



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE
CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

DANIELA NASCIMENTO SILVA

**Salvador – Brasil
2014**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE
CORAÇÕES DE CAMUNDONGOS ADULTOS**

DANIELA NASCIMENTO SILVA

Orientador: Prof^o Dr^o Ricardo Ribeiro dos Santos
Co-orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa para a
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Brasil
2014

SILVA, Daniela Nascimento. Isolamento e caracterização de células-tronco obtidas de corações de camundongos adultos. 60 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

O uso de células-tronco representa uma alternativa para o tratamento das doenças que acometem o coração, devido à capacidade que essas células indiferenciadas têm de preservar sua própria população e de se diferenciar em células dos diversos tecidos, incluindo o cardíaco. Nesse trabalho comparamos as características de células-tronco isoladas a partir do tecido cardíaco e da medula óssea de camundongos transgênicos para a proteína fluorescente verde (GFP). As células-tronco cardíacas e da medula óssea apresentaram característica morfológica fibroblastóide e imunofenotípica de células-tronco mesenquimais, com alta expressão dos marcadores CD44, CD90, CD73, Sca-1 e baixa expressão dos marcadores de células hematopoiéticas. A análise citogenética revelou um cariótipo poliplóide a partir da terceira passagem das células-tronco isoladas do coração e da medula-óssea. A capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, tais como adipócitos, osteócitos e condrócitos, também foi avaliada nas células-tronco de ambas as fontes. Tanto as células-tronco isoladas do coração como da medula óssea foram capazes de se diferenciar nessas três linhagens. Quando estimuladas com 5'azacitidina para testar o potencial cardiomiogênico das células isoladas do coração e da medula óssea, apenas as células-tronco cardíacas passaram a expressar alguns marcadores de cardiomiócitos, tais como troponina T cardíaca e GATA-4. As células-tronco cardíacas GFP⁺ foram injetadas na parede lateral do ventrículo esquerdo de camundongos C57BL/6. Nenhum animal morreu durante o procedimento, e os parâmetros funcionais cardíacos mantiveram-se inalterados. Após 48 horas e uma semana depois da injeção foi possível observar células GFP⁺ em secções do miocárdio. Os resultados indicam que células-tronco isoladas do coração e da medula óssea possuem características similares, porém o potencial cardiomiogênico das células-tronco cardíacas é maior. A injeção intramiocárdica mostrou-se segura podendo ser candidata à via de administração de células no miocárdio. Novos estudos no campo da medicina regenerativa que visam a utilização de células-tronco cardíacas poderão ser úteis para demonstrar sua aplicação clínica como opção de tratamento para as doenças cardíacas.

Palavras chave: coração, medula óssea, células-tronco mesenquimais, caracterização, diferenciação celular, injeção intramiocárdica.

SILVA, Daniela Nascimento. Isolation and characterization of stem cells from hearts of adult mice. 60 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells with the ability of self-renewal and differentiation into different cell types, with the potential to treat heart diseases. In the present study we compared the characteristics of stem cells isolated from the heart to bone marrow stem cells, both obtained from EGFP transgenic mice. Cardiac and bone marrow stem cells presented fibroblastic morphology and an immunophenotype compatible with mesenchymal stem cells – high expression of CD44, CD90, CD73, Sca-1 and low expression of hematopoietic lineage markers. Cytogenetic analysis demonstrated polyploid karyotypes after the third passage of the stem cells isolated from heart and bone marrow. Both bone marrow and heart stem cells were able to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes. In order to test the potential of differentiation into cardiomyocytes, cells were stimulated with 5'azacytidine and only cardiac stem cells expressed heart-specific markers: cardiac T troponin and GATA-4. GFP⁺ cardiac stem cells were injected into the lateral wall of the left ventricle of C57bl/6 mice. The procedure did not alter the functional cardiac parameters or induced mortality. GFP⁺ cells were observed in the heart 48 hours and seven days after the intramyocardial injection. The results indicate that cardiac stem cells and bone marrow stem cells are similar cell populations, although cardiac stem cells appear to have an increased cardiomyogenic potential. Intramyocardial injection was a safe and useful procedure for the transplantation of cardiac stem cells. New studies in the field of regenerative medicine aimed at the use of cardiac stem cells may be useful to demonstrate its clinical application as a treatment option for heart disease.

Key words: heart, bone marrow, mesenchymal stem cells, characterization, cellular differentiation, intramyocardial injection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Células-tronco isoladas de fontes autólogas ou alogênicas utilizadas em cardiologia. | 21 |
| Figura 2 | Aspecto morfológico das células aderentes isoladas a partir de explante cardíaco ou da medula óssea. | 34 |
| Figura 3 | Caracterização das células-tronco mesenquimais por imunofluorescência. | 36 |
| Figura 4 | Análise citogenética de células-tronco mesenquimais cardíacas | 37 |
| Figura 5 | Capacidade de diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais isoladas a partir do explante cardíaco e da medula óssea. | 38 |
| Figura 6 | Capacidade de diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais cardíacas e da medula óssea. | 39 |
| Figura 7 | Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais cardíacas e de medula óssea. | 40 |
| Figura 8 | Avaliação da expressão de marcadores de cardiomiócitos em células-tronco mesenquimais estimuladas com 5' azacitidina. | 41 |
| Figura 9 | Parâmetros funcionais cardíacos avaliados por ecocardiografia. | 43 |
| Figura 10 | Injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas GFP ⁺ . | 44 |

LISTA DE TABELA

| | | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 | Imunofenótipo das células-tronco isoladas do coração e da medula-óssea avaliado por citometria de fluxo | 35 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------|-----------------------------------------------|
| APC | Aloficocianina |
| BSA | Albumina bovina sérica |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CFU-F | Unidade formadora de colônia de fibroblatoide |
| CT | Células-tronco |
| CTM | Células-tronco mesenquimais |
| DAPI | <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i> |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNTP | Desoxirribonucleotídeos fosfatados |
| EGFP | <i>Enhanced green fluorescent protein</i> |
| FC | Fragmento cardíaco |
| GFP | Proteína fluorescente verde |
| PBS | Tampão fosfato salina |
| PE | Ficoeritrina |
| RT-PCR | Reação da polimerase em cadeia em tempo real |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| SBF | Soro bovino fetal |
| Sca-1 | <i>Stem cell antigen-1</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 | OBJETIVOS | 12 |
| 3 | REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 3.1 | CÉLULAS TRONCO | 13 |
| 3.1.1 | Células-tronco mesenquimais | 15 |
| 3.1.2 | Diferenciação cardiomiogênica | 17 |
| 3.1.3 | Células-tronco isoladas do coração | 18 |
| 3.2 | TERAPIA CELULAR EM CARDIOLOGIA | 20 |
| 3.3 | MÉTODOS UTILIZADOS NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO NA CARDIOLOGIA | 22 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4.1 | ANIMAIS | 24 |
| 4.2 | ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO | 24 |
| 4.2.1 | Células-tronco obtidas do coração de camundongos C57BL/6 EGFP | 24 |
| 4.2.2 | Obtenção de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 EGFP | 25 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÃO CELULAR | 26 |
| 4.3.1 | Citometria de fluxo | 26 |
| 4.3.2 | Imunofluorescência | 26 |
| 4.4 | ANÁLISE CITOGENÉTICA | 27 |
| 4.5 | DIFERENCIAÇÃO CELULAR | 27 |
| 4.5.1 | Diferenciação adipogênica | 28 |

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.5.2 | Diferenciação osteogênica | 28 |
| 4.5.3 | Diferenciação condrogênica | 29 |
| 4.5.4 | Diferenciação cardiomiogênica | 29 |
| 4.5.4.1 | Avaliação de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real | 30 |
| 4.6 | INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA GUIADA POR ECOCARDIOGRAFIA | 31 |
| 4.7 | AVALIAÇÃO FUNCIONAL CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAFIA | 31 |
| 4.8 | RASTREAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS GFP ⁺ APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA | 32 |
| 4.8.1 | Espectroscopia <i>in vivo</i> | 32 |
| 4.8.2 | Avaliação por imunofluorescência da presença de células GFP ⁺ no miocárdio | 32 |
| 4.9 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 33 |
| 5 | RESULTADOS | 34 |
| 5.1 | CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DO CORAÇÃO E MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EGFP | 34 |
| 5.2 | CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFLUORESCÊNCIA | 34 |
| 5.3 | ANÁLISE CITOGENÉTICA | 36 |
| 5.4 | POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA, OSTEOGÊNICA, CONDRÓGÊNICA E CARDIOMIOGÊNICA | 37 |
| 5.4.1 | DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA | 37 |

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.4.2 | DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA | 38 |
| 5.4.3 | DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA | 39 |
| 4 | DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA | 40 |
| 5.5 | INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS GFP ⁺ | 42 |
| 5.5.1 | PARÂMETROS FUNCIONAIS CARDÍACOS AVALIADOS POR ECOCARDIOGRAFIA | 42 |
| 5.5.2 | RASTREAMENTO DE CÉLULAS GFP APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA | 43 |
| 6 | DISCUSSÃO | 45 |
| 7 | CONCLUSÕES | 49 |
| 8 | REFERÊNCIAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

Tem sido evidenciado o aumento da expectativa de vida e o crescimento de fatores de risco para doenças cardíacas em todo o mundo (BERNSTEIN & SRIVASTAVA, 2012). Sendo assim, o desenvolvimento de novas e efetivas opções de tratamento para pacientes cardiopatas é de extrema importância, dado o aumento de casos e seus impactos social e econômico na saúde mundial.

Neste contexto, destaca-se a terapia com células-tronco (CT), que são células indiferenciadas e não especializadas com potencial de autorrenovação e potencial de se diferenciar em diversos tipos celulares (WATT & HOGAN, 2000; ZAGO *et al.*, 2006). Os estudos com células-tronco despontam no cenário científico mundial, demonstrando a grande aplicabilidade das mesmas nos variados campos da medicina. Os questionamentos levantados as pesquisas com células-tronco embrionárias proporcionou uma busca por tipos alternativos de células-tronco. Neste aspecto, encontram-se as células-tronco mesenquimais (CTM), que podem ser isoladas de vários locais no organismo (da SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006).

Devido às suas potenciais aplicações na terapia celular, as CTM têm sido objeto de inúmeros estudos, tendo em vista a sua baixa imunogenicidade, multipotencialidade, além de serem facilmente isoladas, purificadas e expandidas *in vitro*. (DOMINICI *et al.*, 2006). A medula óssea é a principal fonte de CTM utilizadas nas terapias celulares e são as CT adultas mais conhecidas (JACKSON *et al.*, 2002; KRAUSE *et al.*, 2002; DOMEN *et al.*, 2006). Além da medula-óssea, outras fontes de células-tronco mesenquimais foram identificadas. Mais recentemente, foi isolada uma população de CT obtidas de corações murinos e humanos que exibem marcadores de CTM (CARLSON *et al.*, 2011; GAMBINI *et al.*, 2011).

Dentre os critérios que definem uma célula como CTM estão a sua capacidade de aderência ao plástico, a morfologia fibroblastóide, bem como a sua capacidade de diferenciação *in vitro* em células de linhagem osteogênica, adipogênica e condrogênica. Além desses critérios, um conjunto de marcadores de superfície proposto pelo Comitê de Células-Tronco Teciduais e Mesenquimais da Sociedade Internacional para Terapia Celular, define o perfil imunofenotípico mesenquimal da célula sendo ela positiva para CD73, CD90, CD105, e ausência da expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 (DOMINICI *et al.*, 2006). A estabilidade cromossômica em culturas de CTM após sucessivas passagens também deve ser avaliada, uma vez que, *in vivo*, mudanças cromossômicas geralmente resultam em carcinogênese (CATALINA *et al.*, 2007).

O avanço nas técnicas de cultivo celular em modelos animais possibilitou o estudo dos sinais químicos e físicos que influenciam o desenvolvimento e diferenciação celular, direcionando-os para os tipos celulares de interesse. Diversos estudos indicam que células-tronco mesenquimais possuem plasticidade e podem ser estimuladas a se diferenciar, *in vitro*, na linhagem cardiomiogênica e serem usadas em terapias celulares para tratamentos de doenças cardíacas (PERIN, 2003). O tratamento das CTM com químicos sintéticos tais como a 5-azacitidina é um dos métodos mais utilizados para diferenciar CTM em cardiomiócitos (MAKINO *et al*, 1999; FUKUDA *et al*, 2002; HAKUNO *et al*, 2002; BALANA *et al*, 2006; HENG *et al*, 2004).

Apesar dos vários estudos pré-clínicos e clínicos evidenciarem os efeitos benéficos da terapia celular na cardiologia, algumas questões devem ser discutidas, dentre essas a melhor via administração das células (SHEN, 2011). Os métodos utilizados no transplante de células-tronco em doenças cardíacas são a injeção intramiocárdica e intracoronária e a injeção intravenosa (OYAMA *et al*, 2004). Alguns autores defendem o método de injeção intramiocárdica como sendo exequível e seguro e o que oferece melhor distribuição celular comparado, por exemplo, com a infusão intracoronariana (KRAUSE *et al*, 2009).

Estudos comparativos do potencial de CTM isoladas de diferentes tecidos poderão nortear a sua utilização de forma mais eficaz para o tratamento de diferentes doenças. Neste trabalho, investigamos as características das CTM isoladas do coração de camundongos, seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares *in vitro* em comparação com as CTM isoladas de medula óssea. Foram avaliadas também a segurança e a exequibilidade da injeção intramiocárdica dessas células em camundongos C57BL/6.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais a partir dos corações de camundongos adultos, e compará-las com células-tronco mesenquimais obtidas a partir de medula óssea.

2.2 Objetivos específicos

1. Isolar e caracterizar fenotipicamente as células-tronco mesenquimais cardíacas e da medula óssea, obtidas a partir de camundongos adultos;
2. Avaliar a capacidade das células-tronco mesenquimais cardíacas e da medula óssea de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos;
3. Induzir a diferenciação cardiomiogênica das células-tronco cardíacas e da medula óssea;
4. Realizar a caracterização citogenética das células-tronco cardíacas e da medula óssea em diferentes passagens;
5. Avaliar a segurança e os efeitos na função cardíaca da injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas em camundongos;
6. Rastrear a presença das células-tronco cardíacas nos corações de camundongos que receberam injeção intramiocárdica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas e não especializadas, com potencial prolongado ou ilimitado de autorrenovação e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (WATT & HOGAN, 2000; ZAGO *et al*, 2006).

Wagers e Weissman (2004) classificam as CT de acordo com o seu potencial de diferenciação e plasticidade. Células totipotentes são aquelas capazes de originar todos os tipos celulares embrionários e extraembrionários. As CT pluripotentes são aquelas com capacidade para gerar todos os tecidos dos três folhetos embrionários do organismo, como é o caso das CT embrionárias. As CT multipotentes são capazes de originar um subconjunto de linhagens celulares e as oligopotentes, pertencentes a um mesmo folheto embrionário. Por fim, as CT unipotentes são as que apresentam capacidade para originar apenas um tipo de célula madura.

As CT podem ainda ser classificadas em três categorias, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento: as CT embrionárias (THOMSON *et al*, 1998), as CT fetais (PAPPA & ANAGNOU, 2009) e as CT adultas (DA SILVA MEIRELLES *et al*, 2006). Dentre as adultas, destacam-se as CT hematopoiéticas e as CT mesenquimais.

Essa classificação está em constante mudança com os avanços das pesquisas na área. Mais recentemente, a publicação do trabalho realizado por Yamanaka e colaboradores (2006) introduziu o conceito das células-tronco pluripotentes induzidas, que são obtidas a partir de fibroblastos adultos e de origem embrionária de camundongos, reprogramados à pluripotência a partir da expressão forçada de quatro fatores de transcrição indutores (Oct-4, Sox-2, c-Myc e KLF-4).

As CT embrionárias são derivadas da massa celular interna de blastocistos. Na década de 80, estas células foram isoladas a partir de embriões de camundongos, sendo que somente em 1998, Thomson e colaboradores (1998) descreveram a metodologia para a obtenção de células-tronco embrionárias humanas. Essas células possuem três características essenciais: são derivadas do embrião da fase de pré-implantação no útero; são capazes de proliferar de forma prolongada e mantendo a sua forma indiferenciada; e podem gerar células derivadas dos três folhetos embrionários (endoderma, ectoderma e mesoderma).

A demonstração da capacidade das CT embrionárias de se diferenciar em muitos tipos celulares tem gerado um grande interesse na aplicação clínica destas células. Contudo, o seu

potencial tumorigênico, como a formação de teratomas, os problemas decorrentes da falta de histocompatibilidade (LA FLAME & MURRAY, 2005) e as questões éticas (CHAPMAN *et al*, 2009) ainda dificultam a utilização terapêutica das células-tronco embrionárias.

As CT fetais podem ser isoladas do feto propriamente dito ou de membranas extraembrionárias de origem fetal, tais como a placenta, o líquido amniótico e o cordão umbilical (PAPA & ANAGNOU, 2009). As CT fetais se expandem rapidamente em cultura, e até momento não foi demonstrado um potencial de formação de teratomas destas células (HEMBERGER *et al*, 2008; PAPPA & ANAGNOU *et al*, 2009).

As CT adultas são células indiferenciadas, responsáveis pela geração de células especializadas durante os processos de crescimento, diferenciação tecidual, renovação celular e regeneração tecidual. Elas podem ser remanescentes ou derivadas das CT embrionárias e estão presentes no organismo após o nascimento para promover vários processos fisiológicos ao longo da vida (CAPLAN, 2007).

Estas células podem ser encontradas em tecidos, tais como a medula óssea, tecido adiposo, fígado, pele, cérebro, músculo esquelético, pâncreas, pulmão, coração, sangue periférico, e atualmente um número crescente de evidências tem se acumulado, indicando o potencial de diferenciação dessas células em diversos tipos celulares, o que representa uma grande perspectiva terapêutica, e as torna objeto de estudo para o tratamento de diversas doenças (ZAGO, 2006 PASSIER *et al.*, 2008).

Desta forma, as CT adultas são inseridas no grupo de tipos celulares mais apropriados para a utilização autóloga na terapia celular, pois estas estão presentes em vários tecidos, podendo ser isoladas do próprio indivíduo, o que evitaria eventuais processos de rejeição imunológica (CAPLAN, 2007).

As CT de medula óssea são as CT adultas mais conhecidas. A medula óssea contém CT hematopoiéticas e mesenquimais (JACKSON *et al.* ; 2002; KRAUSE *et al*, 2002; DOMEN *et al.*, 2006). As CT hematopoiéticas derivadas da medula óssea constituem as CT mais estudadas até hoje e são caracterizadas por sua capacidade plástica e por serem facilmente isoladas. Essas células possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune, e foram também descritas com tendo um potencial de diferenciação em células epiteliais do fígado, pulmão, trato gastrointestinal e pele (KRAUSE *et al*, 2002; ALBELLA *et al*, 2003; TAK; TAHASHI *et al*, 2006).

Na medula óssea, as CT hematopoiéticas são cercadas pelas células estromais, conhecidas como CT mesenquimais. Nos últimos anos, uma atenção especial tem sido dada às

CT mesenquimais. Estas células podem ser isoladas de praticamente todos os tecidos adultos, e induzidas a se diferenciar em múltiplas linhagens celulares (LIU *et al*, 2009).

3.1.1 Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes não hematopoiéticas, com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (REISER *et al*, 2005). As CTM foram isoladas da medula óssea nos estudos pioneiros de Friedenstein e colaboradores (1970), que as descreveram como sendo células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica.

Esse mesmo grupo desenvolveu o método de isolamento de CTM de medula óssea baseado na sua capacidade de aderência ao plástico, que é utilizado até hoje como o método padrão de isolamento destas células. Para a obtenção de CTM a partir de fragmentos teciduais, realiza-se geralmente o tratamento com a enzima colagenase, que permite o desprendimento celular. Após esse processo, realiza-se a etapa de aderência ao plástico. Utilizando abordagens semelhantes, com adaptações, encontramos exemplos de protocolos de extração de células a partir de diversos fragmentos teciduais na literatura (TOMA *et al*, 2001; ZUK *et al*, 2001; INTANKER *et al*, 2004). As células isoladas nesses processos de dissociação são cultivadas com meio contendo soro bovino fetal. Algumas células da linhagem hematopoiética também podem aderir ao plástico, mas, com o tempo e com as várias trocas do meio de cultura, estas são removidas. A cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as CTM. (BYDŁOWSKI *et al*, 2009).

As CTM constituem uma população heterogênea de células, em termos de morfologia e expressão de antígenos de superfície. Para a caracterização fenotípica dessas células deve-se empregar um conjunto de anticorpos monoclonais que permitem a avaliação quantitativa e qualitativa da expressão dos antígenos de superfície por citometria de fluxo, caracterizando um perfil imunofenotípico das células isoladas (DOMINICI *et al*, 2006). Alguns pesquisadores caracterizaram a população de CTM isoladas da medula óssea de humanos e camundongos pela expressão em sua superfície dos marcadores moleculares CD44 (receptor de hialuronato), CD105 (endoglina: marcador angiogênico), CD106 (VCAM-1: molécula de adesão vascular), CD166 (ALCAM: moléculas de adesão de leucócitos ativados), CD29 (integrinas VLA-β), CD73 (SH3 e SH4), CD90 (Thy-1), Stro-1 (estroma de suporte da hematopoese) e Sca-1 (antígeno de células-tronco 1) (GRONTHOS *et al*, 2003; KOLF *et al*,

2007; PHINNEY & PROCKOP, 2007). As CTM não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, tais como o CD11b (marcador de integrina Mac-1), CD14 (receptor de lipopolissacarídeo LPS), CD31 (PECAM-1: molécula de adesão plaquetária), CD33 (receptor transmembrana de células mielóides), CD34 (receptor de células endoteliais e hematopoiéticas), CD133 e CD45 (presentes em todas as células hematopoiéticas) (DOMINICI *et al.*, 2006).

Diante da diversidade de marcadores utilizados para caracterização de células-tronco mesenquimais, o Comitê de Células-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs alguns critérios para a caracterização das CTM (DOMINICI *et al.*, 2006). As células devem expressar CD73, CD90 e CD105 e não devem expressar os marcadores de linhagem hematopoiéticas c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, e CD79 (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, a expressão desses antígenos pode mudar durante o cultivo destas células *in vitro*, a depender da fonte de obtenção, das condições da cultura específicas e do tempo de cultivo entre as passagens (PSALTIS *et al.*, 2008).

Outro ponto a ser investigado no que diz respeito à caracterização das CTM é o monitoramento citogenético. O que se questiona atualmente é se a expansão *in vitro* das CTM, por um determinado período de tempo, leva invariavelmente à senescência celular, com subsequente acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, tornando-as células com potencial neoplásico (PAYÃO *et al.*, 2009). De fato, alguns trabalhos têm demonstrado que as CTM cultivadas por muito tempo sofrem processos de transformação espontânea, sendo necessário um controle citogenético dessas células a fim de garantir a qualidade das mesmas (RUBIO *et al.* 2005; MIURA *et al.*, 2006; CATALINA *et al.*, 2007).

Além da capacidade de autorrenovação, crescimento por aderência em plástico e conjunto de marcadores de superfície, outro critério de caracterização das CTM proposto pelo Comitê de Células-Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular, é sua capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica *in vitro*, que depende do tratamento oferecido às células, tais como o meio basal, a densidade celular, a organização espacial, os fatores de crescimento e citocinas que são fundamentais no sucesso da diferenciação (MANNELLO & TONTI, 2007).

Além dessa capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos, e adipócitos, há trabalhos que descrevem a diferenciação bem sucedida dessas células para uma grande variedade de linhagens celulares, incluindo mioblastos, cardiomiócitos, hepatócitos e neurônios (LIU *et al.*, 2009).

3.1.2 Diferenciação cardiomiogênica

A diferenciação é o processo através do qual uma célula adquire nova morfologia e característica funcional (THEISE & KRAUSE, 2002). A diferenciação *in vivo* leva ao estabelecimento de linhagens celulares somáticas da camada precursora germinativa durante o desenvolvimento dos mamíferos (GROVE *et al*, 2004).

No caso do coração, os mecanismos de diferenciação em cardiomiócitos que ocorrem durante a cardiogênese dependem da expressão de alguns fatores transcricionais, dentre eles o NK2 relacionado ao *locus 5 (Nkx 2,5)*. O Nkx 2.5 é um dos cinco genes membros da família Nkx 2 que são expressos durante o desenvolvimento do coração de vertebrados (SHIOJIMA *et al*, 1996). Seus genes são expressos na fase inicial do desenvolvimento embrionário, e essa expressão se mantém predominante no músculo cardíaco adulto (KOMURO & IZUMO, 1993). O Nkx2,5, juntamente com outros fatores de transcrição, tais como o GATA-4, induz a expressão dos genes estruturais das células cardíacas, como, por exemplo, genes que codificam as proteínas do sarcômero (THOMAS *et al*, 2001). O sarcômero é a unidade funcional dos cardiomiócitos (LEAVIS & GERGELY, 1984). Cada sarcômero é composto de um arranjo geométrico de filamentos grossos da miosina, que por sua vez é contornada por filamentos finos de actina e do complexo das troponinas: troponina I, troponina T e troponina C (PARMACEK & SOLARO, 2004).

Como citado anteriormente, as CTM possuem um grande potencial de diferenciação *in vitro*, não somente em condrócitos, adipócitos e osteoblastos, mas também em outros tipos celulares, incluindo cardiomiócitos (WEIR *et al*, 2008; COLLINS & RUSSEL, 2009). Sendo assim, diversos estudos visando ao desenvolvimento de técnicas de cardioplastia têm explorado o potencial de diferenciação das CTM em estudos pré-clínicos, demonstrando benefícios ao miocárdio nas terapias de modelos de lesão cardíaca (PSALTIS *et al*, 2008).

O comprometimento das CTM com uma linhagem específica é influenciado pelo microambiente em que as células estão sendo cultivadas. No caso da diferenciação cardiogênica, estratégias de co-cultura e uso de químicos sintéticos são utilizados para este fim (HENG *et al*, 2004, LIU *et al*, 2009). A co-cultura utilizada como método de diferenciação pode ser direta ou indireta, na qual as CTM indiferenciadas são cultivadas com células diferenciadas (KONINCKX *et al*, 2009; LI *et al*, 2009). Um outro método de diferenciação descrito é o sistema de cultivo que mimetiza o ambiente tecidual. Ge e colaboradores (2009) descreveram um sistema no qual as células são cultivadas acima de uma

membrana que está sujeita ao efeito da passagem de um fluido, que simula a passagem da corrente sanguínea. Quando as CTM isoladas de camundongos são tratadas com meio condicionado de extratos cardíacos juntamente com o estímulo físico da câmara, e a tensão conferida pela passagem do fluido, as células que eram indiferenciadas passam a expressar marcadores cardíacos.

O tratamento das CTM com químicos sintéticos, tais como a 5-azacitidina, é um dos métodos mais utilizados para diferenciar as CTM em cardiomiócitos (MAKINO *et al*, 1999; FUKUDA, 2002; HAKUNO *et al*, 2002; HENG *et al*, 2004; BALANA *et al*, 2006). A 5-azacitidina é um nucleosídeo sintético que inibe a metilação de DNA, impedindo o silenciamento de alguns genes, de forma randômica, resultando em efeitos genotóxicos (LI *et al*, 2007; ZHANG *et al*, 2009). Quando cultivadas na presença de 5-azacitidina, as CTM sofrem mudanças na morfologia e, após algumas semanas em cultivo, fibras são formadas e começam a ter contração espontânea, apresentando potencial de ação semelhante ao de cardiomiócitos (FUKUDA, 2002; MAKINO *et al*, 1999).

3.1.3 Células-tronco isoladas do coração

Além da medula óssea e de outros tecidos, as CT foram isoladas do coração. Apesar de ser, principalmente, constituído de células terminantemente diferenciadas, este órgão tem sido mais recentemente colocado junto a outros com potencial regenerativo. A descoberta de CT cardíacas que podem ser isoladas do miocárdio adulto e expandidas *in vitro* tem sugerido a sua utilidade em terapia celular (TORELLA *et al.*, 2005).

Nos últimos anos, grupos de pesquisadores de laboratórios independentes isolaram e caracterizaram populações de CT do coração de mamíferos adultos com capacidade clonogênica, de autorrenovação e plasticidade, podendo dar origem as três principais linhagens de células que compõem o miocárdio: miócitos, células endoteliais e células de músculo liso (BELTRAMI *et al*, 2003, OH *et al*, 2003; MARTIN *et al*, 2003, MATSUURA *et al*, 2004; MESSINA *et al*, 2004; DAWN *et al*, 2005, LAUGWITZ *et al*, 2005, STEELE *et al*, 2005; CARLSON *et al*, 2010; GAMBINI *et al*, 2011).

O primeiro isolamento foi baseado na habilidade destas células de realizar o efluxo do corante Hoechst 33342. Hierlihy e colaboradores (2002) foram os primeiros a descrever uma população de células, denominada *side population* (pela exclusão do Hoechst 33342), isolada de corações de camundongos adultos, que são células-tronco.

Logo depois, foram isoladas células-tronco cardíacas através de separação imunomagnética e por *sorting* utilizando citometria de fluxo, com base na expressão do marcador de superfície c-Kit, o receptor para o fator de células-tronco (SCF), que é um marcador usado para vários tipos de células-tronco (BELTRAMI *et al*, 2003). Neste estudo, os resultados indicam a presença de células-tronco c-Kit⁺ no miocárdio caracterizadas como sendo autorrenováveis, multipotentes e clonogênicas, podendo ser expandidas *in vitro*.

Outra população de CT cardíacas que são caracterizadas pela expressão de Sca-1 (antígeno de células-tronco-1) foi isolada do coração de camundongos adultos (OH *et al*, 2003; MATSUURA *et al*, 2004). As células-tronco cardíacas Sca-1⁺ isoladas não se diferenciaram espontaneamente *in vitro*, porém, quando estimuladas em cultura, uma pequena fração apresentou marcadores bioquímicos de miócito cardíaco diferenciado, tais como a α -actina sarcomérica, troponina I cardíaca e a cadeia pesada da miosina (OH *et al*, 2003; MATSUURA *et al*, 2004).

Outras células isoladas do coração com marcadores de superfície de CT e células progenitoras endoteliais foram descritas pelo grupo do Messina e colaboradores (2004), que utilizaram técnica de isolamento baseada na obtenção de cardioesferas, que são aglomerados de células indiferenciadas provenientes do cultivo de biópsias e cultura do tecido cardíaco humano ou murino. Uma quinta população de CT cardíacas foi isolada expressando o fator de transcrição Isl-1. Os experimentos revelaram que as células que expressam este fator podem se diferenciar em células da linhagem cardíaca durante a formação fetal do coração embrionário. Estas células que expressam Isl-1 estão também presentes no coração de mamíferos adultos, porém são limitadas ao átrio direito e estão em menor número do que no coração embrionário (LAUGWITZ *et al*, 2005).

Mais recentemente, foi isolada outra população de CT cardíacas obtidas do coração murino e humano que exibem marcadores de CT mesenquimais (CARLSON *et al*, 2011; GAMBINI *et al*, 2011). Esta é uma abordagem nova quanto ao isolamento dessas células, tendo em vista que anteriormente as CT do coração eram isoladas baseadas em outros marcadores de superfície, que não os de células-tronco mesenquimais. Segundo Leri e colaboradores (2005), esses achados revelam que o coração tem uma mistura de populações celulares com características de células-tronco e que provavelmente estejam envolvidas na formação de novos miócitos, repovoando as células que foram perdidas em lesões cardíacas (BARILE *et al*, 2007).

3.2 TERAPIA CELULAR EM CARDIOLOGIA

O capítulo da terapia celular em cardiologia se iniciou com os primeiros estudos a partir da década de 90 quando foram utilizados diversos tipos celulares, incluindo os cardiomiócitos fetais (PFEFFER & BRAUNWALD, 1990), mioblastos esqueléticos (EGLITIS *et al*, 1997; FERRARI *et al*, 1998; JACKSON *et al*, 1999), fibroblastos (VOGEL *et al*, 2000), CT embrionárias (ORLIC *et al*, 1993). No início dos anos 2000, os pesquisadores começaram a utilizar CT derivadas da medula óssea para regenerar lesões no miocárdio (FERRARI *et al*, 1998; JACKSON, *et al*, 1999). A partir desse momento, a pesquisa com CT cresceu exponencialmente e outros tipos celulares foram testados, dentre esses estão as células tronco progenitoras endoteliais (DAI *et al*, 2005), células-tronco mesenquimais (NAGAYA *et al*, 2001; AMADO *et al*, 2005; QUEVEDO *et al*, 2009), células-tronco pluripotentes induzidas (NELSON *et al*, 2009), e células-tronco cardíacas (BELTRAMI *et al*, 2003; OH *et al*, 2003; MARTIN *et al*, 2004; OTT *et al*, 2007). Atualmente, estão sendo realizados ensaios clínicos em cardiologia utilizando células mononucleares de medula óssea, mioblastos esqueléticos, células-tronco mesenquimais e células derivadas de cardioesferas (WOLLERT *et al*, 2004; MENASCHE *et al*, 2008; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00587990>; <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00893360>).

No Brasil, a eficácia da terapia com células derivadas da medula óssea vem sendo testada em quatro diferentes cardiopatias: doença isquêmica do coração aguda e crônica, cardiomiopatia chagásica e cardiomiopatia dilatada, em um estudo financiado pelo Ministério da Saúde, através do Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapias Celulares em Cardiopatias (*Multicenter Randomized Trial of Cell Therapy in Cardiopathies – MiHeart Study*). Parte deste estudo foi realizado pelo nosso grupo, que desenvolve pesquisas em terapia celular e realizou o estudo pioneiro, no Hospital Santa Izabel da Santa Casa de Misericórdia da Bahia, em cooperação com a FIOCRUZ/ BA, incluindo pacientes com insuficiência cardíaca grave de etiologia chagásica (VILAS-BOAS *et al*, 2006; RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al*, 2012).

O fato é que as conclusões provenientes dos estudos realizados em cardiologia desencadearam a busca por novos tipos celulares, com novas estratégias terapêuticas, como tentativa de obtenção de resultados melhores no processo de regeneração do miocárdio lesado. Desde então, os pesquisadores têm dirigido o foco para populações mais homogêneas e bem definidas de células-tronco, para melhor compreender os mecanismos de ação e de otimização da recuperação cardíaca.

A figura 1 apresenta um esquema que indica as diversas fontes de CT que estão sendo investigadas e utilizadas em terapia celular. Embora os mecanismos de ação não estejam totalmente elucidados, os resultados mostraram que os tratamentos promoveram uma melhora da função cardíaca através dos efeitos benéficos ao miocárdio, incluindo o remodelamento da matriz extracelular, angiogênese, remodelamento das propriedades elétricas, e melhoria na contratilidade muscular (SEGERS *et al*, 2008).

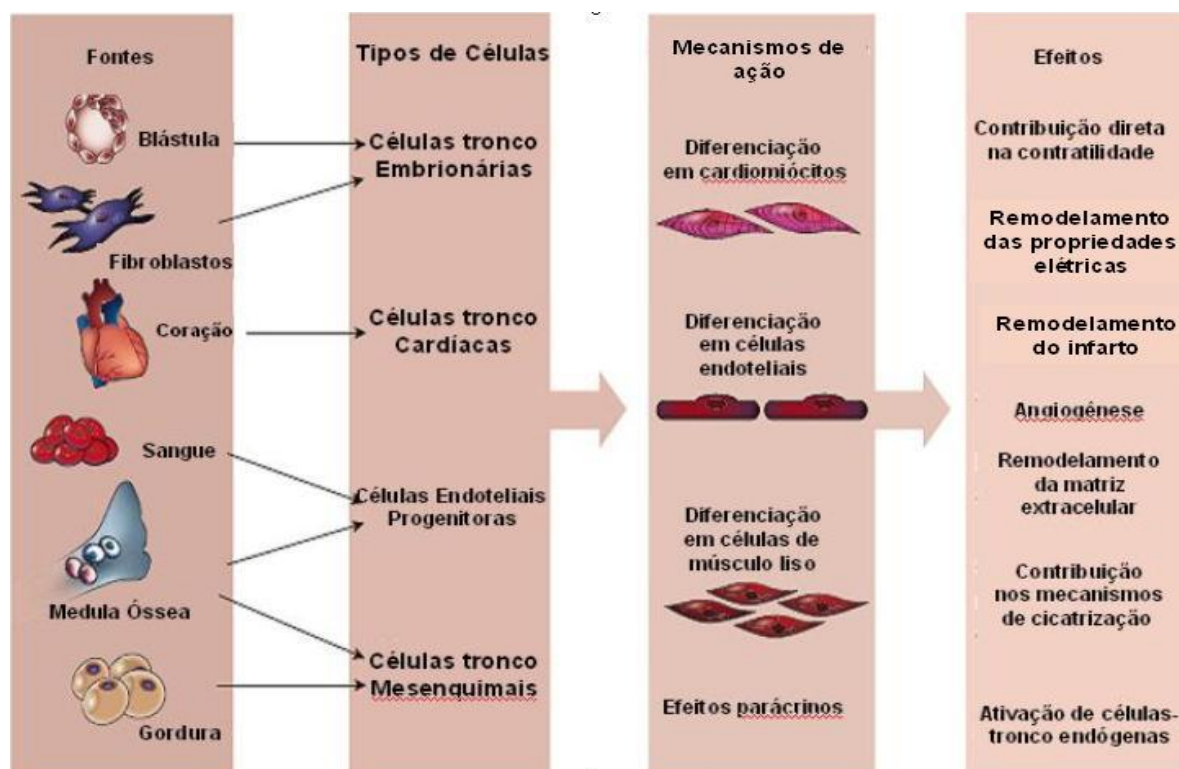


Figura 1: Células-tronco isoladas de fontes autólogas ou alogênicas utilizadas em cardiologia. Diferentes tipos de células-tronco têm sido utilizados na terapia celular e mostraram promover efeitos benéficos à função cardíaca. Fonte: adaptado de SEGERS *et al*, 2008.

A população de CT cardíacas $c\text{-Kit}^+$ descrita por Beltrami e colaboradores (2003) parece ter um potencial de migração e reparo de lesões isquêmicas do miocárdio (DAWN *et al*, 2005; LINKE *et al*, 2005). Messina e colaboradores (2004) isolaram e expandiram CT cardíacas humanas e murinas, a fim de testar a competência funcional destas células. Após o transplante das células de origem humana na borda da área infartada em corações de camundongos, os pesquisadores observaram um aumento significativo na fração de ejeção do grupo transplantado quando comparado ao grupo controle. Em um modelo experimental de infarto do miocárdio, observou-se migração destas células para área de infarto que promoveu a formação de novos miócitos e aumentou a sobrevivência destes animais (URBANECK *et al*, 2005). Esse mesmo grupo isolou CT cardíacas de corações de humanos que morreram após

um infarto agudo do miocárdio e de corações de pacientes transplantados após infarto crônico do miocárdio. Neste estudo foi observado que estas células são ativadas em resposta à lesão isquêmica, e que a perda gradual da funcionalidade destas células em processos crônicos pode ser um dos mecanismos associados à deterioração progressiva da função do coração, levando à insuficiência cardíaca (URBANECK *et al*, 2005).

3.3 MÉTODOS UTILIZADOS NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO NA CARDIOLOGIA

Como visto anteriormente, a terapia com células-tronco está sendo amplamente explorada como princípio de regeneração do miocárdio. Entretanto, ainda é preciso esclarecer algumas questões que poderão otimizar os efeitos benéficos dessa terapia, tais como, o tipo celular, a dose ideal e a via de administração a ser empregada em cada procedimento (OYAMA, *et al*, 2004).

O tipo celular ideal a ser utilizado nas terapias pode variar, a depender do tecido que se deseja induzir a regeneração. É possível que haja uma fonte preferencial para uma dada terapia, e que se possa estabelecer uma correlação entre marcadores imunofenotípicos que caracterizem a população celular e a reparação tecidual (BERNSTEIN & SRIVASTAVA, 2012). A recente descoberta de células-tronco no coração de mamíferos adultos com potencial regenerativo despertou as pesquisas em cardiologia, dada a possibilidade de que as células-tronco residentes em um determinado órgão sejam as mais adequadas para induzir o seu reparo. Há na literatura diversos trabalhos que descrevem a relação entre o uso de células-tronco cardíacas e o reparo do coração em modelos experimentais de cardiopatias (LERI *et al*, 2005).

Outra população que está sendo investigada é a das células-tronco mesenquimais, que podem ser expandidas *in vitro* antes da infusão (WANG *et al* 2008). No entanto, como dito anteriormente, após atingirem confluência máxima, as células são destacadas das garrafas de cultivo utilizando enzimas proteolíticas (FRESHNEY *et al*, 1994), o que pode dificultar a retenção das células após o transplante no órgão de interesse, uma vez que o uso dessas enzimas dissocia as moléculas de adesão presentes na membrana celular (SHIMIZU *et al*, 2003). Dessa forma, a otimização da retenção celular e o aperfeiçoamento das técnicas de administração que visem à injeção direta das células no órgão de interesse poderão aumentar ainda mais os benefícios da terapia celular.

Atualmente os métodos utilizados no transplante de células-tronco em doenças cardiológicas são as injeções intramiocárdica, intracoronária e intravenosa (OYAMA *et al*, 2004). A injeção intravenosa é o método mais simples e menos invasivo de infusão de células-tronco, pois dispensa a realização de cirurgia e o uso de catéter (KOCHER *et al*, 2001). A desvantagem é que esse procedimento requer a injeção de um número muito grande de CT, pois essas células necessitam percorrer um longo percurso até atingir o coração e muitas podem ser retidas em outros órgãos antes de chegar ao tecido cardíaco (LEE *et al*, 2004).

A injeção intramiocárdica consiste na injeção de células-tronco, diretamente nas áreas do miocárdio circundadas pela lesão (OYAMA *et al*, 2004). Nos estudos em cardiologia que utilizaram esse método para a administração de CT foram demonstradas a exequibilidade e a segurança desse procedimento (ORLIC *et al*, 2001; AMADO *et al*, 2005; WANG *et al*, 2008). A vantagem desse método é que ele requer uma menor quantidade de células que podem ser injetadas diretamente na área a ser tratada (PERIN *et al*, 2003).

Por fim, a injeção intracoronária, que é o método não cirúrgico, e que até o momento tem se mostrado seguro, de liberar células na artéria relacionada à irrigação do miocárdio, utilizando-se um cateter (OYAMA *et al*, 2004). Esse procedimento parece ser mais eficiente que a administração intramiocárdica ou intravenosa, pois permite uma distribuição e fixação mais homogênea das células-tronco sobre as áreas afetadas e as áreas circunvizinhas à lesão (STRAUER *et al*, 2002). Entretanto, a administração intracoronária ainda precisa ser otimizada para outros tipos celulares, tais como as células-tronco mesenquimais, pois há relatos prévios sugerindo que essas células apresentam diâmetro celular superior ao calibre dos capilares, podendo levar a eventuais embolias (BOJKO & NOTTERMAN, 1999). Desta forma, para a administração de CTM devem ser utilizadas as estratégias que visam à injeção direta no músculo cardíaco, a fim de evitar problemas desse tipo durante o transplante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos, de quatro a oito semanas de idade, da linhagem C57BL/6 EGFP (transgênicos para a proteína fluorescente verde) para obtenção das células-tronco cardíacas e células da medula óssea. Camundongos C57BL/6 selvagens, de 4 a 8 semanas, fêmeas, foram utilizados para o ensaio de injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas. Os animais foram provenientes do Biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular do Hospital São Rafael, tendo água e alimentação *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para uso de animais do Centro de biotecnologia e terapia celular do Hospital São Rafael.

4.2 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO

4.2.1 Células-tronco obtidas do coração de camundongos C57BL/6 EGFP

Para a obtenção das células-tronco cardíacas, cinco camundongos C57BL/6 EGFP, foram anestesiados profundamente e imediatamente submetidos à eutanásia. A seguir, o coração foi retirado e os fragmentos cardíacos foram processados mecanicamente com bisturi, dissociados em pedaços de aproximadamente 1 mm³, transferidos para tubos de centrífuga de 50 mL estéreis e lavados com solução salina 0,9% para remover debris celulares e o excesso de sangue. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à digestão em solução com colagenase tipo A 0,1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e incubados a 37° C, por 30 minutos, sob agitação constante. Após esse período, adicionou-se aos fragmentos cardíacos dissociados 20 mL de meio de cultura completo constituído de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 0,1% de gentamicina (meio e suplementos foram adquiridos da GIBCO, BRL, New York, EUA). Em seguida, foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos.

Os fragmentos do tecido cardíaco, provenientes do processo de dissociação, foram cultivados em forma de explantes com 2 mL de meio completo distribuídos em placa de 6 poços (TPP, *Trasadigen*, Suíça) e incubados em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂. O meio foi trocado a cada 3 dias, e após 8 dias quando atingiram confluência de 90%, os explantes foram removidos da cultura e as células aderentes à placa foram tripsinizadas

(Trypsina-EDTA 0,05%; GIBCO) e transferidas para frascos de cultura *canted neck* com filtro de 25 cm² com 5 mL de meio completo. A cultura das células derivadas dos explantes cardíacos foi mantida em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂, com meio completo, sendo este trocado a cada 5 dias. As células foram expandidas por sucessivas passagens nessas condições até atingirem a quantidade suficiente para a realização dos experimentos. O processo de isolamento, evolução da cultura, e a caracterização morfológica das células foram monitorados utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS, Center Valley, PA, USA) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA, EUA).

4.2.2 Obtenção de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 EGFP

Os mesmos cinco camundongos C57BL/6 EGFP utilizados para a obtenção das células-tronco cardíacas também foram utilizados para obtenção das células-tronco derivadas da medula óssea. A tíbia e o fêmur foram retirados e foi feita a secção na região das epífises, para a introdução de agulha 0,45x13-26 G na cavidade medular para lavagem pela injeção de 5 mL de DMEM com 0,1% de gentamicina em cada osso. As células obtidas foram submetidas à centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O *pellet* proveniente desse processo foi ressuspenso em 10 mL de meio completo, e a suspensão das células foi distribuída em 2 frascos de cultura *canted neck* de 25 cm² com filtro na tampa, com 5 mL de meio completo, e mantidas em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂. Após 2 dias, o meio foi trocado completamente por meio fresco, retirando-se as células em suspensão, não aderentes ao frasco de cultura. Oito dias após o isolamento, após terem atingido 90% da confluência, as células aderentes ao frasco foram tripsinizadas e transferidas para frascos de cultura *canted neck* com filtro de 75 cm² com 15 mL de meio completo. A cultura das células-tronco derivadas da medula óssea foi mantida em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂, com troca de meio completo a cada 5 dias. As células foram expandidas por sucessivas passagens nessas condições até atingirem a quantidade suficiente para a realização dos experimentos. O acompanhamento do processo de isolamento, da evolução da cultura e a caracterização morfológica das células isoladas foram realizados utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics)

4.3 CARACTERIZAÇÃO CELULAR

Para a caracterização das células-tronco derivadas do coração e da medula óssea de camundongos EGFP foram empregadas as técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência. Para isso, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície através da identificação e quantificação das células pela intensidade dos diversos fluorocromos. As células derivadas da medula óssea foram utilizadas como controle nesses ensaios.

4.3.1 Citometria de fluxo

As células-tronco derivadas do coração e da medula óssea de camundongos EGFP, nas passagens 2, 5 e 8, foram tripsinizadas e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com solução salina 0,9% a 3000 rpm por 2 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspensionado em solução salina 0,9%, e 5×10^5 células foram incubadas à 4° C por 30 minutos com os seguintes anticorpos na concentração 1/50: CD90PE (CALTAG, Buckingham, Inglaterra), Sca1PE-Cy5 (CALTAG), CD45APC (CALTAG), CD34PE (CALTAG), CD44PE (CALTAG), CD31APC (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), CD117PE (BD), e CD73PE (BD). Após o período de incubação, procedeu-se com duas lavagens com solução salina 0,9% e, em seguida, foi realizada a aquisição dos dados e as análises no citômetro de fluxo LRSFortessa (BD). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados e analisados.

4.3.2 Imunofluorescência

As células-tronco derivadas do coração e da medula óssea de camundongos EGFP foram tripsinizadas, na passagem 6, e semeadas 10^4 células por poço, em placas de 24 poços, contendo lamínulas de 13 mm (KNITTEL, Braunschweig, Alemanha). As células foram cultivadas em meio completo e mantidas em estufa umidificada à 37° C com 5% de tensão de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado do poço e foram realizadas duas lavagens com meio DMEM sem SBF durante 3 minutos, seguida de uma lavagem com PBS (*phosphate buffer saline*) (SIGMA) por 3 minutos. Após a remoção do PBS, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos. Em seguida foi feita uma lavagem dos poços por duas vezes com PBS durante 3 minutos. Foi realizado bloqueio com BSA 5% (*bovine serum albumin*) (SIGMA) durante 30 minutos, em seguida as lamínulas foram incubadas a 4° C por

24 horas com os seguintes anticorpos primários nas respectivas diluições: CD44 (1:100) (BD), CD34 (1:50) (ABCAM, Cambridge, MA, EUA), CD45 (1:50) (CALTAG), CD90 (1:50) (BD), CD73 (1:50) (BD), CD117 (1:50) (BD).

Após o período de incubação, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos, seguida de duas lavagens com PBS por mais 3 minutos. Subsequentemente foi realizada a incubação durante 1 hora à 4° C com o anticorpo secundário Alexa Fluor 568 (MOLECULAR PROBES, Carlsbad, CA, EUA) diluído na concentração 1:200 em solução de PBS/BSA 1%. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS/Tween 0,05% durante 3 minutos e mais duas lavagens com PBS também por 3 minutos. As lâminas foram montadas com meio de montagem VectaShield (DAKO, Glostrup, Dinamarca) contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para coloração nuclear, e analisadas utilizando microscópio confocal FluoView 1000 (OLYMPUS).

4.4 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética foi realizada nas células-tronco derivadas do coração e da medula óssea até a 5ª passagem. Para a obtenção das metáfases as células foram incubadas com colchicina a 16 µg/ml (CULTILAB; Campinas, SP, Brasil) para interrupção do ciclo celular durante a metáfase e, posteriormente, as células foram encubadas em solução de KCL 0,075 M. A fixação foi realizada por exposição das células em solução de Carnoy (ácido acético/metanol). O tratamento enzimático para definição das bandas foi feito com solução de tripsina a 0,1% (CULTILAB) e a coloração foi realizada com Giemsa. A análise citogenética foi realizada em microscópio BX61 (OLYMPUS). Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada passagem considerando-se o nível de ploidia e presença de rearranjos estruturais. Foram consideradas normais células que apresentavam 40 cromossomos acrocêntricos.

4.5 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Foi investigado o potencial de diferenciação das células-tronco derivadas do coração e da medula óssea, com a utilização de meio suplementado com fatores indutores de diferenciação específicos, na oitava passagem. As células derivadas da medula óssea foram utilizadas como controle nesses experimentos

4.5.1 Diferenciação adipogênica

As células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas 13 mm em meio completo (10^4 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência todo o meio foi removido e substituído por do meio de indução adipogênica StemPro *Adipogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias, e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo.

Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. A seguir, foram coradas com solução de *Oil red* por 5 minutos e em seguida lavadas com álcool 70%. As imagens foram capturas por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics)

4.5.2 Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, 5×10^3 células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas 13 mm, em meio completo. Após atingirem 50-60% de confluência todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, por até 14 dias, com meio de diferenciação osteogênica StemPro *Osteogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias, e evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo.

A deposição de cálcio foi observada através da coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos, e em seguida, foram feitas duas lavagens com água destilada. As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics)

4.5.3 Diferenciação condrogênica

As células foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços com lamínulas 13 mm em meio completo (10^5 células/poço). Após atingirem 40-50% de confluência todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas, por 21 dias, com meio de diferenciação condrogênica StemPro *Chondrogenesis Differentiation Kit* (GIBCO). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias, e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo.

Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de *Alcian Blue* (GIBCO) em HCl 0,1 N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1 N e, em seguida, foi adicionada água destilada para a neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS) e o *software* ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

4.5.4 Diferenciação cardiomiogênica

As células foram cultivadas com meio DMEM e 10% SBF em placas de 24 poços com lamínulas 13 mm em meio completo. Após atingirem 60% de confluência, foi adicionado 5 ou 10 μ M de 5' azacitidina (SIGMA) durante 24 horas. Após esse período, todo o meio foi removido e em seguida, as células foram cultivadas por 4 semanas em meio completo. Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo na ausência de 5' azacitidina.

Para avaliar a diferenciação cardiomiogênica, após 4 semanas de cultura foram realizadas análises por qRT-PCR e imunofluorescência das células expostas a 5'azacitidina ou não. As lamínulas com as células-tronco derivadas do coração e da medula óssea foram retiradas da placa de 24 poços e foram realizadas duas lavagens com meio DMEM sem SBF durante 3 minutos, seguida de uma lavagem com PBS por 3 minutos. Após a remoção do PBS, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos. Em seguida, foi feita lavagem dos poços por duas vezes com PBS durante 3 minutos, foi realizado o bloqueio

com BSA 5% durante 30 minutos e incubadas à 4°C por 24 horas com os anticorpos primários nas respectivas diluições: anti-troponina T cardíaca (1:100) e anti-conexina 43 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EUA). As imagens das células diferenciadas e seus controles foram adquiridas por microscópio AX70 (OLYMPUS) utilizando *software* Imagepro Plus 7.0 (Media Cybernetics).

4.5.4.1 Avaliação de Expressão Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real

O RNA total foi isolado pelo método TRIZOL (LIFE TECHNOLOGIES, [Carlsbad](#), CA, EUA) de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. Posteriormente, foi realizada checagem por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm.

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (APPLIED BIOSYSTEMS, [Carlsbad](#), CA, EUA). Um micrograma de RNA total foi adicionado a 5 µL de Random primers, 5 µL de 10X *First Strand Buffer*, 2 µL de DNTP 10 mM, 3 µL de Enzima *Multiscribe*, todos da marca Applied Biosystems. Foi adicionada água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para completar um volume final de 50 µL. Essa mistura foi incubada a 25° C por 10 minutos e a 37° C por duas horas. O armazenamento foi realizado a 4° C.

A análise da expressão dos genes foi feita por PCR em Tempo Real. As reações foram preparadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente Taqman *Universal Master Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS) e o equipamento *7500 Real Time PCR System* (APPLIED BIOSYSTEMS).

As sondas utilizadas e as reações de amplificação foram feitas de acordo com as especificações propostas pelo fabricante. As reações foram preparadas em duplicatas em um volume final de 20 µL. As condições da reação para todos os genes avaliados envolveram 10 minutos a 95° C para ativação da polimerase e 40 ciclos a 95° C por 15 segundos e a 60° C por 1 minuto. O máximo coeficiente de variação permitido entre as duplicatas foi de 1%. Nos casos em que esse valor for superior o experimento foi repetido. A escolha dos normalizadores utilizados foi feita com o auxílio do programa *BestKeeper*, disponível no site <http://gene-quantification.com/bestkeeper.html>. Foram testados três potenciais genes normalizadores: *TUBA1C*, *GAPDH* e *HPRT*.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo matemático denominado delta CT. Neste modelo, é feita a comparação dos valores de CT obtidos para uma determinada amostra de interesse e os valores de CT obtidos para o gene

alvo são normalizados com um gene endógeno de expressão constante ou similar em todas as amostras avaliadas. Neste ensaio foi avaliada a expressão do gene *GATA4* (Mm 00484689_m1) nas células-tronco cardíacas e da medula óssea após serem estimuladas com 5' azacitidina.

4.6 INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA GUIADA POR ECOCARDIOGRAFIA

Foram utilizados cinco camundongos C57BL/6 fêmeas, para injeção intramiocárdica de células-tronco obtidas do coração de camundongos EGFP cultivadas até a 6ª passagem. As células foram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Para injeção intramiocárdica, os animais foram anestesiados em circuito anestésico com isoflurano inalatório 2% (ABBOTT, Abbott Park, IL, EUA) por 10 minutos antes e depois da injeção de 10⁶ células-tronco obtidas do coração de camundongos EGFP que foram ressuspensas em 50 µL de solução salina 0,9% estéril e injetadas na parede lateral do ventrículo esquerdo utilizando agulha ultrafina 12.7 mm x 0.33 mm 29 G (BD), guiada por ecocardiografia com *probe RMV 707B*, 30 MHz (Vevo 707®, Visual Sonics, Toronto, Canadá).

4.7 AVALIAÇÃO FUNCIONAL CARDÍACA POR ECOCARDIOGRAFIA

O estudo ecocardiográfico dos animais foi realizado antes e depois da injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas GFP⁺. Para isso, foi utilizado o equipamento descrito acima. Para a realização do estudo ecocardiográfico, os animais foram anestesiados em circuito anestésico com isoflurano inalatório 2%. Após a anestesia, o animal foi posicionado em decúbito dorsal em um suporte aquecido a aproximadamente 37° C, e em seguida, realizou-se tricotomia do tórax. A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas de estudo em modo unidimensional (modo-M), Bidimensional (modo-B) e *doppler* pulsado. Foram utilizadas incidências paraesternal longitudinal (eixo longo), paraesternal transversal (eixo curto), quatro câmaras e a paraesternal direita. Para a captação da imagem no eixo longo do coração, o transdutor foi disposto longitudinalmente ao corpo do animal, nas mediações da região esternal. Nesta imagem, visualizou-se o ventrículo direito, septo interventricular, ventrículo esquerdo, parede posterior, átrio esquerdo, via de saída do ventrículo esquerdo e a artéria pulmonar. No paraesternal transversal, adquiriu-se imagem em eixo curto, sendo possível evidenciar o septo interventricular, ventrículo esquerdo, a parede posterior, parede ântero-lateral e ventrículo

direito. Nesse mesmo plano, realizou-se aquisição em modo-M, aproximadamente ao nível do músculo papilar para as mensurações de espessura de paredes e câmaras. Realizou-se o delineamento do diâmetro endocárdico ventricular obtendo-se medidas de quatro cortes de ventrículo esquerdo, todos em final de sístole e diástole, aplicando-se na fórmula de *Simpson* para cálculo dos volumes diastólico e sistólico final.

Na incidência quatro câmaras, realizou-se medidas de fluxo doppler acima do anel fibroso da valva mitral, bem como o doppler tissular relacionado à capacidade de movimentação da parede ventricular. Volume sistólico, fração de encurtamento, fração de ejeção são calculados a partir dos valores de volume diastólico e sistólico final. Com o transdutor disposto novamente de forma longitudinal, porém com inclinação para a esquerda, realizou-se o plano paraesternal direito, no qual se identificou a via de saída de ventrículo esquerdo, aorta ascendente, arco aórtico com respectivos ramos do tronco braquiocefálico, artéria carótida comum esquerda, subclávia esquerda, porção inicial da aorta descendente e artéria pulmonar direita. Nesta incidência, realiza-se medida de fluxo da aorta ascendente, através do doppler pulsátil paralelo ao fluxo, ao nível da via de saída de ventrículo esquerdo, captando, desta forma, a integral velocidade-tempo do fluxo aórtico.

4.8 RASTREAMENTO DAS CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS GFP⁺ APÓS INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA

4.8.1 Espectroscopia *in vivo*

Após a injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas GFP⁺, foram feitas análises de imagem *in vivo* para monitorar a retenção das células injetadas diretamente no miocárdio. Para isso, foi utilizado o equipamento Kodak *in vivo multispectral imaging system* FX IB6620240 (Carestream Health, Rochester, NY, EUA). Para a obtenção das imagens, foi utilizado filtro de excitação de 480nm e filtro de emissão de 535 nm, com tempo de exposição de 10 segundos para captação de fluorescência e 30 segundos de exposição a raios X. O *software Carestream Molecular Imaging, Standard Edition*, versão 5.0.7.22 (Carestream Health) foi utilizado para aquisição das imagens e para a edição destas, foi utilizado o *software Carestream Multispectral*, versão 1.3.0 (Carestream Health)

4.8.2 Avaliação por imunofluorescência da presença de células GFP⁺ no miocárdio

As células injetadas diretamente no miocárdio foram rastreadas através de sua fluorescência natural. Para isso, o coração dos animais foram criopreservados em Tissue-Tek (SAKURA, Alphen aan den Rijn, Holanda) e secções de 10 µm foram obtidas em criostato LEICA CM 1850 UV (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As secções foram fixadas em paraformaldeído 4%, lavadas em PBS, incubadas com faloidina 633 (1:150) (MOLECULAR PROBES) por 1 hora, lavadas novamente com PBS e montadas com meio Vectashield H1200 (DAKO) contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). A análise foi realizada utilizando um microscópio confocal Flouview 1000 (OLYMPUS).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos dados, utilizou-se o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. Dados paramétricos foram analisados utilizando ANOVA duas vias. Um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DO CORAÇÃO E DA MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS TRANSGÊNICOS PARA A EGFP

Células-tronco do tecido cardíaco e da medula óssea de camundongos transgênicos para a EGFP foram isoladas e expandidas *in vitro*. As células de ambas as fontes foram aderentes ao plástico, apresentam morfologia semelhante à de células-tronco mesenquimais. Após 72 horas, as células-tronco obtidas do coração aderiram à placa e apresentaram morfologia fibroblastóide ou arredondada (figura 2A). Após 8 dias de cultivo, as células que migraram do explante cardíaco apresentavam confluência de aproximadamente 90%, formando agregados celulares ao redor dos explantes (figura 2B). Após sucessivas passagens, as células mantiveram a morfologia fibroblastóide.

Após 72 horas, as culturas das células-tronco isoladas da medula óssea também apresentaram morfologia fibroblastóide e mantiveram essa morfologia após sucessivas passagens (figura 2C).

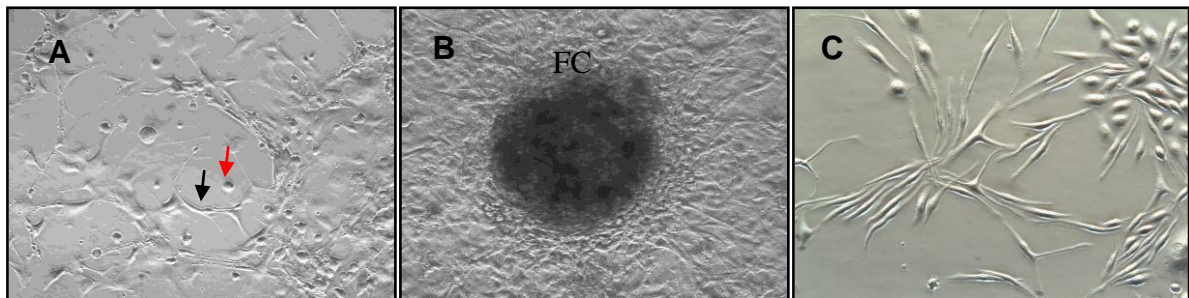


Figura 2: Aspecto morfológico das células aderentes isoladas a partir de explante cardíaco ou da medula óssea. Em (A) as setas preta e vermelha indicam as morfologias fibroblastóide e arredondada, respectivamente, das células aderentes à placa após 72 horas do isolamento a partir do explante cardíaco. Células-tronco migram do fragmento cardíaco (FC), proliferam e atingem confluência de 90% após 8 dias de cultivo (B). Morfologia fibroblastóide de células-tronco isoladas a partir da medula óssea (C). Magnificação x200 (A e B), e x400 (C).

5.2 CARACTERIZAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO E IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células isoladas a partir do coração e da medula óssea de camundongos transgênicos para a EGFP foram caracterizadas nas passagens 2, 5 e 8 por citometria de fluxo

e na passagem 6 por imunofluorescência, utilizando anticorpos utilizados para a identificação de diferentes populações celulares. Os marcadores utilizados foram: CD90, Sca-1, CD45, CD73, CD45, CD117, CD34, CD44, CD45, CD31. De um modo geral, as características imunofenóticas foram semelhantes para as células de ambas as fontes. Os valores para todos os marcadores analisados estão organizados na tabela 1.

A citometria de fluxo das células obtidas dos fragmentos do miocárdio e da medula óssea revelou, em todas as passagens analisadas, uma alta expressão de GFP. Esse resultado foi confirmado pela detecção da fluorescência natural das células GFP⁺ observadas por microscopia de fluorescência (figuras 3A e 3E). Um pequeno percentual das células-tronco obtidas do coração e da medula óssea apresentou a expressão de CD117 na passagem inicial, e esse fenótipo se manteve nas passagens P5 e P8. As células-tronco cardíacas e da medula óssea, nas três passagens analisadas por citometria de fluxo, apresentaram um alto percentual de células expressando marcadores de células-tronco mesenquimais (Sca-1, CD44, CD73, CD90), que foi aumentando nas sucessivas passagens. O ensaio de imunofluorescência realizado nas células isoladas do coração e da medula óssea confirmou o resultado da citometria de fluxo, revelando a presença dos marcadores CD44 (figuras 3B e 3F), CD90 (figuras 3C e 3G) e CD73 (figuras 3D e 3H). Já o percentual de células expressando os marcadores para células hematopoiéticas (CD45, CD31, CD34) diminuíram com o passar do tempo.

Tabela 1. Imunofenótipo das células-tronco isoladas do coração e da medula-óssea avaliado por citometria de fluxo

| Marcadores | P2 | | P5 | | P8 | |
|------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|
| | Coração (%) | Medula óssea (%) | Coração (%) | Medula óssea (%) | Coração (%) | Medula óssea (%) |
| GFP | 92 | 91 | 90 | 88 | 92 | 90 |
| CD45 | 15 | 30 | 2 | 10 | 1 | 1 |
| CD31 | 6 | 14 | 3 | 2 | 3 | 1 |
| CD34 | 20 | 32 | 4 | 11 | 1 | 2 |
| CD44 | 90 | 60 | 95 | 63 | 96 | 97 |
| CD90 | 58 | 29 | 68 | 44 | 76 | 56 |
| CD73 | 92 | 61 | 98 | 91 | 96 | 93 |
| Sca-1 | 93 | 46 | 97 | 82 | 94 | 97 |
| CD117 | 8 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |

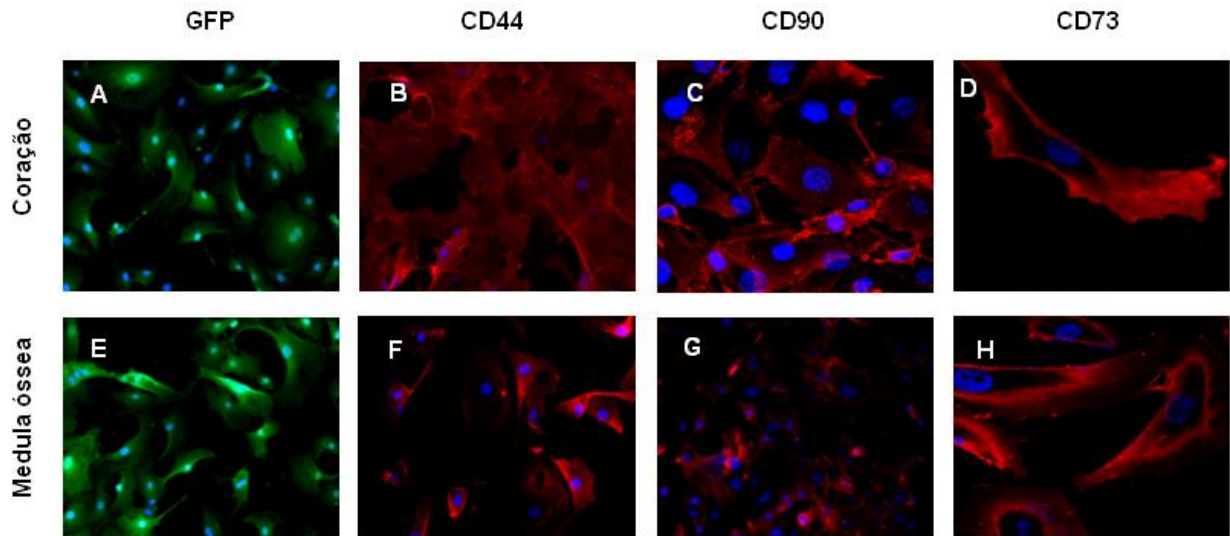


Figura 3: Caracterização das células-tronco mesenquimais por imunofluorescência. Expressão de GFP nas células-tronco cardíacas (A) e de medula óssea (E). Em (B-D), células-tronco cardíacas, e (F-H) células-tronco da medula óssea expressando marcadores de células-tronco mesenquimais CD44, CD90 e CD73, respectivamente. Núcleos foram corados com DAPI. Magnificação x200 (A, B, E, F e G); x400 (C) e x600 (D e H).

5.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA

Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada passagem das células isoladas do coração e da medula óssea, considerando-se o nível de ploidia e a presença de rearranjos estruturais. Foram consideradas normais células que apresentavam 40 cromossomos acrocêntricos. A partir da terceira passagem, células de ambas as fontes apresentaram um alto grau de instabilidade cromossômica com cariótipo poliplóide de número cromossômico variando entre 42 a 75. A figura 6 exemplifica uma metáfase normal, com 40 cromossomos acrocêntricos (figura 4A) e uma metáfase poliplóide com 69 cromossomos (figura 4B), obtidas de cultura de células-tronco cardíacas na terceira passagem.

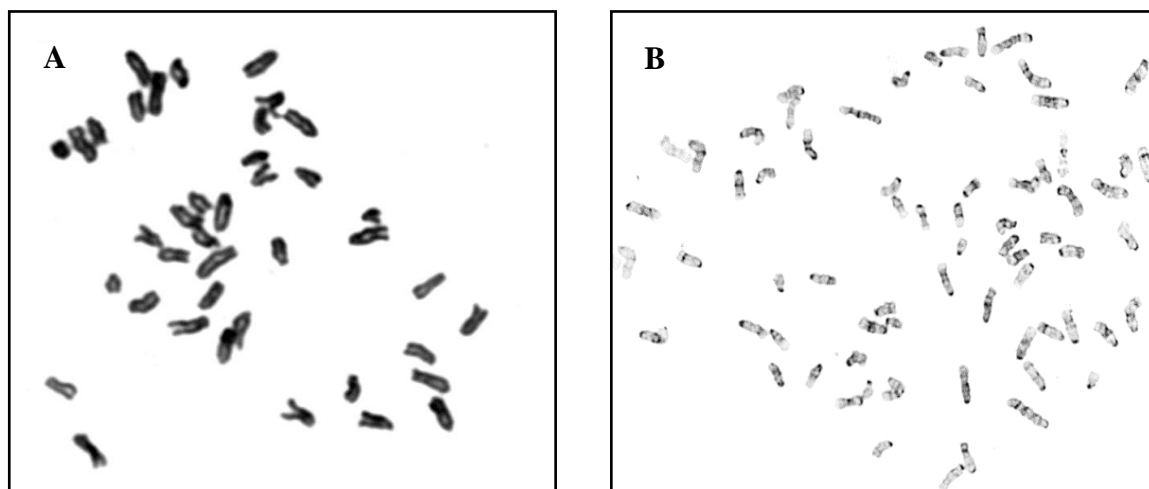


Figura 4: Análise citogenética de células-tronco mesenquimais cardíacas. Metáfase de células-tronco mesenquimais cardíacas na segunda passagem, apresentando cariótipo normal com 40 cromossomos acrocêntricos (A). Metáfase de células-tronco cardíacas analisadas na terceira passagem, apresentando cariótipo poliplóide com 69 cromossomos acrocêntricos (B). **Coloração de Giemsa.**

5.4 POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA, OSTEOGÊNICA, CONDROGÊNICA E CARDIOMIOGÊNICA

Células obtidas a partir do explante cardíaco e da medula óssea se diferenciaram *in vitro* nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica. Quanto ao potencial cardiomiogênico, apenas as células-tronco cardíacas apresentaram marcadores para diferenciação cardiomiogênica quando analisadas por qRT-PCT e imunofluorescência.

5.4.1 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

As células obtidas a partir do explante cardíaco e da medula óssea, mantidas em contato com meio de diferenciação adipogênica por 15 dias, apresentaram um acúmulo lipídico intracelular (figuras 5B e 5E). Para a avaliação da morfologia das células em processo de diferenciação, foram realizadas colorações histoquímicas com solução de *Oil red* (figura 5C e 5F). As células que não foram submetidas ao meio de diferenciação também foram coradas para confirmação do seu estado indiferenciado (figuras 5A e 5D).

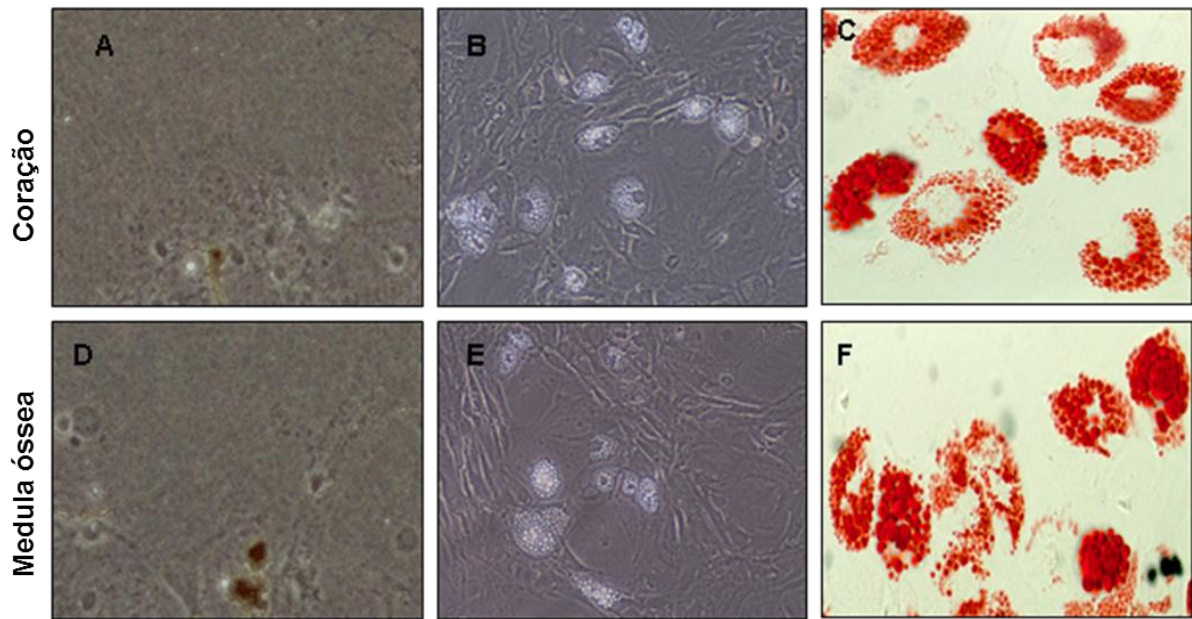


Figura 5: Capacidade de diferenciação adipogênica das células-tronco mesenquimais isoladas a partir do explante cardíaco e da medula óssea. Morfologia das células-tronco não submetidas ao protocolo de diferenciação (A e D) e células-tronco submetidas ao protocolo de diferenciação adipogênica (B e E) que apresentam vesículas lipídicas no citoplasma coradas com *oil red* (C e F). Magnificação x100 (B e E) e x200 (A, C, D e F).

5.4.2 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Após 14 dias de cultura em meio de diferenciação osteogênica, foi observado um aglomerado de células nas culturas das células isoladas do coração e da medula óssea que estavam em processo de diferenciação em osteoblastos. As células foram coradas com vermelho de Alizarina 2%, que revelou a presença de depósitos de cálcio nas culturas (figura 6B e 6D). As culturas sem estímulo para diferenciação também foram coradas para confirmar o estado de indiferenciação das células (figuras 6A e 6C).

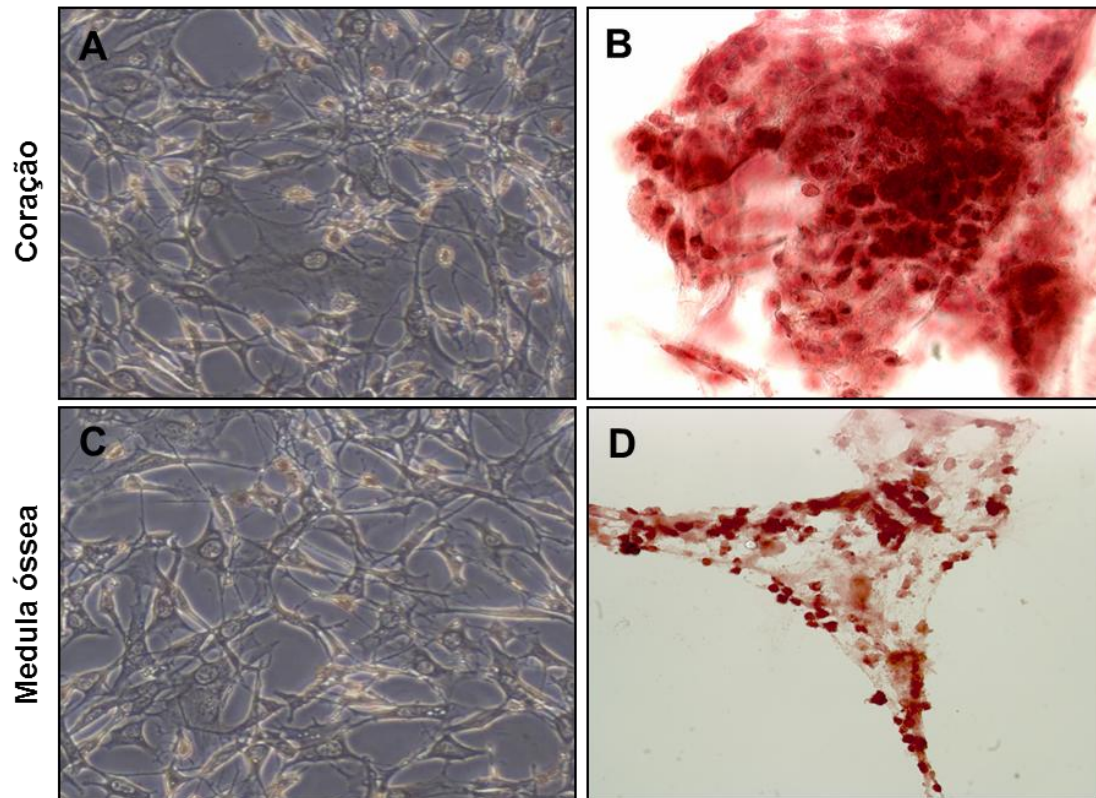


Figura 6: Capacidade de diferenciação osteogênica das células-tronco cardíacas e da medula óssea. Células-tronco não submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica (A e C) e diferenciadas (B e D). Depósitos de cálcio são evidenciados pela coloração em vermelho de Alizarina 2%. Magnificação de x100 (A e C), x400 (B) e x200 (D).

5.4.3 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

Vinte e um dias após o contato das células isoladas do coração e da medula óssea com o meio de diferenciação condrogênica, pôde-se observar o início da formação de aglomerações celulares. A coloração com solução de *Alcian Blue* confirmou a diferenciação condrogênica. As células coradas em azul (condrócitos) apresentaram síntese de proteoglicanos (figuras 7B e 7D). As células sem estímulo para diferenciação condrogênica também foram submetidas ao protocolo de coloração com *Alcian Blue*, para confirmação do estado indiferenciado (figuras 7A e 7C).

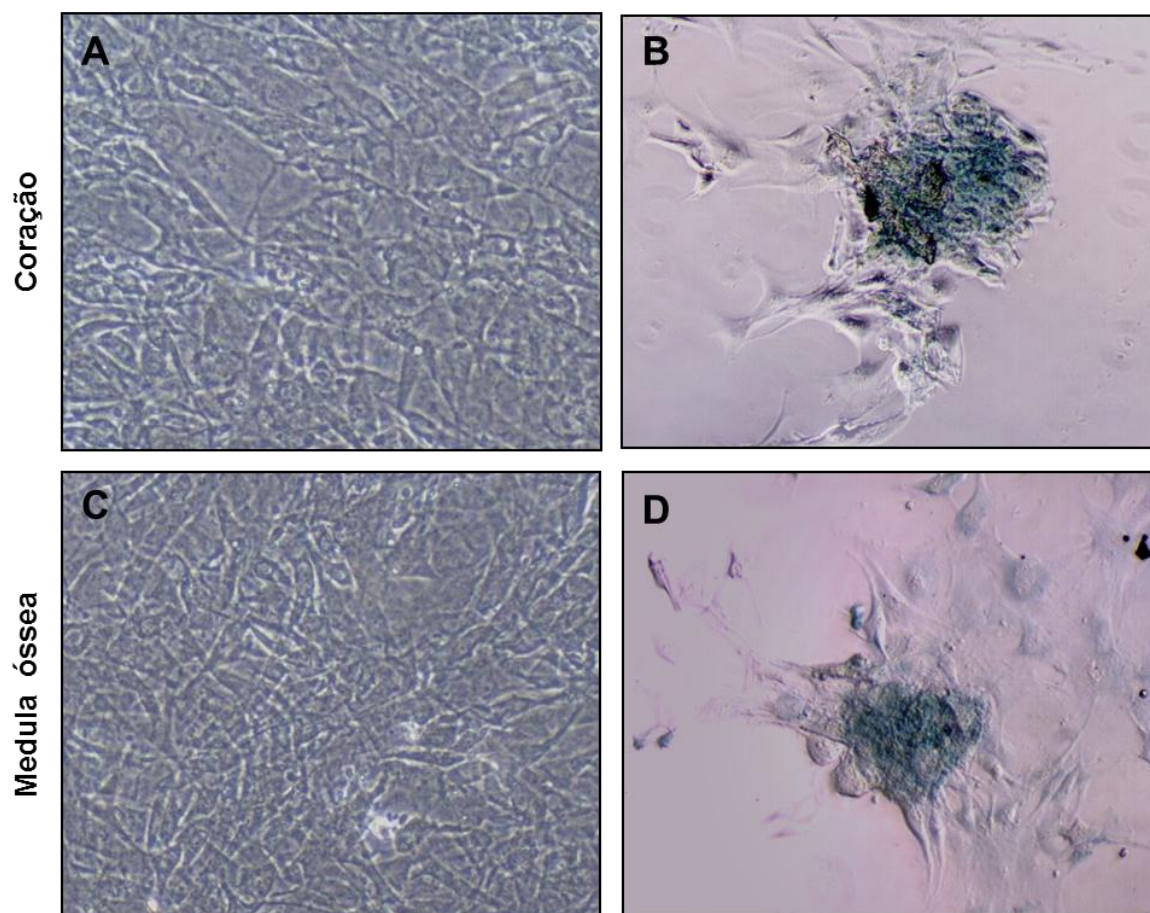


Figura 7: Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais cardíacas e de medula óssea. Células-tronco cardíacas e da medula óssea indiferenciadas (A e C). Células-tronco cardíacas (B) e células-tronco da medula óssea (D) diferenciadas em condrócitos confirmado pela síntese de proteoglicanos corados com *Alcian Blue*. Magnificação x100 (A, B, C e D).

5.4.4 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

Células-tronco mesenquimais isoladas do coração e da medula óssea foram cultivadas, por 24 horas, na presença de 5' azacitidina. Para avaliar a diferenciação cardiomiogênica, foi realizado qRT-PCR e imunofluorescência utilizando marcadores para proteínas e fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação cardiomiogênica. Não foi observado nenhum batimento espontâneo das células-tronco cardíacas ou da medula óssea estimuladas ou não com 5' azacitidina. No entanto, o ensaio de imunofluorescência revelou que algumas células na cultura de células-tronco cardíacas GFP⁺ cultivadas por 4 semanas após o estímulo com 10 μ M de 5' azacitidina passaram a expressar troponina T cardíaca (figura 8A), diferentemente das células-tronco isoladas da medula óssea. A expressão de conexina 43 foi indetectável em ambas as culturas celulares.

Nesse mesmo período, as células-tronco cardíacas e da medula óssea foram submetidas à avaliação por PCR em tempo real. As células-tronco isoladas do coração tiveram um aumento na expressão do mRNA do GATA-4, um fator de transcrição envolvido na diferenciação cardiomiogênica. A expressão de GATA-4 após o estímulo com 10 μM de 5' azacitidina foi maior do que a expressão desse fator de transcrição nas células estimuladas com 5 μM . Não foi observado nenhum aumento da expressão desse marcador nas células-tronco mesenquimais obtidas da medula óssea (figura 8B).

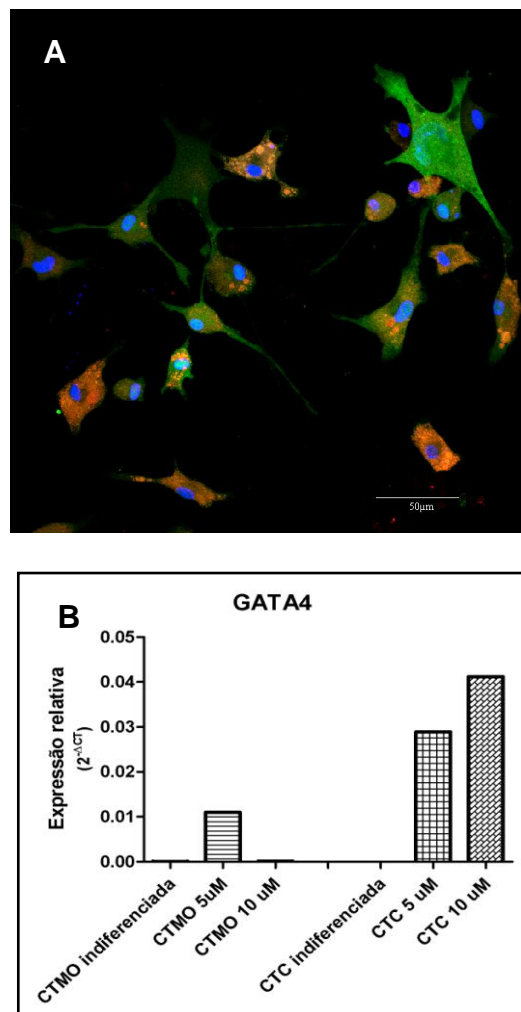


Figura 8: Avaliação da expressão de marcadores de cardiomiócitos em células-tronco mesenquimais estimuladas com 5' azacitidina. Algumas células derivadas das células-tronco cardíacas expressando troponina T cardíaca após indução de diferenciação cardiomiogênica (A). Aumento da expressão gênica de GATA-4 em células-tronco mesenquimais cardíacas comparada com a de células-tronco mesenquimais da medula óssea, demonstrado pela análise por RT-PCR após 4 semanas da indução com 5' azacitidina (B). A: barra=100 μm .

5.5 INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA DE CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS GFP⁺

Células-tronco cardíacas GFP⁺ foram injetadas na parede lateral do ventrículo esquerdo de camundongos C57BL/6. Nenhum animal morreu durante ou após o procedimento, e os parâmetros funcionais cardíacos avaliados mantiveram-se inalterados antes e após a injeção intramiocárdica. As células GFP⁺ foram observadas por espectroscopia in vivo no coração imediatamente após o procedimento. Através de análise por imunofluorescência, foi possível observar células GFP⁺ em secções do tecido cardíaco dois dias e uma semana após a injeção intramiocárdica.

5.5.1 PARÂMETROS FUNCIONAIS CARDÍACOS AVALIADOS POR ECOCARDIOGRAFIA

Os cinco camundongos C57BL/6 utilizados nessa etapa desse estudo foram avaliadas quanto à função cardíaca por ecocardiografia antes, imediatamente depois do procedimento e após uma semana da injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas GFP⁺. Os parâmetros funcionais cardíacos avaliados foram: fração de ejeção, volume sistólico, volume diastólico do ventrículo esquerdo, fração de encurtamento, frequência cardíaca e fluxo da artéria pulmonar. Os resultados para todos os parâmetros analisados estão organizados na figura 9.

Nenhum animal morreu durante ou após o procedimento, e os parâmetros funcionais cardíacos mantiveram-se inalterados até uma semana depois da injeção intramiocárdica.

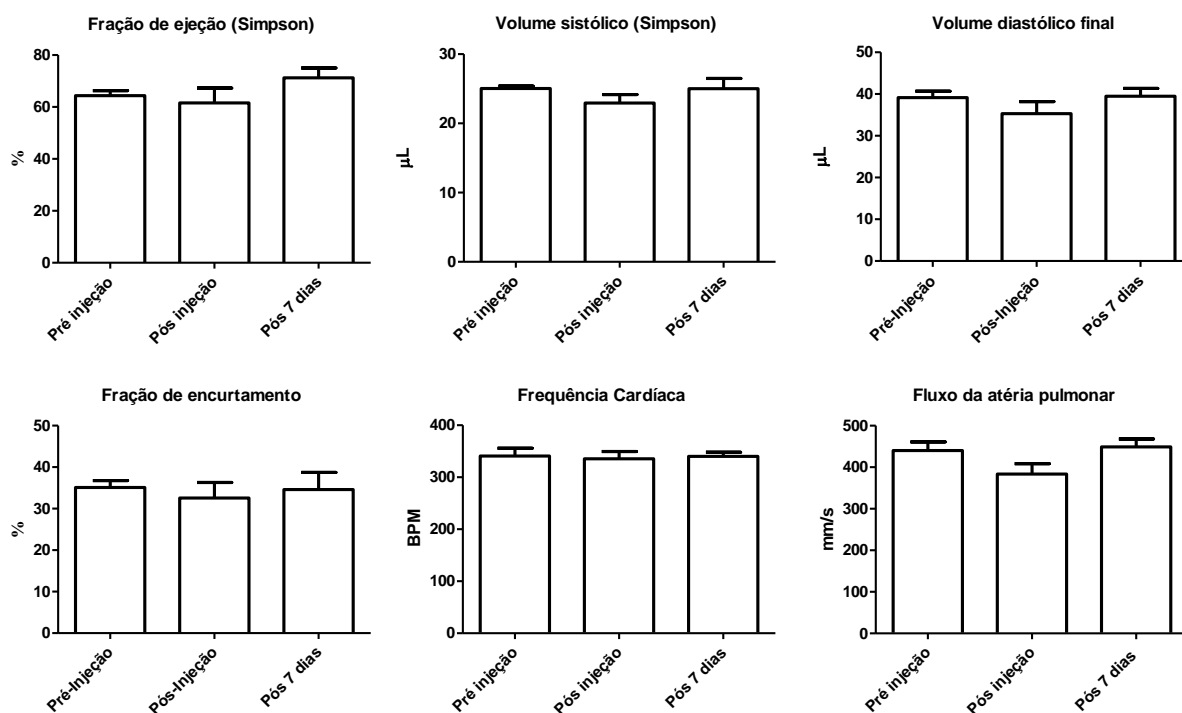


Figura 9: Parâmetros funcionais cardíacos avaliados por ecocardiografia. Fração de ejeção, volume sistólico, volume diastólico, fração de encurtamento, frequência cardíaca, e fluxo da artéria pulmonar mantiveram-se inalterados até uma semana depois da injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas. Os dados representam a média \pm EPM de cinco camundongos por grupo, analisados por ANOVA, sendo $p > 0,05$.

5.5.2 RASTREAMENTO DE CÉLULAS GFP APÓS A INJEÇÃO INTRAMIOCÁRDICA

Após a injeção intramiocárdica, guiada por ecocardiografia, de células-tronco cardíacas GFP⁺ (figura 10A), foram feitas análises de imagem *in vivo* para monitorar a retenção das células injetadas diretamente no miocárdio. A figura 10B mostra a fluorescência emitida por células GFP⁺ localizadas no coração, obtida por espectroscopia *in vivo* imediatamente após o procedimento. Dois dias (figura 10C) e uma semana após a injeção intramiocárdica (figura 10D), observamos a presença de células GFP⁺ em secções do tecido cardíaco marcadas com faloidina e DAPI.

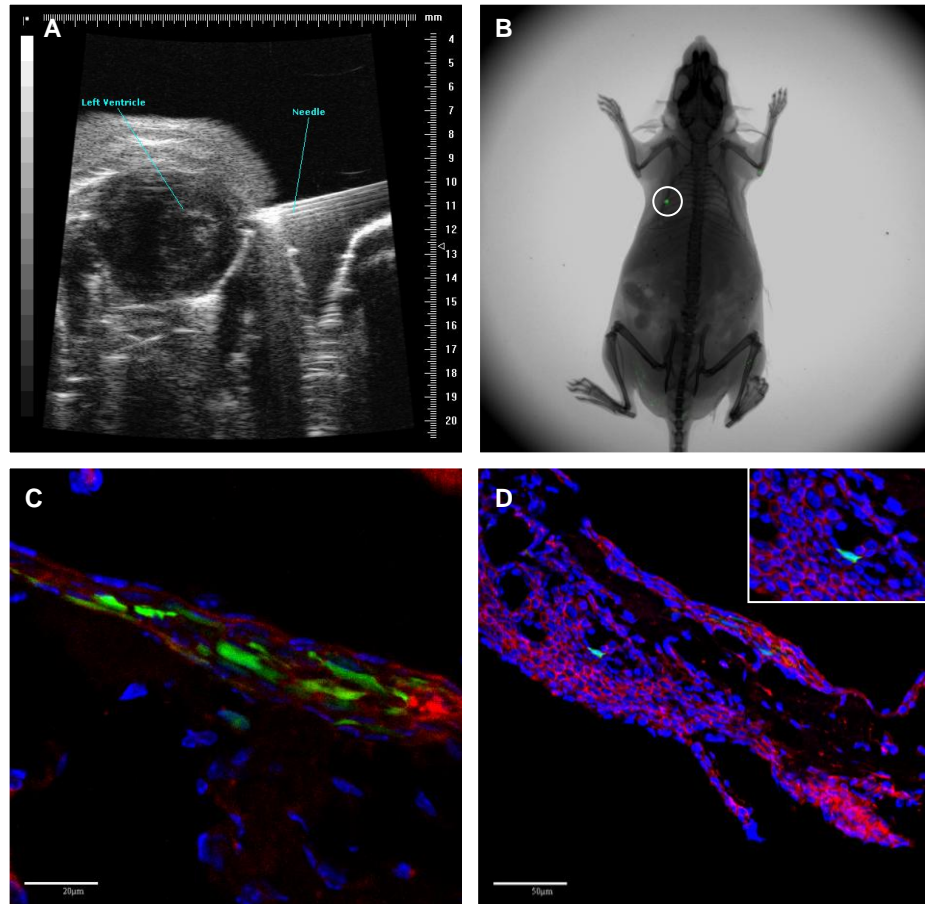


Figura 10: Injeção intramiocárdica de células-tronco cardíacas GFP⁺. Imagem ecocardiográfica evidenciando a agulha sendo inserida na parede lateral do ventrículo esquerdo (A). O círculo branco destaca a fluorescência emitida por células GFP⁺ observada por espectroscopia in vivo localizadas no coração de camundongos C57BL/6 imediatamente após a injeção de células-tronco cardíacas GFP⁺. Em E, células GFP⁺ observadas em seções de corações coradas com faloidina 633 e DAPI 2 dias (C) e uma semana após a injeção intramiocárdica (D). (C) 20 μm e (D) 50 μm.

6 DISCUSSÃO

Apesar de ser constituído principalmente por células terminantemente diferenciadas, descobertas recentes têm colocado o coração na lista dos órgãos com potencial regenerativo, sobretudo após a descoberta da existência de células-tronco no coração (BELTRAMI *et al*, 2003, OH *et al*, 2003, MATSUURA *et al*, 2004, MARTIN *et al*, 2003, MESSINA *et al*, 2004, DAWN *et al*, 2005, LAUGWITZ *et al*, 2005, STEELE *et al*, 2005). Dentre essas populações celulares isoladas do coração, foi demonstrada mais recentemente, assim como em outros órgãos, a presença de célula-tronco mesenquimais (CARLSON *et al*, 2011; GAMBINI *et al*, 2011).

Na primeira parte deste trabalho, isolamos células-tronco mesenquimais do coração de camundongos, e submetemos essas células às mesmas condições de cultivo das células-tronco mesenquimais da medula óssea. Foi feita a comparação do perfil fenotípico das células isoladas de ambas as fontes, bem como a análise citogenética, e a capacidade de diferenciação celular em diferentes linhagens. Na segunda parte deste trabalho avaliamos a exequibilidade e segurança da via de administração intramiocárdica das células-tronco isoladas do coração que foram injetadas no ventrículo esquerdo de camundongos C57BL/6.

A primeira descrição de isolamento de células com características de mesenquimais foi realizada em 1970 por Friedenstein e colaboradores. Obtidas da medula óssea, estas células foram inicialmente denominadas de precursoras estromais multipotentes. Conhecidas também como unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F) pela sua capacidade de formar agregados celulares e possuir semelhança morfológica a fibroblastos. Em nosso estudo, as culturas das CTM isoladas tanto da medula óssea quanto do coração aderiram ao plástico da garrafa de cultivo e, após 72 horas, apresentaram morfologia fibroblastóide ou arredondada, mantendo essa aparência após sucessivas passagens de forma semelhante a de CTM descritas em outros trabalhos (FRIEDENSTEIN *et al*, 1970; da SILVA MEIRELLES *et al*, 2006; CARLSON *et al*, 2011).

A análise de marcadores de superfície das culturas de CTM obtidas de diferentes fontes demonstra semelhança imunofenotípica (da SILVA MEIRELLES *et al*, 2006). Algo similar foi observado neste trabalho quanto ao perfil de marcadores analisados nas CTM isoladas do coração e medula-óssea, que revelou principalmente a positividade para os marcadores de células-tronco mesenquimais.

As culturas de CTM, principalmente as obtidas da medula óssea, apresentam contaminantes hematopoiéticos nas passagens iniciais de cultivo *in vitro*. Com o aumento do tempo de cultura, há uma redução na expressão dos marcadores hematopoiéticos (da SILVA MEIRELLES *et al*, 2006). Em contrapartida, há um aumento na expressão de marcadores mesenquimais nas culturas (GRONTHOS *et al*, 2000; HONG *et al*, 2005; SHIN *et al*, 2005; da SILVA MEIRELLES *et al*, 2006). Em nossos experimentos, a expressão de, CD31, CD34 e CD45 foi maior na primeira passagem analisada. Nas passagens sucessivas, P5 e P8, a expressão desses marcadores foi diminuindo. Por outro lado, foi observado um aumento na expressão dos marcadores de célula-tronco mesenquimal, CD 44, CD73, CD90 e Sca-1. Um pequeno percentual das células-tronco obtidas do coração e da medula óssea apresentaram expressão de CD117 na passagem inicial, e esse fenótipo se manteve nas passagens P5 e P8. A baixa frequência na expressão de CD117 em culturas de CTM obtidas de diferentes órgãos também já foi descrita (HONG *et al*, 2005; SHIN *et al*, 2005). Na medula óssea, por exemplo, apenas 1-5% das células são positivas para este marcador (CIVIN *et al*, 1984).

O controle da estabilidade genética de culturas de células expandidas antes do transplante é um passo importante na terapia celular, a fim de evitar o aparecimento de tumores causados por possíveis alterações cromossômicas (MITALIPOVA *et al*, 2005). As CTM derivadas da medula óssea de camundongos, nas passagens 13 e 29, apresentam transformação *in vitro* e quando transplantadas, favoreceram a formação de tumor (MIURA *et al*, 2006). Em outro estudo, a análise do cariótipo de CTM derivadas da medula óssea de camundongos, revelou o aumento no número de cromossomos e ocorrência de translocações em passagem mais precoce (ZHOU *et al*, 2006). Os dados deste último trabalho assemelham-se aos encontrados em nosso estudo, tendo em vista que, a partir da terceira passagem a análise citogenética de pelo menos 20 metáfases, considerando-se o nível de ploidia e presença de rearranjos estruturais, revelou que as células derivadas do coração e da medula óssea apresentaram um alto grau de instabilidade cromossômica com cariótipo poliplóide de número cromossômico variando entre 42 a 75.

As CTM isoladas de camundongos parecem ser mais susceptíveis à instabilidade cromossômica quando comparadas às CTM de humanos, nas quais as anormalidades cromossômicas estão associadas ao aumento gradual da atividade da telomerase e ao aumento da expressão do oncogene C-myc (MIURA *et al*, 2006). Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos pelos quais as culturas de CTM isoladas de camundongos apresentam instabilidade cromossômica mais precocemente quando comparadas às culturas de CTM humanas.

Um dos critérios que definem uma célula como CTM é o seu potencial de diferenciação nas linhagens adipogênica, osteogênica, e condrogênica (DOMINICI *et al*, 2006). As culturas de CTM derivadas do coração e da medula óssea apresentaram potencial de diferenciação nessas três linhagens após estímulo com meio específico (da SILVA MEIRELLES *et al*, 2006; CARLSON *et al*, 2011). O mesmo foi observado neste estudo, quando as culturas de ambas as fontes foram capazes de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos apresentando acúmulo lipídico intracelular, depósito de cálcio, e síntese de proteoglicanos confirmados através da coloração de oil red, vermelho de Alizarina e alcian blue, respectivamente.

As células-tronco mesenquimais exibem um grande potencial de diferenciação não somente em adipócitos, osteoblastos e condrócitos, mas também em outros tipos celulares como cardiomiócitos. Alguns trabalhos têm demonstrado a diferenciação cardiomiogênica de forma bem-sucedida (MAKINO *et al*, 1999; FUKUDA, 2002; HAKUNO *et al*, 2002; HENG *et al*, 2004; BALANA *et al*, 2006). Porém, a eficiência de diferenciação das CTM em cardiomiócitos *in vitro* é ainda muito baixa e tem sido constantemente questionada (MARTIN-RENDOM, 2008; MADONNA, 2009). No modelo proposto por Rangappa e colaboradores (2003), utilizando 5'azacitidina, apenas 0,05% das células-tronco mesenquimais tratadas se diferenciaram em cardiomiócitos. De maneira semelhante, Martin-Rendom e colaboradores (2008) mostraram que apenas 0,07% das CTMs isoladas de medula óssea cultivadas *in vitro* e tratadas com 5'azacitidina se diferenciaram em cardiomiócitos. Em outro estudo, Madonna e colaboradores (2009) estudaram a potencialidade de diferenciação de CTM isoladas do tecido adiposo com 5'azacitidina e comprovaram que somente 0,02%-0,07% se diferenciam em cardiomiócitos. No presente estudo, o protocolo utilizado também se mostrou pouco eficiente no processo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro*. Não foi observado batimento espontâneo das células-tronco cardíacas ou da medula óssea estimuladas ou não com 5' azacitidina. No entanto, o ensaio de imunofluorescência revelou que algumas células-tronco cardíacas GFP⁺ cultivadas por 4 semanas após o estímulo com 10 µM de 5' azacitidina passaram a expressar troponina T cardíaca, e aumentaram a expressão do mRNA do GATA-4, diferentemente das células-tronco isoladas da medula óssea. Esses primeiros resultados sugerem que as células-tronco cardíacas possuem um maior potencial de diferenciação cardiomiogênica do que as células-tronco da medula óssea. Novos ensaios são necessários para otimizar o protocolo de diferenciação e comprovar o potencial cardiomiogênico das células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e do coração.

Vários estudos estão sendo realizados a fim de explorar o potencial terapêutico de diferentes tipos celulares como princípio de regeneração do miocárdio (WOLLERT *et al*, 2004; <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00587990>; MENASCHE *et al*, 2008; <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00893360>). Gao e colaboradores (2001) realizaram o transplante sistêmico de CTM derivadas da medula-óssea, a fim de avaliar a distribuição dessas células pelas vias intraarterial, intravenosa, e intraperitoneal. Após 48 horas, a maioria das células injetadas por essas três vias estavam retidas no pulmão, baço e fígado. Os autores atribuem isso ao fato das CTM apresentarem diâmetro celular (20 a 24 μm) superior aos dos capilares 10-15 μm , e desta forma, eventuais embolias levam à insuficiência respiratória, que constitui um dos principais problemas do transplante de CTM, além de reter a maioria das células nos órgãos que não são alvo para dada terapia (BOJKO & NOTTERMAN, 1999).

Sendo assim, a escolha da via de administração que seja segura e que proporcione maior retenção celular no órgão de interesse constitui uma etapa fundamental para o sucesso da terapia celular, tendo em vista que a presença das células no órgão alvo irá favorecer ao benefício do possível efeito terapêutico. Estudos demonstraram que o transplante de células após infarto agudo do miocárdio via intramiocárdica é exequível e seguro, e favorece a retenção e permanência de maior número de células no miocárdio, quando comparados com outras vias de administração (HOU *et al*, 2005; KRAUSE *et al*, 2009). Esses dados reforçam os nossos achados quanto à exequibilidade e segurança da injeção intramiocárdica, e quanto à retenção de CTM no miocárdio. Nenhum animal morreu durante o procedimento e os parâmetros funcionais cardíacos mantiveram-se inalterados após a injeção intramiocárdica de CTM isoladas do coração.

Por fluorescência, foi possível observar a retenção de células GFP⁺ no miocárdio 48 horas e uma semana depois da injeção intramiocárdica. A rastreabilidade das células é peça fundamental para o entendimento dos mecanismos pelos quais elas estão atuando no organismo e exercendo o seu papel reparador. Assim como a escolha da melhor via de administração, definição das características fenotípicas, e dos potenciais de diferenciação de cada fonte de CTM. Entender as similaridades e diferenças entre elas poderá ser útil na composição de uma correlação entre o sucesso terapêutico encontrado e uma determinada fonte de células. Com isso, esse estudo torna-se útil no entendimento das propriedades e utilização das células-tronco isoladas da medula óssea e do coração, podendo contribuir com os estudos em modelos experimentais que podem servir como base para novas investigações clínicas.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que células-tronco mesenquimais, obtidas do coração de camundongos adultos:

1. Possuem morfologia, fenótipo, características cromossômicas e capacidade de diferenciação em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica semelhante aos observados em linhagens de células-tronco mesenquimais da medula óssea;
2. Apresentam maior expressão de marcadores cardíacos quando estimuladas à diferenciação cardiomiogênica, indicando um maior potencial de diferenciação em cardiomiócitos, quando comparadas às células da medula óssea;
3. Podem ser injetadas no coração por via intramiocárdica com segurança e sem alterar os parâmetros funcionais cardíacos;
4. Permanecem no tecido após a injeção intramiocárdica por no mínimo sete dias.

8 REFERÊNCIAS

ALBELLA, B. et al. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. **Methods Mol Biol.**, v.215, p. 363-373, 2003.

AMADO, L. C. et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, n. 32, p. 11474-9, 2005.

BACAL, N.S.; FAULHABER, M.H.W. Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo: **Editora Atheneu**, p. 90, 2003.

BALANA, B. et al. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. **Cell Res**, v. 16, n. 12, p. 949-60, 2006.

BARILE, L. et al. Endogenous Cardiac Stem Cells. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 50, p. 31-48, 2007.

BELTRAMI, A. P. et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, v. 114, p. 763-776, 2003.

BERNSTEIN, H. S.; SRIVASTAVA, D. Stem cell therapy for cardiac disease. **Pediatr Res**, v.71, p.491-499, 2012.

BOJKO, T.;NOTTERMAN, D.A. Reversal of fortune? Respiratory failure after bone marrow transplantation. **Crit Care Med**, v. 27, p. 1061, 1999.

BYDŁOWSKI, S. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.25-35, 2009.

MARBAN, E. Cardiosphere-derived autologous stem cells to reverse ventricular dysfunction (CADUCEUS). Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00893360>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2012.

CARLSON, S. et al. Cardiac mesenchymal stem cells contribute to scar formation after myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 91, n. 1, p. 99-107, 2011.

CATALINA, P. et al. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. **Cell Biology International**, v. 31, p. 861-9, 2007.

CARVALHO, A. B.; DE CARVALHO, A. C. Heart regeneration: Past, present and future. **World J Cardiol**, v. 2, n. 5, p. 107-11, 2010.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, p. 341-347, 2007.

CHAPMAN, A. R. The ethics of patenting human embryonic stem cells. **Kennedy Inst Ethics J**, v. 19, p. 261-88, 2009.

CHARWAT, S. et al. Effect of intramyocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear stem cells on the regional myocardial perfusion. NOGA-guided subanalysis of the MYSTAR prospective randomised study. **Thromb Haemost**, v. 103, p. 564-571, 2010.

CIVIN, C.I. et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol.**, v. 133, p. 157-165, 1984.

COLLINS, J. M.; RUSSELL, B. Stem cell therapy for cardiac repair. **J Cardiovasc Nurs**, v. 24, p. 93-7, 2009.

DA SILVA MEIRELLES, L. P.C; CHAGASTELLES; N.B. NARDI, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, v.119, p. 2204-2213, 2006.

DAWN, B. et al. Cardiac stem cell therapy for myocardial regeneration. A clinical perspective. **Minerva Cardioangiol**, vol. 53, p. 549-564, 2005.

DOMEN, J., WAGERS, A., WEISSMAN, I.L. Bone marrow (hematopoietic) stem cells. In: NIH Report. **Regenerative Medicine**. 2006.

DOMINICI, M.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

EGLITIS, M. A.; MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 94, p. 4080-4085, 1997.

FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, p.1528-1530, 1998.

FRESHNEY, R.I. Maintenance of the culture cell lines. **Culture of animal cells**, p. 153–154, 1994.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, p. 393-403, 1970.

FUKUDA, k. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. **C. R. Biologies**, v. 325, p. 1027–1038, 2002.

GAMBINI, E. et al. C-kit⁺ cardiac progenitors exhibit mesenchymal markers and preferential cardiovascular commitment. **Cardiovasc Res**, v. 89, n. 2, p. 362-73, 2011

GAO, J. et al. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v. 169, p. 12-20, 2001.

GE, D. et al. Chemical and physical stimuli induce cardiomyocyte differentiation from stem cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v.381, p. 317-321, 2009.

GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, v.116, p.1827-1835, 2003.

GROVE, J.E., BRUSCIA, E., KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 4, p. 487-500, 2004.

GYONGYOSI, M. et al. Combined delivery approach of bone marrow mononuclear stem cells early and late after myocardial infarction: the MYSTAR prospective, randomized study. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med**, v. 6, p. 70-81, 2009.

HAKUNO, D. et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG Cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. **Circulation**, v. 105, n. 3, p. 380-6, 2002.

HARE, J.M. Prospective randomized study of mesenchymal stem cell therapy in patients undergoing cardiac surgery (PROMETHEUS). Disponível em: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00587990>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2012.

HEMBERGER, M. et al. Stem cells from fetal membranes - a workshop report. **Placenta**, v. 29, p. 17-19, 2008.

HENG, B. C. et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. **Cardiovasc Res**, v. 62, n. 1, p. 34-42, Apr 2004

HIERLIHY, A. M. et al. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. **FEBS Lett**, vol. 23, n. 530, p. 239-243, 2002.

HONG, S.H. et al. *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. **Biochem Biophys Res Commun.**,v. 330, p.1153-1161, 2005.

HOU, D. et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. **Circulation**, v. 112, p. 150-156, 2005.

INT ANKER, P.S. et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, p. 1338-1345, 2004.

JACKSON, K.A.; MI, T.; GOODELL, M.A. Hematopoietic potential of stem cell isolated from murine skeletal muscle. **Proc. Natl Acad. Sci**, v. 96, p. 14482-14486, 1999.

JACKSON, K.A. et al. Stem cells: a minireview. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, v. 38, p. 1-6, 2002.

KOCHER, A.A. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocytes apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. **Nat Med**, v.7, p. 430-6, 2001.

KOLF, C.M. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v.9, p.204-213, 2007.

KOMURO, I.; IZUMO, S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 8145-8149, 1993.

KONINCKX, R. et al. Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. **Cytotherapy**, v.16, p. 778-92, 2009.

KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Gene Therapy**, v. 9, p.754-758, 2002.

KRAUSE, K. et al. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction: first-in-man study. **Heart**, v. 95, p. 1145-1152, 2009.

LAFLAME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. **Nat. Biotechnol**, v. 23, p. 845-856. 2005.

LAUGWITZ, L. et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. **Nature**, v. 433, p. 647-653, 2005.

LEE, M.S.; LILL, M.; MAKKAR, R.R. Stem cell transplantation in myocardial infarction. **Rev Cardiovasc Med**, v. 5, p. 82-98, 2004.

LERI, A., KAJSTURA, J., ANVERSA, P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiol Rev**, vol. 85, n. 4, p. 1373-1416, 2005.

LINKE, A. et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. **Proc Natl Acad Sci**, v. 102, p. 8966-71, 2005.

LEAVIS, P. C.; GERGELY, J. Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. **Crit Rev Biochem**,v. 16, p. 235-305, 1984.

LERI A.; KAJSTURA J.; ANVERSA P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiol Rev**, v. 85, p. 1373–1416, 2005.

LI, X. H. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells cocultured with semi-permeable membrane separated neonatal rat ventricular myocytes differentiated into cardiomyocyte phenotype.v. 36, p. 651-4, 2009.

LIU, Z.J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **J. Cell. Biochem**,v. 106, p. 984–991, 2009.

MADONNA, R.; GENG, Y. G.; CATERINA, R. Adipose tissue-derived stem cells characterization and potential for cardiovascular repair. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, p. 1723-9, 2009.

MAKINO, S. et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. **J Clin Invest**, v. 103, n. 5, p. 697-705, 1999.

MANNELLO, F.; TONTI, G.A. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture. **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1603-1609, 2007.

MARTIN, C.M. et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. **Developmental Biology**, v. 265, p. 262-275, 2003.

MARTIN-RENDON, E. et al. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sang**, v. 95, p.137-48, 2008.

MATSUURA, K. et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. **J Biol Chem**, v.279, n. 11, p. 384-91, 2004.

MENASCHE, P. et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. **Circulation**, v. 117, p. 1189-1200, 2008.

MESSINA, E. et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. **Circulation Res**, v.95, p. 911-921, 2004.

MITALIPOVA, M.M. et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, n.1, p. 19-20, 2005.

MIURA, M. et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. **Stem Cells**, v. 24, p. 1095-103, 2006.

MURRY, C. E. et al. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. **J Am Coll Cardiol**, v. 47, p. 1777-1785, 2006.

OH, H. et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n.21, p. 12313-12318, 2003.

ORLIC, D. et al. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. **Blood**, v. 82, p. 762–770, 1993.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 701-5, Apr 2001.

OYAMA, K.S.R. et al. Cardiomioplastia celular. **Arq Ciênc Saúde**, v.4, p. 266-71, 2004.

PAPPA, K. I.; ANAGNOU, N. P. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? **Regen. Med.**, v 4, p. 423-433, 2009.

PARMACEK, M. S.; SOLARO, R. J. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 47, p. 159-176, 2004.

PASSIER, R., LAAKE, W.L., MUMMERY, L.C. Stem cell based therapy and lessons from the heart. **Nature**, v. 453, p. 322-329, 2008.

PAYÃO, S.; SANTOS R.; SEGATO R. Controle genético das células-tronco humanas cultivadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, p.15-18, 2009.

PERIN, E.C. et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v. 107, p. 2294-22302, 2003.

PERIN, E. C.; GENG, Y.; WILLERSON, J.T. Adult stem cell therapy in perspective. **Circulation**, v. 107, p. 935-938, 2003.

PFEFFER, M.A.; BRAUNWALD, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. **Circulation**, v. 81, p.1161-72, 1990.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair – current views. **Stem Cells**, v.25, p.2896-2902, 2007.

PSALTIS, P. J. et al. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2201-10, 2008.

REISER J.; ZHANG X.Y.; LA RUSSA V.F. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert Opin Biol Therapy**. v.15,

p.289-298, 2005.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. et al. Cell Therapy in Chagas Cardiomyopathy (Chagas Arm of the MiHeart Study): A Multicenter Randomized Trial. **Circulation**, v. 125, p. 2454-2461, 2012.

RUBIO, D. et al. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. **Cancer Research**, v. 65, p. 3035-3039, 2005.

SEGERS, V. F. M.; LEE, R. T. Stem-cell therapy for cardiac disease. **Nature**, v. 451, p. 937-942, 2008.

SEGUNDO, A.V.L.; VASCONCELOS, B.C.E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Rev.Ciênc. Med**, v. 16, n. 1, p. 23-30, 2007.

SHEN, D. et al. Dose-Dependent Functional Benefit of Human Cardiosphere Transplantation in Mice with Acute Myocardial Infarction. **J Cell Mol Med**, 2012.

SHIN, J.W. et al. Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. **Yonsei Med J.**, v. 46, p. 260-267, 2005.

SHIMIZU, T. et al. Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. **Biomaterials**, v. 24, p. 2309–2316, 2003.

SHIOJIMA, I. et al. Molecular cloning and characterization of human homeobox genes CSX1. **Circ Res**, v. 79, p. 920-929, 1996.

STEELE, A., et al. Stem-like Cells Traffic From Heart Ex Vivo, Expand In Vitro, and Can Be Transplanted In Vivo. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 24, n. 11, p. 1930-1938, 2005.

STRAUER, B.E. et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, v. 107, p. 2294-2302, 2002.

SVENSSON, E. C. et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. **Circulation**, v. 99, p. 201-205, 1999.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006.

TAYLOR, D. A. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure. **Curr Control Trials Cardiovasc Med**, v. 2, n. 5, p. 208-210, 2001.

THEISE, N.D.; KRAUSE, D.S. Toward a new paradigm of cell plasticity. **Leukemia**, v. 16, p. 542-548, 2002.

THOMAS, P. S. et al. Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells. **Anat Rec**, v. 263, p. 307-13, 2001.

THOMSON, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

TOMA, J.G. ; et al. Isolation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, p. 778-784, 2001.

TORELLA, D. et al. Cardiac stem and Progenitor Cell Biology for Regenerative Medicine. **Trends Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 6, p. 229-236, 2005.

URBANEK, K., et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. **PNAS**, v. 102, n. 4, p. 8692-8697; 2005.

VILAS-BOAS, G.S.F. et al. Early results of bone marrow cell transplantation to the myocardium of patients with heart failure due to Chagas disease. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 159-166, 2006.

VOGEL, G. Stem cells: new excitements, persistent questions. **Science**, v. 290, p.1672-1674, 2000.

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

WATT, F.M.; HOGAN, B.L.M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WANG, C. C. et al. Direct intramyocardial injection of mesenchymal stem cell sheet fragments improves cardiac functions after infarction. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 3, p. 515-24, 2008.

WEIR, C. et al. Mesenchymal stem cells: isolation, characterization and *in vivo* fluorescent dye tracking. **Heart, Lung and Circulation**, p. 1–9, 2008.

WOLLERT, K.C. et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. **Lancet**, v. 364, p. 10-16, 2004.

ZAGO, M.A. Células-tronco: Origens e Propriedades. In: Marco Antonio Zago; Dimas Tadeu Covas. (Org.) **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 21-34.

ZHANG, Y. et al . First-trimester fetal mesenchymal stem cells towards cardiomyocyte-like cells. Effect of 5-azacytidine induction duration on differentiation of human. **Interact CardioVasc Thorac Surg** , v. 9,p. 943-946, 2009.

ZHOU, Y. F. et al. Spontaneous transformation of cultured mouse bone marrow-derived stromal cells. **Cancer Res**, v. 66, p. 10849-10854, 2006.

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