração miocárdica e a neovascularização pós infarto do miocárdio ¹³.

Baseado neste estudo e no reconhecimento da plasticidade de células-tronco adultas (diferenciação em tipos celulares não relacionados ao tecido de origem), tem sido proposto que células-tronco podem ser usadas para regeneração miocárdica em pacientes com infarto do miocárdio e diversas outras cardiopatias, já que possuem capacidade de proliferação, auto-regeneração e diferenciação em tecidos e órgãos especializados, eventualmente cardiomiócitos ^{14, 15, 16}.

Sob análise funcional, os requisitos fundamentais para que as células possam ser enxertadas são: a capacidade proliferativa, a colonização do miocárdio, sua integração anatômica, o restabelecimento da angiogênese, a diferenciação em cardiomiócitos e a eficácia da contratilidade, criando um acoplamento eletromecânico com o tecido miocárdico circundante e conseqüente melhora funcional ^{6, 17, 18}.

Diferentes tipos celulares podem ser utilizados para a regeneração do tecido miocárdico. Técnicas para coleta, isolamento e expansão também têm sido exploradas. Entre as potenciais células doadoras encontramos cardiomiócitos fetais, cuja vantagem é sua identidade imunofenotípica com o cardiomiócito, porém com as desvantagens de requerer imunossupressão, possuir curta sobrevivência, limitado suprimento e questões de ordem ética ¹⁶.

Com base em evidências experimentais, observou-se que vários tipos de células-tronco podem ser utilizadas com funções terapêuticas. Estas incluem células-tronco mononucleares de medula óssea, células progenitoras endoteliais e células-tronco mesenquimais, entre outras. A seleção de um tipo celular específico requer tecnologias altamente sofisticadas. As células-tronco embrionárias estão envolvidas em problemas éticos, embora tenham a vantagem de serem totipotentes e altamente expandíveis ^{6, 10, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26}.

Outro tipo celular em estudo é a célula satélite (mioblasto esquelético), que possui a vantagem de permitir o transplante autólogo por apresentar resistência à isquemia, seu alto potencial para divisão em cultivo, além de fácil acesso. Suas desvantagens, até o momento, são a possível presença de arritmias ventriculares pós transplante, ausência de *gap junction* (comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas, através de poros proteicos intercelulares) e o fato de requerer expansão *in vitro* ³.

As células-tronco mesenquimais de adulto também estão sendo estudadas e possuem como vantagens a baixa imunogenicidade, sua pluripotência, a facilidade de isolamento, purificação, expansão *in vitro* e a possibilidade de criopreservação. Sua desvantagem reside no fato das propriedades eletrofisiológicas e funcionais não estarem completamente conhecidas ³.

Para promover a miogênese, alguns autores sugerem a utilização de células satélites, células de músculo liso, células-tronco mesenquimais e células multipotentes de medula óssea de adultos. Para angiogênese e vasculogênese, os tipos celulares propostos são: células endoteliais, células-tronco de medula óssea, células progenitoras de sangue periférico e células mesoteliais. Para a regeneração miocárdica, as células principalmente investigadas são as células satélites e células de medula óssea ^{27, 28, 29, 30, 31}.

Uma linha de pesquisa sugere a associação de dois tipos celulares, as células satélites (miogênicas) e as células-tronco mesenquimais (angiogênica), com o objetivo de obter-se regeneração angio-muscular. Os modelos de doenças utilizados nos experimentos foram Miocardiopatia Isquêmica Crônica e e Doença de Chagas, por possuírem alguns aspectos fisiológicos em comum: diminuição de suprimento vascular, fibrose e conseqüente diminuição da contratilidade e da função cardíaca ^{32, 33}.

O avanço nas técnicas de cultivo celular em modelos animais possibilitou o estudo dos sinais químicos e físicos (citoquinas e outros sinais solúveis) que influenciam o desenvolvimento e diferenciação celular, direcionando-os para os tipos celulares de interesse ³⁴. Além de moléculas sinalizadoras solúveis, o contato direto célula-célula parece ser obrigatório para o controle externo do microambiente e a diferenciação de células-tronco. Dados já demonstrados indicam que células-tronco mesenquimais possuem plasticidade ²² e podem ser reprogramadas, *in vitro*, para linhagem cardiomiogênica e serem usadas em terapias celulares para tratamento de doenças cardíacas ²³.

Todos os indivíduos ao nascerem são dotados de um *status* genético relativamente fixo, em combinação com fatores ambientais os quais determinariam a propensão para uma enorme variedade de doenças. Até recentemente, o conceito do *status* genético fixo e inalterável do indivíduo era amplamente aceito e todas as terapias em uso foram desenvolvidas partindo destes princípios. Durante os últimos anos, avanços na genética humana, na biologia celular e terapia gênica resultaram em

mudanças fundamentais neste paradigma terapêutico. Dentre as novas modalidades de tratamento, a terapia gênica e o transplante de células-tronco são considerados os mais promissores ²⁶.

O desenvolvimento de estratégias para melhorar a sobrevivência e diferenciação celular é de grande interesse dos pesquisadores. Nas técnicas de co-cultivo, onde tipos celulares distintos são cultivados, observou-se aumento na multiplicação e diferenciação celular ²⁷. Observou-se ainda, em modelos animais, que este procedimento pode ser utilizado para pré-condicionar células-tronco antes de sua implantação, o que traria benefícios para a regeneração do miocárdio ^{27, 31}.

A possibilidade das células-tronco serem manipuladas *in vitro* torna importante a caracterização precisa das populações celulares. Os instrumentos para a análise e caracterização dos tipos celulares são vários, dentre estes está a análise por citometria de fluxo ^{35,36,37,38}.

A citometria de fluxo é um método moderno do estudo de células, através do qual podem ser determinadas múltiplas propriedades físicas e biológicas de uma célula. A linhagem celular e suas sub-populações podem ser determinadas pelo número e tipo de antígeno de superfície, intracitoplasmático ou mesmo intranuclear, o que propicia a quantificação e classificação ontogênica (imunofenótipo) das células. A citometria permite, além do rastreamento rápido de inúmeras populações celulares, a quantificação de pequenas populações com extrema especificidade, e sua separação para posteriores estudos ³⁹.

Diante de um cenário tão promissor na área de terapia para doenças cardíacas e dando seqüência a estudos anteriores que comprovaram a relevância da utilização de técnicas de co-cultivo, o objetivo principal deste trabalho é a análise imunofenotípica das células satélites e células-tronco mononucleares pré-cultivo e as células obtidas como produto do co-cultivo dessas células, em modelo animal, com o auxílio da citometria de fluxo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Historicamente, grande parte das pesquisas básicas e descobertas sobre as células-tronco foi realizada em modelos animais, particularmente camundongos. A presença de células-tronco não hematopoéticas na medula óssea foi primeiro sugerida pelo patologista alemão Cohnhein, em 1867, e corroborada por Friedenstein, 1970, demonstrando a capacidade de aderência de células estromais da medula óssea cultivadas em placas de plástico ⁴⁰.

Estas células aderentes possuíam pluripotencialidade e rapidamente diferenciavam-se em osteoblastos, condroblastos, células de tecido adiposo e células musculares ⁴¹.

Em 1981, pesquisadores relataram métodos para o cultivo de células-tronco embrionárias de camundongos em laboratório, levando-se cerca de 20 anos para que o mesmo fosse realizado com células-tronco embrionárias humanas ⁴⁰.

Muito do conhecimento desenvolvido sobre células-tronco embrionárias teve origem em dois campos de pesquisa: a biologia reprodutiva aplicada, ou seja, tecnologias de fertilização *in vitro*, e a pesquisa básica em embriologia de camundongos. Em 1998, James Thomson, da Universidade de Wisconsin-Madison, isolou células da massa celular interna do blastocisto e desenvolveu a primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas. Paralelamente, John Gearhart, na Universidade Johns Hopkins, relatou a primeira derivação de células germinais embrionárias humanas de uma população celular isolada de tecido fetal das gônadas, conhecida como célula germinal primordial, a qual origina óvulos e esperma ⁴⁰.

Vários autores, levantaram questionamentos que ainda necessitam de respostas: Qual seria o tipo celular que melhor se adaptaria ao transplante celular com o objetivo de reparar o miocárdio lesado; quais as células precursoras (célula-tronco hematopoética, célula progenitora endotelial, célula mesenquimal, célula adiposa, célula satélite) envolvidas; qual a melhor via de acesso: injeções endovenosas, administração intracoronariana, aplicação trans-endocárdica e trans-pericárdica; quais as linhagens mais eficientes em relação à área cicatricial, zona peri-infartada, área isquêmica; quais os métodos para sua caracterização; quais as vantagens em

favorecer a introdução e migração destas células no miocárdio; quais as cardiopatias que se beneficiariam desta terapêutica ^{6, 10, 16, 20, 42,43}.

Uma das propostas terapêuticas sendo desenvolvida é o uso de células-tronco da medula óssea para recuperação de cardiomiopatias. Esta proposta consiste na introdução destas células no tecido miocárdico lesado, as quais possuem uma eventual capacidade de atuar sobre a causa básica, a destruição do cardiomiócito, regenerando e restaurando a função do músculo cardíaco ^{44,45,46}.

Células-tronco

As células-tronco são células que podem dar origem a todos os tecidos e possuem a habilidade em passar, *in vivo*, de um estado quiescente, indiferenciado, para a auto-replicação. Estas células foram inicialmente caracterizadas como sendo totipotentes ou pluripotentes. Durante a embriogênese normal, as células-tronco totipotentes são originárias de embriões humanos (encontradas na massa interior do blastocisto, 4 a 5 dias após fecundação) ou de tecido fetal, destinados a serem parte das gônadas. Estas células possuem o potencial para desenvolver-se em qualquer tipo de célula e, em última instância, são derivados das três camadas germinais ^{22, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52}.

A maioria dos pesquisadores faz uso do termo pluripotente para descrever células-tronco que são originárias das três camadas germinais embrionárias: mesoderma, endoderma e ectoderma. Estas três camadas germinais são a fonte embrionária de todas as células do corpo e os mais diferentes tipos de células especializadas são derivadas de uma destas três camadas (Figura 1). As células pluripotentes também dão origem a qualquer tipo celular no organismo, porém não possuem a capacidade de formar um organismo completo ⁴⁰.

Células multipotentes são células-tronco que originam diferentes tipos celulares, porém possuem certo comissionamento linhagem-específico. Células precursoras unipotentes são definidas como células no organismo adulto, capazes de diferenciar-se somente em uma linhagem ^{40, 47}.

O uso de células-tronco, independente de sua origem (hematopoética, estromal), em transplantes autólogos, além da vantagem de evitar o uso de terapias imunossupressoras não-específicas, proporciona facilidade de coleta, de manipulação,

e permite a reconstituição mais rápida do tecido lesado do que que no transplante alogênico^{6, 16, 34}.

Várias fontes de células-tronco têm sido estudadas: células tronco-embrionárias e fetais, as quais possuem vasto potencial de desenvolvimento, retendo a capacidade de diferenciar-se em inúmeros tipos celulares, incluindo cardiomiócitos¹⁵ e células-tronco mesenquimais adultas, que são derivadas de medula óssea adulta e *in vitro* parecem possuir capacidade de diferenciação em multilinhagens.

Muitos estudos ainda são necessários na área de biologia celular, no isolamento, cultivo e regulação de diferenciação de células-tronco humanas e nos aspectos éticos envolvidos antes que o completo potencial destas abordagens possa ser conhecido^{14, 25, 51,53,54}.

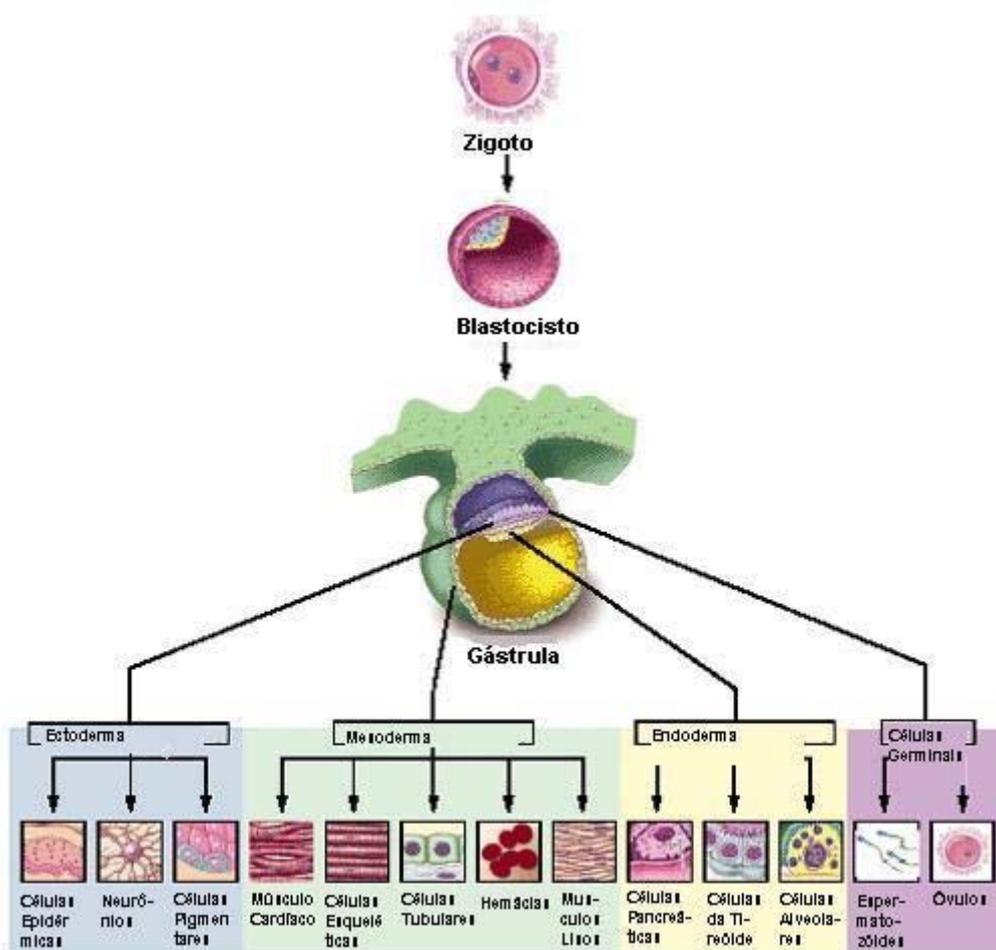


Figura 1: Diferenciação dos tecidos humanos (NIH, 2001).

Células-tronco adultas

Células-tronco adultas, assim como todas as células precursoras, compartilham no mínimo duas características: podem fornecer cópias idênticas delas mesmas por longos períodos de tempo e esta habilidade em proliferar-se é dita auto-renovação; e podem dar origem a vários tipos celulares maduros que possuem características morfológicas e funções especializadas. Células-tronco adultas são raras. Sua função primária é manter o estado funcionante do organismo, denominado homeostasia e, com certas limitações, repor células destruídas por lesão ou doença. Além disso, células-tronco adultas estão dispersas em tecidos maduros e comportam-se de formas diversas, dependendo de seu local de desenvolvimento ^{48,49}.

Dois estudos relataram dois tipos gerais de estratégias pelas quais as células-tronco geram progenitores diferenciados: em um extremo, há o mecanismo que pode ser descrito como invariável, no qual a célula-tronco dá origem, dentro de uma divisão assimétrica, a uma célula-tronco filha e outra célula-filha que segue a diferenciação. No outro extremo, um mecanismo altamente regulatório pelo qual a célula-tronco dá origem a células-filhas com uma probabilidade finita de originar células-tronco ou progenitores comissionados. A maioria dos tecidos auto-regenerativos de mamíferos se encaixa nesta categoria. Ainda que as duas estratégias sejam extremamente diferentes, ambas envolvem controle de retro-alimentação múltiplo e interações intercelulares recíprocas ^{50,55}.

Os controles intrínsecos do destino das células-tronco incluem fatores de transcrição e de expressão gênica, que determinam e controlam as mudanças no nível de promotores ou inibidores do ciclo celular.

Os controles externos estão relacionados ao conceito de nicho celular. Sobre os nichos das células-tronco, os estudos discorrem sobre a importância do microambiente que envolve a célula-tronco (nicho), envolvendo uma complexidade de sinais de curta e longa-distância entre as células-tronco, suas células-filhas diferenciadas e células vizinhas ⁵⁶.

Os sistemas que apoiam a proliferação, diferenciação e sobrevivência de populações progenitoras diversas dependem de fatores secretados por outros tipos celulares. Uma ampla gama de fatores secretados regula o destino e proliferação das células-tronco; duas famílias demonstram sua importância funcional nos processos envolvidos: TGF- β e Wnts. Além destes controles, há o controle homeostático,

realizado por mecanismos de retroalimentação que podem envolver os fatores de transcrição específicos induzindo uma resposta para um sinal externo ou atuando como antagonista de diferentes sinais externos ^{55, 57}.

Outro conceito introduzido por vários autores diz respeito à plasticidade: há evidentes demonstrações de que algumas populações de células-tronco isoladas de tecidos adultos podem mostrar uma inequívoca plasticidade quando transplantadas em receptores, ou seja, células-tronco poderiam diferenciar-se em tipos celulares não relacionados ao seu tecido de origem ^{49, 55, 58}.

Diversos estudos propuseram que uma célula-tronco adulta deveria ser capaz de originar células diferenciadas com fenótipos maduros e inteiramente integradas ao tecido, sendo capazes de executar funções especializadas próprias do tecido. O termo fenótipo referiu-se a todas as características observadas nas células ou organismo: morfologia, interações com outras células e ambientes não-celulares, proteínas que estão presentes na superfície celular e comportamento celular (secreção, contração, transmissão sináptica). Esta capacidade das células-tronco adultas, somada ao conceito da plasticidade, tornaria estas células candidatas viáveis para o reparo da lesão do coração ^{17, 22, 26, 48, 58, 59}.

Três recentes descobertas têm revolucionado a biologia de células-tronco e demonstrado seu potencial em um amplo leque de doenças humanas ⁵⁴.

Primeiro: o isolamento de células-tronco de órgãos onde se pensava não haver potencial regenerativo. Por exemplo, células satélites (células-tronco musculares esqueléticas) podem ser cultivadas *in vitro* e transplantadas em músculos receptores onde se diferenciam em miotubos e fundem-se com fibras musculares endógenas regenerando o músculo danificado.

Segundo: células-tronco adultas órgão-específicas demonstram maior plasticidade do que se pensava, ou seja, células-tronco isoladas de um determinado tecido podem diferenciar-se em vários tipos celulares não relacionados ao seu tecido de origem.

Terceiro: células-tronco embrionárias humanas podem ser isoladas de fetos em estados muito precoces e proporcionar sua diferenciação *in vitro* em ampla variedade de tipos celulares.

As células-tronco têm sido estudadas pelo seu uso potencial em doenças degenerativas. Uma série de estudos sugeriu que células-tronco adultas possuem um novo padrão de desenvolvimento, um processo denominado transdiferenciação ou

plasticidade. Estas descobertas suscitaram um período de excitação e alta expectativa seguida pela controvérsia surgida, sugerindo tratar-se de fusão célula-célula como uma interpretação alternativa para a transdiferenciação. Contudo, estudos posteriores demonstraram que a existência da plasticidade das células-troncos não poderia ser descartada ^{15, 22, 26, 44, 60}.

Células satélites

Outra fonte de células-tronco cogitada seria o músculo esquelético adulto. O músculo esquelético adulto é um tecido único, do ponto de vista estrutural, consistindo predominantemente de miofibras altamente especializadas, destinadas a conduzir funções teciduais específicas. O conceito de célula satélite (célula-tronco de músculo esquelético) é fundamental para a homeostasia muscular pós-natal, em resposta a recuperação, demanda de crescimento ou lesões. Cada miofibrila é intimamente associada a células satélites que repousam sob a lâmina basal, estritamente acoplada ao *plasmodesma*. Nos músculos normais, células satélites são mitoticamente quiescentes, mas tornam-se ativas em resposta a sinais liberados após lesões ou em resposta a um estímulo. Após divisão, células satélites ativadas, denominadas mioblastos, sofrem diferenciação terminal e são incorporadas às fibras musculares adultas, como micronúcleos pós-mitóticos ^{10, 29, 45, 61,62, 63}.

Células satélites são, todavia, uma população de células-tronco que proporciona capacidade de reposição de células pós-mitóticas diferenciadas necessárias para as funções do músculo esquelético adulto. O potencial clonogênico destas células é ilustrado por sua capacidade em gerar colônias de diferenciação progênie-competente *in vitro*. Quando plaqueadas em densidade clonal, elas proliferam formando colônias, sendo que uma porção destas retém a capacidade de diferenciar-se. A habilidade das células satélites em gerar tipos celulares diferenciados é inequívoca, tanto *in vivo* como *in vitro*. Contudo, de que forma esta auto-renovação seria mantida ainda não está bem esclarecida ^{29, 61}.

Vários estudos mostraram que cardiomiócitos alogênicos sobrevivem após implantação em miocárdio normal, quando submetido à criolesão e na área atingida pelo infarto, integrando-se ao tecido miocárdico receptor e melhorando a função contrátil. Uma vez isto estabelecido, as pesquisas foram focadas nos tipos celulares

autólogos facilmente disponíveis: células satélites. Tais células progenitoras de músculo esquelético foram isoladas de uma amostra de músculo esquelético e expandidas em cultura. Os estudos demonstraram que a implantação de um grande número de células satélites na região infartada melhorou a contratibilidade regional em roedores e outros modelos animais ^{45, 64}. Contudo, relatos recentes indicaram o desenvolvimento de arritmias ventriculares em alguns experimentos ^{29, 65}.

Os marcadores de superfície celular são poderosas ferramentas, mas têm suas limitações: eles não são ideais para a identificação de células satélites *in vivo* por sua expressão em células-tronco e outros tipos celulares presentes no tecido muscular ^{66, 67}.

Ainda que a predominância seja de células satélites e miofibras, o tecido muscular esquelético também contém uma ampla gama de outros tipos celulares, incluindo tecido conjuntivo, tecido adiposo, terminações nervosas, células de suporte e um extenso sistema vascular. Até o momento, a conclusão é que nem todas as células satélites seriam equivalentes e que o comportamento regenerativo do músculo esquelético contém diferentes tipos de precursores, fenotípica e funcionalmente ^{63, 68}.

Foram sugeridos vários marcadores para identificação de células satélites ^{10, 69}, sendo que um dos mais considerados é a M-Caderina, presente na interface das células satélites e repousando sob miofibras. Uma ampla gama de marcadores de superfície celular tem sido utilizada em análises por FACS (Fluorescent activated cells sorting) de células-tronco hematopoéticas, mesenquimais, células SP (pequena população lateral de células denominadas SP, que são negativas com o corante Hoechst), e também investigados para células satélites.

Células miogênicas são CD45(-) e a maior parte é CD34(+), ainda que o CD34 não seja um marcador útil para identificar células satélites em cortes de tecidos uma vez que está presente em outras células do tecido vascular e hematopoético.

Estes estudos foram realizados em cortes de tecido e, com o constante aprimoramento das técnicas de separação celular e o descobrimento de novos anticorpos monoclonais, este panorama pode ser modificado.

Células progenitoras endoteliais

Os angioblastos ou células progenitoras endoteliais, encontrados no sangue periférico e medula óssea, quando cultivados e expandidos *in vitro*, mostraram grande potencial terapêutico em casos de neovascularização miocárdica, demonstrando um impacto favorável na preservação da função ventricular⁶⁸.

As células progenitoras endoteliais são identificadas com base na expressão de antígenos de superfície tais como CD133 e VEGFR-2(receptor-2 para fator de crescimento de célula endotelial vascular), também encontrados em células-tronco hematopoéticas. Em modelos utilizando camundongos, os progenitores endoteliais foram mobilizados da medula óssea e contribuíram para a neo-angiogênese da região isquêmica. Da mesma forma, em modelos de isquemia cardíaca em ratos, as células mobilizadas CD34+, CD117(+) de forte intensidade, CD133+ e VEGFR2+ contribuem para reparar o coração do rato após infarto do miocárdio por sua impressionante capacidade de gerar novos capilares na zona infartada^{15, 21, 69, 70, 71}.

Células-tronco mesenquimais

O consenso em diversos estudos é que as células-tronco mesenquimais diferenciam-se em cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo*^{14, 21, 55, 72}.

Ao contrário das células-tronco hematopoéticas e endoteliais, células-tronco mesenquimais são originárias do mesoderme somático, e demonstram seu potencial em diferenciar-se em tecidos funcionais mesodérmicos: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos esqueléticos^{3, 22, 41, 73, 74, 75}. (Figura 2).

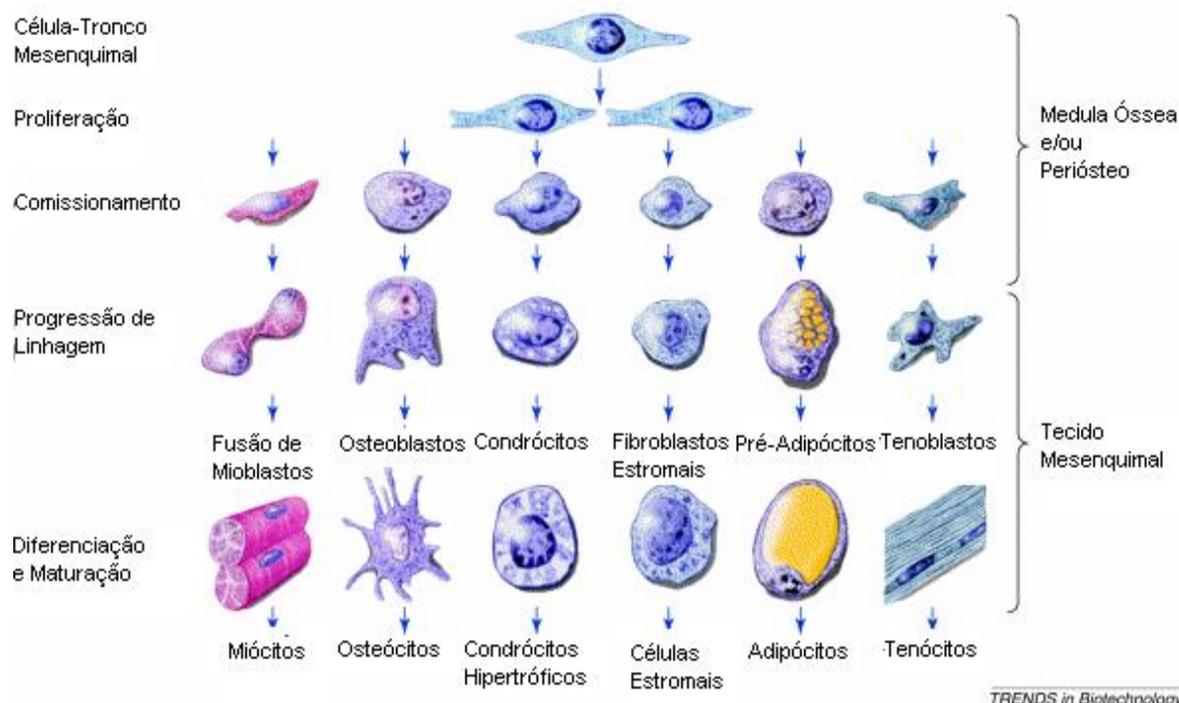


Figura 2: Diferenciação das células mesenquimais.

Células-tronco mesenquimais são raras em medula óssea, representando 0,001% a 0,01% das células nucleadas, porém, podem ser facilmente isoladas, cultivadas e expandidas, têm estabilidade genética e características reproduzíveis, tornando-se ideais para a manipulação *in vitro*, gerando novas células contráteis e tornando seu uso em terapias celulares de grande interesse ³⁸.

Em um estudo realizado com o auxílio da citometria de fluxo, foi traçado um perfil das células-tronco mesenquimais. Partindo do princípio de que a medula óssea adulta contém, no mínimo, dois tipos de células tronco: células tronco-hematopoéticas e células-tronco mesenquimais (também denominadas células estromais da medula), ambos os tipos celulares poderiam ser isolados da fração mononuclear da medula óssea aspirada. Células-tronco hematopoéticas podem ser isoladas com base em marcadores de membrana específicos e, apesar da ausência de um marcador único para células-tronco mesenquimais, algumas estratégias para o enriquecimento da fração dessas células são baseadas nas suas características de adesão a material plástico ⁷⁶.

A simples distinção de que células-tronco hematopoéticas são CD45(+) e CD34(+), enquanto células-tronco mesenquimais são CD45(-) e CD34(-) já indicaria um caminho a ser traçado ¹⁰. Na **Tabela 1** demonstra-se um resumo de estudos sobre a caracterização por citometria de fluxo das diversas populações celulares.

Células-tronco mesenquimais, *in vitro*, se apresentam como uma população homogênea de células aderentes que expressam proteínas específicas em sua superfície (marcadores de membrana), os quais incluem CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105. Muito embora estes marcadores não sejam específicos para células-tronco mesenquimais, eles são principalmente caracterizados por sua habilidade em diferenciar-se em múltiplas linhagens mesenquimais, as quais incluem osteócitos, condrócitos, células adiposas e células de músculos esqueléticos, sob condições controladas, *in vitro*. Todavia, as células-tronco mesenquimais preenchem todos os critérios para serem consideradas células-tronco de fato: auto-regeneração, diferenciação em múltiplas linhagens e reconstituição de tecidos *in vivo* ⁷⁶.

No estudo citado, as células foram cultivadas e após procedimentos técnicos apropriados, foram incubadas com anticorpos monoclonais contra CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, VE-Caderina, VCAM-1, CD105, CD117, CD133, KDR e FLT-1. Os resultados obtidos mostraram que células-tronco mesenquimais tipicamente expressam os antígenos CD73 e CD105, conforme já descrito em trabalhos anteriores. Também apresentaram positividade para CD44, CD90 e CD166 e foram negativos para marcadores hematopoéticos típicos, como CD14, CD34, CD45 e CD133. Células-tronco mesenquimais indiferenciadas não apresentaram positividade para os receptores KDR e FLT-1, ou para VE-Caderina e VCAM ^{77, 78}.

Uma das conclusões desta pesquisa diz respeito à principal vantagem das células-tronco mesenquimais, que é possuir fácil acesso por punção de medula óssea, além da facilidade de cultivo e expansão. Células-tronco mesenquimais demonstraram ser geneticamente estáveis após longo tempo de cultivo ⁷⁸.

Embora não exista um único marcador específico, os marcadores mais comuns expressos em células-tronco mesenquimais de humanos são: CD10, CD13, CD44, CD56 de baixa intensidade de fluorescência, CD61, CD90, CD105, CD109, CD140b, CD164 e CD172a, sendo negativos para CD15, CD34, CD45, CD117, CD133, CD167a ^{12, 20, 34, 51, 78,79,80,81}.

Outros autores já definem as células-tronco mesenquimais humanas isoladas como constituindo uma população imunofenotipicamente distinta, uniformemente

positiva para CD44, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD120a e CD124 e negativa para CD14, CD34 e CD45; podendo ser induzidas a diferenciar-se em células adiposas, condrócitos e osteócitos ^{34, 77, 78, 79, 82}.

As células-tronco mesenquimais não são definidas por sua origem e, mesmo dentro de um tecido definido como a medula óssea, podem haver microambientes (nichos) onde células idênticas ou intimamente relacionadas expressam diferentes moléculas em sua superfície ^{22, 83, 84}.

Outros tipos celulares

Outros tipos celulares ainda sob investigação de seu potencial para a regeneração miocárdica foram relacionados a seguir ^{27, 31}:

Células endoteliais vasculares, que podem ser coletadas da membrana interna de arteríolas autólogas ou veias periféricas. Após expansão *in vitro*, estas células seriam transplantadas no miocárdio isquêmico. Células endoteliais induzem a formação de uma extensa rede capilar, mas podem não ser suficientes para regenerar o tecido lesionado ³¹.

Células mesoteliais, obtidas por excisão e digestão do epíploon ou do fluído peritoneal de pacientes humanos, são facilmente cultivadas e podem ser modificadas geneticamente. Esse tipo celular seria, provavelmente, o precursor das artérias coronárias durante a embriogênese secretando um amplo espectro de citocinas angiogênicas. Essas células têm sido utilizadas para criar neoangiogênese em modelos experimentais de infarto do miocárdio, por apresentarem semelhanças morfológicas e funcionais às células endoteliais e conservarem características de transdiferenciação.

Células estromais de tecido adiposo despertam grande interesse, em razão de sua grande e reversível capacidade para expansão, o que parece ser permanente durante toda a vida adulta. Contudo, seria necessário o desenvolvimento de uma rede capilar para assegurar o remodelamento do tecido adiposo. Apesar deste fato, parece haver uma ligação importante entre células adiposas e a rede vascular. Estas células representam uma heterogêna população que inclui células endoteliais microvasculares constituindo uma fonte de células pluripotentes conveniente e não-restritiva. O entendimento entre o desenvolvimento do tecido adiposo e plasticidade

abre novas perspectivas para a terapia angiogênica baseada na administração de células-tronco derivadas de tecido adiposo no tratamento de doenças cardiovasculares. Outro fato interessante foi a constatação da diferenciação espontânea de cardiomiócitos a partir de células de estroma de tecido adiposo ³¹.

Células-tronco provenientes de polpa dental parece ser fonte viável de células com potencial para o desenvolvimento de terapias de transplante celular autólogo ^{27, 31}.

Co-Cultivo

O cultivo celular tem por objetivo principal possibilitar a oferta de um número maior de células. Já a associação de tipos celulares distintos, denominado co-cultivo, favorece as interações célula-célula *in vitro*, previamente ao transplante, objetivando a adesão celular ao tecido transplantado e otimização das taxas de sobrevivência das células após a implantação, além de diminuir os custos do procedimento.

A idéia da utilização de células musculares esqueléticas, as quais realmente recolonizam o tecido miocárdico infartado com novas fibras musculares de origem esquelética, e células-tronco derivadas da medula óssea, as quais estimulam a formação de novos vasos na região de fibrose foi baseada no conceito de proporcionar regeneração angiomuscular e não somente regeneração angiogênica ou muscular isoladas. Além disso, a opção pelo transplante de células musculares esqueléticas e células-tronco mesenquimais da medula óssea foi baseada na fisiopatologia das miocardiopatias: Isquêmica Crônica e Chagásica, caracterizadas por isquemia, perda de cardiomiócitos e fibrose ^{32, 33}.

Foi demonstrado, em resultados clínicos de fase I, que células musculares esqueléticas são capazes de aumentar a função ventricular, mas com a ocorrência de arritmias ventriculares. Existem alguns questionamentos sobre esse efeito prejudicial estar relacionado à ausência de *gap-junctions* entre as células transplantadas e o tecido miocárdico íntegro. A quantidade de células transplantadas e a inflamação decorrente do transplante poderiam ser outras causas de arritmias em transplante de mioblastos. Outra possível explicação seria de que, quando são proporcionadas somente novas fibras musculares (transplante de mioblastos), estas estruturas

poderiam sofrer isquemia pela falta de vascularização, tornando o tecido mais sujeito à arritmias^{85, 86, 87}.

Outro experimento sugeriu que células-tronco de medula óssea possuem potencial angiogênico, cogitou-se, então, que alguns desses problemas poderiam ser eliminados, proporcionando células angiogênicas e células contráteis⁸⁸.

Foi demonstrado recentemente, em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica crônica, que o transplante de células musculares esqueléticas e células-tronco mesenquimais proporciona células contráteis e vasos, respectivamente; no entanto, não proporcionam remodelamento ventricular a despeito da melhora de função ventricular. Os achados histológicos neste modelo após tratamento assemelharam-se ao encontrado no modelo experimental de miocardiopatia chagásica: identificação de novas fibras musculares e novos vasos na região de fibrose miocárdica³².

No modelo de miocardiopatia isquêmica crônica e utilizando o co-cultivo de células musculares esqueléticas e células-tronco mesenquimais, mas em comparação com os efeitos em ambas as células separadamente, observou-se que o transplante de mioblastos esqueléticos resulta em miogênese e melhora da função ventricular. Em contraste, terapias com células-tronco mesenquimais resultaram em neoangiogênese, porém, sem efeito funcional no tecido miocárdico³².

No transplante destas células co-cultivadas, em miocardiopatia chagásica, observou-se melhora funcional significativa, porém, as células não foram avaliadas isoladamente, portanto, não houve como identificar qual das células transplantadas, senão ambas, são responsáveis pela melhora da fração de ejeção no ventrículo esquerdo⁸⁹.

Outros autores descreveram que este transplante celular também reduz o volume sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo demonstrando efeitos positivos semelhantes no remodelamento ventricular quando células-tronco mononucleares da medula óssea foram administradas por injeção intracoronária em paciente chagásico, contudo, as células foram administradas somente na parede anterior do ventrículo esquerdo, de forma focal, diferentemente de outros modelos, onde células são injetadas em área mais difusa (paredes anterior e lateral do ventrículo). Portanto, o efeito de remodelamento ventricular parece estar mais relacionado à patologia de base e a forma de distribuição das células transplantadas do que com o tipo de células transplantadas⁹⁰.

Citometria de fluxo

FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES DA CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo constitui uma tecnologia relativamente recente, porém, suas características especiais como técnica de análise celular, têm feito com que sua utilização tenha se estendido de forma rápida dos laboratórios de investigação básica ao laboratório clínico na última década. Isto se deve em grande parte, ao caráter multidisciplinar desta técnica ³⁹.

Do ponto de vista prático, a citometria de fluxo permite a análise e separação de células, assim como de outras estruturas intra-celulares (núcleos, cromossomas, mitocôndrias, grânulos de zimogênio) em suspensão, com grande objetividade, sensibilidade e rapidez, analisando de forma simultânea várias características em um grande número de partículas. Diferente dos métodos bioquímicos de análise celular, nos quais se obtém um resultado médio para toda a amostra, a citometria de fluxo proporciona uma informação qualitativa e quantitativa sobre cada célula em particular, permitindo a identificação de sub-populações de células diferentes, inclusive quando estas estão escassamente representadas ^{39, 91}.

O CITÔMETRO DE FLUXO

O princípio no qual se fundamenta esta tecnologia é simples: fazer passar células ou outras partículas em suspensão, alinhadas uma a uma por uma fonte de luz, realizando uma análise multiparamétrica destas células, podendo incluir uma separação física (ou purificação) de uma das populações celulares presentes na amostra, se o citômetro possuir funções separadoras (*sorting*).

A função de análise celular é comum a todos os citômetros de fluxo. Para isto, estes instrumentos dispõem de cinco compartimentos bem definidos: **1. uma fonte de luz**, geralmente um LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation*) de argônio que emite luz azul a 488 nm; **2. um compartimento de fluidos** cuja função é a criação de um fluxo laminar, mediante um sistema regulável de pressões que fazem com que as células permaneçam no centro de um líquido isotônico caudal e atravesse, perpendicularmente, alinhadas uma a uma, a fonte de luz; **3. um sistema óptico** constituído por um conjunto de lentes, espelhos e filtros que permitem separar

luzes de diferentes cores, portadoras de informações sobre as distintas características de cada célula analisada; **4. um conjunto de detectores, amplificadores e processadores de sinal luminoso**, elétrico e analógico que reconhecem e transformam a luz em sinal digitalizado, susceptível a ser processada por um computador; e **5. um sistema informatizado** para a aquisição, análise e armazenamento dos resultados. Além disso, existem outros componentes que, mesmo não imprescindíveis, podem adaptar-se ao citômetro de fluxo para o desenvolvimento de funções específicas. Este é o caso dos preparadores e processadores automáticos das amostras, as unidades de deposição de células separadas ou os sistemas de vídeo para visualização de fluxo, entre outros ^{39, 91} (Figura 3).

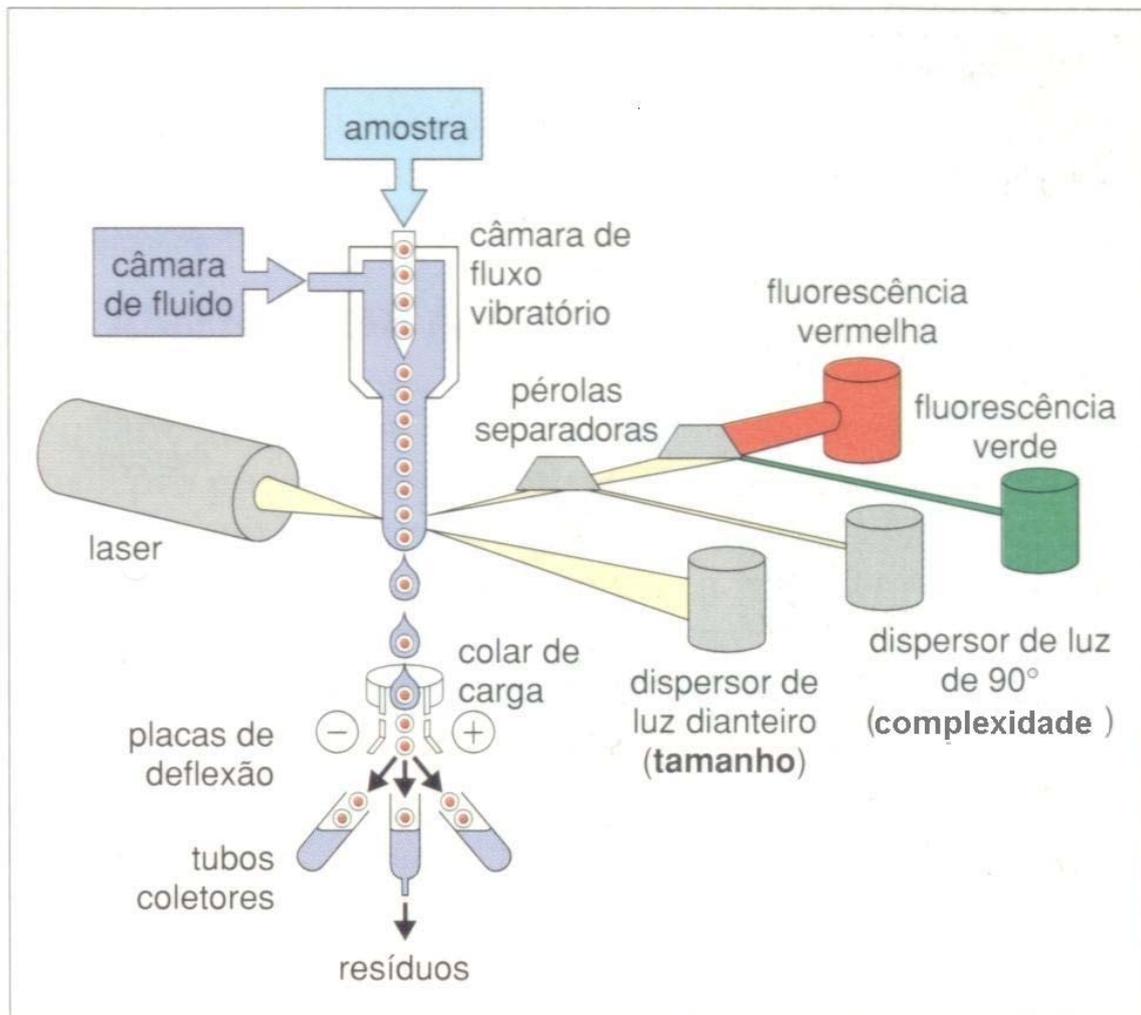


Figura 3: Representação esquemática do FACS (ROITT, 1997)

PARÂMETROS ANALISADOS

A passagem de uma célula em frente a um raio laser faz com que a luz deste se disperse em todas as direções. A quantificação da luz dispersada frontalmente em ângulos próximos a 0° e lateralmente, em ângulos próximos a 90° , constituem dois dos parâmetros analisados. Ambos integram informação sobre um conjunto de diferentes características da célula. No caso da luz dispersada frontalmente (*forward scatter-FSC*), a quantidade de luz reconhecida é relacionada entre outras características celulares, com o tamanho, a opacidade, a assimetria, a viabilidade e a presença, no interior da célula de determinadas substâncias capazes de absorver luz. Por sua vez, a magnitude de luz dispersada lateralmente (*Side scatter-SSC*), depende de um conjunto de fatores integrados pela presença e tipo de grânulos, a membrana celular e a composição interna da célula, englobados genericamente no termo “complexidade interna”. A luz correspondente às diferentes emissões fluorescentes (FL1, FL2, FL3...) se reconhece assim mesmo ortogonalmente, ou seja, em ângulos próximos a 90° , junto com a luz dispersada lateralmente e reflete a existência, na célula, tanto de luz na forma natural (auto-fluorescência) quanto artificial (Anticorpos Monoclonais-AcMo) conjugados com fluorocromos ³⁹.

Para o entendimento e boa aplicação das técnicas baseadas em citometria de fluxo, faz-se necessário uma firme compreensão do conceito de imunofluorescência.

Imunofluorescência é uma técnica que permite a visualização de estruturas ou características celulares por ligação destas a uma molécula que emite luz quando estimulada por uma luz de comprimento de onda distinto. As técnicas de imunofluorescência podem tanto utilizar corantes que se ligam diretamente a estruturas intra-celulares ou sob a membrana celular, ou fluorocromos conjugados à ligantes como anticorpos monoclonais, lecitinas ou citoquinas. A característica em comum destes corantes e fluorocromos é que absorvem a energia luminosa em um comprimento de onda e emitem luz em outro comprimento de onda ⁹².

ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados a diferentes fluorocromos reagem com os epítomos específicos (determinantes antigênicos) na superfície ou no interior das células e são usados rotineiramente na citometria de fluxo.

Marcadores de membrana celulares podem ser definidos como proteínas especializadas, que cobrem a superfície de cada célula e que têm a capacidade de seletivamente ligar-se ou aderir-se a outras moléculas sinalizadoras. Existem muitos tipos de receptores, que diferem em sua estrutura e afinidade pelas moléculas sinalizadoras.

Normalmente, a célula utiliza estes receptores e as moléculas que se ligam a eles como um meio de comunicação com outras células e entre suas próprias funções no organismo. Em muitos casos, a combinação de múltiplos marcadores é usada para identificar um tipo particular de célula-tronco.

Vários laboratórios têm desenvolvido anticorpos monoclonais utilizando células-tronco de medula óssea como um imunógeno, com a finalidade de identificar um ou mais marcadores aptos para a identificação e separação de células estromais. Contudo, o isolamento de uma população “pura” de células-tronco estromais multipotente permanece indefinida. É importante salientar que os marcadores fenotípicos em cultivo, detectados por expressão de RNA mensageiro (RNAm) e técnicas de imunohistoquímica, não refletem o grau de pluripotencialidade ou um clone selecionado, *in vivo*¹⁷.

Em análises por citometria de fluxo, a definição de célula-tronco hematopoética baseia-se principalmente na presença de um marcador da membrana celular, denominado CD34, o qual é uma glicofosfoproteína transmembrânica do tipo I, altamente glicosilada. Outros marcadores de membrana podem ainda ser utilizados com a finalidade de tornar a análise mais acurada, como o CD45, para definir a origem hematopoética das células em questão, ou outros marcadores que auxiliam na caracterização de células mesenquimais, endoteliais, epiteliais, dendríticas, satélites ou outras quaisquer de interesse do pesquisador. A identificação imunofenotípica também pode auxiliar na evidencição da transdiferenciação das células-tronco em cardiomiócitos funcionalmente ativos^{10, 22, 93, 94}.

A **Tabela 1** reúne um resumo de estudos sobre a caracterização por citometria de fluxo das diversas populações celulares. Uma compilação mais abrangente está demonstrada no Anexo 02.

Tabela 1: Perfil geral da caracterização celular por citometria de fluxo:

Tipo de células	Perfil imunofenotípico	Referências bibliográficas
Células-tronco hematopoéticas	CD34(+), CD45(+), CD117 (+).	94, 95, 96, 97, 98, 99, 100.
Células satélites (células musculares esqueléticas)	Myod(+), Myf-5(+), miogenina (+), MRF4(+), M-Caderina(+).	34, 42, 51, 63 100, 101, 102, 108, 109, 110, 129, 130.
Células endoteliais	CD31(+), CD34(+), CD133(+), VE-Caderina (+), E-Selectina (+), VEGFR-2(+), CD140b(+), KDR (+).	12, 15, 71, 93, 98, 100, 111.
Células mesenquimais	CD13(+), CD14(-), CD34(-), CD29(+), CD44(+), CD45(-), CD54(+), CD73(+), CD90(+), CD105(+), CD106(+), CD117(-), CD120a(+), CD124(+), CD166(+), CD140b(+), vWF(+).	12, 36, 37, 38, 51, 75, 76, 77, 78, 81, 94, 98, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120.
Células aderentes	CD44(+), CD54(+), CD106(+), CD164(+), CD172a(+), VE-Caderina (+).	98, 112, 114, 128.
Cardiomiócitos	Conexina-43.	15, 77, 98, 103, 104, 105, 106, 107..

Em negrito: estudos em humanos. Em vermelho: estudos em modelos animais

Aplicações Clínicas: Transplante celular em Infarto do Miocárdio

Muitas das terapias disponíveis aos clínicos atualmente podem significativamente melhorar o prognóstico de pacientes com infarto agudo do miocárdio. Embora a angioplastia e agentes trombolíticos possam aliviar as conseqüências do infarto, o tempo entre a oclusão até a reperfusão determina o grau dos danos irreversíveis ao miocárdio. Nenhuma medicação ou procedimento usado clinicamente tem mostrado eficácia em repor a área de cicatriz miocárdica com tecido contrátil funcional. São necessárias novas terapêuticas para regenerar cardiomiócitos normais.

Recentes esforços em reparar infartos de miocárdio agudos induzidos experimentalmente têm proporcionado sucesso limitado, porém encorajador, em modelos animais. Os resultados mais promissores têm sido obtidos após transplante e mobilização de células da medula óssea para a área do infarto. A perda de

cardiomíocitos, secundária a uma isquemia, provoca disfunção contrátil regional, mudanças na geometria e remodelamento da parede ventricular, onde cardiomiócitos necrosados são substituídos por deposição de tecido fibroso na parede ventricular, formando tecido cicatricial e diminuindo a eficiência do músculo cardíaco ^{12, 13}.

Várias propostas para a recuperação da massa contrátil têm sido apresentadas e o recente progresso de novas tecnologias apontam o transplante celular como perspectiva terapêutica: o transplante de células, cultivadas ou não, em tecido cardíaco lesado, tem sido proposto para o tratamento da insuficiência cardíaca pós-infarto, uma vez que células transplantadas limitam a extensão do tecido cicatricial ¹³.

Outra proposta é o uso de angioblastos autólogos derivados da medula óssea humana, mobilizado por citoquinas e diversos fatores de crescimento, como GM-CSF (fator de estimulação granulócitos-macrófagos), SCF (fator de células tronco), G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) e CFU-F (unidade formadora de colônia-fibroblastos) para revascularização do tecido miocárdico infartado. Em conjunção com as terapias convencionais, oferece também potencial para reduzir a morbidade e mortalidade associada ao remodelamento ventricular pós infarto do miocárdio ^{12, 59, 72, 102}.

Um estudo propôs o cultivo e a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas com a finalidade de proporcionar entendimento desta linhagem de progenitores de múltiplos tipos celulares e seu potencial para novas abordagens terapêuticas na restauração de tecidos danificados ³⁷.

A regeneração do miocárdio é, talvez, o mais estudado e debatido exemplo da plasticidade das células-tronco. Dois estudos ^{44, 60} enfatizaram o conceito que qualquer célula-tronco pode reparar tecidos danificados, dando ênfase às doenças cardíacas isquêmicas. A função sistólica regional e o metabolismo regional decrescem com poucos batimentos cardíacos e há um súbito decréscimo na perfusão miocárdica. A extensão do infarto depende da duração e severidade da deficiência da perfusão. Contudo, a extensão do infarto pode ser modulada por um número de fatores incluindo o suprimento colateral de sangue, medicações e pré-condicionamento isquêmico. Além da contração e fibrose da cicatriz miocárdica, o remodelamento ventricular progressivo do miocárdio não-isquêmico pode reduzir a função cardíaca nas semanas e meses após o evento inicial. Várias fontes de células têm sido estudadas, incluindo cardiomiócitos fetais, mioblastos e células-tronco embrionárias e adultas para o restabelecimento da função cardíaca ^{51, 94}.

Outro estudo deu ênfase ao uso da terapia de reposição celular como forma de repor cardiomiócitos perdidos de forma irreversível por necrose e apoptose ⁵⁷.

O transplante de cardiomiócitos na região de cicatriz miocárdica tem sido proposto como uma nova abordagem para o tratamento de doenças cardíacas pós-infarto do miocárdio. Alguns resultados têm mostrado melhora da função do miocárdio infartado após o transplante de cardiomiócitos. Para melhorar a função cardíaca é necessário que os cardiomiócitos transplantados possuam contrações mecânicas sincronizadas com o tecido hospedeiro. Este estudo mostrou a formação de discos intercalados entre cardiomiócitos transplantados e do tecido hospedeiro e também entre os próprios cardiomiócitos transplantados, além da formação de junções celulares, sugerindo a localização de *gap junctions*, desmossomas e moléculas aderentes possuem um papel importante na maturação de funções eletromecânicas ^{70, 103}.

A adesão e comunicação intercelular são componentes essenciais do remodelamento e diferenciação tecidual. As junções aderentes intercelulares mediadas por Caderinas são importantes para o desenvolvimento tecidual e são cruciais para a manutenção de tecidos sólidos, bem como para o reconhecimento e separação celular durante o desenvolvimento. Igualmente, a comunicação intercelular através de canais *gap junction* tem seu papel não somente na coordenação de sinais elétricos em células contráteis, mas também facilitando a sinalização de células não contráteis durante o desenvolvimento, a regulação do crescimento e diferenciação celular ¹⁰⁴.

Para implantar células que realmente contribuam para as contrações sincronizadas do coração, contudo, elas devem ser anatomicamente integradas com as fibras miocárdicas nativas existentes. Células-tronco do estroma da medula óssea de modelo animal foram isoladas, expandidas, marcadas com 4',6-diaminodino-2-phenylindole e injetadas no miocárdio dos receptores. Em intervalos pré-determinados, amostras foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina e imunohistoquimicamente contra Conexina-43, para identificar *gap junctions*. A conclusão foi de que células-tronco implantadas podem ser integradas às estruturas miocárdicas nativas e contribuir para a função miocárdica ⁶⁶. Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores ^{77, 121}.

Outro estudo referiu-se à Conexina-43, presente na medula óssea, timo, baço e outros tecidos linfóides e seu papel nestes tecidos, proporcionando a formação de *gap*

junctions e sugerindo que a comunicação entre células hematopoéticas e células mesenquimais é mediada por *gap junctions*, contudo, parece tratar-se de um evento raro. Consideráveis evidências sugerem que a expressão de Conexina-43 possa ser de grande importância durante o estabelecimento ou regeneração do sistema hematopoético ¹⁰⁵.

O papel fisiológico das *gap junctions* em vários tecidos foi elucidado pela descoberta de conexinas mutantes associadas à doenças genéticas e pela geração de camundongos com ablações marcadas de genes específicos de conexinas. Muito se estudou sobre a estrutura das *gap junctions*, suas subunidades proteicas, sua regulação farmacológica e características funcionais dos canais, assim como o seu papel em vários tecidos e órgãos, incluindo o tecido vascular, músculos lisos urogenitais, coração e sistema cardiovascular, pâncreas, glândulas endócrinas, sistema nervoso e sistema imune. *Gap junctions* entre miócitos cardíacos são encontrados em regiões especializadas da membrana plasmática conhecidas como junções aderentes a discos intercalados, os quais facilitam o acoplamento mecânico entre as células. Os canais de *gap junctions* no coração parecem ter um papel crítico, permitindo a passagem intercelular de íons, facilitando a propagação de ações potenciais. Diferenças na quantidade, no tamanho e na localização de *gap junctions* em distintas regiões cardíacas podem contribuir para diferenciar suas propriedades de condução elétrica. Mais ainda, por serem constituídos de diferentes conexinas, os canais de *gap junction* podem diferir em suas propriedades de condutância ^{106, 107}.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os animais receberam cuidados profissionais em concordância com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal e o Manual sobre cuidados e uso de animais em laboratório”, formulado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (1991).

Foram utilizados para o experimento seis ratos Wistar, machos, de peso médio 200 g

Isolamento de células satélites (Delaporte, 1984) ¹²²:

O isolamento das células satélites, precedido de anestesia do animal com administração intramuscular de ketamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg), foi realizado a partir da retirada do músculo tibial anterior por biópsia muscular: Em seguida, numa placa de Petri contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium – Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Rockville, Md)) com 1% de antibiótico(ATB): penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 µg/mL, retiraram-se os vasos e os tecidos conjuntivos: aponeuroses, tecidos gordurosos e cutâneos. Na seqüência os fragmentos foram colocados em outra placa de Petri em meio de cultura DMEM a 1% de ATB.

A etapa seguinte consistiu na limpeza e macerado muscular: os músculos foram cortados em pequenos fragmentos, quase secos e triturados com o auxílio de uma tesoura. Após esse procedimento, o macerado muscular foi lavado em aproximadamente 15 mL de meio de cultura DMEM, centrifugado a 1000 rpm por seis minutos. Em seguida, o meio foi aspirado, desprezado e realizou-se a pesagem do material (cerca de um grama de músculo).

Após a pesagem, realizou-se a digestão enzimática do músculo recuperado com o auxílio de dez mL de Colagenase tipo IA (Sigma, USA), na concentração de 1,5 mg/mL, por uma hora a 37^o C em estufa de CO₂, sendo agitado a cada dez minutos. As células foram posteriormente centrifugadas a 1000 rpm durante seis minutos. Seguiu-se a recuperação do botão de células de músculo, com dez mL de Tripsina-

EDTA a 0,05% (Gibco, USA), por 20 minutos, sendo agitado manualmente a cada 10 minutos. Interrompeu-se a digestão enzimática com a adição de Soro Bovino Fetal (SBF – Gibco, USA) a 10% de volume. Procedeu-se a filtração, na qual o material foi filtrado utilizando-se filtros de 100 µm e 40 µm sucessivamente. Após centrifugação a 1200 rpm por sete minutos, o botão de células foi recuperado e diluído em dez mL de meio de cultura DMEM. Realizou-se a contagem das células com auxílio de Câmara de Neubauer e verificou-se a viabilidade celular com Azul de Trypan.

Isolamento de células tronco mesenquimais (Boyüm, 1968) ¹²³:

A coleta da medula óssea foi realizada através de técnica de punção-aspiração da medula óssea da crista ilíaca póstero-superior de ratos Wistar. A técnica de escolha foi precedida de anestesia do animal com administração intramuscular de ketamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg). Não foram utilizadas substâncias inalatórias para este fim, pois interferem no isolamento das células que serão utilizadas para o co-cultivo. Imediatamente as células mononucleares foram isoladas de acordo com a técnica de Boyüm (1968), baseada no princípio de centrifugação em barreira de densidade, utilizando-se solução de Ficoll-Hypaque(FH), densidade 1,077.

O procedimento técnico foi realizado centrifugando-se a amostra, previamente homogeneizada e diluída na proporção de 1:2 com meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium – Gibco, USA), em tubo cônico graduado, de 15mL. Num segundo tubo cônico de 15mL, colocou-se três mL de FH, com auxílio de pipeta graduada. Acrescentou-se lentamente a amostra diluída. Inclinou-se o tubo contendo o FH para que não ocasionasse mistura da medula óssea com o FH. Em seguida, centrifugou-se a 1400 rpm por 40 minutos. Após a centrifugação, formou-se um anel de células mononucleares na interfase, o qual foi retirado com auxílio de pipeta graduada, plástica. Esta suspensão foi transferida para novo tubo cônico, acrescentou-se cerca de um mL de meio IMDM e centrifugou-se a 1500 rpm por dez minutos. Retirou-se o sobrenadante, ressuspendendo o botão de células em meio IMDM. O último procedimento foi repetido e realizou-se a contagem de células, com auxílio de Câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular com o corante Azul de Trypan.

Co-cultivo (Carvalho, 2004) ¹²⁴:

Após o isolamento das células satélites e mononucleares, estas foram inicialmente distribuídas em placas de 75 cm² na seguinte proporção: células satélites/células mononucleares: 2/1, mantendo-se a concentração de cerca de 5 x 10⁵/mL em frascos de cultivo de 75 cm². Foram observadas diariamente em microscópio de inversão quanto à sobrevivência das células, adesão e confluência ao substrato. As células foram distribuídas e cultivadas por 21 dias. Durante o período do co-cultivo, realizou-se a fase de manutenção: a partir da primeira troca de meio de cultura, que ocorreu em 48 horas de cultivo, as células-tronco de linhagem hematopoética e as demais células não aderentes foram eliminadas e permaneceram em cultivo as células: células satélites, fibroblastos e células tronco mesenquimais, ou seja, células que aderiram ao substrato. O meio de cultivo utilizado foi o DMEM suplementado com 15% de SBF, 1% de ATB e 10 ng/mL de IGF-I (fator de crescimento de insulina)(Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Rockville, Md) e 10⁻⁷M de dexametasona. As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. O meio foi trocado duas a três vezes por semana durante 21 dias. Em seguida, realizou-se a tripsinização, para retirada das células⁸⁴, as quais foram mantidas em suspensão, à temperatura ambiente, para realização da técnica de citometria de fluxo.

Citometria de fluxo (MMWR, 1984) ¹²⁵:

Foram utilizadas suspensões celulares obtidas da etapa inicial (células satélites e células mononucleares de medula óssea) e final do co-cultivo.

A técnica utilizada em imunofenotipagem por citometria de fluxo baseou-se no princípio: *Corar, depois lisar*, ou seja, primeiro realizou-se a incubação da suspensão celular com os anticorpos pertencentes ao painel previamente estabelecido, em seguida, procedeu-se a destruição (lise) das hemácias, com o uso de tampão hemolítico.

A primeira etapa foi a identificação dos tubos com os controles e anticorpos a serem utilizados. Em seguida, pipetou-se em tubos plásticos 12X75mm, 100µl da suspensão celular. Após, acrescentaram-se os anticorpos monoclonais de escolha, cuja titulação dependeu do fabricante e de controles de qualidade internos, próprios do citômetro

em uso e do laboratório. Homogeneizou-se com auxílio de vórtex e incubou-se por 15 minutos, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Em seguida, pipetou-se, em cada tubo, um mL de solução de lise de hemácias, homogeneizou-se em vórtex e incubou-se durante dez minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Seguiu-se nova centrifugação dos tubos na rotação de 1500 rpm por cinco minutos. Após, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o material em um mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) e realizou-se nova homogenização. Procedeu-se a leitura no citômetro marca FACScalibur, BD, coletando 10.000 eventos de cada tubo. Entretanto, alguns autores utilizaram um número de eventos diferenciado, devido à quantidade celular em modelo animal ser menor: de 1.000 a 10.000 eventos ^{40, 101}. Em seguida, realizou-se a análise dos dados obtidos no software CELL QUEST.

As células foram coradas com anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC): CD44H, CD49d; ficoeritrina (PE): CD31, CD54, CD73, CD90, CD106; ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5): CD45 e alofocianina (APC): CD34. Outros AcMo do painel foram utilizados em sua forma purificada: Conexina-43, Anti-Myo-D, M-Caderina e CD105 e foram marcados com anticorpo secundário ligado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (PharMingen-BD Biosciences wwwbdbiosciences.com). Seguindo as instruções do fabricante, uma vez que existem diversas aplicações para os AcMo, cada pesquisador deve determinar as diluições apropriadas para seus experimentos. Após testes, com exceção do CD90, cuja diluição foi de 1:100, os demais AcMo, foram diluídos em 1:50. O anticorpo secundário teve sua diluição determinada em 1:5.

Segundo características de moléculas de superfície e de adesão das células envolvidas no experimento ^{37, 38, 39, 40}, demonstradas na **Tabela 2**, foi definido o painel de anticorpos monoclonais de escolha neste estudo (**Tabela 3**).

Tabela 2: AcMo e suas características de função e expressão.

AcMo	Clone	Função/expressão
CD31	TDL-3A12	Fortemente expresso em células endoteliais, virtualmente presente em monócitos, plaquetas e granulócitos. O CD31 está envolvido nos mecanismos da angiogênese, em ratos e camundongos.
CD34	581	Marcador de células-tronco (precursoras), presente também em progenitores hematopoéticos, endotélio vascular e em fibroblastos de alguns tecidos. É uma glicofosfoproteína transmembrânica altamente glicosilada.
CD44 H	OX-49	Fator de adesão celular. Amplamente expresso em células hematopoéticas e não-hematopoéticas, presente em células endoteliais e epiteliais, também no sistema nervoso.
CD45	OX-1	Marcador de leucócitos, as proteínas CD45 são encontradas em todas as células de origem hematopoéticas, exceto eritrócitos.
CD49d	MR α 4-1	Expresso em linfócitos T e B periféricos, timócitos e monócitos. Esta integrina intermedia uma variedade de interações célula-célula e célula-matriz, estando envolvida na adesão celular.
CD54	1A29	Ampla distribuição tecidual, sendo expresso no endotélio vascular de tecidos linfóides, células estromais tímicas, monócitos do sangue periférico, macrófagos e mastócitos peritoniais, células dendríticas e células não-hematopoéticas. A expressão no endotélio é fortemente regulada por mediadores inflamatórios.
CD73	5F/B9	É encontrado numa variedade de órgãos e tecidos, incluindo fígado, rins, córtex adrenal, baço, músculos, tecido nervoso e tecido cardíaco. Em ratos, o CD73 tem sido detectado em sub-tipos de linfócitos B e T periféricos, em células NK e granulócitos, bem como em células mielóides e células estromais da medula óssea.
CD90	OX-7	A sua expressão varia consideravelmente entre diferentes espécies. Expresso em células-tronco hematopoéticas, células mielóides e eritróides precoces, em linfócitos B imaturos da medula óssea e órgãos linfóides periféricos, pró-timócitos humanos, neurônios, células glomerulares mesangiais, no endotélio de locais de inflamação, mastócitos e células dendríticas. Também presente em todos os timócitos de ratos e camundongos, nas células T de camundongos mas não nas células T dos ratos. Nas três espécies, o antígeno é expresso no cérebro.

AcMo	Clone	Função/expressão
CD105	266	Modulador de respostas celulares do complexo receptor TGF-1. É fracamente expresso em fibroblastos estromais; a expressão do CD105 se apresenta aumentada em endotélio ativado, nos tecidos sob intensa angiogênese, tais como em tumores ou inflamações.
CD106	MR106	Expresso em moléculas de adesão vascular. Em células endoteliais, sua expressão é induzida por citoquinas inflamatórias sob certas condições patológicas. Na medula óssea de ratos, o CD106 é expresso em células dendríticas e sub-tipos de linhagem mielóide, porém não é detectado em leucócitos periféricos.
Conexina-43	2	Associado à presença de gap junctions. (comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas). Presente em células endoteliais, epiteliais, linfócitos T e/ou B de humanos. Cardiomiócitos expressam conexina-43.
M-Caderina	5	Envolvida na adesão celular. Está presente em músculos esqueléticos embrionários e adultos, e em baixos níveis nas células satélites.
MyoD	MoAb5.8A	Fator regulatório miogênico. Expresso exclusivamente em músculos esqueléticos. Está presente em células satélites ativadas durante todo o processo da diferenciação de mioblastos.
Anticorpo secundário	G28-5	Anticorpo monoclonal conjugado com FITC. Utilizado como reagente secundário nas colorações por imunofluorescência.

Tabela 3: Painel de AcMo utilizado para análise de células mononucleares e células do produto do co-cultivo:

Tubos	AcMo
1	Controle isotípico
2	CD44H/CD90/CD45/CD34
3	MyoD/CD90/CD45/CD34
4	CD105/CD31/CD45/CD34
5	M-Caderina/CD106/CD45/CD34
6	CD49d/CD73/CD45/CD34
7	Conexina 43/CD54/CD45/CD34

O painel de anticorpos utilizado para análise das células satélites pré-cultivo foi reduzido (Tabela 4), devido às interferências técnicas encontradas para obtenção do número de células adequado para análise imunofenotípica e a presença de resíduos (o isolamento das células satélites se utiliza de maceração e dissociação enzimáticas, gerando muitos resíduos que não são destruídos no decorrer do procedimento técnico utilizado para imunofenotipagem), interferindo na aquisição e análise dos dados de citometria.

Tabela 4: Painel de AcMo para células satélites pré-cultivo:

Tubos	AcMo
1	Controle isotópico
2	MyoD/CD90/CD45/CD34
3	M-Caderina/CD106/CD45/CD34
4	Conexina 43/CD54/CD45/CD34

Tabela 5: Desenho do estudo

Momento zero	Momento final (21 dias)
Caracterização das células satélites	Caracterização das células obtidas no co-cultivo das células satélites e mononucleares.
Caracterização das células mononucleares	

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O objetivo da análise estatística foi comparar o percentual marcado nas três populações celulares e o grau de positividade observado, e a análise foi baseada na comparação dos três tipos celulares em relação ao valor percentual utilizando o teste não-paramétrico de Friedman.

A comparação entre dois tipos de células foi realizada utilizando-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon.

O nível de significância considerado foi de 0,05. Nas comparações múltiplas das células duas a duas, valores de $p < 0,017$ indicaram significância estatística (correção de Bonferroni).

Análise complementar

A associação entre idade e total de células isoladas foi avaliada estimando-se o coeficiente de correlação de Spearman e testando-se a hipótese nula de inexistência de associação entre estas variáveis, *versus* a hipótese alternativa de existência de associação.

5. RESULTADOS

A Tabela 6 mostra uma compilação dos resultados obtidos pela análise imunofenotípica do percentual de positividade dos AcMo.

Tabela 6: Percentual de positividade dos AcMo

AcMo	Percentual de Células mono nucleares pré-cultivo (mediana) (Mín-Máx)	Percentual de Células satélites pré-cultivo (mediana) (Mín-Máx)	Percentual de Células do produto do co-cultivo (mediana) (Mín-Máx)	Valor de p
CD31	4,26 (2,07-8,56)	NR	1,94 (1,51-12,28)	0,2489
CD34	0,26 (0,00-6,58)	0,61 (0,00-2,92)	1,85 (0,47-4,53)	0,3114
CD44 H	25,44 (5,98-79,88)	NR	1,81 (0,17-42,65)	0,1730
CD45	89,49 (49,13-93,73)	3,58 (0,94-10,72)	4,74 (0,17-6,14)	0,0094 *
CD49d	5,59 (0,00-49,08)	NR	0,55 (0,11-16,18)	0,4631
CD54	8,43 (0,55-19,50)	5,29 (0,92-13,69)	4,48 (1,39-56,37)	0,5488
CD73	7,21 (0,37-16,69)	NR	28,99 (4,56-84,90)	0,0277 *
CD90	36,18 (18,24-56,16)	6,01 (0,99-36,18)	48,94 (10,28-95,36)	0,0422 *
CD105	18,46 (5,27-67,93)	NR	2,79 (0,79-19,42)	0,0277*
CD106	12,31 (8,60-18,42)	8,84 (3,66-19,22)	4,49 (0,66-25,03)	0,3114
M-Caderina	21,24 (12,01-68,19)	6,01 (3,49-24,54)	3,02 (0,16-18,16)	0,0302*
MyoD	17,98 (7,45-68,30)	10,35 (1,75-32,33)	2,58 (1,47-12,97)	0,0695
Conexina-43	24,12 (4,98-68,14)	7,51 (1,89-17,80)	2,33 (1,32-13,32)	0,0150*

Os valores de p em negrito (*) correspondem às comparações em que foram encontradas diferenças significativas entre as populações celulares avaliadas (nível de significância de 0,05).

Na tabela 7, abaixo, são apresentados os valores de p das comparações das três populações celulares, duas a duas, em relação ao percentual dos marcadores CD45, CD90, M-Caderina e Conexina-43.

Tabela 7: Valores de p em comparações das populações celulares:

Populações celulares comparadas	CD45 Valor de p	CD90 Valor de p	M-Caderina Valor de p	Conexina-43 Valor de p
Células mononucleares x células satélites	0,0143	0,0143	0,1025	0,1797
Células mononucleares x células de co-cultivo	0,0143	0,4142	0,0143	0,0143
Células satélites x células de co-cultivo	0,4142	0,1025	0,4142	0,0253

Valores de $p < 0,017$ indicam significância estatística (correção de Bonferroni).

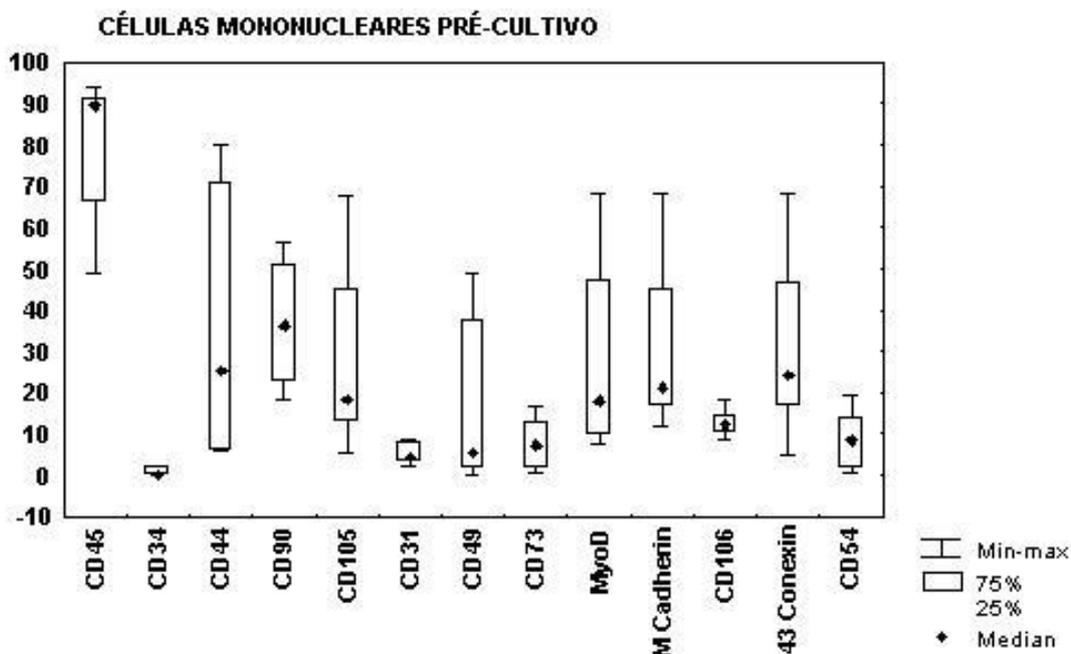


Figura 4: Gráfico: valores de medianas das células-tronco mononucleares.

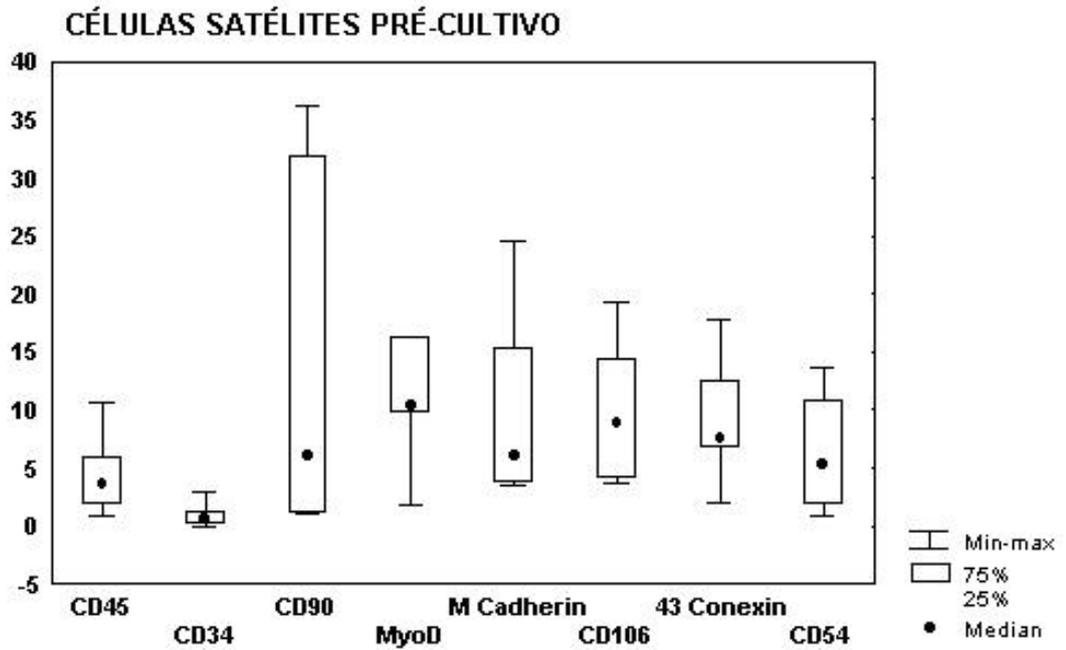


Figura 5: Gráfico: valores de medianas das células satélites.

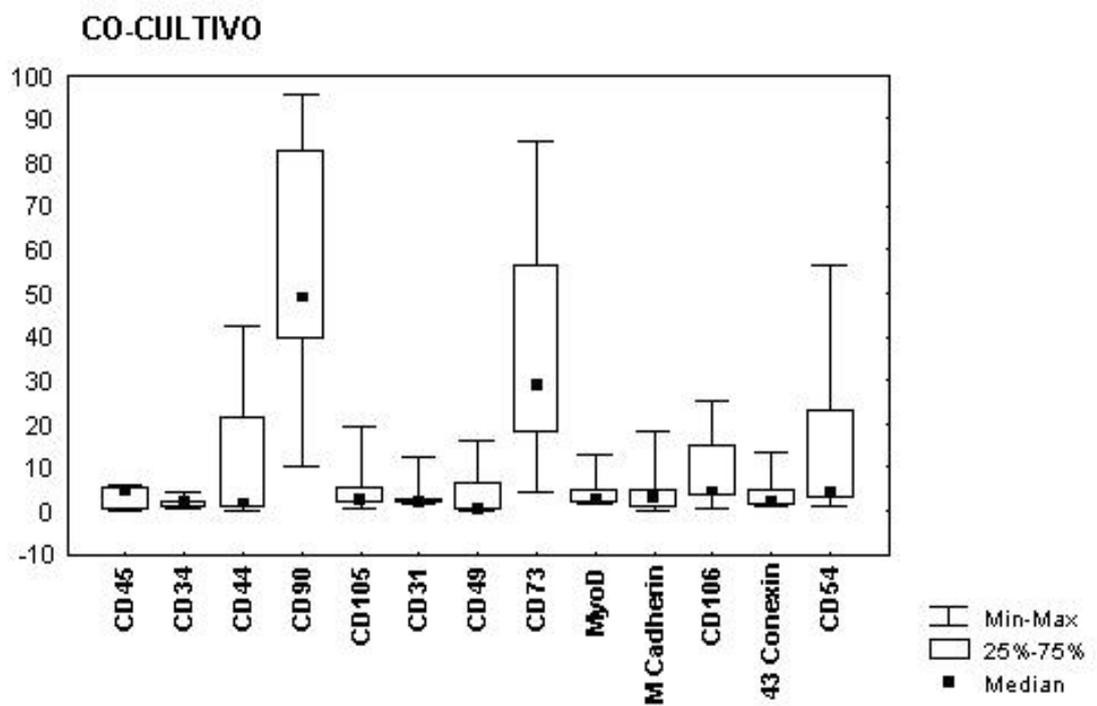


Figura 6: Gráfico: valores de medianas do co-cultivo.

ESTUDO COMPARATIVO DAS POPULAÇÕES CELULARES

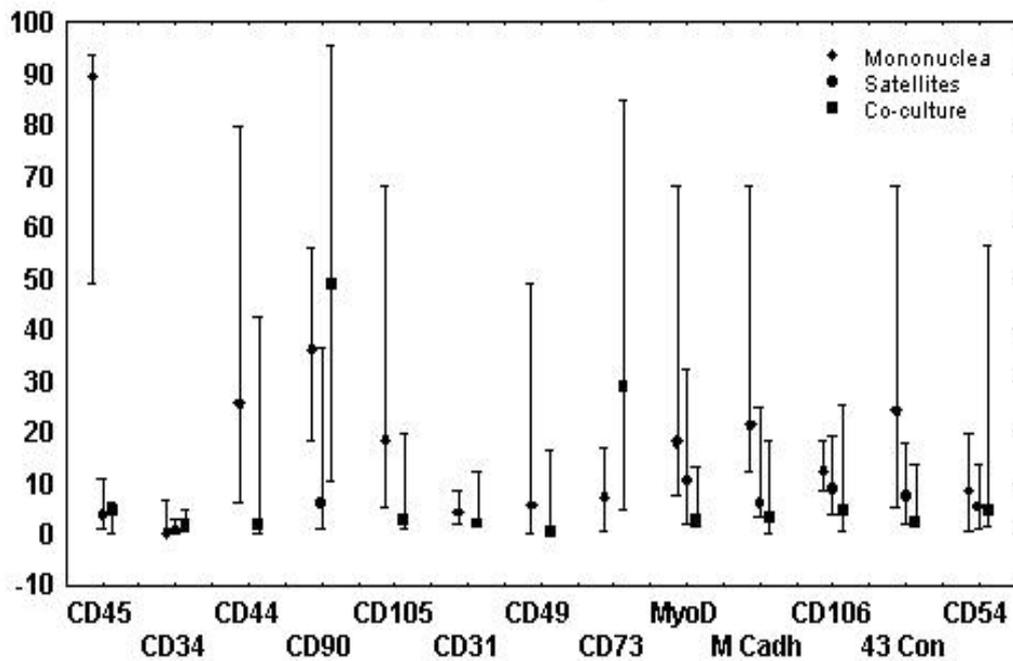


Figura 7: Gráfico comparativo das populações celulares.

Foi avaliada, em análise complementar, a associação entre a idade e o número total de células obtidas no isolamento de células-tronco mononucleares e células satélites. Os dados obtidos e os resultados são apresentados nas Tabelas 8 e 9:

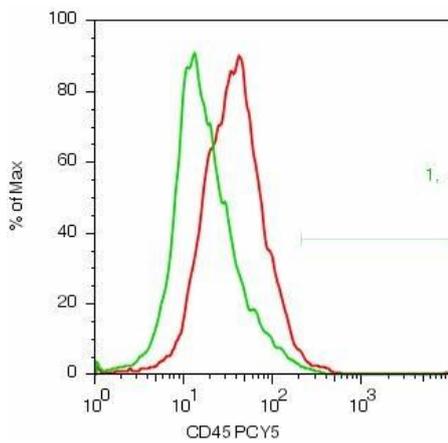
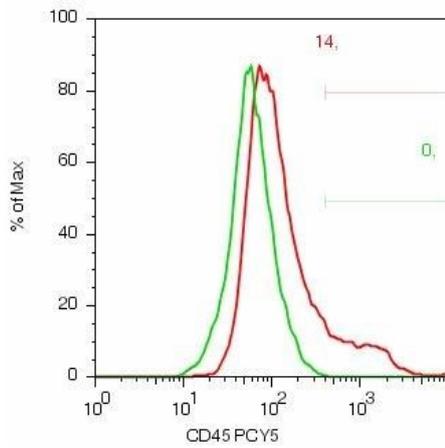
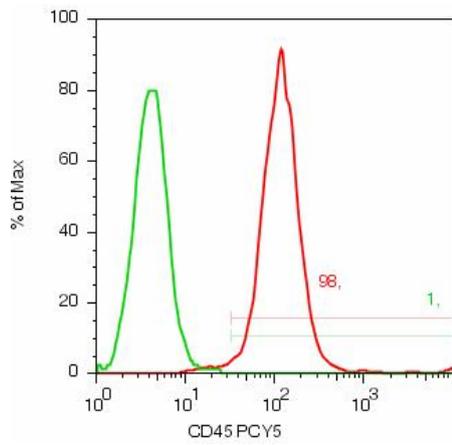
Tabela 8: Dados de idade *versus* número total de células isoladas:

Variável	N	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Idade do rato/meses	6	$2,98 \times 10^7$	$2,00 \times 10^7$	$0,93 \times 10^7$	$6,00 \times 10^7$	$2,39 \times 10^7$
Nº total de células-tronco mononucleares	6	$4,33 \times 10^7$	$3,71 \times 10^7$	$1,88 \times 10^7$	$9,00 \times 10^7$	$2,46 \times 10^7$
Nº total de células satélites	6	$18,16 \times 10^7$	$2,79 \times 10^7$	$2,35 \times 10^7$	$86,00 \times 10^7$	$33,47 \times 10^7$

Tabela 9: Associação idade *versus* número total de células isoladas

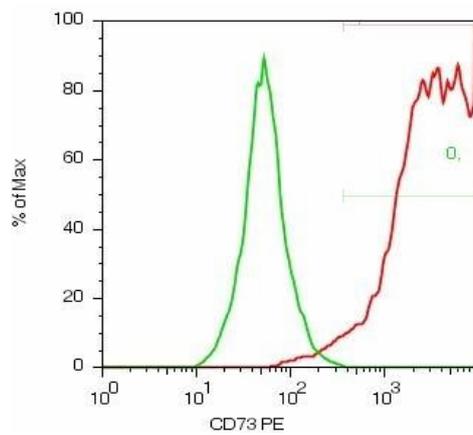
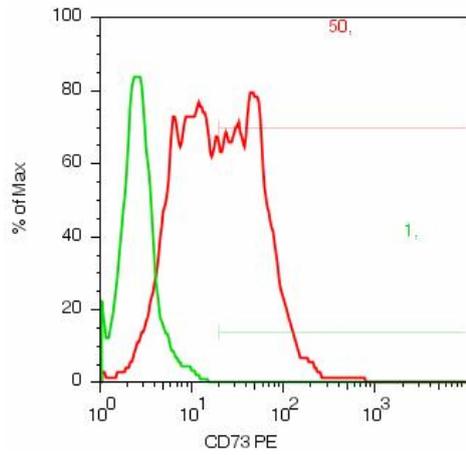
Variáveis	Nº de experimentos	Coefficiente de correlação	Valor de <i>p</i>
Idade x células-tronco mononucleares	6	0,24	0,6483
Idade x células satélites	6	-0,84	0,0378

Em outra análise, observaram-se os marcadores com relação à intensidade de expressão (Anexo 03), sugeriu-se o perfil das células-tronco mononucleares e células satélites pré-cultivo e células do produto do co-cultivo utilizando classificação modal.



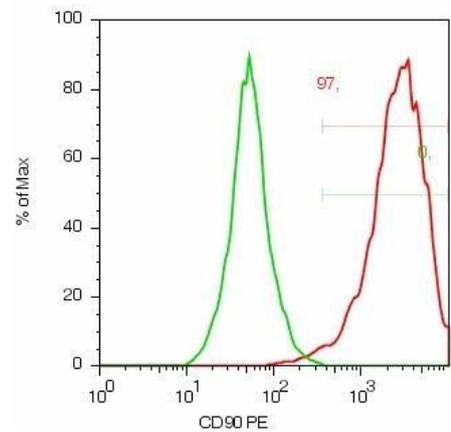
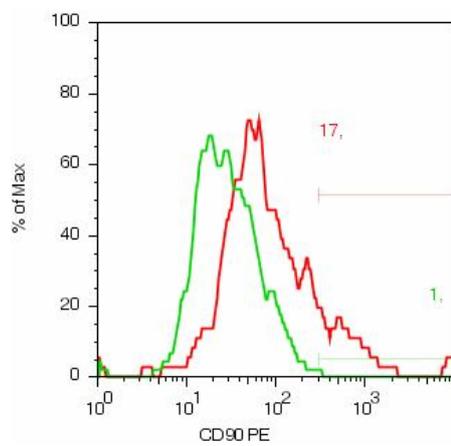
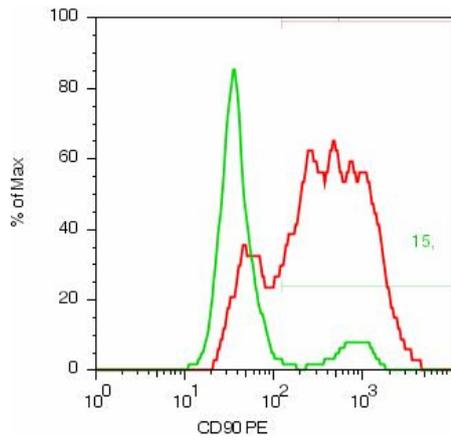
■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

Figura 8: Histogramas: células-tronco mononucleares CD45(+) versus células musculares esqueléticas CD45(-) e células de co-cultivo CD45(-).



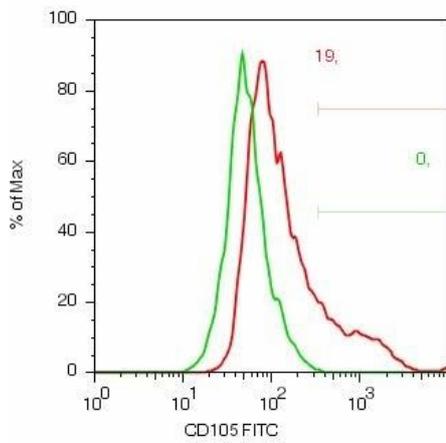
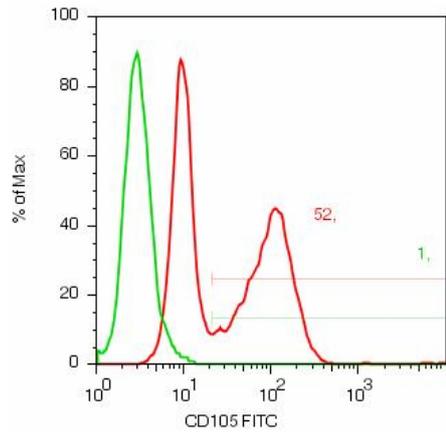
■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

Figura 9: Histogramas: células-tronco mononucleares CD73(+ /++) versus células de co-cultivo CD73(+ /++).



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

Figura 10: Histogramas: células-tronco mononucleares CD90 (+++) versus células satélites CD90(+) e Células de co-cultivo CD90(++/+++).



■ População celular positiva
■ Controle isotípico negativo

Figura 11: Histogramas: células-tronco mononucleares CD105(+) versus células de co-cultivo CD105(-).

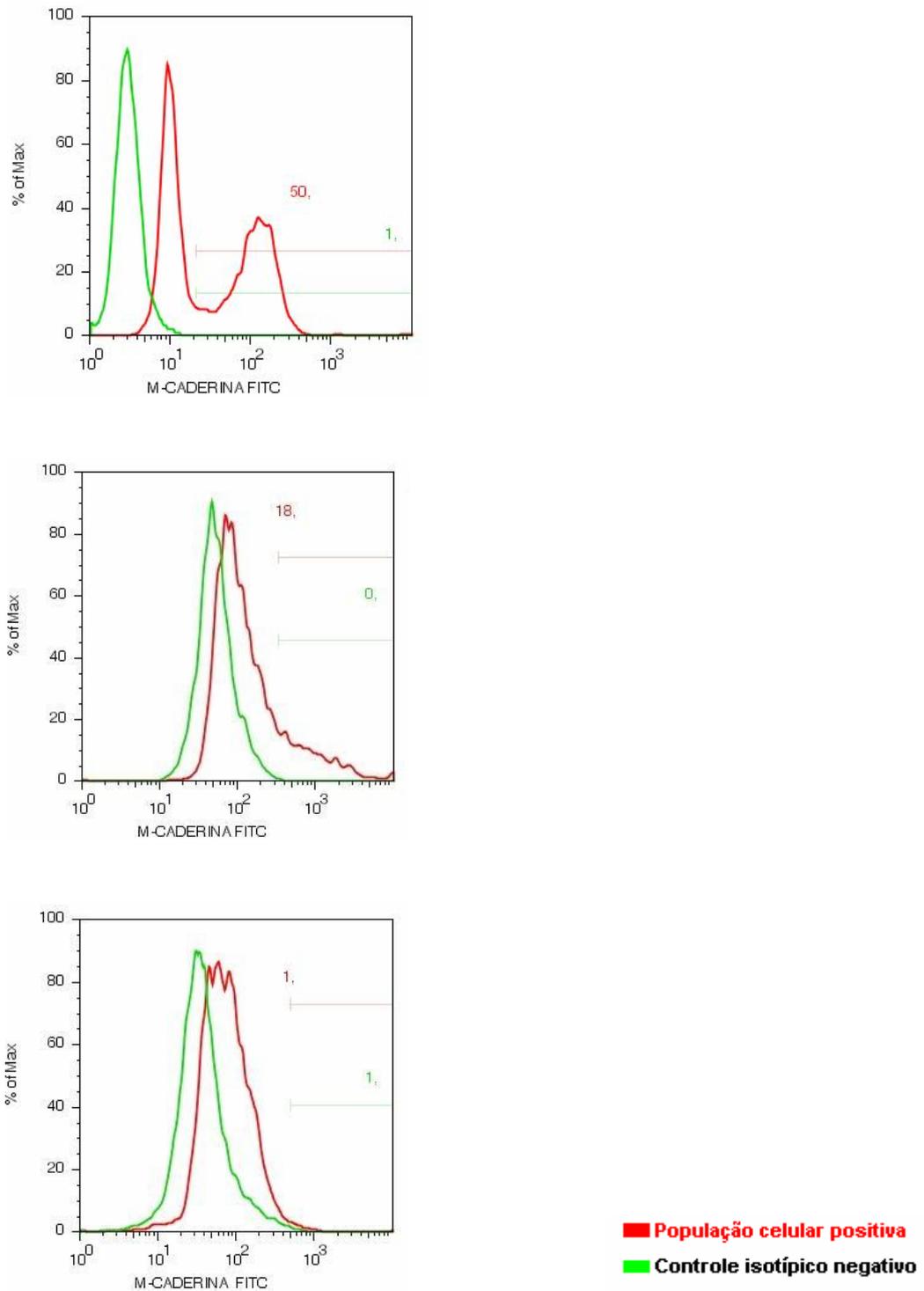


Figura 12: Histogramas de resultados: células-tronco mononucleares M-Caderina(+ /++) versus Células satélites M-Caderina(-) e células de co-cultivo M-Caderina(-).

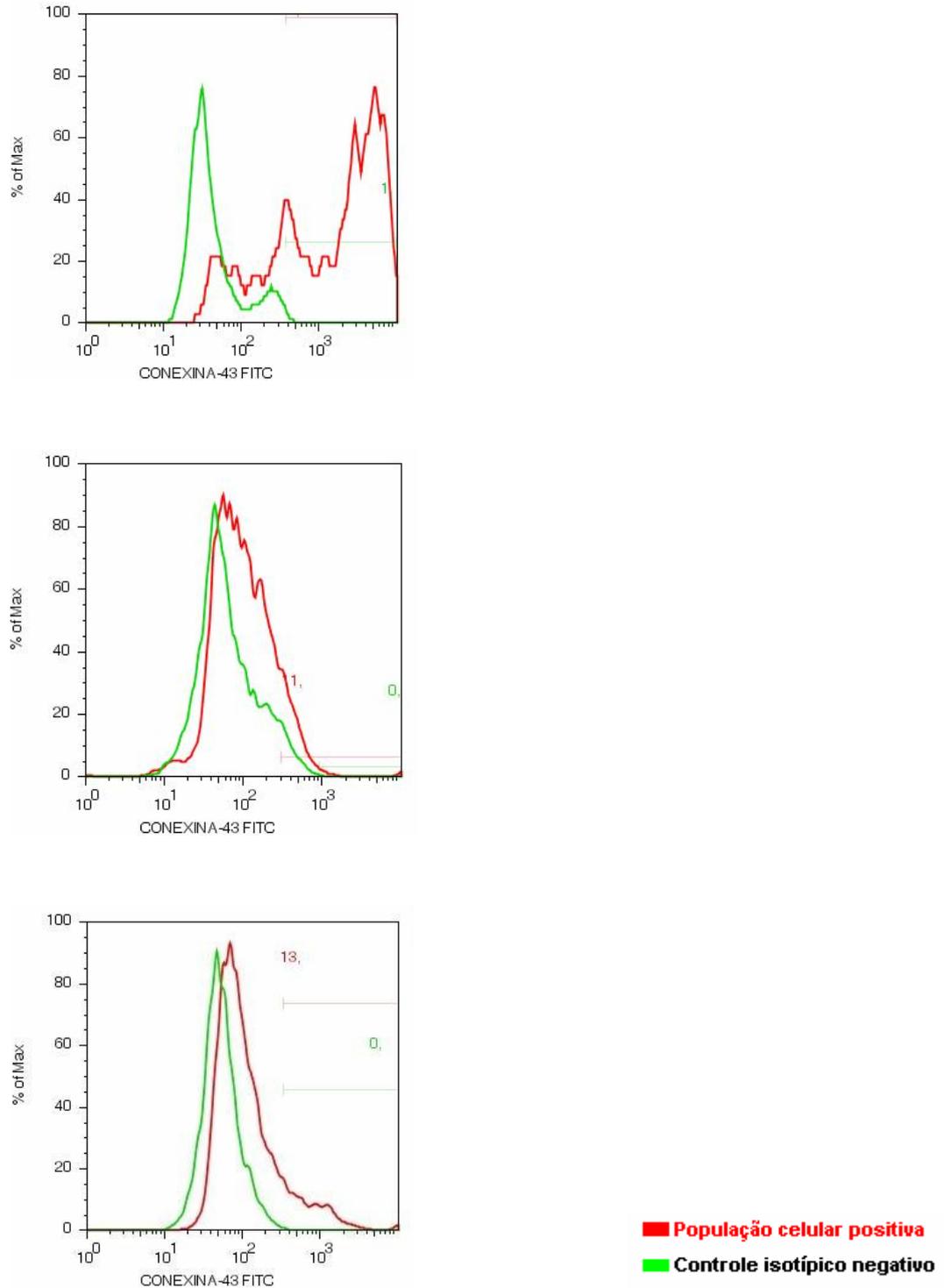


Figura 13: Histogramas de resultados: células-tronco mononucleares Conexina-43 (+/++) versus células satélites Conexina-43(-) e células de co-cultivo Conexina-43(-).

6. DISCUSSÃO

O pensamento inicial sobre células do estroma da medula óssea baseava-se no conceito de que sua função principal era proporcionar suporte estrutural para células-tronco hematopoéticas e células progenitoras na medula. Desde então, foi estabelecido que o estroma medular constitui-se de uma população celular heterogênea, incluindo células endoteliais, fibroblastos, adipócitos e células osteogênicas. Acredita-se que a população celular estromal aderente pode conter outras células não-hematopoéticas que seriam capazes de auto-regeneração e diferenciação em tecido ósseo, cartilagem, músculo, tendão e gordura. Muitos pesquisadores referiam-se a estas células cultivadas como células-tronco mesenquimais ⁹⁴.

As células-tronco podem também ser coletadas e cultivadas de outras fontes autólogas como a medula óssea, o sangue de cordão umbilical e tecido adiposo. É importante, porém, o conceito de quantidade de células necessárias para obter um efeito satisfatório ¹²⁶.

Recentemente, CLARKE (2004) relatou a caracterização de células mesenquimais humanas cultivadas com um painel de anticorpos: CD34(-), CD45(-), CD73 (+), SH3(+), CD105(+). Apesar disso, o exato fenótipo das células-tronco mesenquimais é ainda debatido. Embora utilizando modelo animal, nossos resultados, após o co-cultivo, sugeriram concordância com o autor em relação ao CD45 e CD73, porém, diferem em relação aos marcadores CD34 e CD105 ¹¹³. Os resultados obtidos foram relacionados nas **Tabelas 6 e 7**, e a representação gráfica foi demonstrada nas **Figuras 5, 6 e 7**.

Um estudo realizado com células de medula óssea administradas em modelo experimental (ratos Fisher isogênicos), teve como parte de seu desenho a identificação da população celular injetada em ratos infartados. Para identificar a população celular que migrou para a região afetada, foram utilizados dois marcadores para células progenitoras hematopoéticas: CD34 e CD90 (Thy-1), cujas positivities foram observadas na região infartada ⁹⁵. Neste caso, como o perfil avaliado referiu-se às células hematopoéticas, houve concordância com os resultados obtidos em nosso experimento para os dois marcadores, nas células hematopoéticas pré-cultivo.

Em estudo sobre as células-tronco mesenquimais humanas multipotentes, as células demonstraram um fenótipo estável e permaneceram como camada única *in vitro*. Estas células foram cultivadas, isoladas e caracterizadas por citometria de fluxo. Os resultados da análise imunofenotípica demonstraram, após 14 dias de cultivo, que a população celular foi de 95 a 99% homogênea, e apresentou reatividade negativa para CD14, CD34 e CD45, enquanto os marcadores CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD120a, CD124 foram positivos. Células hematopoéticas não foram identificadas entre células cultivadas ³⁷. Embora existam diferenças entre os marcadores para humanos em relação a modelos animais, percebeu-se que alguns marcadores tiveram um padrão semelhante, tanto em humanos quanto em animais, como é o caso do CD34(-), CD45(-), CD44 H(-/+), CD73(+), CD90(+) e CD106(+).

As células mesenquimais demonstram ser diferentes de células fibroblásticas da medula porque estas últimas permanecem positivas para o antígeno de superfície CD34 ¹²⁷. Nossos resultados em relação ao produto do co-cultivo foram negativos para o marcador CD34, o que sugeriu a possibilidade do produto do co-cultivo não ter constituição de fibroblastos.

Nas células-tronco mesenquimais expandidas por cultivo, o fenótipo obtido foi semelhante em todos os tecidos fetais humanos: CD73(+), CD90(+), CD105(+),

CD166(+), SH4(+) e HLA ABC(+). Os marcadores CD14, CD31, CD34, CD45 e HLA-DR foram negativos. As conclusões dos experimentos foram de que, embora fenotipicamente semelhantes, células-tronco mesenquimais expandidas por cultivo exibem heterogeneidade em seu potencial de diferenciação e estas diferenças podem ter relevância para a aplicação clínica de células-tronco mesenquimais obtidas por cultivo. Nosso experimento mostrou concordância em relação aos marcadores: CD31(-), CD45(-), CD73(+) e CD90(+), porém, foi discordante em relação ao CD34 e CD105. Os outros marcadores não fizeram parte do nosso painel de anticorpos estudados. Como o próprio autor comenta, as células mesenquimais cultivadas exibem heterogeneidade em seu potencial de diferenciação, o que poderia explicar as diferenças observadas entre os experimentos ³⁶.

Em outro experimento, com células humanas, alguns antígenos (CD90, CD164 e CD172a) eram compartilhados por células de origem mesenquimal e nervosa, além disso, nenhum destes antígenos estaria limitado a estas duas populações. O CD90 foi também encontrado em células endoteliais ¹²⁸. Nossos resultados mostraram a presença de CD90(+) em 48,94% das células obtidas no co-cultivo, porém, outros marcadores de células endoteliais foram testados, CD31, CD106, e mostraram negatividade no produto do co-cultivo.

Em um estudo sobre moléculas sinalizadoras nas células-tronco mesenquimais da medula óssea e sua relevância para a biologia destas células, tendo em vista seu envolvimento na regulação da proliferação e diferenciação, destacou-se o conceito de célula-tronco mesenquimal, inicialmente identificada na medula óssea como uma célula progenitora, multipotente, não-hematopoética, que se diferenciava em osteoblastos e adipócitos, condrócitos, células de tendão, miócitos esqueléticos e em células da mesoderme visceral. Recentemente, um *pool* de células-tronco mesenquimais foi demonstrado em outros tecidos, e células-tronco mesenquimais circulantes foram detectadas em sangue periférico, sugerindo que o tecido mesenquimal pode ser suportado por células-tronco mesenquimais circulantes, como acontece com células-tronco hematopoéticas ¹¹⁸.

Ainda que as células-tronco mesenquimais sejam raras na medula óssea de indivíduos adultos ($1/10^5$), elas constituem aproximadamente um terço das colônias estromais aderentes derivadas da medula óssea *in vitro*. Elas expressaram um padrão específico de moléculas, tais como CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, em altos níveis. O marcador CD106(VCAM-1) foi expresso em menor intensidade. Além destes

marcadores, foi assegurada a ausência de células hematopoéticas e endoteliais (com os marcadores CD11c, CD14, CD31 e CD34, CD45, CD123). As células-tronco mesenquimais humanas também foram marcadas com CD10 e CD56, para diferenciação entre células adiposas e osteoblastos, respectivamente ¹¹⁸. Novamente, embora nosso experimento tenha sido em modelo animal, alguns marcadores sugerem possuir perfil semelhante: CD31(-), CD34(-), CD73(+), CD45(-), CD90(+) e CD106(-/+).

Outro estudo investigou a diferenciação, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais. As células foram caracterizadas por citometria de fluxo e foi utilizado um painel de anticorpos monoclonais para testar seu potencial de diferenciação. As células-tronco mesenquimais isoladas foram positivas para os marcadores CD44, CD73, CD90, CD166 e CD105; e foram negativas para marcadores típicos hematopoéticos e endoteliais (CD31, CD34, CD45, CD54, CD105). O autor ressaltou que estes marcadores não são específicos para células-tronco mesenquimais, elas são também caracterizadas por sua habilidade de diferenciar-se em múltiplas linhagens mesenquimais, incluindo osteócitos, condrócitos, células adiposas e células de músculos esqueléticos, sob condições controladas *in vitro*. Todavia, as células-tronco mesenquimais preenchem todos os critérios de células-tronco “de fato”: auto-regeneração, diferenciação em multilinhagens e reconstituição de tecidos *in vivo* ⁷⁶.

Em seu artigo, HORWITZ (2002) apresentou argumentos contrários sobre o fato de que, uma vez que não há uma definição universal de células-tronco mesenquimais (em analogia com células-tronco hematopoéticas CD34+) e nenhum ensaio universal; vários laboratórios desenvolveram novos métodos de isolamento de uma célula mesenquimal levando em conta sua auto-regeneração e capacidade de diferenciação. Porém, nenhum laboratório isolou células por múltiplos métodos e realizou estudos comparativos, o que criou dificuldades para correlacionar estas células com outras ¹¹⁵.

O conceito completo de célula-tronco mesenquimal é pouco claro. O que se sabe sobre a morfologia das células-tronco mesenquimais é que seriam tipicamente células de medula, não aderentes, geralmente fusiformes, mas algumas populações celulares mais esféricas. Quanto aos determinantes antigênicos, ainda não existe nenhum aceito universalmente. Muitos pesquisadores exploraram o CD105 como um importante determinante antigênico na identificação de células-tronco mesenquimais. Em nosso experimento, o marcador CD105 teve sua positividade observada em

18,46% das células-tronco mononucleares pré-cultivo, e em somente 2,79% das células obtidas após o co-cultivo, o que nos leva a concordar com o autor na questão de ainda existirem inúmeras variáveis que podem interferir na caracterização definitiva das células mesenquimais ¹¹⁵.

Outro estudo relatou sobre células-tronco mesenquimais isoladas, cultivadas e fenotipadas por citometria de fluxo apresentando resultados positivos para o marcador CD90 e CD45(-) e CD34(-), o que foi concordante com nossos resultados ¹¹⁹.

Outros estudos relacionaram os anticorpos monoclonais CD29, CD44 e CD90 como importantes determinantes ^{37, 38, 51}, enquanto outro autor relatou que células RS (recycling cells) não podem ser claramente distintas de outras células mesenquimais aderentes somente por expressão antigênica ⁴¹. Nossos dados sugerem positividade para CD44H e CD90, o CD29 não foi testado em nosso painel.

Como já foi sugerido por outros autores, não existe, até o momento, um marcador específico para caracterizar as células mesenquimais. Acreditamos que, como o surgimento de novos anticorpos monoclonais e aprimoramento das técnicas de análise em citometria, num futuro próximo poderão ser caracterizados não só as células mesenquimais, mas também outros tipos celulares que se encontram em situação semelhante.

A diferenciação terminal das células musculares, na avaliação da linhagem mioblástica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é dependente de Fatores Regulatórios Miogênicos (MRFs). Estes fatores incluem a família MyoD, Myf5, miogenina e MRF4. A expressão de qualquer um destes MRFs é suficiente para converter uma variedade de tipos celulares para a rede de diferenciação miogênica. Os mecanismos pelos quais MyoD poderia induzir miogênese envolvem a ativação e expressão do gene músculo-específico, atuando sobre o ciclo celular. As funções do MyoD foram reprimidas na proliferação das células satélites, sendo o MyoD e Myf5 frequentemente classificados como fatores determinantes, uma vez que eles são expressos em células satélites (mioblastos proliferantes), enquanto a expressão da miogenina e MRF4 foi encontrada somente em miotubos maduros. A não utilização do marcador MYf5 em nosso estudo deveu-se a que suas funções são pobremente entendidas: é o fator expresso mais prematuramente e sua expressão é transitória, é regulado por mecanismos pós-transcricionais, além de ser ciclo-celular dependente ¹⁰⁹.

Outros experimentos reforçaram estes conceitos. Células satélites são células miogênicas encontradas entre a lâmina basal e fibras de *sarcolemma*, em músculo

esquelético adulto. Estas células são responsáveis pela habilidade de regeneração muscular. Após ativação, células satélites proliferaram e fundiram-se em miotubos, os quais sofreram maturação originando fibras musculares. Sob injúria e ativação, frações de células satélites realizaram nova entrada no ciclo celular e começaram a expressar os fatores miogênicos regulatórios. Resultados obtidos por métodos imunocitoquímicos e Western blott demonstraram que células satélites expressavam primeiramente Myf5 e MyoD. A expressão proteica de Myf5 permaneceu em nível inalterado nos mioblastos em divisão e foi ausente em miotubos multinucleados. A expressão da proteína MyoD inicia-se em mioblastos proliferantes e estava presente durante todo o período de diferenciação (5^o, 7^o e 11^o dia de cultivo), sendo que o maior conteúdo proteico de MyoD foi observado no 11^o dia de cultivo^{51, 129}. Em nosso experimento, as células foram mantidas em co-cultivo por 21 dias, o que poderia explicar o fato do marcador MyoD ter resultado negativo. Provavelmente houve perda de sua expressão antigênica, uma vez que seu pico de proliferação é no 11^o dia de cultivo.

Outro fator a ser levado em consideração em nosso estudo, com relação à marcação das células satélites foi a dificuldade técnica ocasionada pelos inúmeros resíduos que ocorreram quando do isolamento das células, que se utiliza de maceração e dissociação enzimáticas, gerando muitos resíduos. Estes resíduos, somados ao reduzido tamanho celular, impediram a correta aquisição e interpretação dos dados, criando um impedimento alostérico. Observou-se, em análise complementar (**Tabelas 8 e 9**), que entre idade do animal e total de células no isolamento de células satélites existe uma associação significativa e negativa, ou seja, valores baixos de idade estão associados a valores altos do total de células isoladas.

Num outro estudo foram examinadas diferenças de comportamento e de fenótipo em distintas sub-populações de precursores dentro do *pool* de células satélites. Além disso, especulou-se sobre a possível identidade, origem e relevância de células-tronco musculares, uma população com potencial hematopoético e miogênico e que pode ser isolada de músculo total. Células satélites quiescentes expressavam Myf5, mas não MyoD. Quando MyoD estava ausente, células satélites ativadas mostraram aumento de proliferação e retardo de diferenciação⁶³.

Outras investigações demonstraram o potencial de diferenciação de células-tronco derivadas de músculos e células satélites e a relação entre estas duas populações celulares. Primeiramente, foi examinada a expressão de marcadores da

célula-tronco hematopoética, CD34, Sca-1 e CD45, em células satélites. Observou-se CD34(+) e CD45 e Sca-1 negativos, o que foi concordante com análises prévias de outros autores ^{42, 101, 110}. Em nosso experimento, observamos negatividade para o marcador CD45 e para o marcador CD34. O marcador Sca-1 não foi utilizado em nosso estudo.

Outros marcadores foram expressos pelas células satélites quiescentes: M-Caderina e CD34, o que sugeriu que estas células já estavam comissionadas para a linhagem miogênica, antes da ativação ¹³⁰. Nossos experimentos não obtiveram resultados concordantes em relação à M-Caderina e o marcador CD34 em células satélites, devido às dificuldades técnicas já relacionadas anteriormente.

Alguns pesquisadores demonstraram, tanto em modelo humano como em modelos animais (cães e roedores), utilizando caderinas e conexina-43, a importância da interdependência entre a adesão intercelular e a formação de *gap junctions*, como um importante fator na maturação da função eletromecânica em tecidos cardíacos de mamíferos. Além disso, falhas na geometria normal das conexões elétricas intercelulares em desordens cardíacas estão correlacionadas com distúrbios de condução do impulso elétrico e arritmias ^{104, 106}.

Embora a Conexina-43 seja considerada um marcador de *gap junctions*, células epiteliais e endoteliais expressam conexinas. Tem sido detectada a presença de conexina-43 e conexina-40 em linfócitos T e/ou B isolados de sangue humano a fresco ¹⁰⁷. Nossos resultados identificaram positividade nas células-tronco mononucleares (24,12%), o que sugere concordância com o autor.

A presença de vasos no interior do músculo, quando do isolamento das células mioblásticas esqueléticas, após a biópsia do músculo esquelético (por maceração e digestão enzimática) justifica a positividade para a Conexina-43 nas células satélites pré-cultivo (7,51%).

Análises da linfopoese em camundongos (estado embrionário e neonatos) demonstraram uma clara necessidade de Conexina-43 para o estabelecimento e regeneração do sistema hematopoético. A maturação de timócitos duplo-positivos CD4(+)CD8(+) em células expressando somente CD4 ou CD8 é claramente dependente da expressão de Conexina-43 ¹⁰⁵.

Nossos resultados encontrados para M-Caderina e Conexina-43 em células-tronco mononucleares sugerem concordância com o autor.

Para investigar a possibilidade de células-tronco mesenquimais de doadores diferenciarem-se em cardiomiócitos em tecido miocárdico infartado, foi testado o marcador anti-Conexina-43. Demonstrou-se que certa proporção de células expressou o marcador anti-Conexina-43 ⁷⁷.

Nossos resultados mostraram positividade para a Conexina-43 no produto do co-cultivo (2,33%), o que nos sugere ser favorável à melhor integração no tecido transplantado.

7. CONCLUSÕES

1. As análises dos marcadores propostos demonstraram significância estatística ($p < 0,05$) quando comparados os percentuais das populações iniciais de células-tronco mononucleares pré-cultivo, células satélites pré-cultivo e células do produto final do co-cultivo de ambas, para os marcadores **CD73, CD90, CD105, CD45, M-Caderina e Conexina-43**.
2. Com base na amostra deste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes entre os três tipos celulares avaliados para os marcadores: CD31, CD34, CD44 H, CD49d, CD54, CD106 e Myo-D.
3. As análises dos marcadores utilizados sugerem grande variabilidade nos três grupos celulares avaliados, comprometendo a real valorização da escala logarítmica para intensidade de expressão.
4. Os achados sugerem uma população heterogênea de células, sobretudo de células aderentes, sugerindo interação celular e diferenciação, caracterizando uma mudança do perfil inicial ao produto final, *in vitro*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. InCor HC/FMUSP 2001. www.incor.usp.br. Capturado em 22/05/2005.
2. Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med*. 2004; 5(2): 82-98.
3. Prósper F, Perez A, Merino J, Rábago G, Chachques JC, Hernandez M et al. Adult stem cells for myocardial repair. *Basic appl Myol* 2003; 13(1): 15-22.
4. Scorsin M, Guarita-Souza, LC. Cellular transplantation for the treatment of heart failure. State of the art. *Arq. Bras. Cardiol*. 2001, 77(2)
5. Al Attar N, Razak AB, Scorsin M. Cellular transplantation: new horizons in the surgical management of heart failure. *J.R.Coll. Edinb*. 2002, 47: 749-752.
6. Pompilio G, Cannata A, Capogrossi MC, Alamanni F, Pesce M, Germani A et al. Cardiomioplastica cellulare autologa. *Cardiologia predittiva e regenerativa* 2004. www.cardiogenomica.tk. Capturado em 01/03/2004.
7. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Tan S-M, Finato N, Bussani R et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *NEJM* 2001; 344 (23): 1750-1757.
8. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di-Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *PNAS* 1998; 95(15): 8801-8805.
9. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res*. 2002; 91:501-517.
10. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(5):589-610.
11. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, Ikezawa M, Cummins J, Pruchnic R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *JCB* 2002; 147(5): 851-864.
12. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature* 2001; 7(4): 430-436.

13. Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artificial Organs* 2001; 25(3): 187.
14. Leiden JM. Beating the odds: a cardiomyocyte cell line at last [commentary]. *J Clin Invest* 1999; 103(5): 591-592.
15. Moore MAS. Putting the neo into neoangiogenesis [commentary]. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:313-315.
16. Strauer BE, Kornowski R. Stem cells therapy in perspective [mini-review: expert opinions]. *Circulation* 2003; 107(7): 929.
17. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19(3): 180-192.
18. Boheler KR, Czyz J, Tweedie D et al. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes [review]. *Circ Res.* 2002; 91:189-201.
19. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; 98(7): 2008-2013.
20. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *PNAS* 2002; 99(3): 1341-1346.
21. Penn MS, Francis GS, Ellis SG, Young JB, McCarthy PM, Topol EJ. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium [review article]. *Pcad.* 2002; 45(1): 21-32.
22. Yannaki E, Papayannopoulou TH. Stem cells have an identity crisis [review article]. *Haema* 2001; 4(3): 158-166.
23. Perin EC, Geng Y, Willerson JT. Adult stem cell therapy in perspective [Mini-review]. *Circulation* 2003; 107:935-938.
24. Solter D, Gearhart J. Enhanced: putting stem cells to work. *Science* 1999; 283(5407): 1468-1470.
25. Hescheler J, Fleischmann BK. Indispensable tools: embryonic stem cells yield insights into the human heart. [commentary]. *J. Clin. Invest.* 2001; 108(3): 363-364.
26. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults [Clinical review]. *BMJ* 2002; 325(7360): 372-376.
27. Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:1121-30.

28. Kao RL, Zhang F, Yiang ZJ, Gao X, Li C. Cellular cardiomyoplasty using autologous satellite cells: from experimental to clinic study. *Basic Appl Myol* 2003; 13(1): 23-28.
29. Law PK, Sim EKW, Haider KH et al. Myoblast genome therapy and the regenerative heart. *Cardiovascular Cell* 2003; 17:243-258.
30. Lee MS, Makkar RR. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: a status report [review]. *Ann Intern Med.* 2004; 140:729-737.
31. Chachques JC, Salanson-Lajos C, Lajos P, Shafy A, Alshamry A, Carpentier A. Cellular cardiomyoplasty for myocardial regeneration [review paper]. *Asian Cardiovascular & Thorac Ann* 2005; 13(3): 287-296.
32. Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C, Senegaglia A, Furuta M, Miyague N et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 83(4):294-9.
33. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Woitowicz V, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P et al. Simultaneous autologous transplantaion of co-cultured mesenchymal stem cells ans skeletal myoblasts improves ventricular function in a murine modelo f Chagas disease. *Circulation.* 2006. In press.
34. Fontes PA, Thomson AW. Stem cell technology. *BMJ* 1999; 319(7220): 1308.
35. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W et al. The use of four-color immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J. Anat.* 2004; 204:133-139.
36. Pieterella SA, Noort WA, Scherjon AS, Kleuburg-Van der Keur C, Kruisselbrink AB, Van-Bezooijen RL et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; 88(8): 845-852.
37. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284(5411): 143-147.
38. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics [Reviews]. *Circ Res.* 2004; 95:9-20.
39. Bacal NS, Faulhaber MHW. *Aplicação prática em citometria de fluxo.* São Paulo: Editora Atheneu, 2003.90p.

40. National Institutes of Health. Department of health and human services. Stem cells: scientific progress and future research directions [report]. June 2001. Disponível na world web <http://www.activision-life.com/stem_cells/00.html> Capturado em 30 março 2004.
41. Prockop DJ, Azizi SA, Colter D, DiGirolamo C, Kopen G, Phinney DG. Potential use of stem cells from bone marrow to repair the extracellular matrix and the central nervous system. Biochemical Society 2000.
42. Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. PNAS 1999; 96(25): 14482-14486.
43. Kereiakes DJ. Stem cells: the chameleon fountain of youth [mini-review]. Circulation 2003; 107:939.
44. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem Cells for Myocardium regeneration [reviews]. Circ Res. 2002; 91:1092.
45. Ramakrishnan S, Kothari SS, Bahl VK. Stem cells and myocardial regeneration. IHJ 2003; 55(2).
46. Tomita S, Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, Kim E-J, Sakai T et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 1999; 100: II-247.
47. Henningson Jr CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. J Allergy Clin Immunol 2003; 111(2): S745-753.
48. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines [concise review]. Stem Cells 2001; 19(3): 193-204.
49. Verfaillie CM, Pera MF, Landsdorp PM. Stem cell: hype and reality. Hematology 2002; 369-391.
50. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. Cell 2000; 100:157-168.
51. Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. PloS Med 2005; 2(6):e161.
52. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. [special report]. NEJM 2004; 350: 13.
53. Civin CI. Stem cell research: back to the future [editorial]. Stem Cells 2001; 19(5): 356-357.
54. Kaji EH, Leiden JM. Gene and stem cell therapies. JAMA 2001; 285(5): 545-550.

55. Watt FM, Hogan BLM. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287(5457): 1427-1430.
56. Hawley RG. National stem cell resource: stem cells find a niche [editorial]. *Stem Cells* 2001; 19(6): 475-476.
57. Chedrawy EG, Wang JS, Nguyen DM, Shum-Tim D, Chiu RCJ. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibers: anatomic basis for functional improvements. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124(3): 584-590.
58. Martin-Rendon E, Watt SM. Exploitation of stem cell plasticity [review article]. *Transfusion Medicine* 2003; 13:325-349.
59. Graf T. Differentiation plasticity of hematopoietic cells. *Blood* 2002; 99(9): 3089-3101.
60. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *PNAS* 2001; 98(18): 10344-10349.
61. Ferrari G, Cusella G, De Angelis GC, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279(5356): 1528-1530.
62. Siminiak T, Kurpisz M. Myocardial replacement therapy. *Circulation* 2003; 108(10): 1167-1175.
63. Zammit PS, Beauchamp JR. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? [Review]. *Differentiation* 2001; 68:193-204.
64. Stamm C, Steinhoff G. Bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *BIOforum Europe* 2003; 5:1-4.
65. Laugwitz K-L, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S et al. Postnatal isl¹⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005; 433:647-653.
66. Qu Z, Balkir L, Deutekom JCT, Robbins PD, Pruchnic R, Huard J. Development of approaches to improve cell survival in myoblasts transfer therapy. *JCB* 1998; 142(5): 1257-1267.
67. Conboy IM, Conboy MJ, Smythe GM, Rando TA. Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 2003; 302:1575-1577.

68. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi J-I, Uchida S, Masuda H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103(5): 634.
69. Li RK, Jia Z-Q, Weisel RD, Mickle DAG, Choi A, Yau TM. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation* 1999; 100: II-63.
70. Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *J Clin Invest*. 2003; 11(1): 71-79.
71. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*, february 2002; 109(3): 337-346.
72. Watt SM, Bühring HJ, Rappold I et al. CD164, a novel sialomucine on CD34+ and erythroid subsets, is located on human chromosome 6q21. *Blood* 1998; 92(3): 849-866.
73. Bacigalupo A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. *Best practice & Research Clinical Haematology* 2004; 17(3): 387-399.
74. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells [minireview]. *Exp Biol Med* 2001; 226(6): 507-520.
75. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burguer JÁ et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2:477-488.
76. Oswald J, Boxberger S, Jorgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 2004; 22:377-384.
77. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat modelo of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2005; 112:1128-1135.
78. Lee H-S, Huang G-T, Chiang H, Chiou L-L, Chen M-H, Hsieh C-H et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* 2003; 21: 190-199.

79. Sukhikh GT, Malaitsev VV, Bogdanova IM, Dubrovina IV. Mesenchymal stem cells [reviews]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002; 133(2): 103-109.
80. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV et al. Direct isolation of human central nervous stem cells. *PNAS* 2000; 97(26): 14720-14725.
81. Vogel W, Grünebach F, Messan CA, Kanz L, Brugger W, Bühring H-J. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003; 88(8): 126-133.
82. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses [review]. *Experimental Hematology* 2000; 28 (8): 875-884.
83. Carlo-Stella C. Applicazioni terapeutiche delle cellule stromali midollari. *Unità trapianto di Midollo Osseo Istituto Nazionale Tumori. Milano.*
84. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105:93-98.
85. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41:1078-83.
86. Léobon B, Garcin I, Menasché P, Vilquin J-T, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *PNAS* 2003; 100(13): 7808-7811.
87. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, Juffe A, Rendal E, Prosper F, Genovese J. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardiovector-desfibrilators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 2004; 95(suppl II): S29-33.
88. Bel A, Messas E, Agbulut O, Richard P, Samuel JL, Bruneval P et al. Transplantation of autologous fresh bone marrow into infarcted myocardium: a word of caution. *Circulation* 2003; 108(suppl II).
89. Guarita-Souza LC, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M et al. Cell transplantation: differential effects of myoblasts and mesenchymal stem cells. *Int J Cardiol* 2005; 9.
90. Vilas-Boas F, Feitosa G, Soares M, Pinho-Filho J, Mota A, Almeida A et al. Bone marrow cell transplantation to the myocardium of a patient with heart failure due to Chagas' Disease. *Arq Bras cardiol* 2004; 82(2): 185-7.

91. McCoy Jr JP. Basic principles of flow cytometry. *Hematology Oncol Clin N Am* 2002; 16:229-243.
92. Simmer M. Flow cytometry: a technology to count and sort cells. www.bioteach.ubc.ca/MolecularBiology/FlowCytometry. Capturado em 25/04/2004.
93. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107(7): 1024.
94. Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood* 2004; 104(12): 3581-3587.
95. Ciulla MM, Lazzari L, Pacchiana R, Esposito A, Bosari S, Ferrero S et al. Homing of peripherally injected bone marrow cells in the rat after experimental myocardial injury. *Haematologica* 2003; 88:614-621
96. Goodell MA. CD34+ or CD34-: does it really matter? *Blood* 1999; 94(8): 2545-2547.
97. Gratama JW, Sutherland DR, Keeney M, Papa S. Flow Cytometric enumeration and immunophenotyping of hematopoietic stem and progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15:14-22.
98. Kuçi S, Wessels JT, Bühring HJ, Schilbach K, Schumm M, Bader P et al. Identification of a novel class of CD133+CD34 – peripheral blood cells with SCID-repopulating capacity. *Blood* 2001; 98(11): 27a.
99. Matsuoka S, Ebihara Y, Xu M, Ishii T, Sugiyama D, Yoshino H et al. CD34 expression on long-term repopulating hematopoietic stem cells changes during developmental stages. *Blood* 2001; 97(2): 419-425.
100. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *PNAS* 2003; 100(21): 12313-12318.
101. Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *JCB* 2002; 159 (1): 123-134.
102. Condorelli G, Borello U, De Angelis L, Latronico M, Sirabella D, Coletta M et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to transdifferentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *PNAS* 2001; 98(19): 10733-10738.

103. Matsushita T, Oyamada M, Kurata H, Masuda S, Takahashi A, Emmoto T et al. Formation of cell junctions between grafted and host cardiomyocytes at the border zone of rat myocardial infarction. *Circulation* 1999; 100[suppl II]: II-262-II-268.
104. Ko, K, Arora P, Lee W, McCulloch C. Biochemical and functional characterization of intercellular adhesion and gap junctions in fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279:C147-C157.
105. Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Expression of connexin 43 (Cx43) is critical for normal hematopoiesis. *Blood* 2000;96:917-924.
106. Angst BD, Khan LUR, Severs NJ, Whitely K, Rothery S et al. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junction during postnatal differentiation of ventricular myocardium. *Circ Res.* 1997; 80:88-94.
107. Sáez JC, Berthoud VM, Brañes MC, Martínez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003; 83:1359-1400.
108. Jankowski RJ, Deasy BM, Cao B, Gates C, Huard J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *JCS* 2002; 115(22): 4361-4374.
109. Lindon C, Montarras D, Pinset C. Cell cycle-regulated expression of the muscle determination factor myf5 in proliferation myoblasts. *JCB* 1998; 140(1): 111-118.
110. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans [expedited review]. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(3):879-88.
111. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95(3): 952-958.
112. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Experimental Hematology* 2003; 31:723-732.
113. Clarke E. Mesenchymal cells. [Mini review]. www.stemcell.com. Capturado em 09/05/2004.
114. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *PNAS* 2000; 97 (7): 3213-3218.

115. Horwitz EM. Mesenchymal cells: a basic review for ISCT. ISCT Nonhematopoietic and Mesenchymal stem cell committee 2002.
116. Jay KE, Gallacher L, Bhatia M. Emergence of muscle and neural hematopoiesis in human. *Blood* 2002; 100(9): 3193-3202.
117. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. [research article]. *Arthritis Rheum* 2002; 46(12): 3349-3360.
118. Krampera M, Pasini A, Rigo A, Scupoli MT, Tecchio C, Malpeli G et al. HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. *Blood* 2005; 106(1): 59-66.
119. Krouglyakov PV, Sokolova IB, Nekrasova NN, Amineva HK, Polyntsev DG, Kislyakova TV. Mesenchymal stem cells-mediated cell therapy of rat infarcted myocardium. *Cell Therapy* 2003.
120. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003; 21:105-110.
121. Mummery C, Oostwaard DW, Doevendans P, Spijker R, Van der Brink S, Hassink R et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 107:2733.
122. Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne Dystrophy Muscle. *J Neurol Sci* 1984; 64:149-60.
123. Boyüm A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scan J Clin Lab Invest* 1968; 21(suppl):77-89.
124. Carvalho KA, Guarita-Souza LC, Rebelatto CL, Senegaglia AC, Hansen P, Mendonça JG et al. Could the coculture of skeletal myoblasts and mesenchymal stem cells be a solution for postinfarction myocardial scar? *Transplantation Proc* 2004; 36:1023-4.
125. Centers for Disease Control and Prevention. Morbidity and Mortality Weekly Report. 1994; 33(47): 661-4.
126. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J. Clin. Invest.* 1996; 98(11): 2512-2523.

127. Briards D, Brouty-Boyé D, Azzarone B et al. Fibroblasts from human spleen regulate NK cell differentiation from blood CD34+ progenitors via cell surface IL-15. *The Journal of Immunology* 2002; 168: 4326-4332.
128. Magrassi L. Differences and similarities among phenotypes of mesenchymal and neural stem cells. *Haematologica* 2003; 88(2): 121.
129. Domek K, Markiewicz I, Moraczewski J. The expression of the regulatory factors myoD and myf-5 in myogenic stem cells during differentiation in vitro. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2002;7: 43.
130. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells* 2002; 20(3): 205-214.
131. Geiger H, True JM, Grimes B, Carroll EJ, Fleischman RA, Van Zant G. Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. *Blood* 2002; 100(2): 721-723.
132. McLaren FH, Svendsen CN, Van der Meide P, Joly E. Analysis of neural stem cells by flow cytometry: cellular differentiation modifies patterns of MHC expression. *Journal of Neuroimmunology* 2001; 112(1): 35-46.
133. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, november 2001; 98(9): 2615-2625.

GLOSSÁRIO

Blastocisto: o blastocisto consiste em uma esfera composta de camadas de células (trofoderma), uma cavidade repleta de fluido (blastocelo) e um conjunto de células no interior (massa celular interior). Pré-implantação de embrião de 30-150 células .

CD: *cluster of differentiation* - sistema de nomenclatura uniforme. De acordo com este sistema, um marcador de superfície celular que identifique uma linhagem ou um estágio particular, que tenha uma estrutura definida e que seja reconhecido por um grupo de anticorpos monoclonais, é designado como um membro do grupo de diferenciação.

Célula-tronco: células primitivas que possuem a capacidade de auto-renovação e a habilidade para se diferenciar em múltiplos tipos celulares.

Células-tronco embrionárias: células pluripotentes derivadas da massa celular interior do blastocisto; dão origem às células das três camadas germinais.

Células-tronco adultas: presentes em todos os tecidos com renovação, estas células se dividem para auto-renovação e diferenciação em múltiplos tipos celulares progenitores.

Células-tronco hematopoéticas: células precursoras adultas raras, presentes no sangue periférico e medula óssea, dão origem a várias populações distintas de células progenitoras formadoras das células sanguíneas.

Células progenitoras: células precursoras multipotenciais intermediárias para células maduras tecido-específicas.

Células progenitoras endoteliais: células que estão presentes no sangue periférico e medula óssea; estão envolvidas na angiogênese e neovascularização pós-natal.

Células-tronco mesenquimais: Também referidas como células estromais da medula, estas células se diferenciam *in vitro* seguindo múltiplos passos que incluem a miogênese cardíaca.

Células RS: *Recycling Stem cells*. Sub-população de células pequenas, agranulares, presentes em cultivo de células-tronco mesenquimais.

Células SP: *Side Population cells*. População lateral de células, que se apresentam negativas com o corante Hoechst, específico para identificar células-tronco hematopoéticas.

Citoquinas: termo genérico utilizado para uma grande variedade de proteínas regulatórias produzidas e secretadas por células e usadas para comunicação com outras células. Uma classe de citoquinas são as interleucinas, as quais são mediadores intra-celulares na geração de respostas imunes.

Fibroblastos: células que originam tecido conjuntivo.

Gap junction: comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas, do citoplasma de uma célula para o citoplasma da outra, através de poros proteicos intercelulares. .

Imunofenotipagem: identificação de vários tipos de células por separação de acordo com seus marcadores de superfície celular.

Marcador de superfície: proteínas de superfície que são únicas para determinados tipos celulares, capazes de detectá-los por anticorpos ou outros métodos de detecção.

Medula óssea: tecido que preenche a maioria das cavidades ósseas e contém células precursoras hematopoéticas, das quais evoluem as células sanguíneas (leucócitos, eritrócitos e plaquetas). A medula óssea também contém células precursoras mesenquimais.

Transplante alogênico: dois ou mais indivíduos (ou linhagens celulares) são ditos alogênicos quando os genes de um ou mais loci não são idênticos em sequência no mesmo organismo.

Transplante autólogo: o tecido transplantado origina-se de receptor do transplante. Tais transplantes evitam complicações de rejeição imune.

Plasticidade: a capacidade de células precursoras adultas que, presentes em um tecido, diferenciam-se em células maduras de um outro tecido, não-relacionado .

FACS: *fluorescence activated cell sorting*. Fundamento da tecnologia do citômetro de fluxo: fazer passar células ou outras partículas em suspensão, alinhadas, por uma fonte de luz, realizando uma análise multiparamétrica, incluindo uma separação física de uma população previamente determinada, se o aparelho possuir funções separadoras (sorting).

CD29 (integrina 1): Propriedade de adesão celular. É expressado na maioria das células.

CD31 (PECAM-1): *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*. Fortemente expressado em células endoteliais, virtualmente presente em monócitos, plaquetas e granulócitos. O CD31 está envolvido nos mecanismos da angiogênese, em ratos e camundongos.

CD34 (HPCA-II): marcador de células-tronco (precursoras), presente também em progenitores hematopoéticos, endotélio vascular e em fibroblastos de alguns tecidos. É uma glicofosfoproteína transmembrânica altamente glicosilada.

CD44 H (OX-49): fator de adesão celular. Amplamente expressado em células hematopoéticas e não-hematopoéticas, presente em células endoteliais e epiteliais, também no sistema nervoso.

CD45 (T200, Ly-5, A20): marcador de leucócitos, as proteínas CD45 são encontradas em todas as células de origem hematopoéticas, exceto eritrócitos.

CD49d: É expressada em linfócitos T e B periféricos, timócitos e monócitos. Esta integrina intermedia uma variedade de interações célula-célula e célula-matriz, estando envolvida na adesão celular.

CD54 (ICAM-1): Ampla distribuição tecidual, sendo expressado no endotélio vascular de tecidos linfóides, células estromais tímicas, monócitos do sangue periférico, macrófagos e mastócitos peritoniais, células dendríticas e células não-hematopoéticas. A expressão no endotélio é fortemente regulada por mediadores inflamatórios.

CD73 (SH3): é encontrado numa variedade de órgãos e tecidos, incluindo fígado, rins, cortex adrenal, baço, músculos, tecido nervoso e tecido cardíaco. Em ratos, CD73 têm sido detectado em sub-tipos de linfócitos B e T periféricos, em células NK e granulócitos, bem como em células mielóides da medula óssea

CD90 (Thy-1): Sua expressão varia consideravelmente entre diferentes espécies. Expressado em células-tronco hematopoéticas, células mielóides e eritróides precoces, em linfócitos B imaturos da medula óssea e órgãos linfóides periféricos, pró-timócitos humanos, neurônios, células glomerulares mesangliais, no endotélio de locais de inflamação, mastócitos e células dendríticas. Também presente em todos os timócitos de ratos e camundongos, nas células T de camundongos mas não nas células T dos ratos. Nas três espécies, o antígeno é expressado no cérebro.

CD105 (endogлина/SH2): Modulador de respostas celulares do complexo receptor TGF- β 1. É fracamente expressado em fibroblastos estromais; a expressão do

CD105 se apresenta aumentada em endotélio ativado, nos tecidos sob intensa angiogênese, tais como tumores ou inflamações.

CD106 (VCAM-1): Expressado em moléculas de adesão vascular. Em células endoteliais, sua expressão é induzida por citocinas inflamatórias sob certas condições patológicas. Na medula óssea de ratos, o CD106 é expresso em células dendríticas e sub-tipos de linhagem mielóide, porém não é detectado em leucócitos periféricos.

CD133 (AC 133): Célula precursora endotelial (CD34+CD133+).

CD140b (PDGFRb): Beta receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas.

CD164 (MUC-24, MGC-24v): mucina.

CD172a (SIRP, SHPS-1): molécula de adesão da super família das imunoglobulinas, expressada em neurônios, no SNS, na retina e em macrófagos. Não reage com plaquetas, células T e B.

Conexina-43: associado à presença de *gap junctions*. (comunicação célula-célula para permitir a passagem de íons e outras moléculas pequenas). Cardiomiócitos expressam conexina-43.

M-Caderina: envolvida na adesão celular. Está presente em músculos esqueléticos embrionários e adultos, e em baixos níveis nos mioblastos.

MyoD: Expressado exclusivamente em músculos esqueléticos. Está presente em células satélites ativadas durante todo o processo da diferenciação de mioblastos.

Sca-1 (Ly-6, TAP, MALA-1): Expressado em células progenitoras hematopoéticas de camundongos.

TGF-β: fator beta de crescimento tumoral. É uma citocina multifuncional, responsável pela imunossupressão, funciona como fator remodelador da matriz celular, como agente formador de vasos e inibidor do crescimento celular.

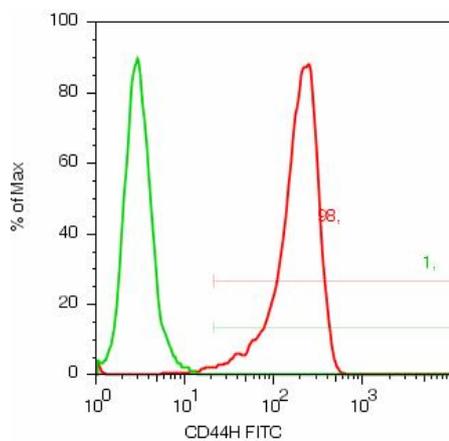
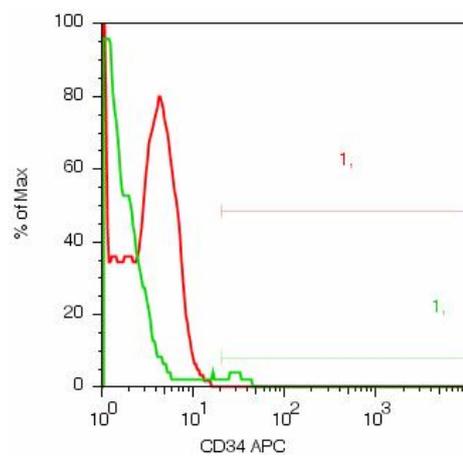
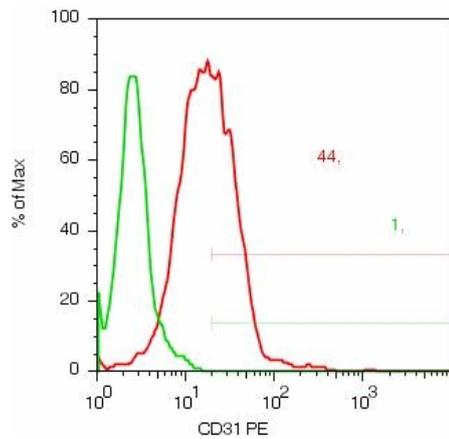
VEGF: Fator de crescimento de célula endotelial vascular.

VEGFR-2: receptor-2 para VEGF.

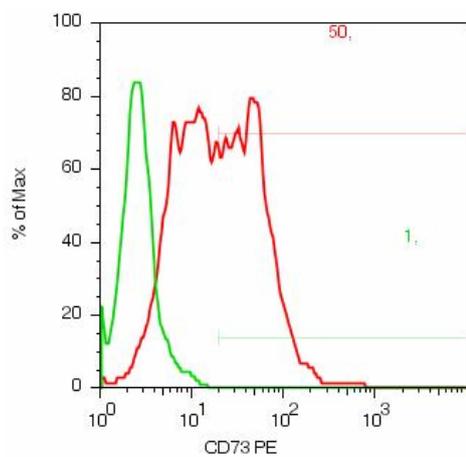
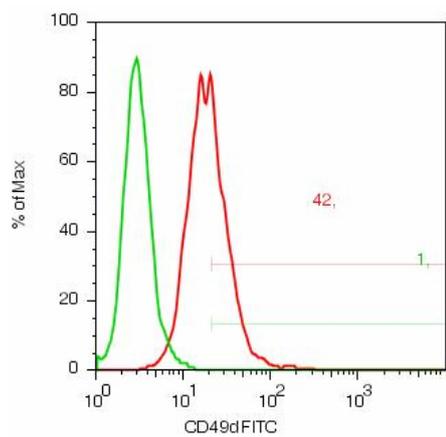
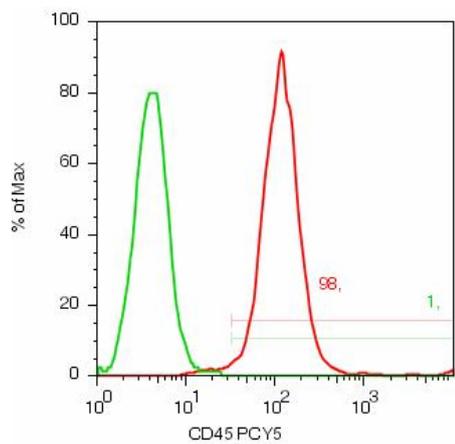
Wnts: família de genes envolvidos na regulação dos sistemas de adesão celular.

ANEXO 01 - ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO

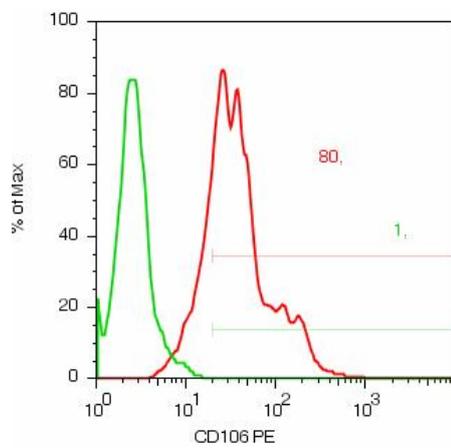
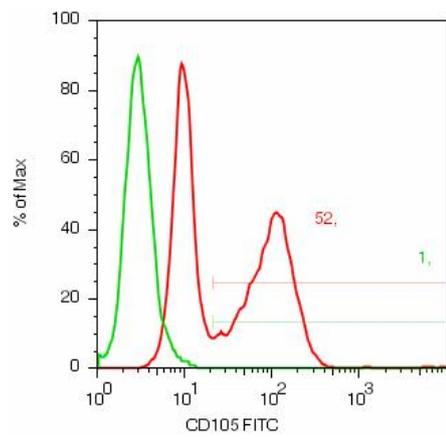
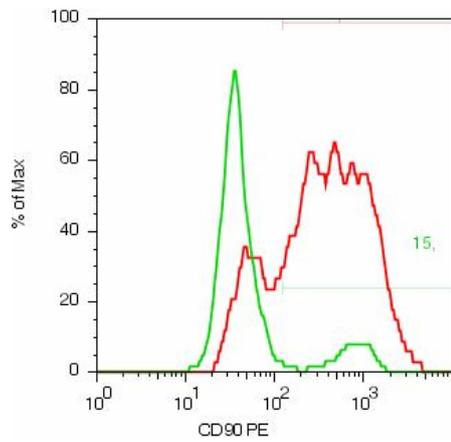
a. Células-tronco mononucleares



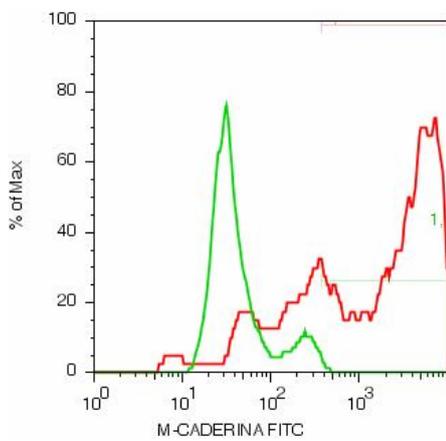
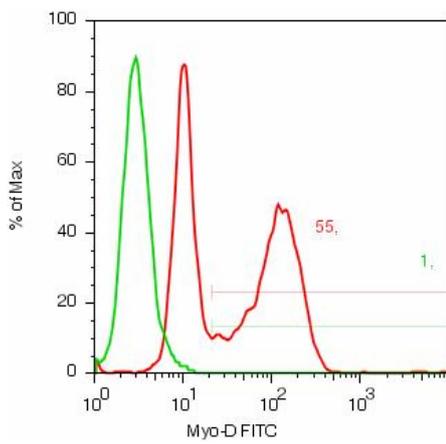
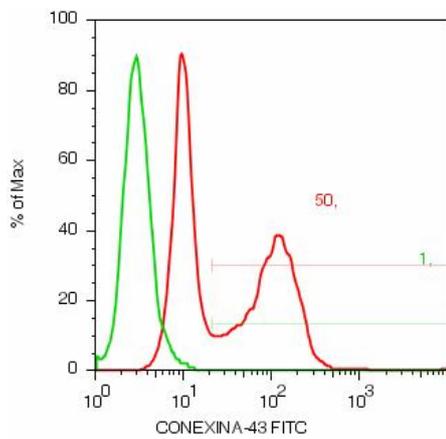
■ População celular positiva
■ Controle isotípico negativo



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

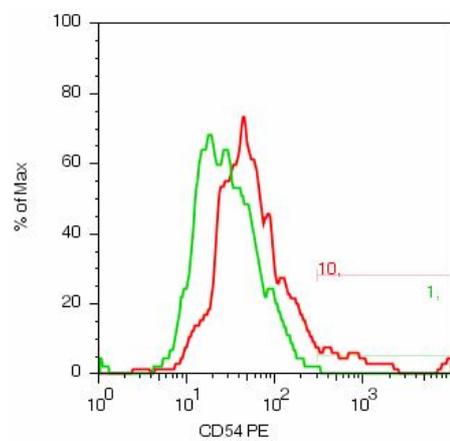
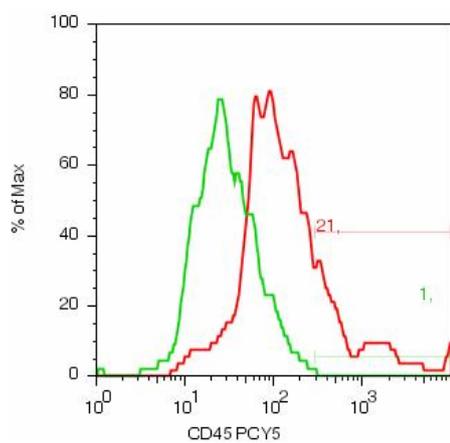
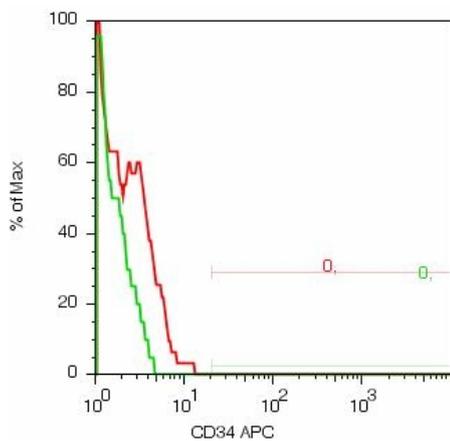


■ População celular positiva
■ Controle isotípico negativo

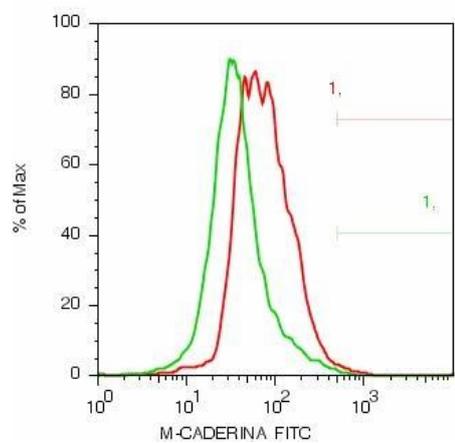
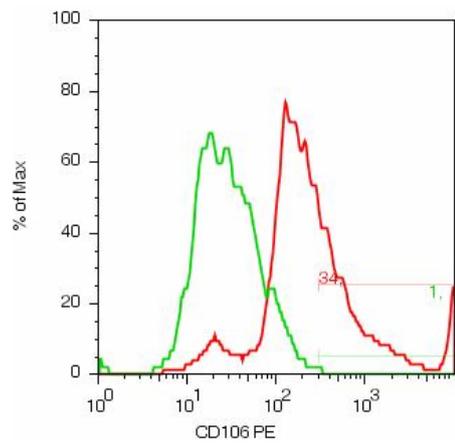
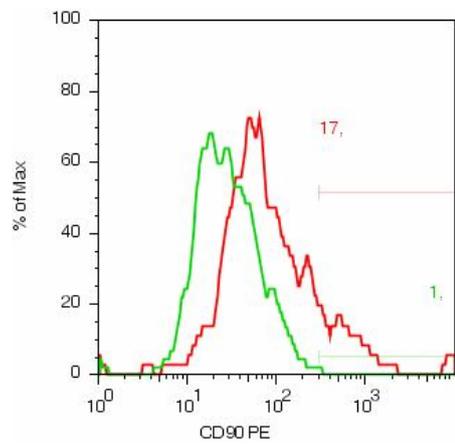


■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

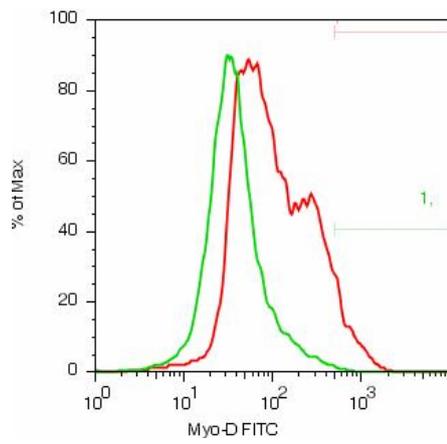
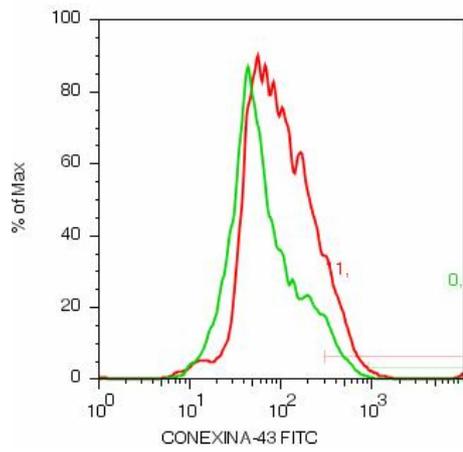
b. Células musculares esqueléticas:



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

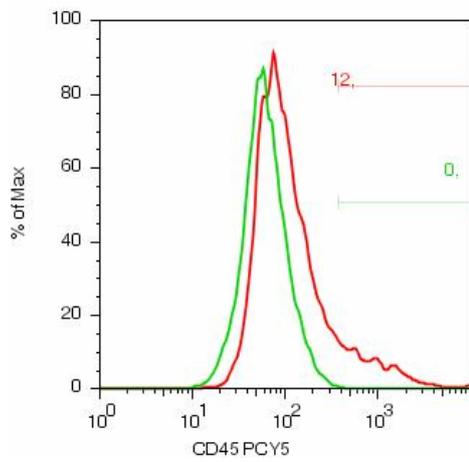
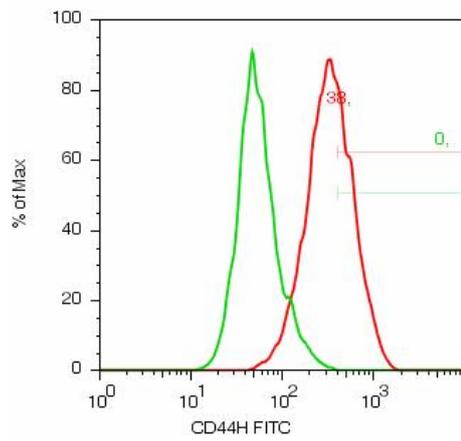
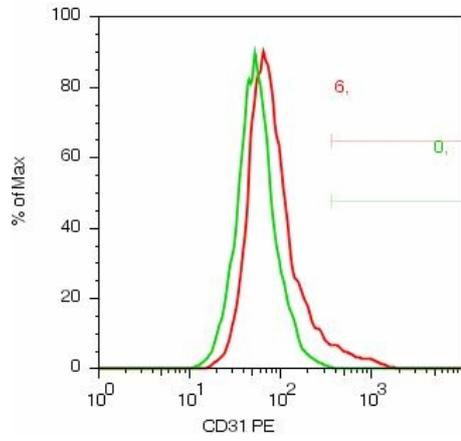


■ População celular positiva
 ■ Controle isotópico negativo

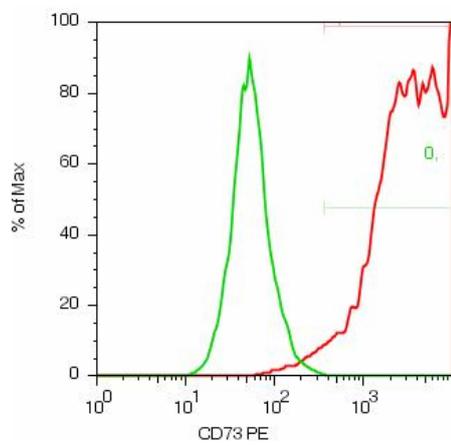
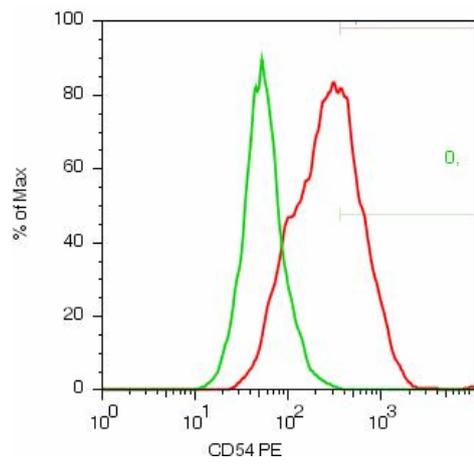
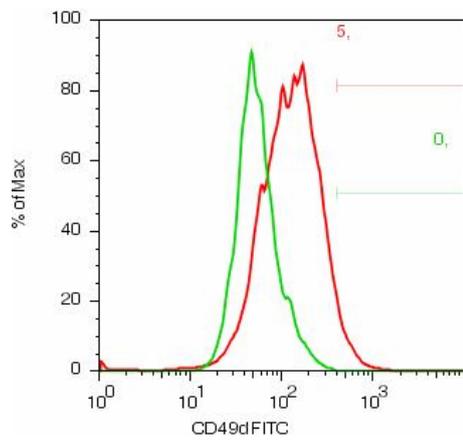


■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

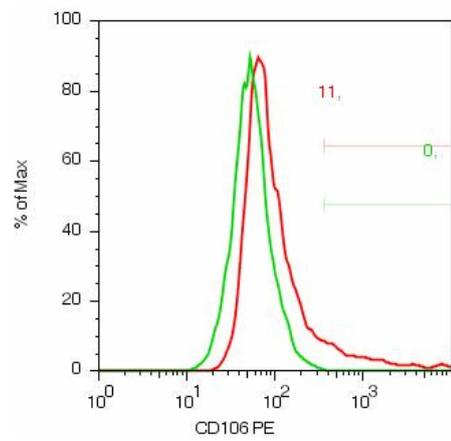
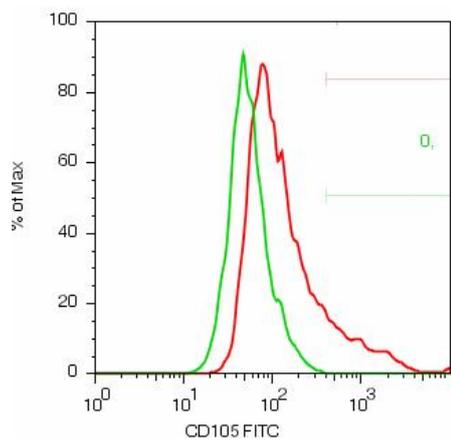
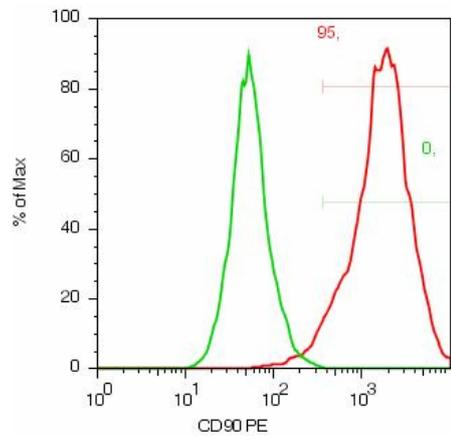
c. Células obtidas no co-cultivo



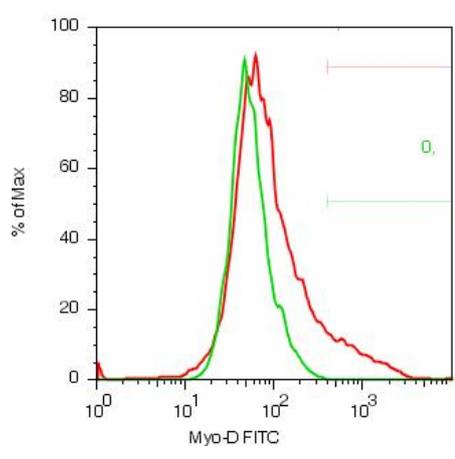
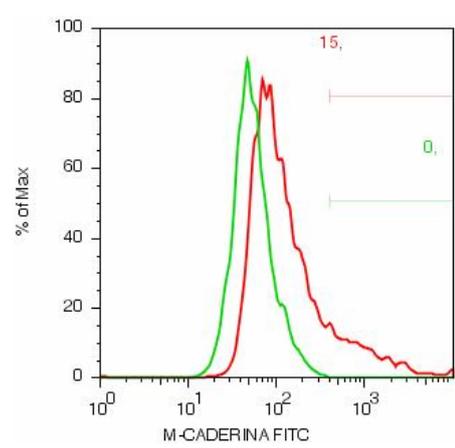
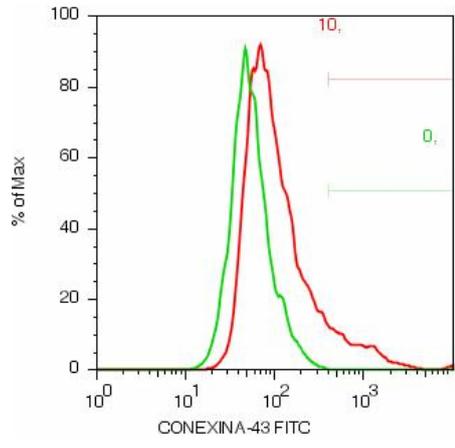
■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo



■ População celular positiva
■ Controle isotópico negativo

ANEXO 02 - PERFIL GERAL DE CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO:

Tipo de células	Perfil imunofenotípico	Referências bibliográficas
Células-tronco hematopoéticas	CD34(+), CD45(+), CD117 (+).	94, 95, 96, 97, 98, 99, 100.
Músculos SP (side population)	Sca-1(-), CD45(+).	101.
Células satélites (células musculares esqueléticas)	Myod(+), Myf-5(+), miogenina (+), MRF4(+), M-Caderina(+).	34, 42, 51, 63, 100, 101, 102, 108, 109, 110, 129, 130.
Células musculares de origem hematopoética	Sca-1 (-), CD34(-), CD31(-) e CD31(+), CD45(+).	100, 131.
Células-tronco derivadas de músculo	Linhagem miogênica (-), CD34(+/-), Sca-1(+), CD56(+), c-Kit (-) e CD45(-).	3, 27, 42, 83, 94, 101, 110, 127.
Células endoteliais	CD31(+), CD34(+), CD133(+), VE-Caderina (+), E-Selectina (+), VEGFR-2(+), CD140b(+), KDR (+).	12, 15, 72, 93, 98, 100, 111.
Células mesenquimais	CD14(-), CD45(-), CD34(-), CD13(+), CD29(+), CD44(+), CD54(+), CD73(+), CD105(+), CD106(+), CD117(-), CD120a(+), CD124(+), CD166(+), CD90(+), CD140b(+), vWF(+).	12, 36, 37, 38, 51, 75, 76, 77, 78, 81, 94, 98, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120.
Células neurais	CD34(+), CD45(+), CD56(+), CD90(+), CD133(+), CD172(+), Nestina (+).	81, 116, 132.
Células aderentes	CD44(+), CD54(+), CD106(+), CD164(+), CD172a(+), VE-Caderina (+).	98, 112, 114, 128.
cardiomiócitos	Conexina-43.	15, 77, 98, 103, 104, 105, 106, 107.
Células progenitoras mesodermas	CD34(-), CD44(low), CD45(-), CD117(-), HLA-classe I(-), HLA-DR (-).	133.

Em negrito: estudos em humanos. Em vermelho: estudos em modelos animais.

ANEXO 03 – CLASSIFICAÇÃO MODAL: INTENSIDADE DE EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS:

AcMo	Células mononucleares pré-cultivo *	Células satélites pré-cultivo*	Produto do co-cultivo*
CD31	(+/++)	NR	(-)
CD34	(-/+))	(-)	(-)
CD44 H	(+/++)	NR	(-/+))
CD45	(+)	(-)	(-)
CD49d	(-/+))	NR	(-)
CD54	(+/++)	(+)	(+)
CD73	(+/++)	NR	(+/++)
CD90	(+++)	(+)	(++/+++)
CD105	(+)	NR	(-)
CD106	(+/++)	(+/++)	(-/+))
M-Caderina	(+/++)	(+)	(-)
Myo-D	(+)	(+)	(-)
Conexina-43	(+/++)	(+)	(-)

*Os resultados foram expressos segundo a intensidade de expressão (escala logarítmica), conforme legenda a seguir: $< 10^1 = (-)$; $10^1 - 10^2 = (-/+)$; $10^2 = (+)$; $10^2 - 10^3 = (+/++)$; $10^3 = (++)$; $10^3 - 10^4 = (++/+++)$; $> 10^4 = (+++)$.

NR: não realizado.

ANEXO 04 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 25 de outubro de 2004.
PARECER N. 23/04/CEPA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCRPR, em reunião realizada no dia 25 de outubro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Caracterização por Citometria de Fluxo de Células Precursoras para Transplante Cardíaco", sob o registro no CEPA /PUCPR nº 02.

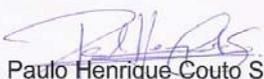
O experimento classificado como de categoria C será realizado com o número de 10 ratos Wistar.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Sra. Leila de Oliveira