

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**



TESE DE MESTRADO

**ESTUDO DO POTENCIAL CARDIOMIOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

JULIANA LOTT DE CARVALHO

BELO HORIZONTE

. 2011 .

JULIANA LOTT CARVALHO

**ESTUDO DO POTENCIAL CARDIOMIOGÊNICO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

BELO HORIZONTE - MG

. 2011 .

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA LOTT CARVALHO

ESTUDO DO POTENCIAL CARDIOMIOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Trabalho apresentado à banca examinadora como pré-requisito para obter o título de Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Minas Gerais. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular sob orientação do Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes e com financiamento da FAPEMIG.

Área de concentração: Bioquímica.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Sílvia Carolina Guatimosim Fonseca

Profa. Dra. Rogéria Serakides

Dra. Silviene Novikoff

Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte, 16 de fevereiro de 2011
Sala Baeta Viana, ICB

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

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente na produção desta dissertação.

Agradeço especialmente:

Ao Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes, por ter acreditado neste trabalho, por orientar todo esse esforço, me ensinando a superar os recorrentes percalços do processo da pesquisa, sempre com muita paciência, alegria e disposição. Agradeço pelo excelente exemplo de pesquisador humano e competente nos mais diversos aspectos científicos e humanos.

Ao Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes, pesquisador admirável, por me ensinar que o conhecimento não deve trazer consigo arrogância ou afetação.

À Dra. Silviene Novikoff, por adicionar tanto ao nosso laboratório, com a sua meiguice e, principalmente, com a sua competência.

Aos amigos do LICM I e LICM II, meus colegas de laboratório, de rotina, de experimentos que dão certo e errado, de empolgação com a ciência, pela feliz convivência. Em especial à Nath, Luiza e Ale pelas discussões enriquecedoras, cheias de lições e pelo companheirismo. À todos os outros, obrigada por toda atenção e carinho e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À querida Maira, por sua alegria contagiante, não só pela enorme ajuda nas análises estatísticas, mas por todas as pequenas ajudas do dia-a-dia.

Às professoras Maria de Fátima Leite, Silvia Guatimosin, Gerluza, Rogéria e aos professores Anderson Ferreira, Almir e Jader Santos, pelo apoio e colaboração com reagentes, equipamentos, protocolos e conversas. Aos alunos Danilo, Enéias, Vanessa, Fúlvia, Jankerle, pela ajuda nos experimentos e pelos ensinamentos.

À Betinha, mãe zelosa e carinhosa de todos do LICM.

À minha família, apoiadora incondicional das minhas escolhas. Em especial aos meus amados pais, pois a eles devo tudo, dos meus sonhos às minhas realizações. Ao meu irmão pelo modelo de caráter, pelo carinho e amizade.

Às minhas queridas amigas Aline, Rafaella, Vivis, Denise, essenciais na minha vida. Ao Thi, pelo amor, respeito, carinho e cumplicidade.

MUITO OBRIGADA.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	x
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	p. 2
1.1 O coração e doenças cardiovasculares.....	p. 2
1.2 Infarto Agudo do Miocárdio.....	p. 4
1.3 Terapias atuais para doenças cardiovasculares e a promessa da terapia celular...	p. 6
1.4 Células-tronco.....	p. 8
1.5 Células-tronco e o processo de cardiomiogênese <i>in vitro</i>	p. 12
2 OBJETIVO	p. 18
2.1 Objetivo geral.....	p.18
2.2 Objetivos específicos.....	p.18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	p.19
3.1 Obtenção e cultivo celular.....	p.20
3.1.1 Meios de cultura celular.....	p.20
3.1.2 Isolamento dos diferentes tipos celulares.....	p.21
3.2 Análise fenotípica das CTM por citometria de fluxo.....	p.25
3.3 Teste de viabilidade celular.....	p.26
3.4 Ensaio de detecção da FA celular.....	p.27
3.5 Dosagem relativa de colágeno.....	p.28
3.6 Detecção de nódulos de mineralização por coloração de Von Kossa.....	p.29
3.7 Extração de RNA e RT-PCR.....	p.29
2.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	p.30
3.9 Ensaio de imunofluorescência.....	p.32
3.10 Experimentos de eletrofisiologia.....	p.33

3.11 Análise estatística.....	p.35
4 RESULTADOS.....	p.37
4.1 As células isoladas da medula óssea e tecido adiposo são Células-tronco Mesenquimais.....	p.37
4.2 As células cultivadas em meios de diferenciação cardiomiogênica apresentam diminuição da viabilidade, produção de fosfatase alcalina e colágeno.....	p.43
4.3 As células-tronco mesenquimais cultivadas em meios cardiomiogênicos mudam seu padrão de expressão gênica.....	p.46
4.4 As células-tronco mesenquimais mudam seu perfil fenotípico ao longo da diferenciação cardiomiogênica.....	p.50
4.5 As células-tronco mesenquimais cultivadas em meios cardiomiogênicos passam a expressar proteínas importantes para a função de cardiomiócitos.....	p.54
4.6 As células-tronco mesenquimais apresentam plasticidade, mas não originam cardiomiócitos funcionais.....	p.56
5 DISCUSSÃO.....	p.59
6 CONCLUSÃO.....	p.73
7 PERSPECTIVAS.....	p.75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	p.76

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance (Análise de variância)
ANF	Atrial Natriuretic Factor (fator natriurético atrial)
ARA-C	1-β-D-arabinofuranosídeo citosina
BCIP	Bromo-cloro-indol fosfato
BMP	Bone Morphogenetic Protein (proteína óssea morfogenética)
BSA	Bovine Serum Albumin (Soroalbumina bovina)
CD	Cluster of Differentiation (grupamento de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CHEF	Chinese Hamster Embryo Fibroblast cell line (linhagem celular de fibroblastos embrionários de hamsters chineses)
CT	Célula-tronco
CTE	Células-tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
CTM-MO	Células-tronco Mesenquimais derivadas da Medula Óssea
CTM-TA	Células-tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxiribonucléico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilendiamino tetra-acético)
FA	Fosfatase Alcalina
FADH ₂	Flavin adenin dinucleotide (Flavina adenina dinucleotídeo)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fator de crescimento Fibroblástico)
FITC	Fluoresceína isotiocianato
FT	Fator de Transcrição
GAPDH	Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	hidroxy-ethyl piperazin ethanesulphonic acid (ácido etanosulfônico hidroxi-etil piperazina)
HLA	Human Leukocyte Antigen (antígeno leucocitário humano)
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 (molécula 1 de adesão intercelular)
IgG	Imunoglobulina G

IL	Interleucina
JNK	c-Jun NH(2)-terminal kinases (Jun N-terminal cinase)
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Mol
MEC	Matriz extracelular
MLC1	Myosin Light Chain 1 (cadeia leve 1 da miosina)
MyoD1	Myogenic Differentiation protein 1 (proteína 1 de diferenciação miogênica)
µm	Micrômetros
MP	Membrana Plasmática
ms	Milisegundo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mV, nV	Milivolt, nanovolt
nA	nanoAmpére
NADH	Nicotinamide Nucleotide dinucleotide (Nicotinamida adenina dinucleotídeo)
NBT	Nitro blue tetrazol
NKE	Nk2 response Elements (elementos de resposta a NK2)
Nkx2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila) (Fator de transcrição relacionado a NK2 e localizado no locus 5 em drosofilas)
Oct-4	octamer-binding transcription factor 4 (fator de transcrição que se liga a octâmeros)
PA	Potencial de Ação
PBS	Tampão salina-fosfato
PCR/ RTPCR	Reação em cadeia da polimerase / Reação em cadeia da polimerase em tempo real
PSA	Penicillin, Streptomycin, Amphotericin (penicilina, estreptomicina e anfotericina)
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
SCF	Stem cell factor (Fator de Células-tronco)
SDS	Sodium Dodecil Sulfate (dodecil sulfato de sódio)
SFB	Soro Fetal Bovino
Sox-2	Sex determining region Y-Box 2 (região Y determinadora do sexo- caixa 2)
SRF	Serum Response Factor (fator de resposta ao soro)
TGF-β	Tumor Growth Factor – β (fator β de crescimento tumoral)
UI	Unidades Internacionais
x g	Força centrífuga em g (unidade da força centrífuga relativa)
α-MHC	Cadeia Pesada da Alfa Miosina
B-MHC	Cadeia Pesada da Beta Miosina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Iniciadores utilizados	p. 30
TABELA 2. Iniciadores utilizados nas RTPCR	p. 31
TABELA 3. Anticorpos utilizados nas imunofluorescências.....	p. 33
TABELA 4. Sumário dos critérios de identificação das CTM	p. 37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Reação da fosfatase alcalina sobre o substrato BCIP e redução concomitante do NBT.....	p. 28
FIGURA 2. Cultura celular de Células-tronco Mesenquimais isoladas da Medula Óssea (A) e Tecido adiposo (B) de ratos Wistar.....	p.38
FIGURA 3. Caracterização fenotípica das CTM-MO	p. 39
FIGURA 4. Caracterização fenotípica das CTM-TA	p. 39
FIGURA 5. Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão dos diversos marcadores das populações de CTM (CTM-MO em A e CTM-TA em B).....	p. 40
FIGURA 6. Coloração por Von Kossa de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico por 0 e 14 dias.....	p. 41
FIGURA 7. Coloração por Von Kossa de CTM-TA cultivadas em meio osteogênico por 0 e 14 dias.....	p. 41
FIGURA 8. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação do gene colágeno II por PCR.....	p.43
FIGURA 9. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação do gene GATA-4 por PCR.....	p.47
FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação do gene GATA-4 por PCR	p.47
FIGURA 11. Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de conexina-43 em CTM-MO cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.....	p.54
FIGURA 12. Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de conexina-43 em CTM-TA cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.....	p.54
FIGURA 13. Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de α -actinina sarcomérica em CTM-MO cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.....	p.55
FIGURA 14. Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de α -actinina sarcomérica em CTM-TA cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.....	p.55
FIGURA 15. Corrente máxima e mínima.....	p.56
FIGURA 16. Relação da corrente de pico máxima do estímulo (A) e Corrente mínima no início do estímulo em -30 mV (B).....	p.57
FIGURA 17. Hipótese de que as CTM diferenciadas originam cardiomiócitos que só apresentarão funcionalidade <i>in vivo</i>	p.70
GRÁFICO 1. análise gráfica dos valores obtidos através da contagem direta da formação de nódulos de mineralização por CTM-MO (A) e CTM-TA (B) em cultura. Teste de Kruskal Wallis e $p < 0,01$ em relação às CTM-TA não diferenciadas (controle).....	p. 42
GRÁFICO 2. Análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de MTT.....	p.44

GRÁFICO 3. Análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de FA.....	p.45
GRÁFICO 4. Análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de dosagem relativa de colágeno.....	p.45
GRÁFICO 5. Representação gráfica da quantificação da expressão relativa dos genes Nkx2-5, α e β MHC em CTM-TA e CTM-MO.....	p.48
GRÁFICO 6. Análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD45 das populações de CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos I e II.....	p.52
GRÁFICO 7. Análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD54 das populações de CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos I e II.....	p.52
GRÁFICO 8. Análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD73 das populações de CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos I e II.....	p.53
GRÁFICO 9. Análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD90 das populações de CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos I e II.....	p.53

**ESTUDO DO POTENCIAL CARDIOMIOGÊNICO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS
RESUMO**

A diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteócitos, condrócitos e adipócitos é estabelecida na literatura, porém a diferenciação cardiomiogênica é altamente controversa. Existem autores que defendem a realização da diferenciação cardiomiogênica *in vitro*, e autores que questionam a reprodutibilidade dos resultados e a falta de ensaios funcionais em alguns trabalhos. Os diversos trabalhos investigam diferentes populações celulares e diferentes técnicas de indução, tornando a comparação entre os resultados impossível. A fim de elucidar conceitos e o potencial cardiomiogênico de células-tronco mesenquimais, o presente trabalho induziu a cardiomiogênese de duas populações de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e do tecido adiposo, com a utilização de dois meios cardiomiogênicos descritos na literatura. Os resultados obtidos indicam que as CTM foram responsivas aos estímulos do meio, apresentando fenótipo semelhante ao de cardiomiócitos: as células diminuíram sua proliferação, produção de fosfatase alcalina e colágeno, passaram a expressar fatores de transcrição como *Nkx2-5*, *GATA4*, α e β -MHC, porém em níveis menores do que os apresentados por cardiomiócitos adultos e neonatais. Não obstante, as CTM aproximaram o seu perfil fenotípico ao apresentado por cardiomiócitos: CD45⁻, CD54^{baixo}, CD73^{+ ou -}, CD90⁻. Apesar da expressão de CD45 ter aumentado em algumas condições e a expressão de CD90 ter se mantido ao longo do cultivo, nenhum desses resultados é incompatível com o fenótipo cardiomiogênico. As CTM diferenciadas apresentaram α -actinina sarcomérica e conexina-43 corretamente, indicando a possibilidade de uma diferenciação funcional. Porém, funcionalmente elas não reproduziram as características de cardiomiócitos isolados *in vivo*. Experimentos de eletrofisiologia demonstraram que as CTM diferenciadas não apresentaram capacidade de gerar correntes de entrada e saída, essenciais à função cardiomiogênica, e conseqüentemente, não desenvolveram potenciais de ação quando estimuladas. Os resultados descritos permitem sugerir que as CTM induzidas à seguir a diferenciação cardiomiogênica originaram cardiomiócitos não funcionais *in vitro*. Pela primeira vez, demonstrou-se que os picos de expressão gênica das CTM diferenciadas não atingiram os níveis apresentados por cardiomiócitos funcionais. O presente trabalho, portanto, evidencia a importância de controles positivos nos experimentos, assim como a utilização de técnicas quantitativas nas análises. Atualmente, a sensibilidade das técnicas utilizadas é extremamente alta, sendo que sinais não relevantes biologicamente podem ser detectados.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, Diferenciação *in vitro*, cardiomiogênese.

STUDY OF THE CARDIOMYOGENIC POTENTIAL OF MESENCHYMAL STEM CELLS

ABSTRACT

Even though mesenchymal stem cell differentiation towards osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages has been extensively described in the literature, cardiomyogenic differentiation remains largely controversial. In one hand several authors claim that they achieved cardiomyogenic differentiation *in vitro*, on the other hand, some authors question the reproducibility of the results and the lack of functional essays. Published papers study different cell populations, differentiation and testing techniques, rendering the comparison among them impossible. In order to shed light into this unclear phenomenon and find out the real cardiomyogenic potential of mesenchymal stem cells, the present study induced the cardiomyogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from the bone marrow and adipose tissue of wistar rats using two published differentiation protocols. The results obtained allow to suggest that the MSC responded to the stimuli present in the inductive media, as they presented a similar phenotype compared to cardiomyocytes: MSC presented lower levels of proliferation, alkaline phosphatase and collagen production, began to express transcription factors such as GATA-4 and Nkx2-5, and genes such as α and β -MHC. The levels presented by differentiated MSC, never the less, were lower than the levels presented by neonatal and adult cardiomyocytes. MSC also presented phenotypic profile similar to cardiomyocyte published profile: CD45⁻, CD54^{low}, CD73^{positive or negative} and CD90⁻. Even though the expression of CD45 raised in some conditions and the expression of CD90 did not lowered through differentiation process none of such results are incompatible with the cardiomyogenic phenotype. In agreement with such argument, differentiated MSC presented sarcomeric α -actinin and connexin-43 correctly located in the cell, indicating the possibility of a complete and functional differentiation. MSC did not show electrophysiology properties of functional cardiomyocytes, though. Not only they did not show inward and outward currents but, consequently, they also did not developed action potentials when stimulated. Taken together, the present data allow to suggest that MSC induced to follow cardiomyogenic differentiation originated non-functional cardiomyocytes *in vitro*. For the first time it was demonstrated that the peaks of expression of Nkx2-5, α and β -MHC in differentiated MSC do not reach expression levels of functional cardiomyocytes. Such observation underscores the importance of quantitative techniques in order to prevent misguided interpretations, as well as the paramount role of positive and negative controls. Nowadays, the sensibility of many techniques is extremely high, and even biologically irrelevant signals are detected.

Key words: Stem Cells, in vitro differentiation, cardiomyogenic differentiation.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 O coração e doenças cardiovasculares

O coração e a vasculatura constituem os componentes primários do sistema cardiovascular, responsável pela circulação sanguínea e por facilitar a troca de gases, fluidos, eletrólitos, grandes moléculas e calor entre as células e o meio externo. O coração é, portanto, um órgão vital para qualquer organismo multicelular (Klabunde, 2005).

A formação desse órgão passa por duas formas de crescimento ao longo do seu desenvolvimento. Inicialmente, durante o período intra-uterino de formação e desenvolvimento inicial do órgão, a massa ventricular aumenta através de mitose, porém este processo cessa logo após o nascimento. Na vida pós-natal, os cardiomiócitos deixam de proliferar, passando antes por um ciclo final de síntese de DNA e mitose nuclear, sem que ocorra citocinese. A partir de então, o tecido cardíaco não cresce mais em número de células, mas em massa, num processo chamado hipertrofia (Macmillan e Schneider, 2000; Ahuja *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2009).

O mesmo padrão de desenvolvimento é observado em outros tecidos, e segue a visão tradicional de que a capacidade de proliferação celular é inversamente proporcional à diferenciação ou grau de especialização da célula (Neuringer e Randell, 2004; Tzu-Ri Shih *et al.*, 2005; Knoblich, 2008; Stall e Luis, 2010). Em geral, o processo terminal de diferenciação celular é regulado por vias de sinalização, como Wnt, e envolve a parada do ciclo celular e o aumento da expressão de um painel de genes tecido-específicos. Assim, o esperado, e observado em diversos trabalhos, é que exista, nos tecidos, reservas de células indiferenciadas, responsáveis pela renovação celular e regeneração tecidual. Estas células são chamadas progenitoras e são capazes de avançar no ciclo celular, sofrer mitose e se renovar, dando origem a células igualmente indiferenciadas e a células comprometidas, que recompõem o tecido (Bianco *et al.*, 2001; Neuringer e Randell, 2004; Tzu-Ri Shih *et al.*, 2005; Mimeault e Batra, 2006; Meirelles, Caplan e Nardi., 2008). Proporcionalmente às necessidades teciduais, essas células vão sendo mobilizadas e diferenciadas.

As necessidades teciduais de renovação celular decorrem do desgaste natural das células e de eventuais lesões. Mediante as injúrias, ocorre a predominância de um de dois processos: cicatrização e regeneração. A predominância de um ou outro depende da natureza do tecido (capacidade proliferativa, presença de células progenitoras, aporte sanguíneo), da presença

ou não de antígenos e inflamação, da idade do organismo, dentre outros fatores (Crawford, 2007).

Em tecidos que apresentam alta capacidade de renovação celular, como o fígado, situações de injúria geralmente são seguidas de processo regenerativo, que consiste na substituição das células mortas por outras igualmente funcionais. O processo regenerativo depende não só da capacidade de divisão celular das células restantes do tecido, mas também da condição do estroma vizinho e do número de células restantes. O processo regenerativo recupera plenamente a função tecidual (Crawford, 2007). Por outro lado, injúrias que acometem órgãos que apresentam baixa ou nenhuma capacidade regenerativa, como o cérebro, levam a processos cicatriciais (Tenq *et al.*, 2008; Yoshioka, Hisanaga e Kawano, 2010). O processo cicatricial promove a substituição das células por tecido conectivo fibroso, sendo que, em geral, a função tecidual não é restaurada (Crawford, 2007).

O coração foi considerado, por décadas, um órgão no qual não há renovação celular, sendo o número de miócitos determinado logo após o nascimento e apenas preservado ao longo da vida do indivíduo (Rubart e Field, 2006 *apud* Kajstura *et al.*, 2010). Como consequência desta característica, acreditava-se que o coração era capaz apenas de apresentar processos cicatriciais, e não regenerativos. Hoje, porém, diversas publicações indicam não só a presença de células progenitoras no coração (Ahuja *et al.*, 2007; Pfister *et al.*, 2010; Di Nardo *et al.*, 2010; Kajstura *et al.*, 2010), como também a ocorrência de altas taxas anuais de renovação celular variando de 0,08% (Morales, 2007) a 40% (Kajstura *et al.*, 2010). Apesar das variações na predição da ocorrência de renovação celular, hoje se sabe que ela existe no organismo adulto, porém ainda permanece o consenso de que este processo ocorre de maneira insuficiente mediante injúria. Deste modo, posterior a uma lesão, há a predominância do processo de cicatrização tecidual sobre o de regeneração (Morales, 2007).

Atualmente, as doenças cardiovasculares constituem a maior causa de óbitos em todo o mundo, e, segundo a Organização Mundial de Saúde, as projeções indicam que elas se mantenham em primeiro lugar isolado nos próximos anos. De acordo com projeções do clássico estudo *Global Burden of Diseases* de Murray, Lopez e colaboradores para o ano 2020, há indicações de que as doenças cardiovasculares não só permanecerão como a causa principal de óbito, mas também representarão a principal causa de incapacidade.

Causadas por fatores não modificáveis, como idade, hereditariedade e gênero, e ainda por fatores modificáveis, como hipertensão arterial sistêmica, hábitos de vida pouco saudáveis,

que incluem o tabagismo, o sedentarismo e a má alimentação, as doenças cardiovasculares são facilmente prevenidas, porém dificilmente tratadas. Segundo o ministério da saúde, apenas em 2007, ocorreram 571.835 óbitos devido a doenças do aparelho circulatório. Em 2008, estas enfermidades foram responsáveis por 29,48% das mortes no Brasil (ministério da saúde). Os gastos gerados por estas doenças também são alarmantes: apenas em 2005, foram registradas 1.180.184 internações por doenças cardiovasculares, com custo global de R\$ 1.323.775.008,28, excluindo-se os gastos com medicações aos pacientes internalizados e não internalizados (Sociedade Brasileira de Cardiologia).

Entre as doenças cardiovasculares, a de maior incidência é a doença arterial coronária, cujas principais manifestações clínicas são a angina *pectoris*, o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a morte súbita (Batlouni, 1993; *apud* Colombo e Aguillar, 1997).

1.2 Infarto Agudo do Miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) consiste na necrose isquêmica de uma região do miocárdio, se enquadrando entre os diversos quadros clínicos caracterizados pela isquemia miocárdica. Ele se instala quando o fluxo de sangue é insuficiente para suprir as necessidades metabólicas do coração, principalmente as de oxigênio (Higuchi *et al.*, 2000), resultando em um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio e nutrientes (Berne e Levy, 2004). O infarto agudo do miocárdio é causado, em 90% das vezes, por uma oclusão trombótica coronariana, que leva a um processo necrótico do tecido subendocárdico que, com o tempo, pode sofrer uma progressão transmural, aumentando a área comprometida do miocárdio e prejudicando a função sistólica do coração e, por consequência, o estado clínico do paciente (Simek *et al.*, 2004).

Após a ocorrência de um infarto agudo do miocárdio de grande porte, cerca de 1 bilhão de cardiomiócitos chegam a ser afetados. O IAM representa um cenário único e mais complicado que outras condições patológicas, uma vez que devido à ausência de aporte sanguíneo característica do infarto, há extensa morte celular na região infartada, acompanhada de edema e inflamação após algumas horas. Como descrito anteriormente, a capacidade regenerativa do miocárdio é limitada, e, portanto, o tecido necrosado acaba predominantemente substituído por um tecido mais simples, constituído de fibroblastos e colágeno depositado, que gera um aumento do trabalho hemodinâmico (Pfeffer e

Braunwald, 1990). O processo cicatricial reconstitui, portanto, a continuidade do tecido, mas não a sua função (Mummery, Davis e Krieger, 2010).

No organismo, todos os sistemas funcionais (circulatório, digestório, etc) são extremamente integrados, portanto, o comprometimento da função cardíaca gerado pela injúria afeta todo o sistema cardiovascular. Inicialmente, o evento de cicatrização do miocárdio leva ao aumento e afinamento da região infartada, um processo descrito em 1987 por Hutchins e Buckley como “expansão do infarto” (revisado por Pfeffer e Braunwald, 1990; Gorman *et al.*, 2010). O aumento do trabalho hemodinâmico representado pela área infartada afeta todas as regiões sadias do coração, comprometendo globalmente a sua função. A dinâmica cardíaca comprometida afeta o volume de ejeção do coração, o que leva a uma resposta renal de aumento do volume sanguíneo, com a produção de aldosterona e hormônio antidiurético. O aumento do volume de sangue no organismo promove aumento da resistência periférica do sistema, culminando em uma diminuição ainda maior do volume de ejeção cardíaco. O resultado desta cascata de eventos inclui, dentre outros, o aumento das câmaras cardíacas e uma menor deformação ventricular. O processo descrito acima de forma resumida ainda começa a ser desvendado, mas já é denominado remodelamento ventricular (Gorman *et al.*, 2010). Em alguns casos, o processo descrito pode, ainda, culminar em morte por perda de inotropismo e conseqüente insuficiência cardíaca (Assis *et al.*, 2010).

Embora a mortalidade hospitalar por IAM tenha decaído expressivamente a partir da década de 80, particularmente com o advento das Unidades de Tratamento Intensivo e das Unidades Coronarianas e, posteriormente, com a incorporação de estratégias de revascularização, a incidência do IAM e a sua mortalidade pré-hospitalar e hospitalar permanecem altas. Em 2007, por exemplo, das 571.835 mortes causadas por doenças cardiovasculares, 71.997 foram causadas por infarto agudo do miocárdio e 92.568 por doenças isquêmicas do coração. Ainda segundo a sociedade brasileira de cardiologia, a mortalidade hospitalar do IAM gira em torno de 18-20%. Não obstante, os 80% dos pacientes que sobrevivem ao infarto agudo do miocárdio carregam o fardo de manter medicações e dietas restritivas por longos períodos.

Segundo Vasconcelos, 2007, pacientes que sobrevivem a um IAM apresentam menor qualidade de vida e sofrem de ansiedade e depressão com maior frequência do que a população comum. Esse fato ocorre, pois, após a alta hospitalar, a doença de base continua em curso e o prognóstico tardio está diretamente relacionado à função ventricular esquerda remanescente, à presença de isquemia miocárdica residual e à existência de arritmias cardíacas potencialmente graves. Esta evolução é diretamente influenciada pela quantidade

de miocárdio viável e em risco de necrose (Simpósio de Ergonomia no Brasil, 1996 *apud* Vasconcelos, 2007). Assim, quando o paciente volta para casa ele não está curado, e ainda se depara com a doença base associada à necessidade de mudança radical nos hábitos alimentares e à necessidade de abandonar vícios como o fumo e o sedentarismo. Essa realidade pode acabar culminando em ansiedade e depressão, que levam, por sua vez, a um menor comprometimento às recomendações médicas e a maior taxa de recorrência de IAM.

O IAM constitui, portanto, um evento de alta mortalidade, mas também de alta morbidade associada, o que justifica a sua posição como uma das doenças que mais oneram o estado brasileiro atualmente (Ministério da Saúde, 2004).

1.3 Terapias atuais para doenças cardiovasculares e a promessa da terapia celular

Apesar dos eventos bioquímicos e fisiológicos pós-IAM ainda não serem completamente elucidados, já existe a consciência por parte de médicos e pesquisadores de que a natureza do processo de remodelamento ventricular induzido pelo IAM está associada aos maus resultados obtidos por terapias que visam tratar fases tardias de insuficiência cardíaca. Conseqüentemente, hoje há o aumento do interesse em se desenvolver terapias que visem a aplicação no período inicial pós-lesão, ou no caso, pós-IAM, que visam prevenir e limitar os efeitos adversos do remodelamento (Gorman *et al.*, 2010).

Atualmente, o tratamento do infarto do miocárdio, e de insuficiência cardíaca em geral, inclui diversas metodologias, dentre elas: medicação oral utilizando substâncias trombolíticas; cirurgia de ponte cardíaca ou coronariana (na qual uma veia retirada de outro local do corpo – geralmente da região interna da perna – é enxertada de forma a substituir a coronária obstruída e recompor o fluxo sanguíneo); angioplastia (cirurgia realizada com o intuito de desobstruir a artéria ocluída através da utilização de um cateter que apresenta um balão na ponta, inflado na região obstruída, e a utilização de uma mini tela de aço chamada *stent*, de forma a manter o vaso aberto permanentemente); reparo ou substituição de válvulas, transplante de coração e colocação de coração artificial (Organização Mundial de Saúde).

Se a perda da função cardíaca causada por essas enfermidades é a maior causa de óbitos, a recuperação das áreas contráteis do coração constitui o tratamento mais adequado. Seguindo este princípio, todas estas metodologias previnem morte celular através da

recuperação do fluxo sanguíneo e prevenção da formação de novos trombos, porém são incapazes de reconstituir o miocárdio já comprometido, estratégia que, teoricamente, pode recuperar a função contrátil do miocárdio de forma plena.

A terapia celular constitui uma estratégia que segue este princípio, e visa tratar injúrias através do reparo ou substituição do tecido injuriado (Perl *et al.*, 2010). Inicialmente utilizada há mais de 50 anos no tratamento de leucemias (através da substituição do sistema hematopoiético leucêmico por um sadio), essa estratégia foi posteriormente estendida para incluir o transplante autólogo de células progenitoras para o tratamento de cânceres e outras doenças. Uma vez que a reposição do tecido hematopoiético se tornou possível, maiores doses de quimioterapia puderam ser utilizadas o que levou ao aumento significativo da eficiência do tratamento (Perl *et al.*, 2010). Nos últimos anos, a terapia celular tem sido considerada uma interessante estratégia de tratamento de diversas injúrias que afetam tecidos nos quais a regeneração não ocorre de maneira satisfatória (Perl *et al.*, 2010). Análise de dados até o ano de 2007 envolvendo estudos randomizados e controlados indica que essa nova estratégia pode levar à melhores resultados comparada à terapia convencional (Hoke *et al.*, 2009).

Durante os últimos 10 anos, a utilização da terapia celular para regeneração do miocárdio se tornou parte dos focos principais da pesquisa em cardiologia (Perl *et al.*, 2010). Um grande problema da metodologia da terapia celular, porém, constitui a fonte de células para o transplante (Baker, 2008).

Como dito anteriormente, a terapia celular se aplica em condições onde a regeneração tecidual não ocorre de maneira satisfatória. Estas condições são características de tecidos cujas células não se replicam eficientemente ou que passaram por perda celular excessiva, como o miocárdio, o tecido ósseo (considerando-se grandes perdas ósseas) e o tecido hematopoiético após irradiação. Deste modo, a demanda por células é enorme e a fonte de células é escassa. Cardiomiócitos fetais e miócitos derivados de outros tecidos foram utilizados, em vão, na tentativa de prevenir e reverter a perda da contratilidade do tecido cardíaco (Henning, 2011). As dificuldades de obtenção de um número suficiente de células e as dificuldades em obter-se sincronia perfeita com o tecido cardíaco, porém, limitaram o uso destes tipos celulares para terapia (Mummery, Davis e Krieger, 2010)

Uma solução à escassa fonte de células é o cultivo celular, essencial para promover a proliferação celular e aumentar o número de células disponíveis para o tratamento. Porém, este passo é possível para alguns tipos celulares, como os osteoblastos e células

hematopoiéticas, mas não é possível para outros, como é o caso de neurônios, cardiomiócitos fetais e miócitos derivados de músculos esqueléticos. Nestes casos, a utilização de células capazes de proliferar e ao mesmo tempo de gerar tipos celulares diferenciados é essencial. Assim, a procura por outras fontes celulares continuou, até que células ainda não comprometidas a fenótipos diferenciados começaram a ser investigadas (Fazel, 2007).

A terapia celular envolvendo a aplicação de células-tronco (CT) na recuperação do miocárdio propõe a utilização de células isoladas do próprio paciente, sua expansão *in vitro* e posterior injeção na corrente sanguínea ou no pericárdio. Uma vez no ambiente do tecido cardíaco, essas células promoveriam angiogênese e recuperação de tecido contrátil (Wang *et al.*, 2006; Assis *et al.*, 2010), além de realizar imunorregulação e imunossupressão (Pedemonte *et al.*, 2007; He *et al.*, 2009). Seriam, portanto, excelentes candidatas à prevenção da perda tecidual e à promoção da regeneração do tecido necrosado (Wang *et al.*, 2006; Perl *et al.*, 2010). Na prática, porém, o processo através do qual as CT colaboram na melhora da função cardíaca não é completamente compreendido. Ao contrário do que foi previsto inicialmente, hoje se demonstrou que as CT introduzidas no ambiente cardíaco não se diferenciam em cardiomiócitos (ou o fazem raramente). Na verdade, há indícios de que elas permanecem indiferenciadas ou diferenciam-se em outros tipos celulares como células endoteliais, de modo que a melhora clínica registrada nos estudos está mais relacionada a efeitos parácrinos das CT do que à diferenciação cardiomiogênica e restauração da função tecidual (Hatzistergos *et al.*, 2010). Casos de CT que não se diferenciam (Field *et al.*, 2004) e de diferenciações em fenótipos inesperados já foram descritos *in vivo* (Losordo *et al.*, 2004; He *et al.*, 2008).

A intenção inicial de se restaurar a função cardíaca através da reposição das células mortas ainda permanece por ser atingida. Sem que haja conhecimento profundo de todo o processo de diferenciação das CT em cardiomiócitos, as pesquisas atuais ainda se baseiam apenas em resultados clínicos e não há compreensão plena do que ocorre *in vivo*. Estudos *in vitro* do processo de diferenciação se mostram então extremamente relevantes para a utilização eficaz e segura de CT na reparação e recuperação tecidual (Kicic *et al.*, 2003; Baker, 2008).

1.4 Células-tronco

O organismo adulto completamente desenvolvido é constituído por aproximadamente 411 tipos celulares que derivam de apenas uma célula inicial: o zigoto (Vickaryous e Hall, 2006).

Todas as células do corpo, portanto, apresentam o mesmo genoma, com exceção dos linfócitos, que sofrem o processo de evolução somática. A diferença fenotípica observada entre as células constituintes do corpo humano é resultado de diferentes padrões de expressão gênica que surgem em resposta a mecanismos de indução e determinação. Mecanismos de indução acontecem naturalmente através da produção celular de metabólitos que afetam células vizinhas através da ligação de proteínas de membrana com componentes da matriz extracelular ou ainda pela interação direta célula-célula (Gilbert, 2006). Esses mecanismos culminam na formação de tipos celulares especializados que passam pelo processo de comprometimento até a formação do tipo celular funcional. O processo de comprometimento celular é complexo e ordenado espacial e temporalmente, sendo constituído de duas etapas: a primeira etapa é denominada especialização, fase na qual a célula é capaz de se diferenciar autonomamente quando colocada em meio de cultura básico (sem fatores de diferenciação), porém é igualmente capaz de abandonar o estado comprometido se estimulada. A segunda etapa é chamada determinação e começa quando a célula chega a um ponto de comprometimento irreversível. O resultado ao longo do desenvolvimento é a formação de tipos celulares determinados que, em geral, abandonaram o ciclo celular e não o retomam nem mesmo em resposta a agentes mitógenos ou *stress* fisiológico. Paralelamente a esse abandono das divisões celulares, ocorre a aquisição de um padrão de expressão exclusivo para cada tipo celular e importante para a sua função, que agora é constituir a parte funcional dos tecidos.

Em 1961, Till e McCulloch (revisado por Jens *et al.*, 2004) deram início às descobertas de um tipo celular diferente dos até ali descritos, quando demonstraram a existência de células precursoras da medula óssea capazes de gerar, no baço, células de múltiplas linhagens hematopoiéticas. Essas células, ao contrário das outras até ali conhecidas, não se apresentavam determinadas em organismos adultos, podendo dar origem a todos os tipos celulares pertencentes à linhagem hematopoiética. Posteriormente, elas foram denominadas células-tronco.

As CT são estudadas, desde então, sendo hoje definidas como um tipo celular único pela sua capacidade de se renovar e de originar células com diferentes especializações. Ao contrário dos tipos celulares determinados, as células-tronco adultas permanecem relativamente indiferenciadas até que recebam estímulos para se tornarem determinadas.

No organismo saudável, as CT têm papel essencial no estabelecimento de tecidos embrionários ao longo do desenvolvimento intra-uterino e na substituição de células adultas ou de células perdidas por lesões ou infecções (Knoblich, 2008). Estudos recentes também

sugerem papéis dessas células na regulação do sistema imune (Le Blanc e Ringdén, 2007; Meirelles, Caplan e Nardi, 2008).

Desde os relatos de Till e McCulloch, outras populações de CT foram descobertas no organismo adulto, sendo que foram definidas classificações para as mesmas de acordo com a fase do organismo em que elas estão presentes e com a sua capacidade de diferenciação.

De acordo com essa classificação, o zigoto é uma célula-tronco embrionária totipotente devido à sua capacidade de originar todos os tipos celulares do organismo e anexos embrionários.

As células da massa interna do embrião na fase de blastocisto, células-tronco germinativas embrionárias e algumas células encontradas em teratomas são, por sua vez, classificadas em CT embrionárias pluripotentes, já que são capazes de originar todos os tipos celulares do organismo. Elas se diferenciam do zigoto por não originarem anexos embrionários, gerados pelas células do trofoblasto (Gilbert, 2006). As CT embrionárias pluripotentes são caracterizadas pelo alto potencial de diferenciação e proliferação contínua, garantidos pela expressão de genes como *oct 4*, *nanog*, *sox 2* e proteínas como as do grupo polycomb (Scheres, 2007; Boyer *et al.*, 2006). São caracterizadas também, pela instabilidade de cariótipo e fenótipo em culturas *in vitro*, que culminam na formação de fenótipos diferenciados sem qualquer estímulo aparente e na formação de teratomas *in vivo*, tornando necessário o uso de inibidores de diferenciação *in vitro* e constituindo uma desvantagem muito grande no seu uso em transplantes (He *et al.*, 2008).

Células do cordão umbilical, do líquido amniótico e células indiferenciadas do organismo adulto dão origem a apenas tipos celulares de mesma origem embrionária (endo, meso ou ectoderma) e, portanto, são classificadas em células-tronco multipotentes (De Coppi *et al.*, 2007).

Entre as células-tronco do organismo adulto, há ainda uma classificação diferencial: células de origem mesenquimal (CTM) ou hematopoiética (CTH). As células descobertas por Till e McCulloch são células-tronco hematopoiéticas. Descritas como presentes no pâncreas, as CTH são encontradas também no sangue e medula óssea do adulto, e no cordão umbilical e sistema hematopoiético do feto. Seu papel no organismo saudável é o de renovar a população de células das linhagens linfóide e mielóide (Wilson e Trumpp, 2006).

Ao contrário das CTM, as CTH expressam uma proteína de membrana CD34, que media o ancoramento das mesmas à matriz óssea e ao seu nicho (Okuno *et al.*, 2002). Seu cultivo *in*

vitro é feito sem que ocorra adesão à placa de cultura nem expansão do número de células, o que a tornaria um tipo celular desinteressante ao uso em terapias celulares, devido à grande demanda de células dessa técnica (Scheres, 2007). Hoje, porém, elas são usadas em terapias de reconstituição da medula óssea em pacientes que passaram por radioterapia (Morales, 2007), já que são o tipo de célula tronco mais bem conhecido até o momento (Wilson e Trumpp, 2006).

1.4.1 Células-tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (CTM) são encontradas nas porções estromais de diversos tecidos ao longo do desenvolvimento, desde o cordão umbilical e o líquido amniótico, até os diversos órgãos do organismo adulto, como medula óssea, tecido adiposo, cérebro e músculo esquelético e cardíaco (De Coppi *et al.*, 2007; Tzu-Ri Shih *et al.*, 2005; Morales, 2007). Hoje se discute se as CTM fazem parte da população de células perivasculares ou se as CTM residem apenas na medula óssea e se propagam até os tecidos através da corrente sanguínea mediante sinalização (Mctaggart e Atkinson, 2007; Meirelles, Caplan e Nardi, 2008). Como dito anteriormente, elas são classificadas em multipotentes, apresentando um potencial para diferenciação mesodérmica (Meirelles, Caplan e Nardi, 2008). Estudos *in vitro*, porém, demonstram que além dessa capacidade de originar tipos celulares derivados do mesoderma, as CTM apresentam uma propriedade chamada plasticidade: a capacidade de originar tipos celulares de origem diferente da própria (Mezey *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010). Originada de diversos tecidos, a população de CTM se apresenta heterogênea. Estudos demonstram que há variação fenotípica em nível celular em culturas a partir de uma única CTM isolada (Bobis *et al.*, 2006). A identificação das CTM, portanto, não é fácil: por enquanto não há marcadores celulares específicos para essa classe de células.

Em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular e o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais estabeleceram uma série de parâmetros a fim de definir e padronizar as populações de CTM estudadas. Eles são: aderência à superfície plástica em condições padrão de cultivo, a expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD 90, concomitante a não expressão de marcadores como CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA classe II, e por fim, o potencial de diferenciação multipotente (Dominici *et al.*, 2006).

A principal fonte de CTM estudada é a medula óssea. Nela, as CTM apresentam papel importante na criação e manutenção do micro ambiente de seu nicho. Sua principal função é criar o suporte mecânico para o sistema hematopoiético através da secreção de

fibronectina, laminina, colágeno e proteoglicanas, mas as CTM também têm papel importante na regulação da hematopoiese, já que interagem diretamente com as CTH e secretam fatores hematopoiéticos e não hematopoiéticos (Wilson e Trumpp, 2006).

A medula óssea também é composta por células da linhagem osteoblástica, células adiposas, CTH e seus derivados, além de fibroblastos, que, junto às CTM, também secretam o fator de células-tronco (*stem cell factor* - SCF), importante para o estabelecimento do nicho das CTH. Assim, as CTM constituem uma pequena porcentagem do número total de células da medula (aproximadamente 0,01 a 0,001% do total de células mononucleares), sendo que essa pequena porcentagem ainda diminui com a idade (Bobis *et al.*, 2006). A aparente barreira para o uso das CTM da medula óssea na terapia celular é superada, porém, através do seu cultivo e expansão estabelecidos *in vitro*.

O tecido adiposo também é uma fonte abundante de CTM. Assim como a medula óssea, ele deriva do mesoderma embrionário e apresenta estroma facilmente isolável, ao contrário do procedimento doloroso e altamente invasivo da coleta de medula. As células processadas do material lipoaspirado foram a primeira fonte de estudo de CTM derivadas da gordura e se mostraram muito parecidas com as CTM derivadas de medula óssea, podendo ser classificadas como CTM de acordo com os pré-requisitos citados anteriormente (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002).

Mesmo pertencendo à mesma classe de células-tronco, CTM derivadas de medula óssea (CTM-MO) e CTM derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) apresentam diferenças em seu transcriptoma (Wagner *et al.*, 2005), o que poderia refletir em processos de diferenciação com pequenas diferenças. É o que sugere o trabalho de Carvalho e colaboradores, ainda não publicado, que mostra que o processo de osteogênese de CTM-MO e CTM-TA é diferente, sendo que CTM-TA são mais prontamente diferenciadas na linhagem osteogênica. Esse tipo de estudo é extremamente importante para a escolha da fonte de CTM mais apropriada para diferenciação nos diversos tipos celulares e para as diversas formas de aplicação clínica. A diferenciação de CTM em células musculares cardíacas, por exemplo, apresenta taxas muito pequenas de diferenciação, sendo que o aumento, mesmo que minimamente significativo, dessas taxas pode ser importante para a viabilização da técnica de diferenciação *in vitro* para o uso clínico.

1.5 Células-tronco e o processo de cardiomiogênese *in vitro*

A cardiomiogênese *in vitro* constitui um processo de produção de cardiomiócitos fora do organismo e em larga escala. Sendo assim, é um processo interessante não apenas para atender à enorme demanda da terapia celular, mas também às demandas da indústria farmacêutica, que visa aprofundar seus experimentos *in vitro* a fim de aumentar seu grau de sucesso *in vivo*. Até recentemente, estudos de cardiomiócitos humanos eram limitados pela baixa disponibilidade de material o que atrasava qualquer pesquisa (Phillips e Crook, 2010).

A capacidade das CTE originarem cardiomiócitos funcionais é consenso na comunidade científica, pois é comum observar corpos embrióides que apresentam contração *in vitro*. A capacidade das CTM e CTH de gerar cardiomiócitos, por outro lado, ainda é discutida (Rose *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010).

Atualmente ocorre uma ausência de protocolos que levem à cardiomiogênese de maneira indiscutível, o que faz com que diversas metodologias sejam desenvolvidas. Nenhuma delas, porém, levou à geração de cardiomiócitos funcionais de maneira reprodutível.

A primeira publicação indicando a ocorrência de cardiomiogênese *in vitro* é de 1993, com a descrição da formação de cardiomiócitos a partir de corpos embrióides de CTE murinas da linhagem D3 (Maltsev *et al.*, 1993). A obtenção de cardiomiócitos a partir de CT adultas, por outro lado, só foi publicada em 2001, com a utilização do agente demetilante 5-azacitidina, que até então era estudado como droga antitumoral (Weiss *et al.*, 1972). Em 1979, Taylor e Jones descreveram a capacidade da 5-azacitidina em induzir a diferenciação de células das linhagens 10T1/2 e 3T3 em adipócitos e condrócitos (Taylor e Jones, 1979, *apud* Rosca e Burlaco, 2010). Em 1982, 5-azacitidina foi descrita novamente como agente indutor da diferenciação adipogênica, desta vez em células CHEF/18 (*Chinese Hamster Embryo Fibroblast cell line*) (Sager e Kovak, 1982). Posteriormente, foi então descrita a capacidade do agente demetilante em questão de induzir expressão de MyoD1. Essa proteína é chamada *myogenic differentiation protein 1*, em português, proteína 1 de diferenciação miogênica, e apresenta papel importante na cardiomiogênese, pois induz à expressão de α -actinina cardíaca e MLC 1, chamada myosin light chain 1, em português, cadeia leve da miosina 1, proteínas importantes à função cardíaca. O trabalho foi publicado em 1992, porém, não objetivava a obtenção de cardiomiócitos, mas células musculares a partir de células murinas da linhagem L6E9 (Muthuchamy, Pajak e Wieczorek, 1992).

Apesar de ter sido um dos primeiros fatores estudados como indutores da cardiomiogênese, ainda existe controvérsia sobre a real capacidade da 5-azacitidina em originar cardiomiócitos funcionais. Como um agente demetilante, a ação da 5-azacitidina não é específica em promover a expressão de um ou outro gene. Como dito anteriormente, ela parece induzir a diferenciação adipogênica e condrogênica em alguns tipos celulares, e dados atuais, como os de Geng e colaboradores descrevem a utilização bem-sucedida desse agente para induzir a diferenciação miogênica de células-tronco mesenquimais (Geng *et al.*, 2009).

Entre os trabalhos que estudam a 5-azacitidina como um agente indutor da cardiomiogênese, existem incontáveis trabalhos que descrevem a indução da expressão de genes relacionados à linhagem cardíaca, porém poucos trabalhos obtêm evidências funcionais da diferenciação. Dentre eles estão trabalhos como o do grupo do pesquisador Yongshang Cheng (Cheng *et al.*, 2004), que descreve a obtenção de cardiomiócitos capazes de gerar células com características de cardiomiócitos, como miofilamentos e capacidade de resposta de liberação de cálcio diante de baixas concentrações de K^+ . Alguns grupos descrevem ainda a geração de células contráteis a partir de CTM imortalizadas após estimulação por 5-azacitidina (Makino, 1999; Rangappa *et al.*, 2003). Em contraposição, estes resultados não foram reproduzidos por diversos grupos (Balana *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2008; Matitskaya e Denecke, 2009; Rosca e Burlacu, 2010).

Em 2006, Ye e colaboradores estudaram as mudanças no proteoma de CTM-MO suínas tratadas com 5-azacitidina e encontraram o aumento da expressão de proteínas relacionadas à proliferação e à diferenciação celular, dentre elas a α -tropomiosina, relacionada à cardiomiogênese. Outras proteínas relacionadas à diferenciação em outras linhagens celulares foram encontradas, indicando a falta de especificidade da ação deste agente indutor. A quantidade de trabalhos que indicam o aumento da expressão de marcadores de cardiomiócitos em células-tronco tratadas com esse agente, porém, levam a crer que há a predominância do fenótipo cardiomiogênico nas células induzidas. Deste modo, os mecanismos de indução da cardiomiogênese via estimulação com 5-azacitidina permanecem por ser completamente elucidados e esta continua sendo a técnica de indução cardiomiogênica mais publicada.

O segundo método mais publicado de indução da cardiomiogênese constitui uma técnica simples: a cocultura de células indiferenciadas e cardiomiócitos. Essa técnica segue a teoria de que assim como o ambiente *in vivo* induz à cardiomiogênese de células precursoras, espera-se que cardiomiócitos *in vitro* reproduzam ao menos em parte essas condições, de

modo a também induzir a diferenciação cardiomiogênica. Os fatores responsáveis pela indução ainda não foram descritos, porém é provável que constituam componentes de matriz extracelular (Van Dijk *et al.*, 2008), fatores parácrinos liberados por cardiomiócitos (Xie *et al.*, 2006) e interação célula-célula com os cardiomiócitos. Novamente, existem inúmeros trabalhos relatando a expressão de genes relacionados à linhagem cardiomiogênica nas células indiferenciadas que passaram pelo cocultivo, inclusive descrevendo a obtenção de células contráteis *in vitro* (Choi *et al.*, 2010). No trabalho de Wojakowski, publicado em 2010, o sistema de cocultura foi utilizado ainda em combinação à outra estratégia de diferenciação, sendo também bem sucedido na obtenção de cardiomiócitos. A controvérsia permanece, porém, devido à existência de relatos que indicam que o potencial cardiomiogênico das CTM induzidas por essa técnica é limitado (Matitskaya e Denecke, 2009; Koninckx *et al.*, 2009; Roura *et al.*, 2010).

Além destes dois métodos mais publicados, existem diversas outras técnicas, que variam da utilização do sobrenadante de cardiomiócitos (Xie *et al.*, 2006), a elaboração de meios de cultura contendo citocinas (Planat-Benard *et al.*, 2003), utilização de TGF- β (Gwak *et al.*, 2009), Óxido Nítrico (Rebelatto *et al.*, 2009), Pioglitazona (Shinmura *et al.*, 2010), oxitocina (Danalache *et al.*, 2007), BMP (Matitskaya e Denecke, 2009), dentre diversas outras metodologias. Estas metodologias em geral foram publicadas em trabalhos individuais e ainda não foram amplamente testadas.

Independente da estratégia de diferenciação utilizada, em geral, os parâmetros utilizados para atestar a cardiomiogênese são a expressão de determinados fatores de transcrição indicadores do comprometimento da célula à linhagem cardíaca e a presença de estruturas características de cardiomiócitos funcionais (Huang *et al.*, 2010; Shinmura *et al.*, 2010). Análises morfológicas feitas visualmente através do microscópio de contraste de fase também colaboram na comprovação da cardiomiogênese uma vez que as células se agrupam e formam estruturas alongadas ao longo do processo em questão, podendo apresentar contração (Planat-Bénard *et al.*, 2003).

Dentre os fatores de transcrição mais intimamente envolvidos com a cardiomiogênese estão o GATA-4, NKX2.5 e fator de resposta a soro (*serum response factor* - SRF), marcadores precoces das células pré-cardíacas (Martin, Afouda e Hoppler, 2010). O GATA-4 é um fator de transcrição pertencente à superfamília GATA, composta de 6 membros: GATA-1 a 6. Os membros dessa família são assim nomeados, pois se caracterizam por apresentar dois dedos de zinco centrais à proteína que reconhecem o motivo consenso (A/T)GATA(A/G), presente, dentre outros, nas regiões regulatórias dos genes para o fator atrial natriurético

ANF (*Atrial natriuretic factor*) e cadeia pesada da α -miosina. GATA-1 a 3 têm expressão restrita à linhagem hematopoiética e GATA-4 a 6 são abundantes no coração desde o início do desenvolvimento. GATA 4 é um fator de transcrição envolvido no topo das cascatas de eventos que culminam no processo de cardiomiogênese, sendo determinante e essencial para o mesmo (Afouda *et al.*, 2008). Estudos envolvendo a deleção e superexpressão do gene *gata-4* revelaram que esse fator de transcrição apresenta papel crítico para a embriogênese e formação do coração: embriões que não expressam GATA-4 estão fadados a não chegar ao 10º dia de desenvolvimento, enquanto os que o superexpressam, apresentam hipertrofia cardíaca. *In vitro*, a expressão bloqueada desse fator de transcrição impede a cardiomiogênese (Pu *et al.*, 2004).

O NKX2.5 também participa do processo de diferenciação das CT, sendo um cofator do GATA-4 (Durocher *et al.*, 1997; Martin, Afouda e Hoppler, 2010). Ele atua promovendo a expressão de α -actina e ANF, dentre outros genes que apresentam a seqüência 5'-TNNAGTG-3', chamadas de sítio NKE. É um fator de transcrição importante para a cardiomiogênese, sendo que o bloqueio da sua expressão gera a diminuição da expressão de vários genes específicos da linhagem cardiomiogênica e a sua superexpressão se mostra suficiente para promover a cardiomiogênese de células da linhagem de teratocarcinoma murino, P19 (Li *et al.*, 2007).

GATA-4, Nkx2-5 e SRF colaboram nos primeiros passos da formação do coração embrionário a partir do mesoderma embrionário. A formação do tecido cardíaco subsequente ao início da diferenciação cardiomiogênica envolve a expressão de proteínas de citoesqueleto, incluindo miosinas e troponinas (Martin, Afouda e Hoppler, 2010).

Como dito anteriormente, ao longo da diferenciação a célula-tronco inicialmente capaz de originar vários tipos celulares recebe estímulos externos que fazem com que alguns genes sejam ativados e outros sejam irreversivelmente reprimidos (Gilbert, 2006). Os mecanismos de transdução de sinais que transmitem a informação de um ligante externo ao núcleo aparentemente envolvidos na cardiomiogênese incluem as vias de sinalização induzidas por TGF- β (Li *et al.*, 2008), fator de crescimento de fibroblasto (*Fibroblast growth factor* – FGF) e BMP (Barron *et al.*, 2000), Akt (Xu *et al.*, 2008) e Wnt, além de remodelamento da cromatina. As vias de sinalização reguladas e integradas pelos FT citados para promoção da cardiomiogênese são as vias canônica (Wnt/ β -catenina) e não-canônica de Wnt (sinalização Wnt11/JNK). A via não canônica de Wnt promove a cardiomiogênese, enquanto a via canônica regula e restringe o desenvolvimento do coração e a diferenciação em músculo cardíaco subsequente.

Essas vias em geral atuam promovendo a expressão de fatores de transcrição como os descritos anteriormente (Wnt atua ativando a expressão dos genes *Gata-4* e *Nkx2.5* através da via da fosfoquinase C e FGF atua ativando a expressão de *SRF*) ou de proteínas como a ANF, miosina e troponina, dentre outras (Barron *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2008).

O campo emergente da terapia celular propõe uma melhora no tratamento de várias doenças degenerativas ou associadas à velhice através da renovação das células dos tecidos acometidos. Devido à sua fácil obtenção, alta taxa de proliferação e capacidade de multilinhagem, células-tronco são candidatas ideais à terapia celular. Mais estudos, porém, são necessários, como demonstram os estudos de cardiomiogênese *in vitro*, que precisam ser validados e otimizados, seja através de novos protocolos de diferenciação, seja através da adequação da utilização das CT mais vantajosas em cada procedimento.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Atestar a diferenciação cardiomiogênica de CTM derivadas da medula óssea e do tecido adiposo de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, e a eficiência de dois meios cardiomiogênicos, constituídos de citocinas (meio I), e de meio basal condicionado por cardiomiócitos neonatais (meio II).

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Isolar populações de CTM a partir de tecido adiposo e medula óssea de *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar e comprovar a população isolada;
- Induzir a diferenciação cardiomiogênica das CTM;
- Estudar o processo de diferenciação, analisando e comparando as CTM e os meios de diferenciação utilizados;

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e cultivo celular

3.1.1 Meios de cultura celular

Meio de cultura basal

O cultivo inicial das CTM, cardiomiócitos, fibroblastos, macrófagos e XR63-IL3 foi realizado em meio DMEM acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Sorallis), sendo este definido como meio de cultura basal. Todo SFB utilizado nos meios foi previamente inativado por alta temperatura (30 minutos a 56°C). O meio basal constituía-se de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco) suplementado com 3,7 g de Bicarbonato de Sódio (Merck), 60 µg de gentamicina/mL (Ariston) e 10 mL de solução de Penicilina, Estreptomicina e Anfotericina (PSA) 100X (Gibco), compondo uma concentração final de 100 u/mL de penicilina G sódica, 100 µg/mL de estreptomicina, 0,025 µg/mL de anfotericina B. Após o preparo do meio, o pH foi ajustado para 7.4 e a solução foi filtrada em membranas com poros de 0,22 µm. O meio foi mantido a 4° C por até 3 semanas.

Meio de cultura osteogênico

O meio osteogênico constituía-se de meio basal acrescido de 0,05 g/L de Ácido Ascórbico (Sigma), 2,75 g/L de β-glicerofosfato (Sigma) e 10,85 µl de Dexametasona (Sigma). O meio foi mantido em geladeira protegido da luz por até 2 semanas (Sugiura, Kitoh e Ishiguro, 2004).

Meio de cultura condrogênico

O meio indutor condrogênico foi feito baseado no protocolo revisado por Otto, 2004 e realizado por Medrado (2006) e Koay (2007). Foram utilizados 10µg TGF-β recombinante (Bioclone), 10⁻⁷M de dexametasona (Sigma), 50µg/ml de ácido ascórbico (Sigma), 6,25µg/ml de insulina (Biobras), 6,25µg/ml de transferrina (Sigma), 1mM de piruvato (Sigma), 1,25µg/ml de BSA (Sigma). Para esterilização, essa solução foi filtrada em membrana de PVDF 0,22 µm (Millipore) e completou-se o volume para 100 mL com DMEM acrescido de

1% de SFB. O meio indutor de condrogênese foi estocado em geladeira por no máximo 2 semanas.

Meio de cultura cardiomiogênico I

A indução da cardiomiogênese das CTM foi realizada com o cultivo dessas células em meio de cultura cardiomiogênico, inicialmente proposto por Planat-Bénard em 2003 e modificado no presente trabalho. Este meio constitui-se de DMEM acrescido de: 15% v/v de SFB; 10% v/v de solução de IL-3 (obtida a partir do sobrenadante da linhagem celular XR63-IL3); 10% v/v de solução rica em IL-6 (obtida após indução dos macrófagos); 10% v/v de fator de célula-tronco; 2-mercaptoetanol para concentração final de 10^{-4} M (Sigma); L-glutamina para concentração final de 2 mM (Sigma); insulina recombinante humana Novolin® para concentração final de 10 µg/mL (Novo nordisk farmacêutica do Brasil); e apo-transferrina humana para concentração final de 200 µg/ mL (Sigma).

Meio de cultura cardiomiogênico II

O meio de cultura cardiomiogênico II constitui-se de meio basal condicionado por cardiomiócitos neonatais. A sua obtenção foi realizada pela coleta do sobrenadante dos cardiomiócitos cultivados, seguindo a metodologia utilizada por Xie e colaboradores publicada em 2006.

3.1.2 Isolamento dos diferentes tipos celulares

Isolamento das CTM-MO

Em fluxo horizontal, ratas fêmeas da linhagem Wistar de 4 a 8 semanas foram eutanasiadas por deslocamento cervical posterior a anestesia, realizada utilizando-se cloridrato de quetamina 10% e cloridrato de xilazina 2% (ambas da Syntec), de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 079/2007). Estes animais tiveram seus membros posteriores tricotomizados e banhados em álcool 70%, a fim de se prevenir contaminação. Tíbias e fêmures foram isolados e colocados em tubo de 50mL contendo DMEM. Em fluxo laminar, as epífises dos ossos foram cortadas e as medulas coletadas com a injeção de DMEM na cavidade dos ossos. As medulas passaram então por

centrifugação a 300xg durante 10 minutos e dissociação mecânica com a utilização de uma seringa de 15mL (BD Biosciences). O sobrenadante resultante da centrifugação das medulas foi coletado e constituiu o Fator de Célula-Tronco ou *Stem Cell Factor* (SCF) (Pedemonte *et al.*, 2007; Assis *et al.*, 2010).

Isolamento das CTM-TA

Ratas fêmeas da linhagem Wistar apresentando de 4 a 8 semanas de idade foram eutanasiadas como previamente descrito. Esses animais tiveram seu abdômen tricotomizado e banhado em álcool 70% a fim de evitar contaminação do material coletado. Em fluxo horizontal, o tecido adiposo inguinal foi isolado e colocado em tubo de 50mL contendo DMEM. Em fluxo laminar, o tecido adiposo foi então lavado em PBS, cortado, macerado e submetido à ação da enzima colagenase do tipo II (Sigma), preparada em uma concentração de 0,15% p/v e diluída em tampão salina fosfato (*phosphate buffer saline* – PBS), cuja constituição a 0,15M é de: Cloreto de Sódio a 8 g/L, Cloreto de Potássio a 0,2 g/L, Fosfato de Sódio anidro a 1,15 g/L e Fosfato de Potássio a 0,2 g/L (todos Vetec) solubilizados em água destilada (a solução produzida teve o pH final ajustado para 7,2 e anterior ao uso foi esterilizada por filtração em membrana de 0,22 µm).

Por 1 hora o tecido adiposo permaneceu nessa solução, sendo enzimaticamente processado em estufa a 37° C e 5% de CO₂, sendo agitado vigorosamente a cada 15 minutos. A ação da enzima foi então interrompida ao adicionar-se DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino na proporção de 1:1. As frações adipocitária e estromal do tecido adiposo foram separadas de acordo com a densidade através de centrifugação, realizada a 300xg por 10 minutos. O *pellet*, constituído da população estromal foi ressuscitado em meio de cultura basal acrescido de 10% de SFB. O protocolo descrito foi estabelecido a partir do protocolo utilizado por Zuk e colaboradores, em 2002, com modificações.

Cultura celular primária

As células obtidas ao final dos protocolos de isolamento foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T75 (T75 cm² de superfície de área tratada para o cultivo celular) (Tecno Plastic Products). A primeira troca de meio foi realizada após 24hs do isolamento, e as demais trocas foram realizadas com intervalos de dois ou três dias. Apenas as células aderentes foram mantidas em cultura a fim de se obter uma população homogênea em

monocamada. Próximas de atingir a confluência, as células foram descoladas da superfície de cultura com o uso da enzima tripsina/EDTA 10X (Sigma), diluída em PBS e utilizada na concentração de 1X, e expandidas na proporção de 1:3. Células que se apresentavam no intervalo entre a 3ª e 5ª passagens foram utilizadas nos experimentos.

Isolamento de cardiomiócitos neonatais

Cardiomiócitos neonatais foram isolados como descrito por Chlopčiková e colaboradores em 2001. Em fluxo horizontal, ratos machos da linhagem Wistar de 4 a 5 dias de idade foram eutanasiados por decapitação, seguindo as normas do CETEA. Seus corações foram rapidamente retirados e coletados em tubo de 50mL contendo 20mL de solução tampão de sal de Hank (Hank's Buffered Salt Solution – HBSS) gelada. O HBSS é composto de 0,137 M de NaCl, 5,4 mM de KCl, 0,25 mM de Na₂HPO₄, 0,44 mM de KH₂PO₄, 1,3 mM de CaCl₂, 1,0 mM de MgSO₄ e 4,2 mM de NaHCO₃ (todos Vetec). Em fluxo laminar, os corações foram cortados, lavados em HBSS para retirada de hemácias e adicionados a uma solução de tripsina a 1 mg/mL, diluída em HBSS. Os corações permaneceram a 2-3° C por 16 a 20hs, sendo agitados de maneira suave, porém constante. Após esse período, a digestão pela tripsina foi interrompida com a adição de 1 mL de inibidor de tripsina (Roche *Diagnosis Corporation*) e a digestão utilizando colagenase II foi iniciada, com a adição de 10mL de solução de colagenase do tipo II também a 1mg/mL (Sigma), diluída em HBSS. Durante 40 minutos, o tubo permaneceu a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. A cada 5 minutos, a solução era agitada. O conteúdo do tubo foi então filtrado em separadores de nylon (*Cell Strainers*) com malha com poros de 70 µm (BD falcon) e centrifugado por 5 minutos a 300 xg. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura basal acrescido de 10% de SFB e pré-plaqueado em garrafas T75 durante 2 horas em estufa a 37 °C e 5% CO₂, de modo que apenas uma população muito rica em fibroblastos aderisse às placas. O pré-plaqueamento tem como objetivo diminuir a contaminação das culturas com fibroblastos. Após o pré-plaqueamento, realizou-se o plaqueamento das células não aderidas em garrafas T25 ou placas de 6 poços contendo filme de fibronectina (Sigma).

O preparo das garrafas de cultura com fibronectina foi feito com a adição de solução de fibronectina a 0,01 mg/mL diluída em DMEM por 2hs às garrafas de cultura celular e recolhimento prévio ao plaqueamento das células. A solução de fibronectina foi reaproveitada por até 5 vezes. Após 24 horas do plaqueamento, o meio de cultura basal foi substituído por um novo acrescido de 1-β-D-arabinofuranosídeo citosina (ARA-C) em uma concentração de 10ug/mL (Sigma), um inibidor de síntese de DNA, especialmente tóxico

aos fibroblastos. Esse passo objetivou a eliminação e inibição do crescimento de fibroblastos remanescentes do passo de pré-plaqueamento. O inibidor foi retirado após dois dias, sendo que o meio de cultura basal acrescido de SFB foi novamente adicionado às culturas. As culturas de cardiomiócitos foram mantidas por até 7 dias.

Células XR63-IL3

As células da linhagem XR63-IL3 constituem uma linhagem de células produtoras de interleucina 3 (IL-3). Essa linhagem foi estabelecida a partir de células da linhagem X63AG-654, isoladas de um mieloma em *Mus musculus*, que foram transformadas com o uso do vetor pBV-1MTHA contendo o gene IL-3. A XR63-IL3 constituem uma linhagem celular mielóide de morfologia linfoblastóide e foram adquiridas no banco de células do Rio de Janeiro, pertencente à Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de ratas fêmeas da linhagem Wistar foram obtidos como descrito por Hirohashi e Morrison, em 1996. Inicialmente, foi realizada inoculação intraperitoneal de solução de tioglicolato de sódio (Merck), em uma concentração 4% p/v. Após 5 dias da inoculação, os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente. O peritônio dos animais foi lavado com meio de cultura basal e essa solução foi centrifugada a 300xg por 10 minutos. O *pellet* foi então ressuspendido em 1mL de meio basal e as células foram contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, a população rica em macrófagos foi plaqueada e estimulada a secretar IL-6. Essa estimulação consistiu em um pré-tratamento de 6 horas feito por meio da adição do antígeno lipopolissacarídeo (LPS, Merck) na concentração final de 0,5 ng/mL, seguido de um tratamento, no qual a concentração de LPS foi mantida em 100 ng/mL por 18 horas (Shacter *et al.*, 1993).

Células musculares cardíacas isoladas

Ratos machos da linhagem Wistar receberam injeção intraperitoneal de 100 UI de heparina diluída em 100 µL de solução salina. Após 10-15 minutos, os ratos foram eutanasiados por decapitação, e em seguida foi realizada toracotomia. As cartilagens condrocostais foram abertas em ambos os lados e o esterno rebatido para cima, expondo dessa forma a cavidade torácica. Posteriormente, seccionou-se as veias cavas superior e inferior, e as

artérias aorta e pulmonar, a traquéia, o esôfago, juntamente com parte dos pulmões, sendo dessa forma o coração retirado em bloco. Em seguida o coração foi colocado em uma placa de petri que continha 100 ml de solução tampão a aproximadamente 4°C (constituição em mM: NaCl 130, Ácido Láctico 1, Ácido Pirúvico 3, HEPES 25, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.33, D-glicose 22, e 5 µL de solução estoque de insulina a 100 u/ml, com pH em 7.4 ajustado com NaOH), que tinha como objetivo diminuir o metabolismo do tecido cardíaco. Na placa de petri, todos os tecidos, exceto o do coração, foram removidos, deixando amostra o coto da aorta. O coração foi então canulado pelo coto da aorta em uma cânula, com o auxílio de duas pinças, e fixado na cânula por uma linha.

Os corações isolados foram colocados em um Sistema de Langendorff, sendo as células obtidas enzimaticamente como descrito previamente (Roman-Campos *et al.*, 2010). Resumidamente, os corações, no Sistema de Langendorff, foram perfundidos por 5-10 minutos com a solução tampão. Posteriormente os corações foram perfundidos com solução contendo 1mg/ml de colagenase (Sigma). O coração digerido foi removido da cânula e os ventrículos separados e cortados em pequenos pedaços. Células isoladas foram obtidas por isolamento mecânico e mantidas em DMEM. Apenas células tolerantes ao cálcio, quiescentes e com estrias bem definidas foram utilizadas. Os cardiomiócitos isolados foram utilizados entre 2-6 horas após o final da preparação.

3.2 Análise fenotípica das CTM por Citometria de Fluxo

A caracterização fenotípica das CTM isoladas foi realizada por meio de citometria de fluxo e seguiu os parâmetros postulados pela Sociedade Internacional para Terapia Celular em 2006. Portanto, segundo um dos critérios postulados, analisou-se a presença das proteínas de superfície celular CD54, CD73 e CD90, consideradas marcadores positivos para CTM (Bobis *et al.*, 2006 e Dominici *et al.*, 2006). A presença da molécula de superfície celular CD45, considerada um marcador de CTH e células progenitoras de precursores hematopoiéticos (Dominici *et al.*, 2006) também foi averiguada.

Marcação celular com anticorpos primários e secundários

CTM-MO e CTM-TA que se apresentavam na 3ª passagem foram utilizadas para os ensaios de citometria. O processo de caracterização constituiu no descolamento das células

aderidas à superfície das garrafas, coleta e centrifugação do sobrenadante das garrafas. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura para a contagem das células em câmara de Neubauer. Entre 5 e 10. 10⁵ células foram passadas a uma placa de 96 poços de fundo em U, onde foram incubadas por 30 minutos a 4°C com 0,4 µg de anticorpos monoclonais IgG-1 de camundongo contra as estruturas CD45, CD54, CD73 e CD90 (BD Biosciences). Após a incubação, as células foram lavadas com solução de PBS 0,15 M e incubadas novamente por 30 minutos a 4°C com 0,4 µg de anticorpo secundário policlonal de coelho anti-IgG1 de camundongo associado ao fluorocromo Fluoresceína isotiocianato (FITC – Calbichem). Mais uma vez, o excesso de anticorpos não ligados foi lavado com PBS 0,15M e as células foram fixadas em PBS contendo 2% de formaldeído (Vetec). Células incubadas apenas com o anticorpo secundário funcionaram como controle negativo do experimento. Células não incubadas com anticorpos também foram fixadas e utilizadas para definir-se a população celular de acordo com os parâmetros de tamanho versus granulosidade.

Leitura no citômetro de fluxo FACScan

As células incubadas com os anticorpos foram submetidas à análise por citometria de fluxo no aparelho *FACScan* (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). O mínimo de 15000 eventos foi adquirido, utilizando o programa Cell Quest para captura de fluorescência. Os dados foram analisados no programa WinMDI 2.9, no qual a população analisada foi determinada a partir do gráfico tamanho versus granulosidade, gerado pela análise das células não marcadas. O controle negativo também foi considerado na geração do gráfico de histograma.

3.3 Teste de viabilidade celular

A fim de se determinar a viabilidade e o grau de ativação das células cultivadas, realizou-se o ensaio de metabolização do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT). Esse ensaio consiste em quantificar o poder redutor de células que, quando viáveis, são capazes de reduzir um substrato solúvel – o MTT em um produto não solúvel, o cristal formazan. A quantidade de cristais de formazan formados é proporcional ao número de células viáveis, como foi proposto por Mossman em 1983 e confirmado por outros grupos, posteriormente (Yang *et al.*, 2009; Naqvi *et al.*, 2010; Labbaf *et al.*, 2011).

O poder redutor das células viáveis constitui-se, basicamente, na ação de enzimas desidrogenases que transferem os elétrons de NADH e FADH₂ (cofatores dessas enzimas) para seus substratos. A redução de moléculas de NAD⁺ e FAD em NADH e FADH₂ ocorre ao longo da glicólise e ciclo do ácido cítrico, ativos apenas em células vivas e com mitocôndrias funcionais. Células mortas, ao contrário, não realizam glicólise ou ciclo do ácido cítrico e, portanto, não reduzem suas moléculas de NAD⁺ e FAD, não sendo capazes de reduzir substratos como o MTT (Fotakis e Timbrell, 2006).

As CTM utilizadas nestes ensaios apresentavam-se entre a 3^a e 5^a passagens. Neste ponto, foram tripsinizadas e plaqueadas em triplicatas de 1. 10⁵ células por poço em placas de 24 poços (NUNC). Em seguida voltaram a ser incubadas em meio basal acrescido de SFB em estufa de 37° C e 5% CO₂ até que aderissem à nova superfície de cultura (período de 12 a 18 hs). Após esse tempo, retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 210 µL de meio de cultura basal e 170 µL de solução de MTT (Sigma), diluída em PBS a 5 mg/mL, a cada poço. A placa foi novamente incubada em estufa por 2 horas, e, em seguida, observada ao microscópio óptico para visualização dos cristais de formazan formados.

Para se quantificar os cristais de formazan e se determinar indiretamente a viabilidade relativa das células, o ensaio de MTT apresenta um passo de solubilização dos cristais de formazan. Esses cristais, inicialmente insolúveis na solução de meio basal, passam a ser solúveis após a adição de 210 µL de solução de SDS 10%-HCL em cada poço e acabam modificando a absorbância da solução total mensurada a 595 nm em relação ao branco, constituído de meio basal e solução de MTT. O tempo de solubilização dos cristais de formazan é de 18 horas, aproximadamente, e o volume da solução total medido em espectrofotômetro (Anthos 2010 Standart Plus, Biochrom ltd.) foi de 100 µL.

3.4 Ensaio de detecção da Fosfatase Alcalina celular

O ensaio de detecção de fosfatase alcalina celular, utilizado no presente trabalho, foi o de NBT/BCIP (Zymed), o qual se baseia na reação cromatogênica iniciada pela fosfatase alcalina presente nas células, que cliva o grupo fosfato do substrato BCIP (Bromo-cloro-indol fosfato), como ilustra a figura. 1. A reação produz um próton, que associado ao NBT (nitro *blue* tetrazol), gera um precipitado insolúvel púrpura.

Assim como o MTT, o ensaio do NBT/BCIP se baseia em uma reação química que resulta na formação de um cristal de formazan, que dissolvido no meio torna a mensuração da absorbância da solução uma medição quantitativa direta da quantidade de formazan formado. A quantidade de formazan formado é diretamente proporcional à quantidade de substrato (padronizada no ensaio) e, indiretamente proporcional à quantidade de enzima produzida pela célula.

O procedimento realizado consistiu na tripsinização e plaqueamento, feitos como descrito para o ensaio do MTT. Após o período inicial de incubação e adesão das células à superfície de cultivo, houve a retirada do meio de cultivo e substituição deste

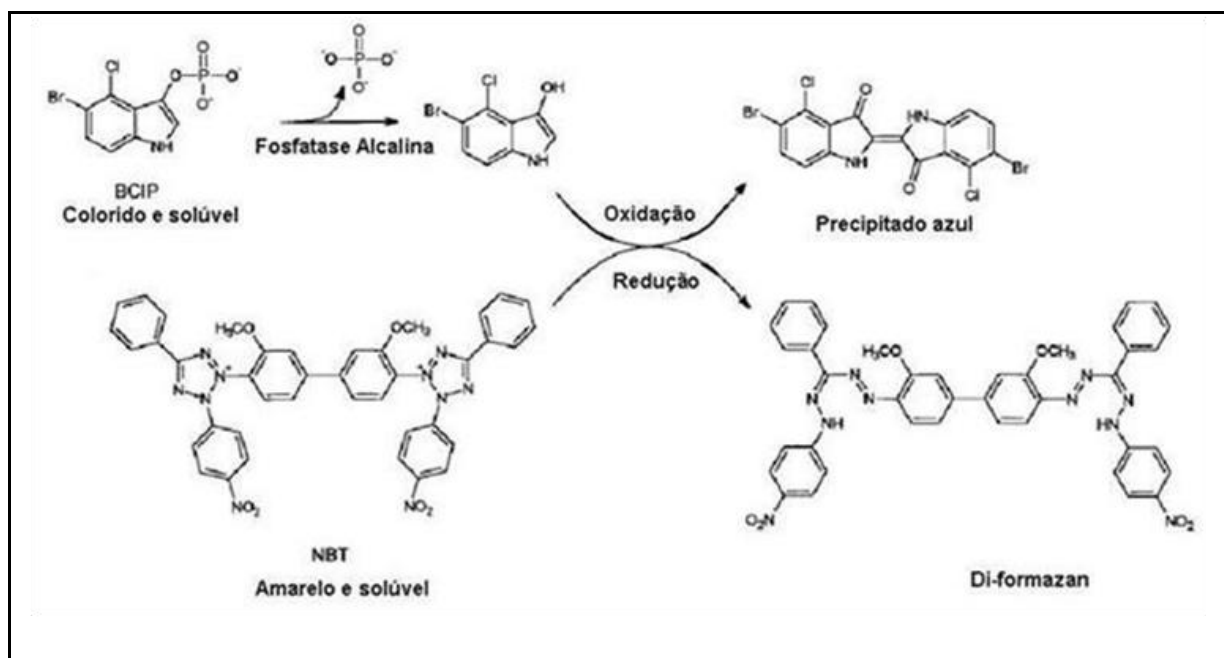


FIGURA 1 – Reação da fosfatase alcalina sobre o substrato BCIP e redução concomitante do NBT.

Fonte: <<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1681451a.pdf>>.

Acesso em: 28 maio 2010.

por 210 μ L de solução de NBT/BCIP, preparada de acordo com as instruções do fabricante. Após 2 horas de incubação, cada poço recebeu 210 μ L de SDS10%-HCL. Assim como o ensaio do MTT, o ensaio da produção da fosfatase alcalina se torna quantitativo pela dissolução do precipitado e a leitura de 100 μ L da solução resultante a 595 nm. Assim, após a adição de SDS10%HCL, incubou-se as placas por 18 horas, e retirou-se 100 μ L de cada poço para a determinação da absorbância a 595 nm.

3.5 Dosagem relativa de colágeno

A quantidade de colágeno produzida pelas CTM foi mensurada relativamente por meio do ensaio de marcação utilizando Sircol (*Sircol collagen assay* – Biocolor). Para este ensaio, as células foram tripsinizadas e plaqueadas seguindo o mesmo procedimento utilizado nos ensaios de MTT e FA. Após o período de adesão das células, estas foram lavadas com PBS e fixadas com Bouin, por 1 hora a temperatura ambiente. A solução de Bouin é constituída de ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial (todos Vetec) na proporção de 15:5:1. Após esse período, as células foram lavadas e deixadas para secar naturalmente. Neste momento adicionou-se solução de *Sircol Red* a 0,6 mg/mL diluída em ácido pícrico, corante específico para colágeno. A coloração foi incubada sob agitação por 30 minutos a temperatura ambiente. O excesso de corante foi então retirado nas lavagens com solução de HCl (Vetec) preparada a 0,01N. A quantificação da produção de colágeno foi feita solubilizando-se o corante associado ao colágeno em 300 µL de NaOH (Grupo química) e realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 540nm (Valerio *et al.*, 2004).

3.6 Detecção de nódulos de mineralização por coloração de Von Kossa

A diferenciação osteogênica das CTM foi atestada pela capacidade de células da linhagem osteogênica mineralizar a MEC. A detecção de nódulos de mineralização foi realizada com coloração de Von Kossa e seguiu o seguinte protocolo: inicialmente CTM-MO e CTM-TA que se apresentavam na 3ª passagem foram tripsinizadas, contadas e plaqueadas em placas de 6 poços (TPP) contendo lamínulas de vidro (Easy Path) com 22x22mm. As CTM foram então cultivadas por 14 dias em meio basal ou meio osteogênico. Após esse período, realizou-se a coloração de Von Kossa (adaptado de Prophet *et al.*, 1992). Para isso, retirou-se o meio dos poços, lavou-se com PBS 0,15M e fixou-se as células com álcool 70% por 24hs. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas em água destilada, e incubadas em solução de nitrato de prata (Cennabras) a 5% p/v em água destilada, por 2 horas em uma câmara escura contendo apenas uma fonte de luz incandescente. As lamínulas foram então lavadas novamente em água destilada, e incubadas em solução de tiosulfato de sódio (Labsynth) 5% p/v em água destilada por 5 min. As lâminas foram então contra-coradas com eosina, lavadas novamente com água destilada, álcool 95%, álcool absoluto e xilol. Por fim, as lâminas foram montadas e os nódulos contados em microscópio sob aumento de 40x.

3.7 Extração de RNA e RT-PCR

Extração de RNA total

O comprometimento à linhagem cardíaca das CTM foi atestado considerando-se a análise da expressão do fator de transcrição GATA-4 em cada tempo de análise (0, 1, 4, 7 e 14 dias de diferenciação). Para isso, isolou-se o RNA total das células cultivadas em garrafas T25 utilizando-se o reagente *Trizol* (Invitrogen) e seguindo-se as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi efetuada por meio da avaliação das absorvâncias a 260nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280nm. O RNA também foi analisado quanto a possível contaminação por DNA genômico, por meio da realização de um ensaio de PCR (*Polimerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando os iniciadores para o gene ubíquo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). As amostras de RNA contaminadas com DNA genômico foram submetidas à ação de enzima DNase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Neste momento, 1 µg de RNA de cada amostra foi utilizado para a construção da fita de DNA complementar, utilizando-se o kit de síntese de cDNA fita simples *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas). O cDNA obtido foi utilizado na PCR descrita abaixo.

3.9 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O cDNA sintetizado foi utilizado em reações de amplificação utilizando iniciadores (tabela 1) para os genes *gata-4* e *gapdh*, o último constituindo o controle positivo. A reação em cadeia da polimerase acontece ao longo de vários ciclos compostos por passos nos quais a temperatura é adequada a fim de otimizar as etapas da reação. No início da reação há aquecimento até 94° C, temperatura na qual as fitas de DNA se separam e se tornam disponíveis à replicação. Esse passo dura 3 minutos e meio no primeiro ciclo e 30 segundos nos ciclos posteriores, sendo que é seguido de um passo de 30 segundos no qual a temperatura é ajustada de acordo com o iniciador utilizado, já que nesse passo ocorre o anelamento entre DNA e iniciador. Após o anelamento, a extensão da cadeia de DNA é promovida a 72° C, temperatura ótima da enzima polimerase utilizada. Esse ciclo foi então repetido por 29 vezes de modo a se obter amplificação exponencial (2^{29}) da seqüência de DNA flanqueada pelos iniciadores. A amplificação terminou com mais um passo final de alongamento, desta vez com duração de 6 minutos. Os produtos da amplificação foram

submetidos a eletroforese em gel de agarose ultrapura (Invitrogen) a 2% adicionado de SYBR Safe (Invitrogen - molecular probes). A análise do número de pares de base do amplicon obtido foi realizada por meio da comparação com um padrão de peso molecular *Gene Ruler™ 100bp DNA ladder* (Fermentas).

TABELA 1 – Iniciadores utilizados

Iniciador	Seqüência Senso (sentido 5'-3')	Seqüência Antisenso (3' 5')	Amplicon
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTA	GGATGCAGGGATGATGTTTC	177pb
GATA-4	TCTCACTATGGGCACAGCAG	CGAGCAGGAATTTGAAGAG	244pb
Colágeno II	GCGTGAGGTCTTCTGTG	GGAGACTACTGGATTGA	492pb

Fonte: Pesquisa direta, 2008.

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)

O cDNA produzido como descrito anteriormente foi utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real. Esta técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação de PCR, através da ligação de uma sonda específica ou de um corante fluorescente, na fita recém sintetizada. As reações, feitas sempre em triplicata, foram realizadas utilizando-se os cDNA produzidos, iniciadores específicos para cada gene analisado (tabela 2) e o reagente *SyberGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems), que além de conter todos os reagentes necessários para PCR (dNTP's, MgCl₂, tampão, *Taq Ampli-Gold*), continha o corante *SYBRGreen*, componente intercalante de dupla fita. Como controle negativo das reações, foram utilizadas reações nas quais, ao invés de se adicionar as amostras de cDNA, foi adicionado água estéril.

Todo procedimento para a PCR em tempo real foi feito na plataforma de instrumentação *ABI Prism 7900* (Applied Biosystems). As reações foram realizadas utilizando-se 45 ciclos de 15 s a 95°C para desnaturação, 1 min a 60°C para anelamento e 1min a 75°C para extensão, seguido de mais 10 min a 75°C para o término da reação. Os resultados foram apresentados pelo programa *GeneAmp 5700SDS* (Applied Biosystems) em gráficos de fluorescência versus número de ciclos. O ciclo no qual se detecta fluorescência acima do limite basal estabelecido (*threshold*) é denominado ciclo de *threshold* ou *Ct*. Quanto maior a expressão de um gene, ou seja, quanto mais cópias existirem no início da reação, mais precocemente ocorre a amplificação e conseqüentemente, menor é o *Ct* detectado.

3.9 Ensaios de Imunofluorescência

Para a realização de ensaios de imunofluorescência, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo lamínulas de vidro (Easy Path) de 22 x 22 mm. Após a adesão das células na superfície da lamínula (período de 12 a 18 hs), realizou-se o seguinte protocolo de marcação das proteínas de interesse: primeiramente, as células foram fixadas incubando-as em solução de paraformaldeído 4% p/v, diluída em PBS, por 10 minutos. Em seguida, lavou-se os poços por duas vezes com PBS, e permeabilizou-se as células incubando-as em solução de Triton X-100 a 0,1% v/v, diluída em PBS. As células foram então mantidas por 1 hora em solução de bloqueio, constituída de: 1% p/v de soro albumina bovina (BSA) e 5% v/v de soro de cabra, diluídos em PBS. Após o bloqueio, as células foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente em solução de PBS 1% BSA acrescida com anticorpos primários, de acordo com a tabela 3. Após a incubação com anticorpos primários, as células foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos utilizando-se PBS, sendo em seguida incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em solução de PBS 1% BSA acrescida com os seguintes anticorpos secundários: anti-camundongo associado ao fluorocromo Alexa-555 para os anticorpos anti-CD45, anti-CD54, anti-CD73, anti-CD90 e anti- α -actinina sarcomérica; anti-coelho associado ao fluorocromo Alexa-555 para os anticorpos anti-conexina43, todos usados na concentração de 1:500, e todos da Invitrogen.

TABELA 3 – Anticorpos primários utilizados nas Imunofluorescências

Anticorpo	Concentração	Espécie	Fabricante	Número de Catálogo
Anti-CD45	1:50	Camundongo	BD Pharmingen	610266
Anti-CD54	1:50	Camundongo	BD Pharmingen	554967
Anti-CD73	1:50	Camundongo	BD Pharmingen	551123
Anti-CD90	1:50	Camundongo	BD Pharmingen	554895
Anti- α -actinina sarcomérica	1:50	Camundongo	Abcam	9465
Anti-Conexina 43	1:30	Coelho	Abcam	11370

Fonte: pesquisa direta, 2010

Finalmente, incubou-se as células por 20 minutos em solução de Hoechst, uma sonda fluorescente de núcleo, a 200 ng/mL, diluída em PBS. Após 5 lavagens de 5 minutos em PBS, as lamínulas foram montadas utilizando-se solução de Hydrmount. As imagens de

imunofluorescência foram obtidas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 meta, com objetiva de imersão em óleo de 63X, abertura numérica de 1,4 e a íris (pinhole) mantida abaixo de 2 um. As análises foram realizadas utilizando o software *Image J*.

3.10 Experimentos de Eletrofisiologia

Registros no modo *whole patch clamp: current e voltage-clamp*

Para a realização dos experimentos de eletrofisiologia, foi utilizada a técnica de *Whole Cell Patch Clamp*, técnica na qual é possível fazer registros de correntes que fluem através da célula em análise. Basicamente, esta técnica consiste em pressionar uma micropipeta de vidro, preenchida com uma solução eletrolítica adequada e, no presente trabalho, com resistência variando de 1 e 2 M Ω . A pipeta é encostada na célula, e é aplicada de uma pressão negativa, permitindo que se forme um gigaselo, entre a pipeta e a membrana plasmática (MP). Posteriormente, a região da MP pressionada pela micropipeta é rompida, de forma a se obter acesso ao interior da célula (isto é, de toda/*Whole* a célula/*Cell*). Na região onde existia um contato entre a pipeta e a célula, forma-se um orifício, por onde é permitido ao amplificador controlar as propriedades elétricas da célula. Sendo assim, quando ocorre a abertura dos canais iônicos, o fluxo de íons por eles gera uma corrente que é passível de mensuração pelo amplificador, que está conectado a pipeta. A corrente iônica, medida nestas condições, reflete a atividade de uma grande população de canais amostrados de uma célula inteira e, por isso, é denominada uma corrente macroscópica (Cheffer, 2008).

No presente experimento, amplificadores EPC-9.2 (HEKA Electronics) foram utilizados para realizar a técnica de *Whole Cell Clamp* (configurações de *whole cell voltage* e *current clamp*), sendo que os parâmetros registrados foram: potencial de membrana e corrente macroscópica (Roman-Campos *et al.*, 2010). Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (23 a 26 °C). Todos os registros foram realizados com configuração

específica do amplificador: a) Para medir as correntes iônicas, foi utilizada a configuração *Whole-cell voltage clamp*; b) Para medir potenciais de ação, foi utilizada a configuração *Whole-Cell current clamp*. Em todas as medições, após o rompimento da MP, esperou-se de 3 a 5 minutos, de forma que a solução interna da micropipeta se equilibrasse com o citoplasma. Nos experimentos de Voltage-clamp, utilizou-se filtro com corte a 2.9 kHz. A

resistência em série foi de 3-5 mΩ. Uma compensação eletrônica de 40 a 70% foi realizada na maior parte dos experimentos de *whole-cell voltage-clamp*.

Potencial de Ação (PA) e Corrente Total

A medida da corrente total foi realizada com o preenchimento das pipetas com a seguinte solução (em mmol/L): 130 de K-aspartato, 20 de KCl, 10 de HEPES, 2 de MgCl₂, 5 de NaCl, 5 de EGTA, sendo o pH final ajustado para 7.2. A solução utilizada no lado externo da pipeta foi a solução de Tyrode, cuja composição, em mmol/L é: 140 de NaCl, 5.4 de KCl, 1 de MgCl₂, 1.8 de CaCl₂, 10 de HEPES, 10 de glicose. Desta vez, o pH final foi ajustado para 7.4. A corrente iônica total foi induzida seguindo o seguinte protocolo: início a -80 mV, durante 25 ms; hiperpolarização a -120 mV durante 100 ms, seguida de incrementos de 10 mV no intervalo de -80 a 70 mV durante 300 ms, em uma frequência de 0.1 Hz e uma frequência de amostragem de 10 kHz.

PA foram mensurados partindo-se de um potencial de membrana de -80 mV. A fim de se verificar a ocorrência de PA nos grupos experimentais, foi aplicada uma corrente de 0 a 1 nA, com incrementos de 0.1 nA. A onda induzida foi uma onda quadrada com a duração de 5 ms a 1 Hz. Quando houve PA, foram registrados de 30 a 50 PAs por célula, até que uma condição estável fosse atingida, sendo que o último PA foi utilizado para análise. Uma frequência de registro de 10 kHz foi utilizada nos ensaios. Foram avaliados a máxima despolarização, a taxa máxima de despolarização e a duração do PA até atingir 10, e 90 % de repolarização. Para análise destes experimentos, foi utilizado um software desenvolvido no laboratório de Membranas Excitáveis e de Biologia Cardiovascular, do departamento de Bioquímica da UFMG, Origin 8.0 e Sigmaplot 11.0.

3.11 Análise Estatística

A análise estatística foi iniciada com o estudo dos dados gerados nos diversos ensaios. Primeiramente verificou-se se os dados seguiam distribuição normal. Para tanto, o empregou-se o programa Sisvar (Ferreira, 2008), desenvolvido na Universidade Federal de Lavras, e disponível gratuitamente para download na internet. O teste empregado foi o de Shapiro-Wilk.

Os conjuntos de dados que apresentaram distribuição normal foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) e pós-teste Student-Newman-Keuls (SNK) para as variáveis: tipo celular (CTM-TA ou CTM-MO) e meio cardiomiogênico (Meios cardiomiogênicos I e II), e pós-teste Skott-knott para os tempos de cultura nos meios cardiomiogênicos (0,1,4,7,14 e 21 dias em cultura).

Os dados que não apresentaram distribuição normal (quantificação de nódulos de mineralização e dados das PCR em tempo real) passaram por transformação (análise estatística realizada após transformação logarítmica dos dados de PCR em tempo real) ou foram analisados utilizando-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (quantificação de nódulos de mineralização).

A comparação dos grupos com cardiomiócitos adultos foi por análise computacional intensiva, estipulando em 10.000 o número de reamostragens do tipo "bootstrap" ($p < 0,05$).

Os dados dos ensaios de eletrofisiologia foram plotados como média (desvio padrão). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas com a utilização ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni. Para estas análises foram utilizados softwares produzidos no laboratório de Membranas Excitáveis e de Biologia Cardiovascular, do departamento de Bioquímica da UFMG, além do Origin e Sigmaplot (Cruz e Matsuda, 1994).

Em todos os testes, o nível de significância estatística adotado foi 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 As Células isoladas da Medula Óssea e do Tecido Adiposo são Células-Tronco Mesenquimais

O primeiro passo de qualquer trabalho que envolve a utilização de CTM é a comprovação da população com a qual se trabalha, já que os protocolos e fontes teciduais utilizados para o isolamento dessa população variam entre os diferentes grupos de pesquisa.

O presente trabalho segue a recomendação da Sociedade Internacional para a Terapia Celular e do Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais, que em 2006 definiram os seguintes parâmetros (também retratados na tabela 4): 1. as CTM devem apresentar a capacidade de adesão à superfície de cultura; 2. a população de CTM deve apresentar um perfil fenotípico definido e 3. as CTM devem apresentar potencial de diferenciação multipotente.

TABELA 4 – Sumário dos critérios de identificação das CTM

1	Aderência ao plástico		
2	Perfil fenotípico	Marcadores positivos (>95%):	Marcadores negativos (<2%):
		CD105	CD45
		CD73	CD34
		CD90	CD14 ou CD11b
			CD79α ou CD19
			HLA-DR
3	Diferenciação <i>in vitro</i> em osteoblastos, adipócitos e condroblastos		

Fonte: Modificada a partir de Dominici *et al.*, 2006

A capacidade de adesão das CTM à superfície de cultura foi atestada e utilizada como propriedade de isolamento durante o isolamento celular. Uma vez aderidas à superfície de cultivo, as CTM-MO e CTM-TA apresentaram formato fibroblastóide, como demonstrado na figura 2. Durante os primeiros dias de cultivo da população isolada dos tecidos, é comum observar-se células não aderentes nas culturas, como indicado nas setas brancas. À medida que o meio vai sendo trocado, porém, este tipo celular não aderente é permanentemente retirado da cultura.

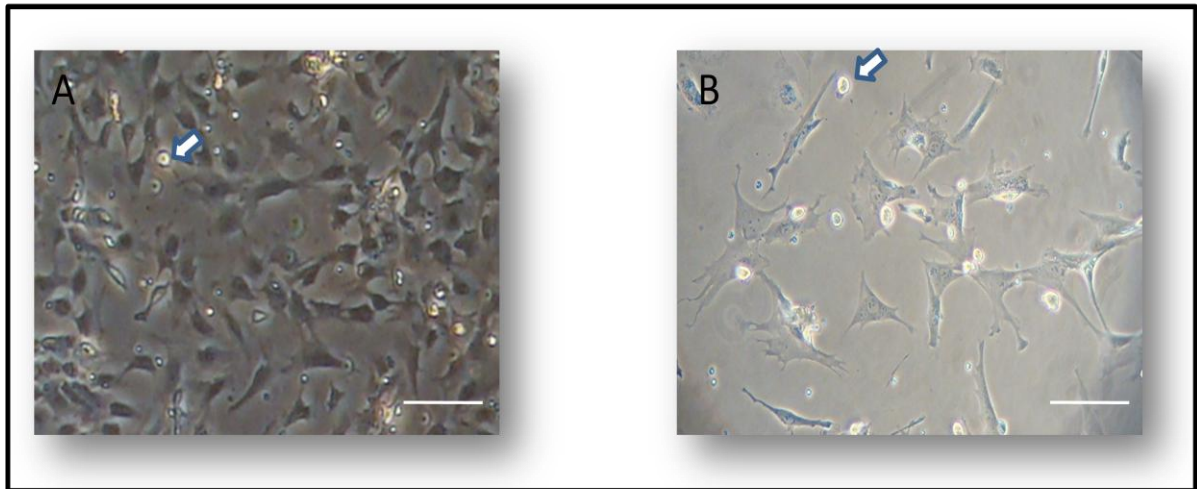


FIGURA 2: Cultura celular de Células-tronco Mesenquimais isoladas da Medula Óssea (A) e Tecido Adiposo (B) de ratos Wistar. Documentação fotográfica de microscopia ótica de CTM a fresco. CTM apresentam formato fibroblastóide, como demonstrado em A para as CTM-MO e em B para as CTM-TA. No período inicial das culturas, é comum a presença de células não-aderentes, indicadas nas setas.

Uma vez estabelecidas as culturas de CTM, foi realizado o ensaio de imunofenotipagem, mais uma vez seguindo as recomendações da Sociedade Internacional para Terapia Celular e do Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais. O ensaio de imunofenotipagem consistiu primeiramente na determinação da população analisada, através da produção de um gráfico de tamanho versus granulosidade. Em seguida, realizou-se a determinação do nível de expressão dos marcadores CD45, CD54, CD73, e CD90 nas populações. Ensaio de imunofluorescência e citometria foram realizados de modo a demonstrar a localização celular destes marcadores de superfície, e a obter os níveis de expressão destes marcadores nas populações de células estudadas como um todo, respectivamente. Como preconizado, e retratado nas figuras 3 e 4, as CTM-MO e CTM-TA apresentaram padrão fenotípico semelhante ao de CTM clássicas, sendo ele: CD45⁻, CD54⁺, CD73⁺ e CD90⁺. Os marcadores testados constituem proteínas de superfície e assim sendo, apresentaram o padrão de marcação celular esperado, como retratado na figura 5.

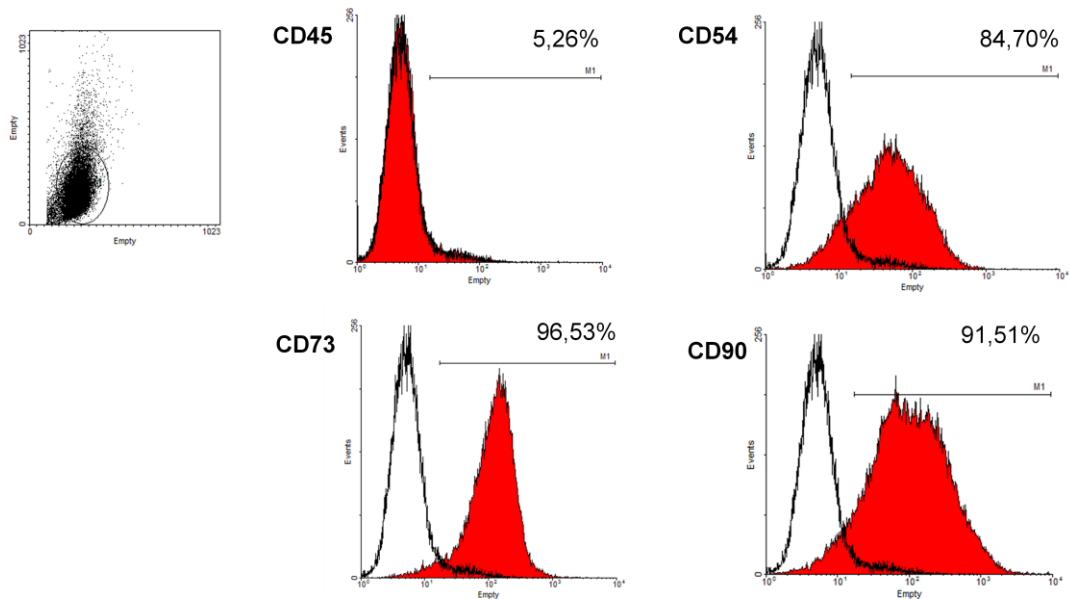


FIGURA 3: Caracterização fenotípica das CTM-MO. Os gráficos acima mostram o perfil de expressão das CTM-MO dos marcadores CD45, CD54, CD73 e CD90. A linha preta constitui a fluorescência do controle negativo. Em vermelho, a fluorescência da população de células analisadas, definida no gráfico de tamanho *versus* granulosidade. A porcentagem das células positivas para cada marcador é informada no canto superior direito de cada histograma e é constituída pelos pontos localizados na região M1.

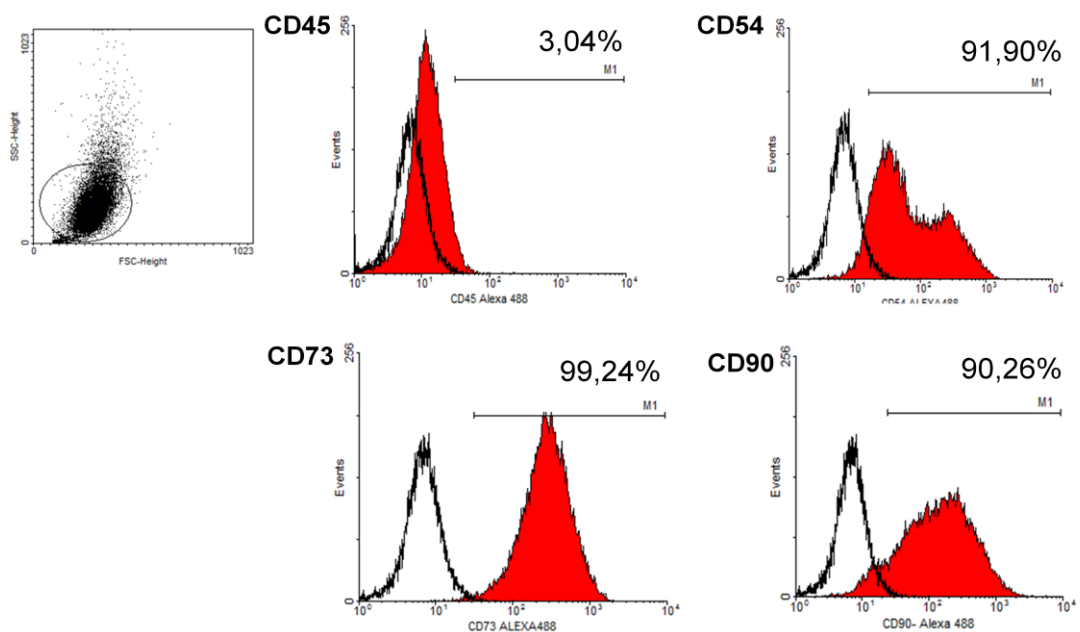


FIGURA 4: Caracterização fenotípica das CTM-TA. Os gráficos acima mostram o perfil de expressão das CTM-TA dos marcadores CD45, CD54, CD73 e CD90. A linha preta constitui a fluorescência do controle negativo. Em vermelho, a fluorescência da população de células analisadas, definida no gráfico de tamanho *versus* granulosidade. A porcentagem das células positivas para cada

marcador é informada no canto superior direito de cada histograma e é constituída pelos pontos localizados na região M1.

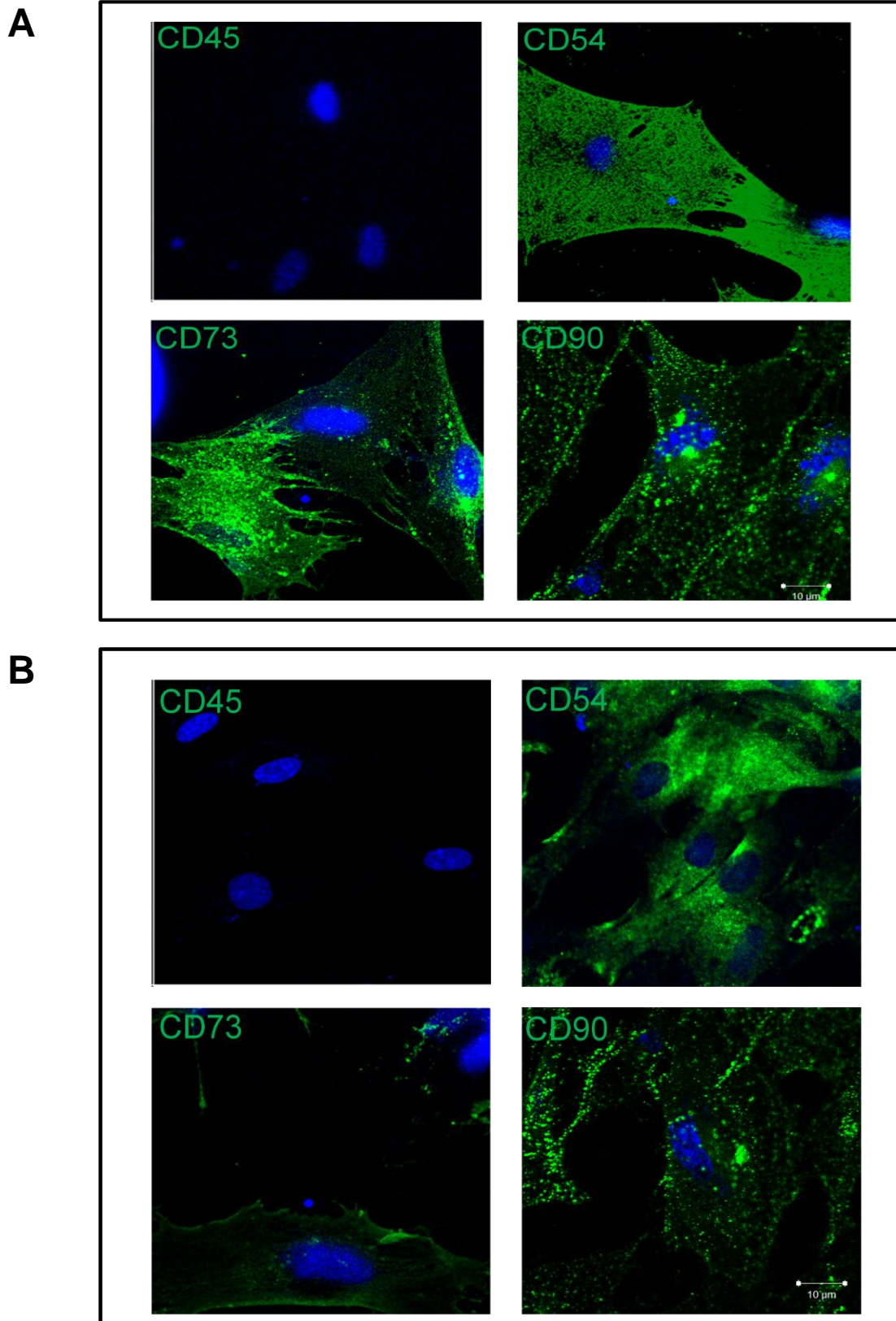


FIGURA 5: Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão dos diversos marcadores das populações de CTM (CTM-MO em A e CTM-TA em B). O perfil apresentado foi de CD45⁻, CD54⁺, CD73⁺ e CD90⁺.

Por fim, atendendo ao terceiro critério de comprovação da multipotencialidade das células isoladas, realizou-se os ensaios de detecção da diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM isoladas.

As CTM foram cultivadas em meios indutores destas duas linhagens por 14 dias, sendo depois utilizadas nos ensaios de coloração por Von Kossa e isolamento de RNA para detecção da expressão de colágeno do tipo II. Os resultados dos ensaios de Von Kossa estão apresentados nas figuras 6, 7.

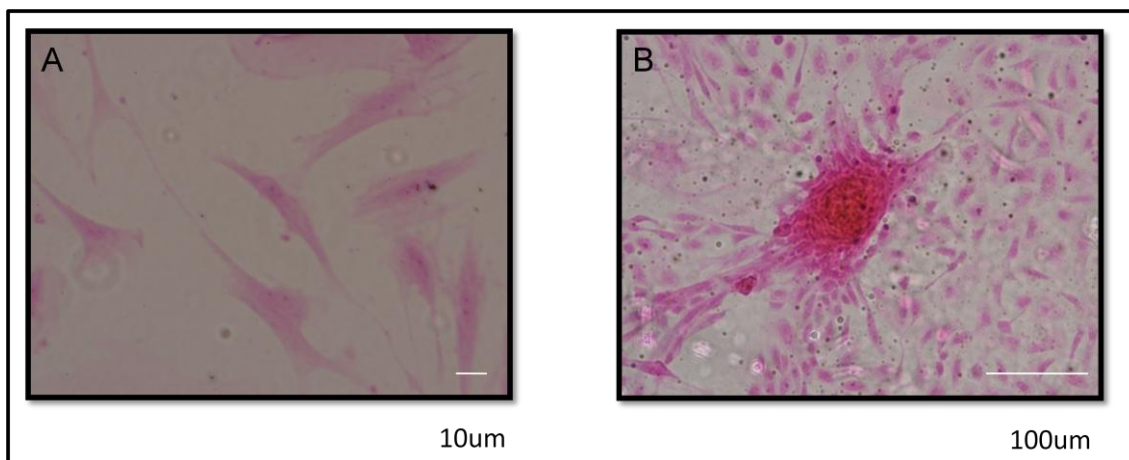


FIGURA 6: Coloração por Von Kossa de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico por 0 e 14 dias. Em contraste às CTM indiferenciadas (A), apenas CTM-MO induzidas a diferenciar em osteoblastos mineralizam a MEC (B). Os nódulos de mineralização apresentam cor amarronzada após coloração por Von Kossa.

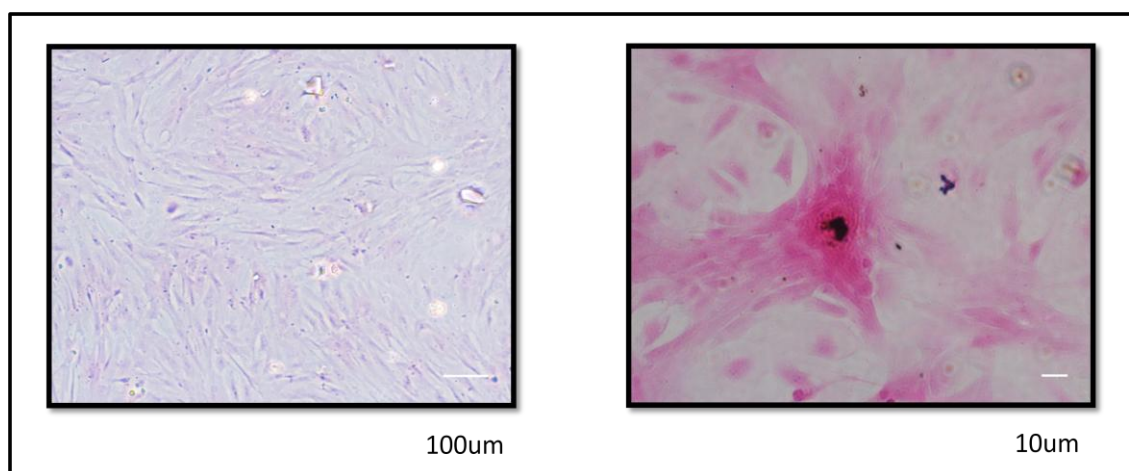


FIGURA 7: Coloração por Von Kossa de CTM-TA cultivadas em meio osteogênico por 0 e 14 dias. Apenas CTM-TA induzidas a diferenciar em osteoblastos mineralizam a MEC. Os nódulos de mineralização apresentam cor amarronzada após coloração por Von Kossa.

O ensaio de Von Kossa detecta nódulos de mineralização, portanto é um ensaio indicativo da diferenciação osteogênica. As células induzidas para este tipo de diferenciação tendem a se agrupar em diversos pequenos agrupamentos de células, nos quais elas sintetizam e mineralizam a MEC. Uma vez em contato com o Nitrato de Prata, a MEC mineralizada se cora ficando escura.

Em relação às células indiferenciadas, tanto as CTM-MO quanto as CTM-TA, induzidas à diferenciação osteogênica, produziram número significativamente maior de nódulos de mineralização como demonstrado nos gráficos 1A e 1B.

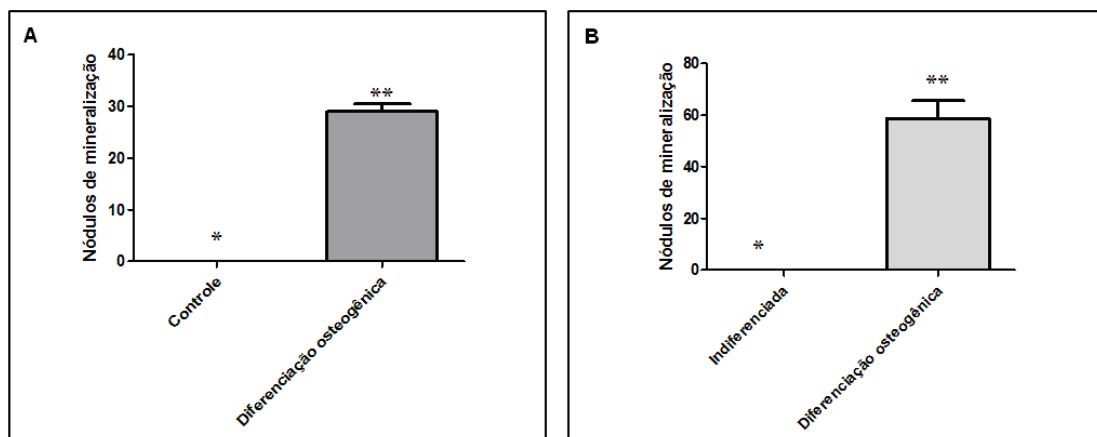


GRÁFICO 1: análise gráfica dos valores obtidos através da contagem direta da formação de nódulos de mineralização por CTM-MO (A) e CTM-TA (B) em cultura. Teste de Kruskal Wallis e $p < 0,01$ em relação às CTM-MO / CTM-TA não diferenciadas (controle).

O ensaio de detecção da diferenciação condrogênica pode ser realizado de diferentes maneiras. A Sociedade Internacional para Terapia Celular e o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais sugerem que a detecção seja feita por colorações que detectem colágeno, porém, no presente trabalho optou-se por detectar a expressão do gene que codifica a proteína colágeno II pela técnica de PCR (figura 8).

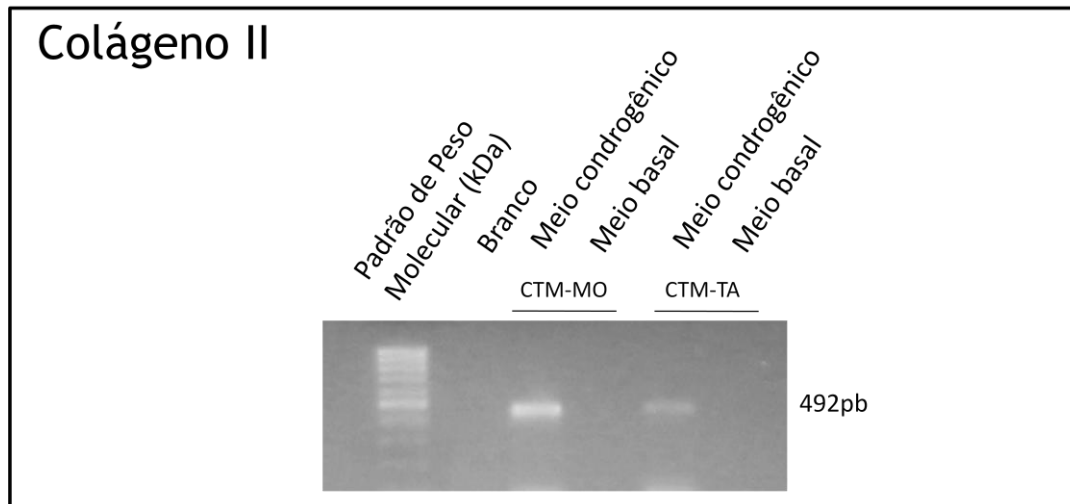


FIGURA 8: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 1% DEMONSTRANDO O RESULTADO DA AMPLIFICAÇÃO DO GENE COLÁGENO II POR PCR. A FIGURA INDICA QUE A TRANSCRIÇÃO DO GENE COLÁGENO II EM CTM-MO E CTM-TA OCORRE APENAS QUANDO ESSAS CÉLULAS SÃO CULTIVADAS EM MEIOS INDUTORES DE CONDRÓGENESE.

O ensaio de PCR para o gene *colágeno II* permite observar que as CTM indiferenciadas não expressam este gene, exclusivo de condrócitos. Após 14 dias de cultivo em meio condrogênico, porém, esse gene passou a ser transcrito.

Apesar de nenhuma das propriedades demonstradas acima serem exclusivas das CTM, unidas, elas permitem determinar que as populações de células isoladas da medula óssea e do tecido adiposo neste trabalho constituem-se de CTM.

4.2 AS CTM cultivadas nos meios de diferenciação cardiomiogênica apresentam diminuição da viabilidade, da produção de Fosfatase Alcalina e de colágeno

Ao longo do cultivo das CTM nos meios de diferenciação cardiomiogênica, a sua viabilidade foi monitorada utilizando-se o ensaio de metabolização do MTT. Os resultados obtidos no ensaio e demonstrados no painel de gráficos 2 indicam que as CTM-TA induzidas a diferenciar-se em cardiomiócitos sobrevivem ou proliferam mais do que as CTM-MO, independente do meio cardiomiogênico utilizado ($p < 0,05$).

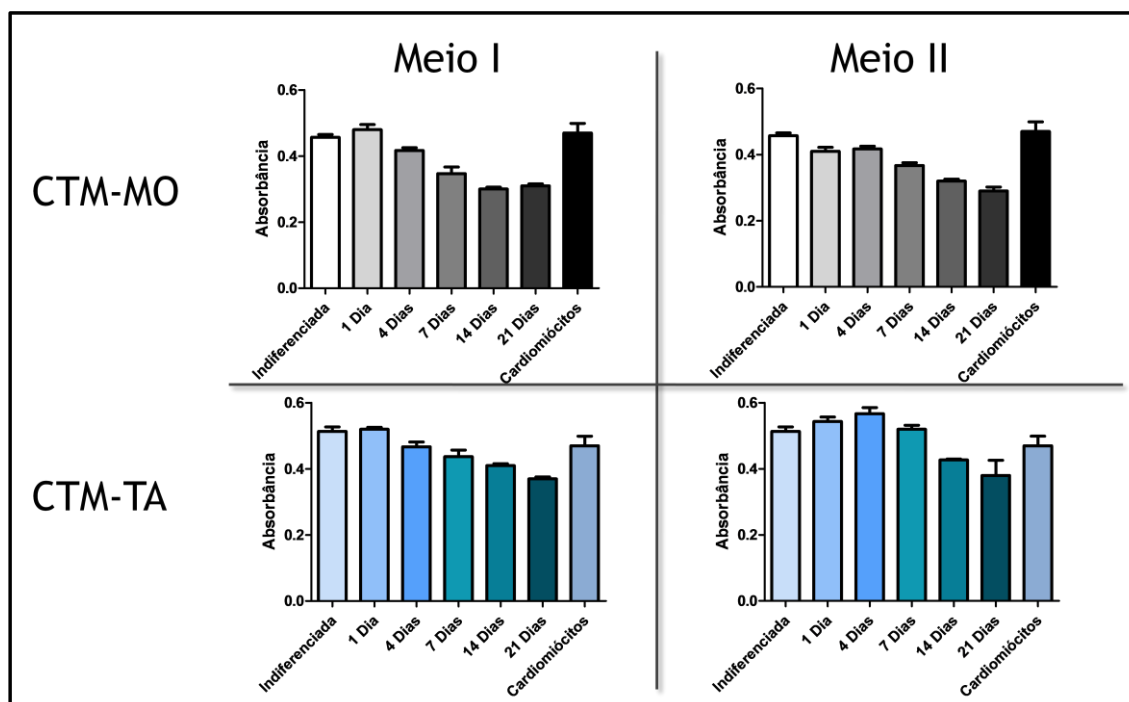


GRÁFICO 2: análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de MTT. Os gráficos acima contém os valores das absorbâncias a 595nm dos ensaios de MTT realizados nas CTM-MO e CTM-TA cultivadas nos meios cardiomiogênicos I e II.

Os resultados dos ensaios de MTT também permitiram observar que as CTM-TA apresentaram maiores níveis de metabolização de MTT quando cultivadas em meio cardiomiogênico II ($p < 0,05$). Em todas as situações analisadas, os níveis de metabolização de MTT foram menores aos 21 dias de cultivo em meios de diferenciação quando comparadas aos níveis de metabolização de MTT em células indiferenciadas ($p < 0,05$).

Os ensaios de metabolização de fosfatase alcalina são indicativos do estado de diferenciação das células-tronco. Quando indiferenciadas, essas células produzem a enzima fosfatase alcalina (Riektina et al.; 2009). Quando seguem a diferenciação cardiomiogênica, por outro lado, estas células diminuem consideravelmente a produção desta enzima. Os ensaios de FA (gráfico 3) permitem indicar que o meio cardiomiogênico I levou a quedas de produção de FA precoces e mais acentuadas quando comparado ao meio II, nas duas populações de CTM estudadas ($p < 0,05$).

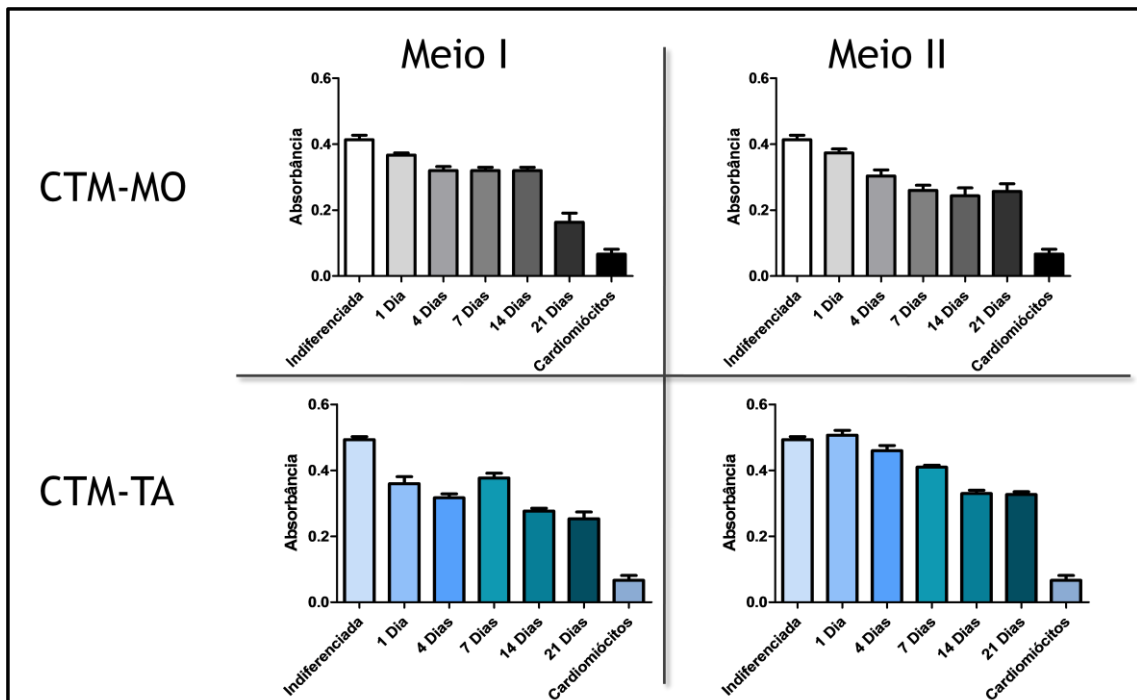


GRÁFICO 3: análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de FA. Os gráficos acima contém os valores das absorbâncias a 595nm dos ensaios de FA realizados nas CTM-MO e CTM-TA cultivadas nos meios cardiomiogênicos I e II.

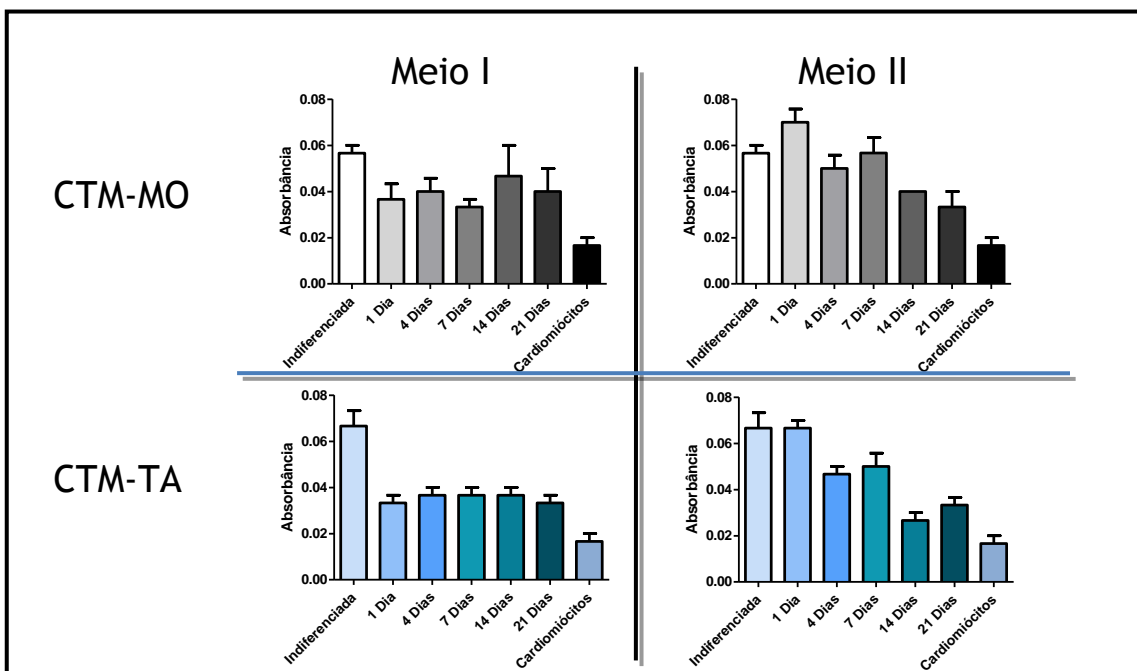


GRÁFICO 4: análises gráficas dos valores obtidos através da leitura da absorbância nos ensaios de dosagem relativa de colágeno. Os gráficos acima contém os valores das absorbâncias a 595nm dos ensaios de dosagem relativa de colágeno realizados nas CTM-MO e CTM-TA cultivadas nos meios cardiomiogênicos I e II.

A produção de colágeno total também foi analisada, já que as CTM produzem níveis elevados de colágeno e remodelam a MEC de maneira mais importante do que os cardiomiócitos. Os resultados obtidos (gráfico 4) indicam, novamente, que o meio I levou a uma mudança fenotípica precoce comparado ao meio II. Enquanto as células cultivadas em meio I diminuíram significativamente a sua produção de colágeno já a partir do primeiro dia de cultivo, as CTM cultivadas em meio II só apresentaram essa diminuição significativa após 14 dias de cultivo. Houve pequenas diferenças de comportamento entre as CTM estudadas, porém estas não foram estatisticamente significativas.

Os ensaios de MTT permitem, portanto, atestar a viabilidade celular ao longo da indução cardiomiogênica. Os ensaios de FA e dosagem de colágeno constituem, por sua vez, os primeiros indícios de diferenciação das CTM.

4.3 As CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos mudam seu padrão de expressão gênica

A expressão gênica das CTM-MO e CTM-TA cultivadas nos meios cardiomiogênicos I e II foi monitorada, a fim de se atestar a responsividade das CTM aos estímulos dos meios, assim como a dinâmica do processo.

A técnica de PCR foi utilizada para o monitoramento da expressão do gene GATA-4, e a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para monitorar a expressão dos genes Nkx2.5, e os genes das cadeias pesadas das miosinas α e β .

Considerando-se a análise da expressão de GATA-4, os ensaios permitiram observar que quando indiferenciadas, as CTM-MO e CTM-TA não apresentam GATA-4. Por outro lado, a análise da expressão gênica das CTM permitiu observar a sua responsividade aos estímulos dos meios: após 1 e 7 dias, as CTM passaram a expressar o gene GATA-4. Apesar de ambas serem responsivas aos meios indutores, CTM-MO e CTM-TA apresentaram dinâmicas diferentes de expressão do gene em questão.

As CTM-MO passaram a transcrever o gene GATA-4 entre o 4^o e o 7^o dia de cultivo em meios indutores, independentemente do meio cardiomiogênico utilizado (figura 9). As CTM-TA, por sua vez, já apresentaram transcritos do gene GATA-4 a partir do 1^o dia de cultivo em meios cardiomiogênicos (figura 10), demonstrando uma resposta mais rápida à indução, se comparadas às CTM-MO. Os resultados das amplificações do transcrito GATA-4 por PCR indicam que o meio I induz a uma maior transcrição de GATA-4, porém não se realizou nenhum ensaio quantitativo para se confirmar a hipótese.

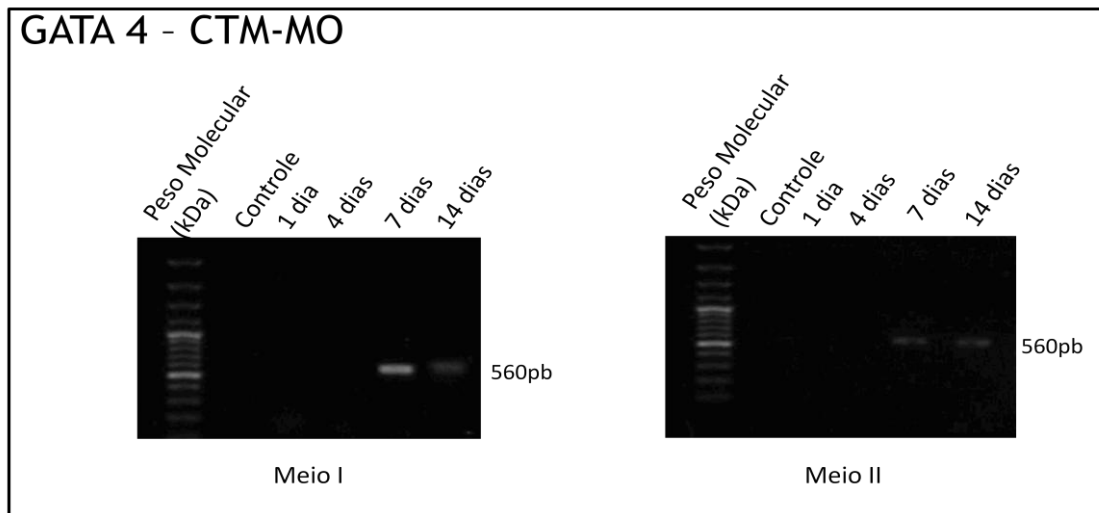


FIGURA 9: eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação do gene GATA-4 por PCR. A transcrição do gene GATA-4 em CTM-MO ocorre entre o 4º e o 7º dia de cultivo em meios cardiomiogênicos I e II.

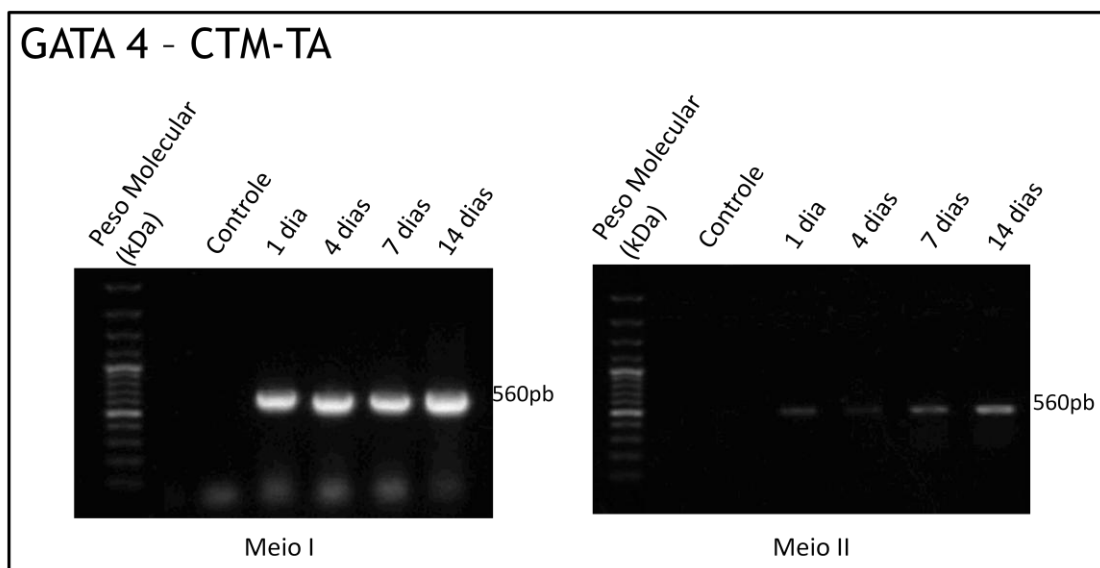


FIGURA 10: eletroforese em gel de agarose 1% demonstrando o resultado da amplificação do gene GATA-4 por PCR. A transcrição do gene GATA-4 em CTM-TA ocorre a partir do 1º dia de cultivo em meios cardiomiogênicos I e II.

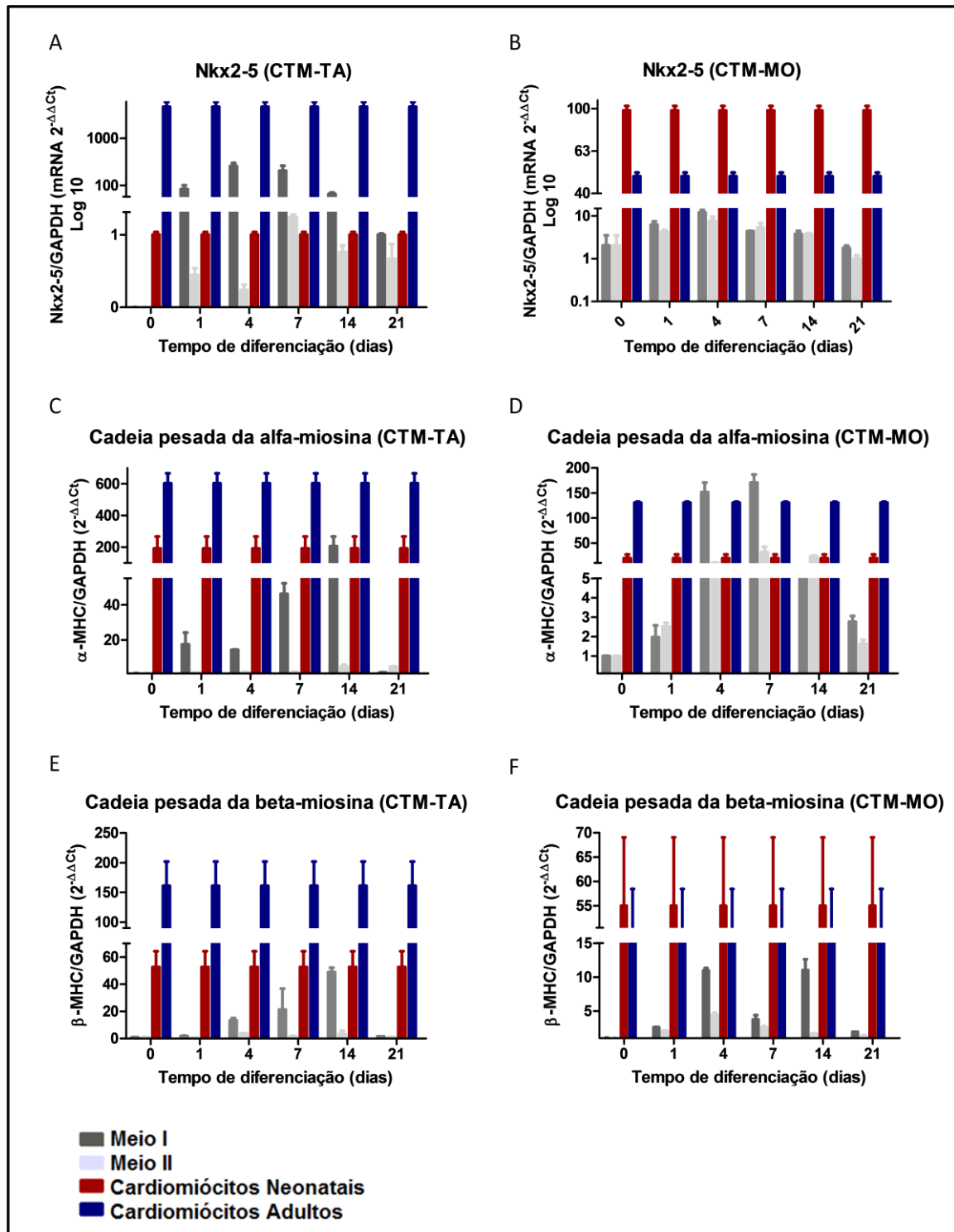


GRÁFICO 5: Representação gráfica da quantificação da expressão relativa dos genes Nkx2-5, α e β MHC em CTM-TA e CTM-MO. Os gráficos acima resumem a relação entre os valores de expressão gênica dos genes Nkx2-5 (A e B), α -MHC (C e D) e β -MHC (E e F), quantificados por PCR em tempo real. Os dados plotados nos gráficos foram normalizados em relação ao gene ubíquo GAPDH e utilizados na forma de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A expressão dos demais genes analisados foi observada realizando-se ensaios de PCR em tempo real, que permitem a quantificação relativa dos transcritos presentes no pool de RNA isolado. Nos ensaios quantitativos, foram incluídos controles positivos da expressão dos genes analisados, sendo eles amostras isoladas de cardiomiócitos neonatais e adultos.

O primeiro gene a ser analisado foi o gene que codifica o fator de transcrição (FT) Nkx2-5, essencial à formação do coração ao longo do desenvolvimento embrionário e à diferenciação cardiomiogênica (gráfico 5A e B). Inicialmente, a expressão de Nkx2-5 em CTM-TA indiferenciadas foi extremamente baixa. A partir do 1º dia de cultivo em meios cardiomiogênicos, porém, a expressão desse gene aumentou significativamente. A mudança de expressão gênica provocada pelos meios cardiomiogênicos variou de acordo com o meio utilizado e com a CTM estudada.

Os dados obtidos sugerem que as CTM-TA respondem mais rapidamente aos estímulos dos meios cardiomiogênicos, chegando a ultrapassar os níveis de expressão desse gene em cardiomiócitos neonatais 24hs após o início do cultivo em meio I. É possível sugerir ainda que as CTM-TA são mais responsivas aos meios cardiomiogênicos quando comparadas às CTM-MO, que não atingem os níveis de expressão gênica apresentados por cardiomiócitos neonatais em nenhum momento. As CTM-MO apresentaram outras características *in vitro*. Apesar de não terem respondido aos estímulos dos meios tão bem quanto as CTM-TA, as CTM-MO apresentaram níveis iniciais de expressão de Nkx2-5 maiores quando comparadas às CTM-TA. Estes níveis, porém, foram ainda muito baixos em relação aos apresentados por cardiomiócitos neonatais e adultos. Por fim, diferente das CTM-TA, as CTM-MO responderam de maneira semelhante ao cultivo nos meios I e II.

As alterações na expressão de Nkx2-5 promovidas pelos meios cardiomiogênicos se caracterizaram por aumentos progressivos até o quarto dia de cultivo em meios de diferenciação, a partir do qual houve diminuição gradual da expressão do FT. Por fim, é importante salientar que em nenhum momento CTM-TA e CTM-MO atingiram níveis de expressão gênica semelhantes aos apresentados por cardiomiócitos adultos.

O segundo gene analisado foi o gene codificador da cadeia pesada da α -Miosina (gráfico 5C e D). A cadeia pesada da miosina é uma proteína contrátil, componente das isoformas V2 e V3 da miosina, proteína essencial à função muscular. Ao contrário do Nkx2-5, a expressão de α -MHC é característica de estágios mais avançados da cardiomiogênese (Martin, Afouda e Hoppler, 2010), e, em concordância com esta observação, os picos de expressão desse gene ocorreram entre o 4º e o 7º dia de cultivo em meios cardiomiogênicos. Novamente, as respostas celulares aos meios variaram de acordo com o tipo celular e o meio

cardiomiogênico. Desta vez, porém, as CTM-TA atingiram níveis de expressão similares aos níveis de expressão de cardiomiócitos neonatais e as CTM-MO superaram os níveis de expressão de cardiomiócitos adultos. As CTM-MO atingiram, portanto, níveis de α -MHC característicos de células funcionais adultas. Novamente, o meio I promoveu maiores mudanças de expressão gênica comparado ao meio II.

Finalmente, a expressão do gene codificador da cadeia pesada da β -Miosina foi acompanhada por 21 dias de cultivo das CTM em meios cardiomiogênicos (figura 5E e F). A isoforma β da cadeia pesada da miosina não é exclusiva de células musculares cardíacas, porém é essencial para atividade contrátil. O pico de expressão dessa proteína também foi tardio em relação ao pico de Nkx2-5. Novamente, os picos atingidos pelas CTM foram discretos e menores dos apresentados por cardiomiócitos neonatais e adultos, com exceção das CTM-TA cultivadas em meio I por 14 dias. Por fim, o meio I se mostrou novamente mais eficiente no aumento da expressão de β -MHC.

As análises de expressão gênica indicam, portanto, uma aproximação do perfil de expressão gênica das CTM diferenciadas do perfil apresentado por cardiomiócitos, o que permite sugerir que a diferenciação está ocorrendo *in vitro*. Os picos de expressão gênica atingidos pelas CTM diferenciadas, porém, se mantêm abaixo dos níveis dos cardiomiócitos funcionais na maior parte das análises.

4.4 As CTM mudam seu perfil fenotípico ao longo da diferenciação cardiomiogênica

Ao longo da diferenciação cardiomiogênica, o perfil fenotípico das CTM, inicialmente analisado para se atestar as populações de células-tronco estudadas, foi monitorado a fim de se averiguar a diferenciação.

O primeiro marcador averiguado foi o CD45. O CD45 é um marcador clássico de CTH, portanto os seus níveis iniciais se mostraram baixos nas populações de CTM-MO e CTM-TA. Por outro lado, os resultados da citometria de fluxo indicam que o meio I levou a um aumento significativo da expressão desse marcador aos 14 e 21 dias de diferenciação de CTM-MO e CTM-TA (gráfico 6).

O marcador CD54 foi o segundo marcador a ser monitorado nas populações de CTM (gráfico 7). Os resultados de citometria de fluxo indicam que a expressão do CD54 diminuiu aos 14 e 21 dias de diferenciação cardiomiogênica, em ambos os meios cardiomiogênicos. A queda na expressão de CD54 foi maior em CTM-TA do que em CTM-MO, demonstrando

uma maior responsividade dessas células aos meios de diferenciação, ao menos em relação a este parâmetro.

O marcador de superfície CD73, uma exo-nucleotidase, também teve seus níveis de expressão monitorados ao longo da indução da diferenciação cardiomiogênica. Neste ensaio, foi possível observar a diminuição dos níveis de expressão deste marcador aos 14 e 21 dias de diferenciação em ambas as populações de CTM e em ambos os meios. Foi possível observar também uma diferença entre as populações de CTM, sendo que as CTM-MO apresentaram menor variação no nível de expressão de CD73 (gráfico 8). Mais uma vez, essa população demonstrou-se menos responsivas aos estímulos dos meios.

Por fim, a proteína de superfície CD90 teve seus níveis de expressão monitorados. Com relação a este marcador, não houve mudança de expressão protéica significativa gerada pelos meios, porém foi possível perceber que como um todo, as CTM apresentaram maiores níveis de expressão desta proteína quando cultivadas em meio II (gráfico 9).

Tomados juntos, os presentes resultados indicam uma mudança fenotípica nas CTM-MO e CTM-TA em resposta aos estímulos dos meios cardiomiogênicos. Apesar de algumas diferenças, as respostas das duas populações de CTM foram semelhantes, assim como os efeitos indutores dos dois meios cardiomiogênicos.

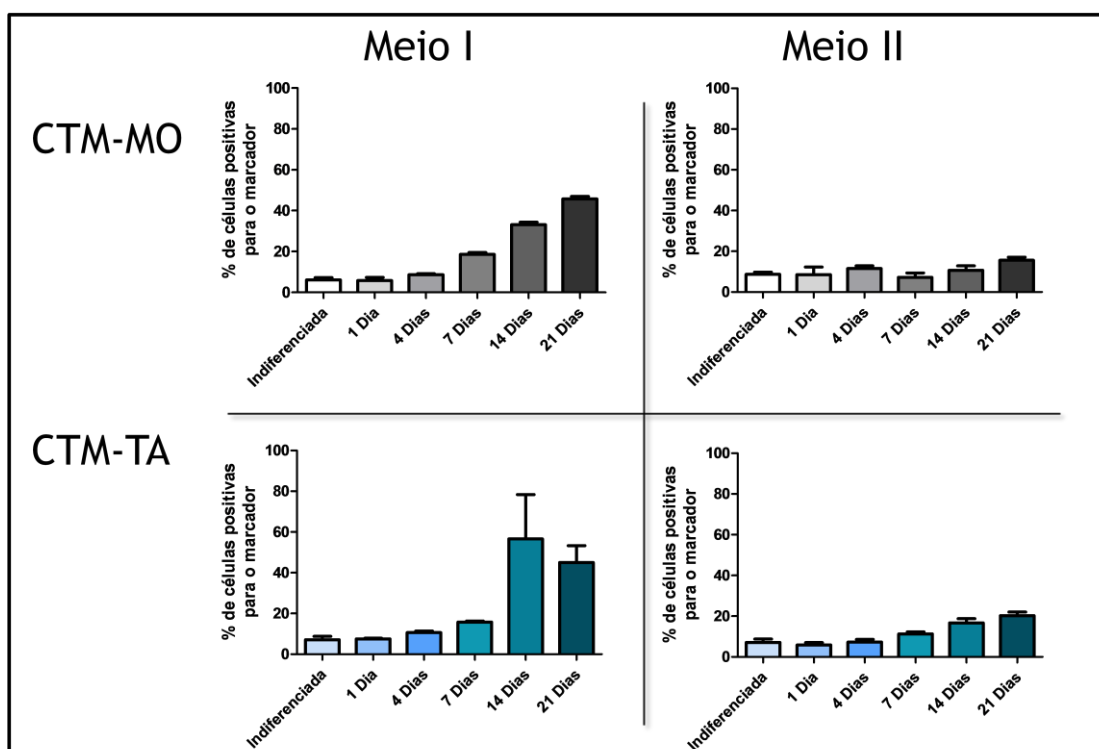


GRÁFICO 6: análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD45 das populações de CTM cultivadas em meio cardiomiogênico I e II.

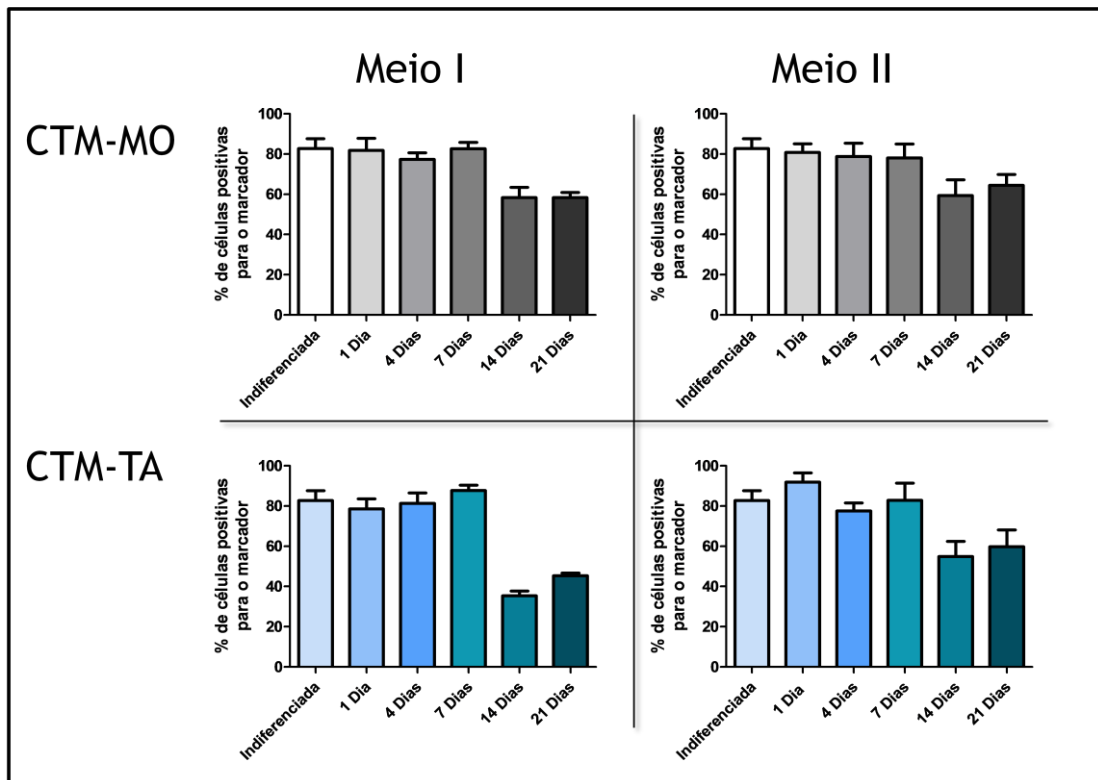


GRÁFICO 7: análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD54 das populações de CTM cultivadas em meio cardiomiogênico I e II.

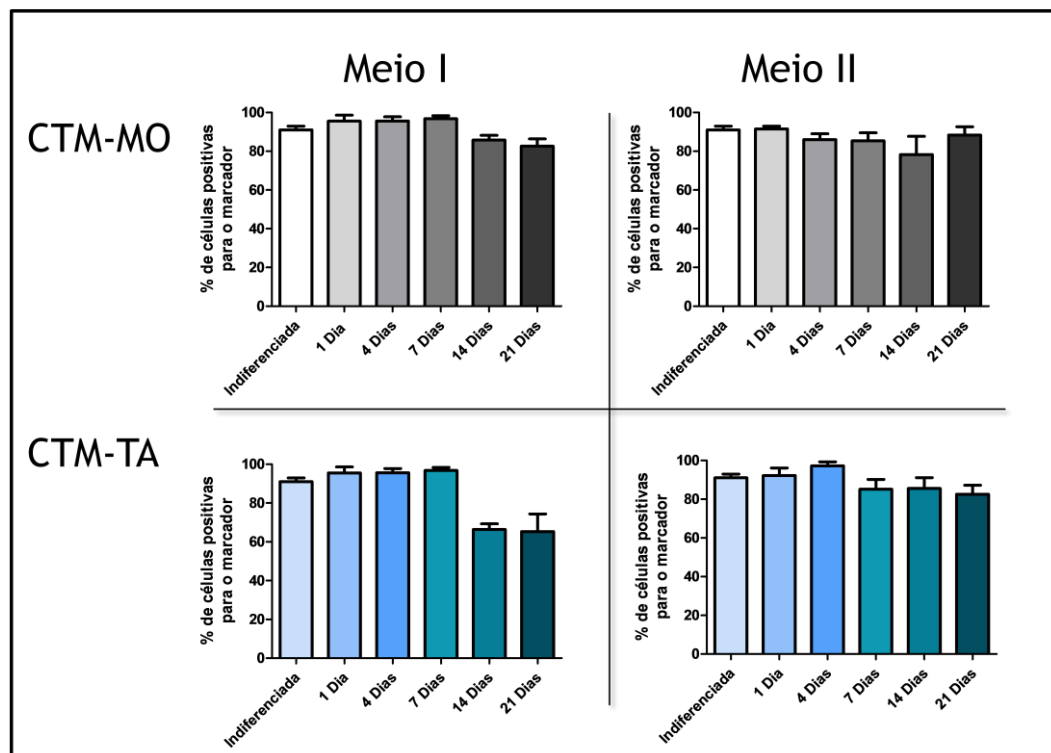


GRÁFICO 8: análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD73 das populações de CTM cultivadas em meio cardiomiogênico I e II.

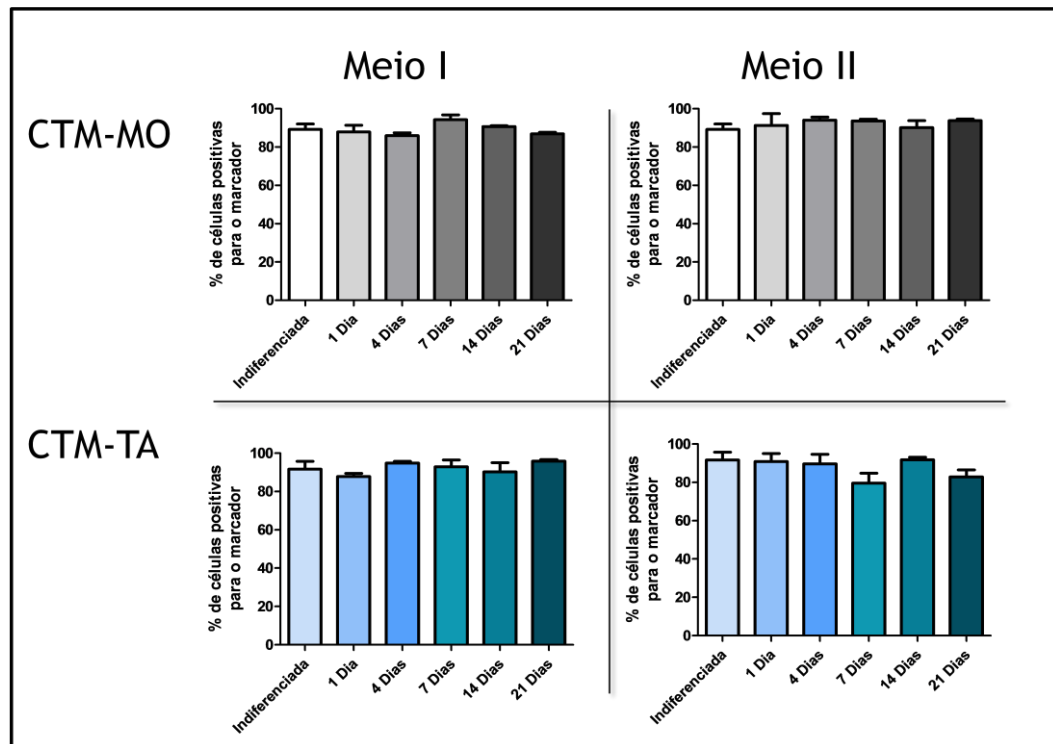


GRÁFICO 9: análise gráfica das porcentagens de células positivas para o marcador CD90 das populações de CTM cultivadas em meio cardiomiogênico I e II.

4.5 As CTM cultivadas em meios cardiomiogênicos passam a expressar proteínas importantes para a função de cardiomiócitos

Além da expressão gênica e do perfil fenotípico, a expressão protéica das CTM cultivadas nos meios cardiomiogênicos foi analisada através de imunofluorescência para algumas proteínas importantes para a função de cardiomiócitos. A expressão das proteínas conexina-43 e α -actinina sarcomérica foi averiguada aos 0 e 7 e 14 dias de cultivo nos meios cardiomiogênicos I e II (figuras 10 a 13).

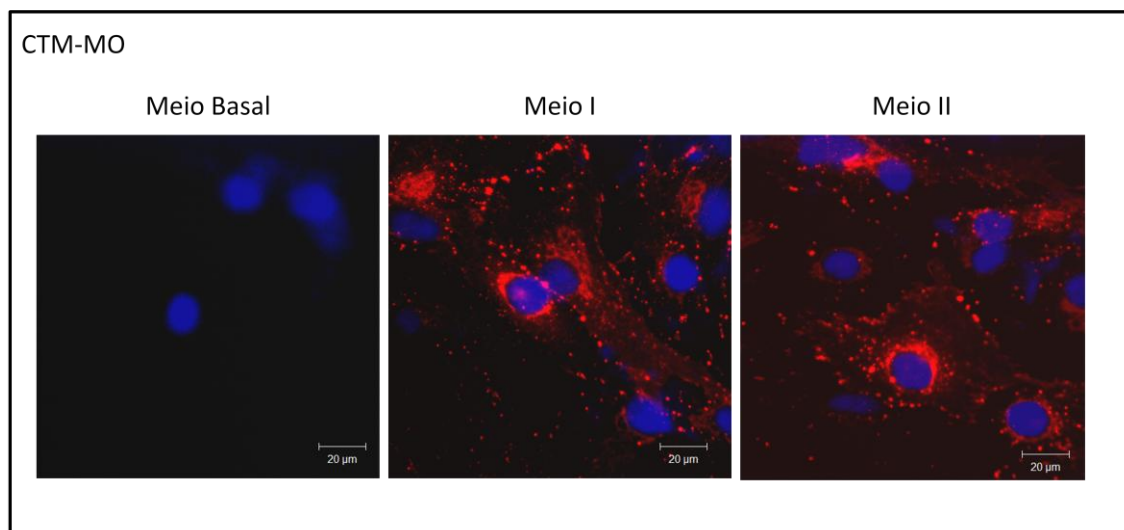


FIGURA 11: Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de Connexina-43 (vermelho) em CTM-MO cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.

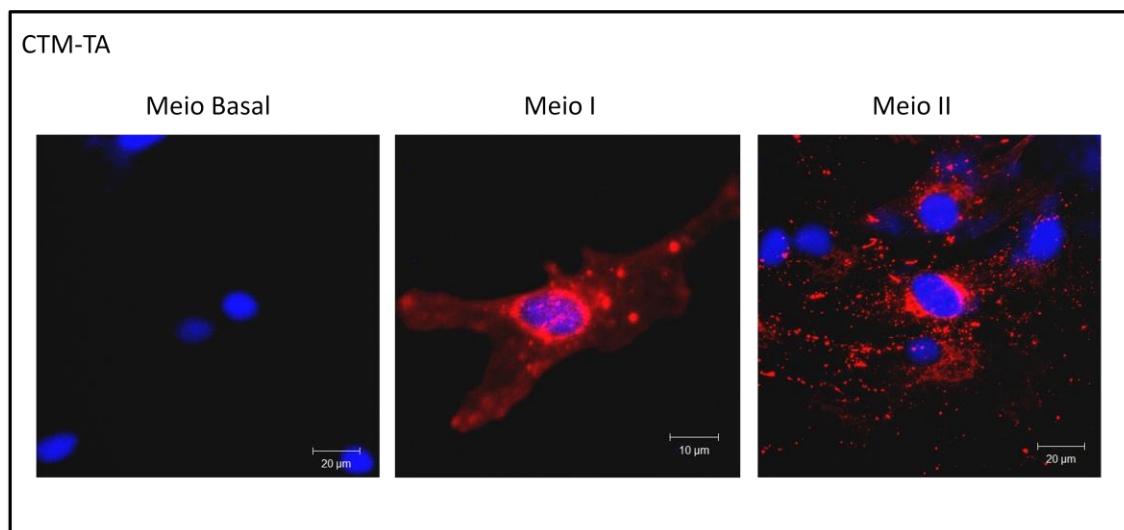


FIGURA 12: Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de Connexina-43 (vermelho) em CTM-TA cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.

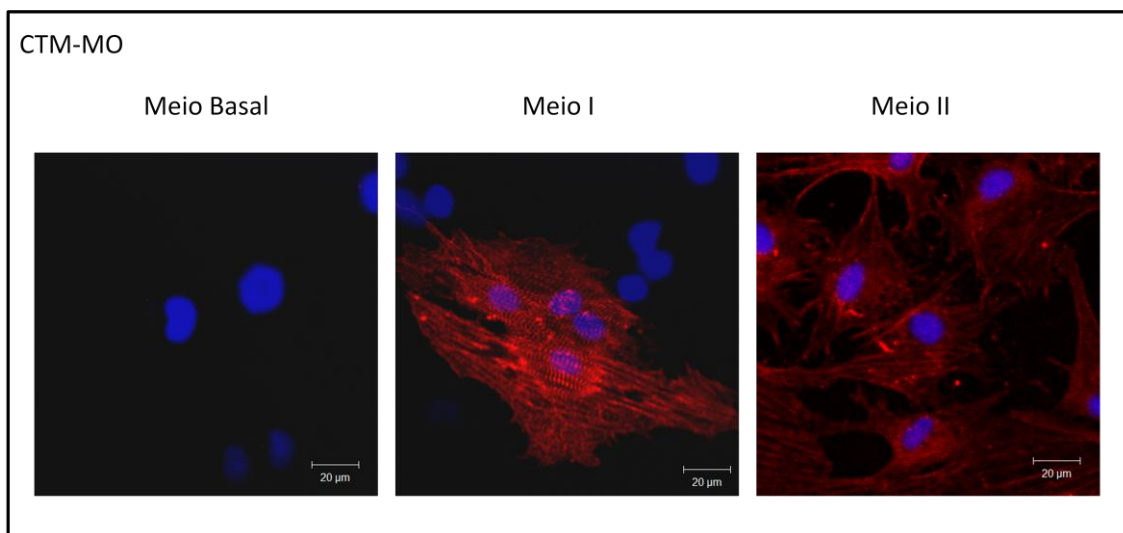


FIGURA 13: Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de α -actinina sarcomérica (vermelho) em CTM-MO cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.

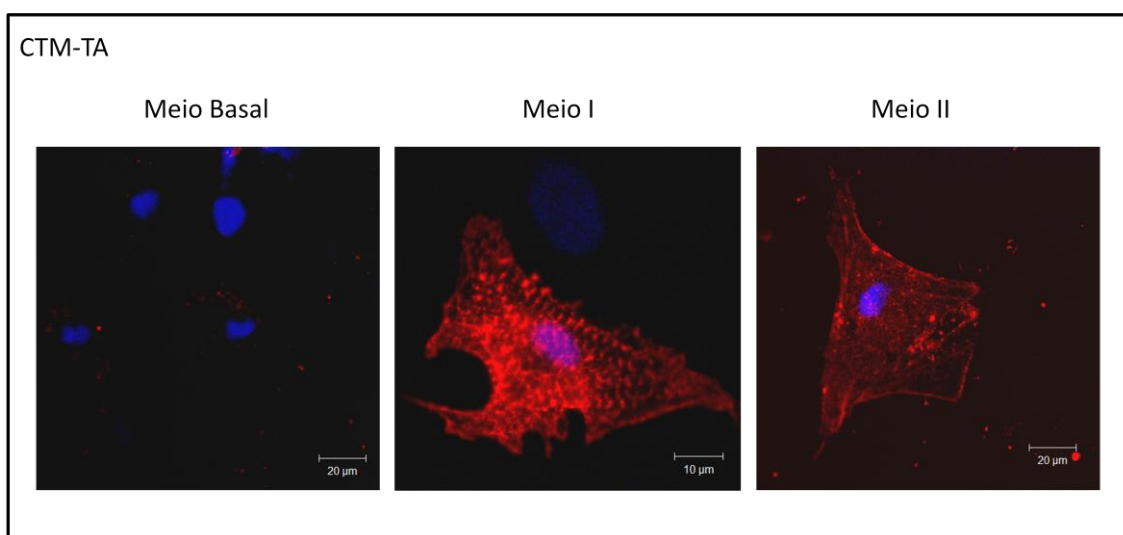


FIGURA 14: Imunofluorescência visualizada por microscopia confocal exibindo a expressão de α -actinina sarcomérica (vermelho) em CTM-TA cultivadas em meio basal, meio cardiomiogênico I e II.

Os resultados obtidos indicam que os meios cardiomiogênicos foram capazes de induzir a expressão destas proteínas, inicialmente ausentes nas CTM analisadas, após 14 dias de cultivo. Devido ao fato de que aos 7 dias de cultivo em meios de diferenciação as CTM ainda não apresentavam conexina-43 e α -actinina sarcomérica, não serão apresentadas as fotos deste ensaio.

4.6 As CTM apresentam plasticidade, mas não originam cardiomiócitos funcionais

Após averiguar as mudanças de expressão gênica e protéica das CTM induzidas a diferenciar-se em cardiomiócitos, realizou-se experimentos de eletrofisiologia a fim de se estudar a atividade dos canais de membrana dessas células, essenciais à função cardiomiogênica e à capacidade das CTM induzidas de gerar potenciais de ação.

Inicialmente, estudou-se a corrente total de saída, ou corrente positiva. Os dados demonstraram que as células de cardiomiócitos adultos apresentaram corrente de saída maior do que os demais grupos. Abaixo dos valores de corrente positiva dos cardiomiócitos adultos veio a corrente total de saída dos cardiomiócitos neonatais. Alguns grupos das CTM-MO e CTM-TA apresentaram uma pequena corrente total de saída, porém nenhum dos grupos apresentou um valor de corrente maior ou igual aos valores obtidos nas análises dos cardiomiócitos (figura14). OS traçados representativos das CTM cultivadas em meio II não foram demonstrados, pois também não apresentaram correntes de entrada e saída mensuráveis. Sendo assim, nenhuma das células diferenciadas apresentou características eletrofisiológicas, no que se refere a correntes totais de saída, semelhantes às características eletrofisiológicas dos cardiomiócitos adultos ou neonatais.

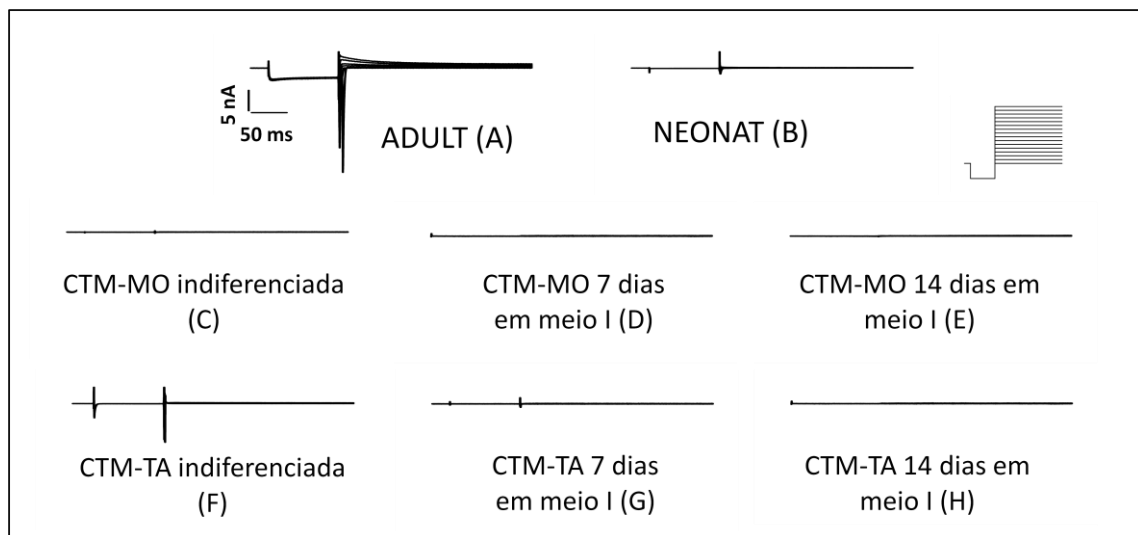


FIGURA 15: Corrente máxima e mínima. (A,B,C,D,E,F,G,H) Traçados representativos para (A) cardiomiócito adulto (n=3), (B) cardiomiócito neonatal (n=3), (C) CTM-MO indiferenciadas (n=3), (D) CTM-MO cultivadas em meio I por 7 dias (n=3), (E) CTM-MO cultivadas em meio I por 14 dias (n=4), (F) CTM-TA indiferenciadas (n=3), (G) CTM-TA cultivadas em meio I por 14 dias (n=8), (H) CTM-TA cultivadas em meio I por 14 dias (n=3). Apenas os pulsos pares são demonstrados nos traçados.

Em segundo lugar, a corrente total de entrada, ou corrente negativa, foi analisada. Os dados obtidos demonstraram que a corrente total de entrada dos cardiomiócitos adultos é

significativamente maior do que as correntes de entrada dos demais grupos. Cardiomiócitos neonatais apresentaram pequena, mas mensurável, corrente de entrada. Ao contrário da corrente de saída, as CTM não apresentaram nenhum tipo mensurável de corrente de entrada.

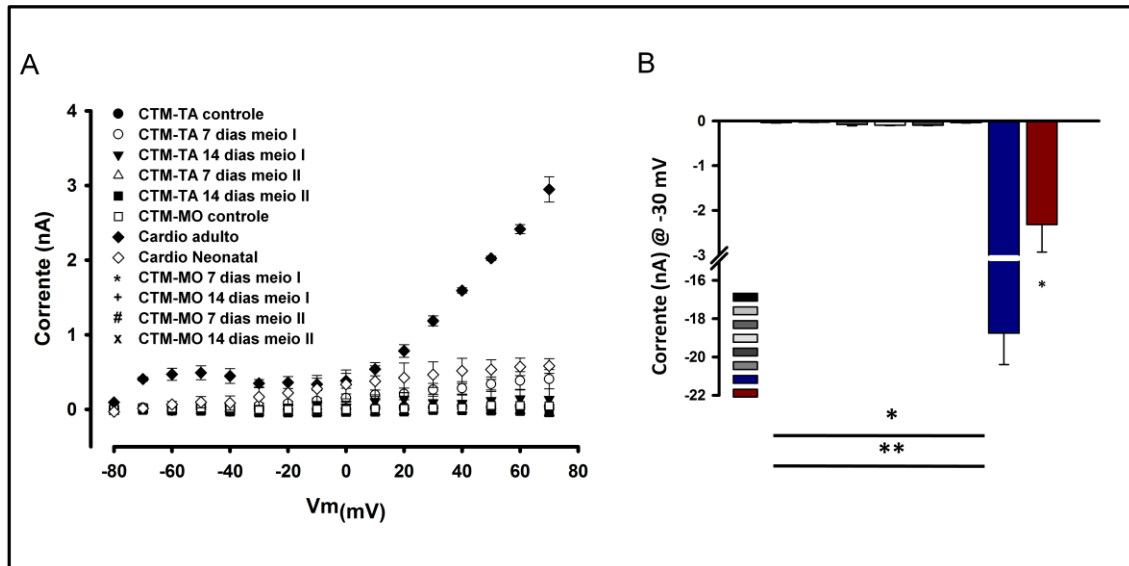


FIGURA 16: Relação da corrente de pico máxima do estímulo (A) e Corrente mínima no início do estímulo em -30 mV (B). Inset Protocolo de estímulo. Os dados representam média \pm EPM. * comparando Cardiomiócito Adulto com experimentais; ** comparando cardiomiócito neonatal com experimentais; & comparando Adulto e Neonatal *, **, & $p < 0,05$ para two-way ANOVA.

Por fim, foi analisado o potencial de gerar potenciais de ação (PA). Neste experimento, o potencial de membrana foi variado até desencadear um PA. Os resultados obtidos mostram que cardiomiócitos adultos e neonatais apresentam PA, porém o PA dos cardiomiócitos adultos foi mais longo em 50% da repolarização, quando comparado aos neonatais. O inverso foi observado em 90% da repolarização. Essa observação decorre do fato de que os cardiomiócitos adultos apresentam uma elevada corrente de cálcio, que contrapõe a corrente de saída de potássio, favorecendo a ocorrência do *plateau*. Cardiomiócitos neonatais, por sua vez, não apresentam uma corrente elevada de cálcio, o que caracteriza a ausência de *plateau*. Já aos 90% da repolarização, as demais correntes que não são encontradas nos neonatais são expressas em cardiomiócitos adultos, o que faz com que o potencial de ação seja mais curto nessa altura, comparando-se cardiomiócitos adultos aos neonatais.

Ademais, todos os demais grupos não desenvolveram PA. Assim sendo, é possível correlacionar a falta de corrente de entrada à impossibilidade de gerar um PA. Finalmente, é possível concluir que nenhum dos grupos estudados apresentou um fenótipo eletrofisiológico similar a cardiomiócitos adultos ou neonatais funcionais.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A capacidade das CTM em dar origem a tipos celulares diferenciados como osteoblastos, condrócitos e adipócitos é um consenso na comunidade científica, e constitui uma das características definidoras dessa população de células multipotentes (Dominici *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008). A diferenciação das CTM em outros tipos celulares, por outro lado, ainda permanece controversa. Atualmente existem estudos que indicam a ocorrência da diferenciação cardiomiogênica (Planat-Bénard *et al.*, 2003; Gwak *et al.*, 2009), porém existem também autores que indicam que as CTM são capazes de apresentar marcadores de cardiomiócitos, mas são incapazes de gerar cardiomiócitos funcionais (Liu *et al.*, 2003; Rose *et al.*, 2008; Koninckx *et al.*, 2009). A falta de padronização entre os protocolos de indução da cardiomiogênese, a ausência de comprovação da população celular com a qual se trabalha e a realização de diferentes testes de comprovação da cardiomiogênese fazem com que discussões sobre o real potencial das CTM originarem cardiomiócitos sejam controversas. O presente trabalho objetivou, portanto, estudar o potencial cardiomiogênico das CTM utilizando para isso duas fontes de CTM e dois meios de diferenciação que induzem a cardiomiogênese com sucesso, de acordo com a literatura, de forma a possibilitar a comparação da eficiência de dois meios descritos e do potencial cardiomiogênico de duas fontes de CTM.

Existem diversas metodologias de indução da cardiomiogênese atualmente, sendo que nenhuma apresenta reprodutibilidade nem altas taxas de diferenciação. A exposição das células a 5-azacitidina, um agente demetilante, promove a cardiomiogênese através do remodelamento da cromatina (Antonitsis *et al.*, 2007). A cocultura com cardiomiócitos constitui mais uma estratégia hoje utilizada para promover a diferenciação de CTM e CT embrionárias, porém apresenta resultados discutíveis já que fusão entre os tipos celulares pode ocorrer *in vitro* (Plotnikov *et al.*, 2007). Nesses casos, a diferenciação não pode ser atestada devido ao fato das células fusionadas apresentarem marcadores de cardiomiócitos e CT. Em 2006, a estratégia de Xie e colaboradores, a qual utiliza o sobrenadante de cultura de cardiomiócitos fetais para promover a cardiomiogênese de CTM, foi inicialmente proposta para responder a pergunta sobre a real necessidade do contato entre CT e cardiomiócitos para promover a diferenciação das mesmas, já que os resultados até ali haviam sido obtidos através da cocultura dos tipos celulares. O resultado obtido foi que a interação física não era necessária. Apenas entrando em contato com o sobrenadante dos cardiomiócitos as CT se direcionaram a essa linhagem. No mesmo trabalho, Xie e colaboradores determinaram

ainda que o sobrenadante de cardiomiócitos era ainda mais rico em fatores cardiomiogênicos quando as células eram submetidas à hipóxia. A estratégia de Xie foi, portanto, mimetizar o ambiente cardíaco utilizando os metabólitos dos cardiomiócitos. Quais deles atuam promovendo a diferenciação das CT e como eles atuariam permanece por ser elucidado.

Em 2003, Planat-Bénard e colaboradores criaram uma nova estratégia independente de cardiomiócitos e promoveram a cardiomiogênese de CTM-TA através de um meio contendo Interleucina-3 (IL-3), Interleucina-6 (IL-6) e fator de célula-tronco (SCF- *Stem Cell Factor*). O papel das citocinas na diferenciação é citado como potencializador. IL-3, em células hematopoiéticas promove o seu comprometimento à linhagem arterial através da via STAT-5 (Zeoli *et al.*, 2008). Já em células da medula que não expressam CD45, IL-3 em conjunto com fator de célula-tronco foi capaz de promover a proliferação e prevenir a apoptose (Baksh *et al.*, 2005). Assim, é possível sugerir que no trabalho de Planat-Bénard, IL-3 e fator de célula-tronco atuaram prevenindo a apoptose das CTM (que não expressam CD45), evento relativamente comum e esperado em processos de diferenciação (Meier, Finch e Evan, 2000). IL-6, por sua vez, atua sobre as CTM inibindo a sua diferenciação para células dendríticas (Djouad *et al.*, 2007), inibindo a proliferação e promovendo a hipertrofia de cardiomiócitos. Essas propriedades, associadas ao fato de que a inativação de IL-6 provocou a diminuição da expressão de marcadores de cardiomiócitos *in vitro*, sugerem a importância dessa citocina na expressão dos marcadores e na diferenciação das CTM a essa linhagem (Fredj *et al.*, 2005).

A eficiência das estratégias utilizadas, porém, é sempre extremamente baixa. Entre células embrionárias, taxas de diferenciação de 20% são consideradas altas (Beqqali *et al.*, 2006), e entre células mesenquimais adultas, taxas que chegam a 1,5% são incomuns (Planat-Bénard *et al.*, 2003). Assim, existem diversos protocolos para a diferenciação das CT em cardiomiócitos, porém não há nenhum que apresente grande eficiência e que atue como referência.

A necessidade de padronização e a impossibilidade de compararem-se os resultados obtidos na literatura levaram ao objetivo do presente trabalho, que constituiu comparar o potencial cardiomiogênico de diferentes fontes de células-tronco e a eficiência de diferentes meios de diferenciação.

Anteriormente à indução da cardiomiogênese, porém, o presente trabalho incluiu a caracterização das populações celulares isoladas. De acordo com os resultados obtidos

no presente trabalho, as populações celulares estudadas eram: 1. homogêneas fenotipicamente, sendo em sua maior parte (85% em CTM-MO e 90% em CTM-TA) positivas para os marcadores CD54, CD73 e CD90 e negativas (positividade abaixo de 5%) para o marcador CD45; 2. capazes de aderir à superfície de cultura, sendo essa propriedade um dos parâmetros utilizados no seu isolamento; e 3. Multipotentes, demonstrando a sua habilidade de gerar, *in vitro*, osteócitos e condrócitos funcionais, capazes de mineralizar a sua MEC e de produzir colágeno II, respectivamente. Tomadas juntas, essas características definem uma população de CTM, de acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular e o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais (Dominici *et al.*, 2006).

Ao longo da diferenciação cardiomiogênica, a viabilidade das CTM foi monitorada através do ensaio de metabolização do substrato MTT. A metabolização do MTT indica a viabilidade celular de uma população como um todo, baseando-se na capacidade de células viáveis apresentarem mitocôndrias funcionais, que promovem a redução de suas coenzimas a NADH e FADH₂, de forma que elas se tornam aptas a reduzir seus substratos. Uma célula que não esteja viável não apresenta a sua mitocôndria realizando respiração celular, e, portanto, não apresenta capacidade de reduzir suas coenzimas. Estas, por sua vez, não estando reduzidas, são incapazes de se oxidar e reduzir seus substratos.

Variações dos níveis de metabolização de MTT de uma população podem indicar variações nos níveis de metabolização de cada célula dentro da população, ou indicar variações no número de células que constituem essa população. Assim, na maior parte dos trabalhos, nos quais não há variação no fenótipo da população de interesse, o MTT é utilizado como ensaio de atividade metabólica, sendo indicativo de proliferação e de citotoxicidade (Yang *et al.*, 2009; Naqvi *et al.*, 2010; Labbaf *et al.*, 2011). No presente estudo, porém, as células são induzidas a diferenciar-se em outro tipo celular, que apresenta diferentes taxas de metabolização de MTT (Guo *et al.*, 2009). Não obstante, o processo de diferenciação celular é caracterizado pela mudança no número de mitocôndrias na célula indiferenciada, o que leva a uma modificação da capacidade intrínseca de cada célula em metabolizar o substrato em questão (Mandal *et al.*, 2010). Deste modo, no presente trabalho o ideal seria contar o número de células em cada amostra e construir uma curva padrão para se determinar eventos de proliferação versus morte celular, e ainda modificações na metabolização do MTT em nível celular.

Infelizmente, o presente trabalho não inclui a construção de uma curva padrão, pois a partir do momento em que se iniciou a indução das células-tronco à cardiomiogênese, essas não foram tripsinizadas. O que se pode discutir dos resultados obtidos, portanto, é que: os meios cardiomiogênicos levaram à redução dos níveis de metabolização de MTT pelas células neles cultivadas, fato que pode ser consequência de morte celular, diminuição da proliferação celular em relação ao grupo controle, ou ainda modificação nas taxas de metabolização do MTT em nível celular.

Células-tronco indiferenciadas, quando em condições de auto-renovação, apresentam menor número de mitocôndrias, que se apresentam como aglomerados perinucleares e apresentam poucas cristas e limitada capacidade oxidativa (Mandal *et al.*, 2010). Concomitantemente, essas células apresentam altos níveis de expressão de enzimas glicolíticas. Tomados juntos, esses dados indicam que as CT sobrevivem bem em ambientes anaeróbicos e confirmam os resultados de que as CT exibem aumento nas taxas de auto-renovação e pluripotência em atmosferas que mimetizam condições fisiológicas de 3-5% de O₂ (Ezashi, Dal e Roberts, 2005 *apud* Mandal *et al.*, 2010). Cardiomiócitos, por outro lado, apresentam taxas metabólicas excepcionalmente altas, pois possuem a função de contrair repetidamente. Essas células se contraem de 1 a 3 vezes por segundo ao longo de toda a vida do organismo, sendo que esses ciclos de contração e relaxamento demandam quantidades enormes de ATP, que nos cardiomiócitos são produzidos de maneira aeróbica. Por isso os cardiomiócitos apresentam grandes números de mitocôndrias (Klabunde, 2005). Assim, é também compreensível que alguma alteração nas taxas de metabolização das CT cultivadas em meios de diferenciação decorra de alterações na capacidade de metabolização do substrato MTT em nível celular.

Morte celular e diminuição da proliferação constituem eventos naturais e esperados ao longo de processos de diferenciação celular (Vaux e Korsmeyer, 1999; Meier, Finch and Evan, 2000; Knoblich, 2008; Stall e Luis, 2010; Salucci *et al.*, 2010). Ao contrário do aumento metabólico previsto pela cardiomiogênese, morte celular e diminuição da proliferação são eventos que diminuem a capacidade de uma população de metabolizar MTT. Os resultados obtidos de diminuição da metabolização do MTT pelas populações cultivadas em meios de diferenciação indicam uma prevalência dos efeitos de diminuição da proliferação e de morte celular sobre os efeitos de aumento da capacidade celular de metabolização do substrato esperados do processo de cardiomiogênese.

O segundo parâmetro monitorado ao longo da indução da cardiomiogênese foi a expressão da enzima Fosfatase Alcalina. Esta é uma enzima que retira grupos fosfato com atividade ótima em pH 9,0 e que, curiosamente, tem a sua expressão associada a células indiferenciadas e que apresentam altas taxas de divisão celular. Apesar de essa enzima estar presente também em alguns tipos celulares diferenciados, como osteoblastos, no presente estudo ela constituiu um marcador das células indiferenciadas, já que cardiomiócitos não se caracterizam por expressar essa enzima.

Como esperado, as populações celulares cultivadas em meios cardiomiogênicos apresentaram queda nos níveis de expressão de FA. Os resultados obtidos permitem ainda observar que o meio I levou a quedas mais precoces e acentuadas comparado ao meio II, fato que constitui o primeiro indício de que ele seria mais eficiente na promoção da cardiomiogênese do que o meio II.

A produção de colágeno foi monitorada no processo de diferenciação e apresentou diminuição ao longo do tempo de cultivo nos meios indutores. A matriz extracelular cardíaca é uma entidade dinâmica, responsável por conectar miócitos, alinhar elementos contráteis, transmitir força de contração e prover elasticidade ao músculo. É composta por uma complexa mistura de colágeno, fibrilas, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, depositadas junto a fatores de crescimento citocinas e proteases. O colágeno é um dos principais componentes dessa MEC e confere várias das características da mesma, como elasticidade e resistência. Esse componente da MEC é secretado principalmente por fibroblastos, porém cardiomiócitos colaboram na sua produção (Pathak *et al.*, 2001). As CTM, por outro lado, remodelam constantemente a MEC e apresentam maior produção de colágeno total. Essa característica de produção relativamente alta de colágeno pelas CTM-MO é surpreendente, pois, *in vivo*, elas se situam em um local onde há pouca MEC, a medula óssea. O acúmulo de MEC é tão pequeno nesse tecido que a sua dissociação é realizada facilmente através de pipetagem ou passagem por seringas (Bianco *et al.*, 2001). O ensaio de dosagem de colágeno total corroborou os dados da literatura de que cardiomiócitos apresentam menor produção de colágeno comparado às CTM, e novamente demonstrou que o meio I levou a mudanças fenotípicas precoces em relação ao meio II. Considerando-se este ensaio, o comportamento das CTM foi semelhante, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre elas.

Os ensaios de MTT permitem, portanto, atestar a viabilidade celular ao longo da indução cardiomiogênica e os ensaios de FA e dosagem de colágeno constituíram, por sua vez, os primeiros indícios de diferenciação das CTM.

Após estes primeiros ensaios, a expressão gênica das CTM induzidas a iniciar o processo de cardiomiogênese foi estudada. De acordo com Alberts e colaboradores, 2002, o conjunto de genes expressos por uma célula define o seu fenótipo, pois define o seu repertório de proteínas. O proteoma de uma célula é tão importante porque ele acaba determinando o seu tamanho, morfologia, metabolismo, e, conseqüentemente, a sua função no organismo. Fisiologicamente, a diferenciação celular ocorre em duas fases: a fase de indução e determinação (Gilbert, 2006). Inicialmente, a indução ocorre com a estimulação das células por sinais como interações com a MEC, com células vizinhas, sinalização parácrina e até fatores mecânicos como a rigidez do substrato onde a célula se encontra, e contração do tecido onde ela está inserida (Discher, Mooney e Zandstra, 2009). Estes estímulos em geral regulam a função em tipos celulares diferenciados, porém, em células ainda não diferenciadas, em geral levam à produção de proteínas típicas de algum tipo celular específico. Estas proteínas inicialmente expressas iniciam então o processo de determinação da diferenciação. Em geral, as primeiras proteínas a serem expressas são proteínas regulatórias, que se ligam a regiões regulatórias de diversos genes, inclusive os seus próprios genes, aumentando a sua expressão por um mecanismo de *feed forward* ou regulação positiva. Deste modo, a expressão gênica, que inicialmente era dependente de estímulos externos, torna-se auto-suficiente e passa a constituir uma característica permanente da célula. Como dito, outros genes são regulados por essas proteínas chamadas fatores de transcrição (FT), de modo que após algum tempo do início da determinação é gerado um tipo celular com um perfil de expressão proteica complexo, que torna a célula apta a exercer alguma função específica no organismo. No caso da diferenciação cardiomiogênica, algumas proteínas responsáveis pelo processo de indução da diferenciação já foram identificadas. Dentre elas, destacam-se os FT GATA4 e Nkx2-5 (Martin, Afouda e Hoppler, 2010). A fim de se estudar o processo de cardiomiogênese, analisou-se a expressão desses dois genes.

Apesar de terem sido utilizadas diferentes técnicas para a detecção da expressão desses 2 genes, característicos do início do processo de cardiomiogênese, foi possível perceber o início/pico da expressão dos mesmos variou de acordo com a fonte de CTM utilizada e com o meio indutor. As CTM-TA apresentaram menores níveis de Nkx2-5 quando indiferenciadas, porém, mostraram-se mais responsivas aos estímulos dos meios,

apresentando maior nível de mudança de expressão de Nkx2-5 e passando a expressar GATA4 mais rapidamente do que as CTM-MO. Com relação ao FT Nkx2-5, por outro lado, as duas populações de CTM apresentaram picos de expressão no mesmo período. Os resultados obtidos também permitiram observar que o meio cardiomiogênico I levou a maiores mudanças de expressão gênica comparado ao meio II, se mostrando novamente, mais eficiente na indução da cardiomiogênese. Os resultados obtidos no ensaio de quantificação da expressão de Nkx2-5 corroboram com os dados da literatura, que indicam um pico de expressão desse gene aos 5 dias de indução e decréscimo nos períodos posteriores (Rose *et al.*, 2008). Em nenhum momento, porém, os níveis de expressão gênica atingido pelas CTM diferenciadas chegaram a ser semelhantes aos apresentados por cardiomiócitos adultos.

A expressão dos genes das cadeias pesadas das miosinas α e β também foi analisada, pois estas proteínas possuem a sua expressão regulada por Nkx2-5, GATA4, dentre outros FT como Tbx5 e Mef2c, além de enriquecerem as análises da cardiomiogênese por serem características de estágios mais avançados da diferenciação (Martin, Afouda e Hoppler, 2010). Corroborando com os dados descritos por outros grupos, os picos de expressão desses genes ocorreram posteriormente aos picos de expressão de Nkx2-5. Novamente, porém, os picos de expressão gênica apresentados pelas CTM não atingiu os níveis de expressão apresentados pelos cardiomiócitos neonatais e adultos.

Os dados de PCR em tempo real também permitiram observar a maior eficiência do meio I em aumentar os níveis de expressão dos genes analisados em relação ao meio II. Foi possível observar, também que mais uma vez as CTM-TA apresentaram mudanças de expressão gênica maiores e mais precoces, comparadas às CTM-MO, havendo exceções.

Diferentemente dos dados apresentados em diversos artigos consultados, no presente trabalho foram incluídos controles positivos nos ensaios de PCR em tempo real, além dos controles negativos. Para isso, realizamos ensaios de comparação entre os níveis de expressão de CTM diferenciadas na linhagem cardiomiogênica e os níveis apresentados por cardiomiócitos neonatais e adultos. Pela primeira vez foi possível determinar, portanto, que os níveis de expressão gênica atingidos pelas CTM é menor do que os apresentados por cardiomiócitos funcionais. Talvez essa seja a razão da ausência de funcionalidade observada ao fim da indução cardiomiogênica.

O perfil fenotípico das CTM também foi monitorado ao longo da indução da cardiomiogênese. Resumidamente, observou-se que o perfil fenotípico das CTM se

aproximou ao perfil fenotípico de cardiomiócitos descrito pela literatura: CD54^{baixo} (Boyd *et al.*, 2008), CD73^{ou +} (Ledent *et al.*, 2007) e CD90⁻ (Zhang *et al.*, 2010), com a exceção do CD45, que em geral está ausente em cardiomiócitos, porém foi aumentada nas populações de CT cultivadas em meios cardiomiogênico I (Nygren *et al.*, 2004). Neste ponto, o meio I foi menos eficiente na promoção da cardiomiogênese.

O CD54 constitui uma proteína de superfície, também chamada de ICAM-1 (*Inter-cellular Adhesion Molecule -1*, ou molécula 1 de adesão intercelular). Como o próprio nome diz, CD54 ou ICAM-1 é uma proteína relacionada à adesão intercelular e de remodelamento da MEC. ICAM é uma proteína que não é expressa em altos níveis em cardiomiócitos. Em cortes histológicos do coração, ela tem sua expressão concentrada em locais de vascularização. Em situações de stress, como hipóxia ou inflamação, ICAM é superexpressa no interstício cardíaco, induzida pela proteína C reativa (Ceausu, Curca e Dermengiu, 2009). A diminuição da expressão de CD54 nas CTM induzidas a diferenciação indicou uma mudança fenotípica compatível com a diferenciação cardiomiogênica. Indiferenciadas, as CTM-TA e CTM-MO apresentaram níveis semelhantes de expressão de CD54 (dado: porcentagem de células positivas para o marcador), sendo que mais uma vez, CTM-TA apresentaram maior responsividade aos meios, apresentando maiores alterações de expressão de CD54 na população. Os resultados do monitoramento da expressão de CD54 indicam ainda que mais uma vez o meio I leva a maiores mudanças fenotípicas com relação ao meio II.

O marcador de superfície CD73 constitui uma glicoproteína com função de ecto-5'-nucleotidase, ou seja, de hidrolisar nucleosídeos monofosfatos presentes no ambiente extracelular em intermediários de nucleosídeos biologicamente ativos. Essa proteína é tipicamente expressa em células do sistema vascular, porém também é encontrada em cardiomiócitos. É consenso na literatura também que situações de hipóxia aumentam a expressão de CD73 (Thompson *et al.* 2004), importante para a sobrevivência celular em situações como essa. Este fato corrobora os dados de que em situações de infarto há aumento na expressão de CD73 e de que o bloqueio de sua função aumenta a área de necrose (Ledent *et al.*, 2007).

O CD90, também conhecido como Thy-1, é uma proteína de membrana N-glicosilada que se apresenta ancorada à membrana citoplasmática por uma âncora GPI. É uma molécula de múltiplas funções e localidades. Está envolvida com a ativação de linfócitos T, sinalização apoptótica, adesão e migração celular, dentre outros. O CD90 pode ser encontrado em

fibroblastos, células tronco hematopoiéticas, mesenquimais e células progenitoras do fígado, mas não está presente em cardiomiócitos (Zhang *et al.*, 2010). As CTM induzidas à cardiomiogênese, porém, mantiveram seus níveis de CD90 ao longo dos 21 dias analisados.

De acordo com Zhang e colaboradores CD90 está ausente em cardiomiócitos, mas está presente em cardiomiócitos adultos de origem atrial e ventricular que se desdiferenciam naturalmente em cultura. Foi demonstrado que essas células não abandonam completamente o fenótipo, porém apresentam baixos níveis de inibidores de ciclo celular como p53, e se mostraram capazes de proliferar e gerar progenitores de cardiomiócitos que apresentavam alguns marcadores de CTM, dentre eles, CD90. Essas células apresentavam ainda níveis mais baixos de α -MHC, troponina e ausência de contratilidade. Ao final do trabalho, Zhang discute se essas células que se desdiferenciam não o fariam *in vivo*, como de fato sugerem alguns outros trabalhos. Considerando os dados de Zhang e colaboradores, é possível sugerir que a manutenção da expressão de CD90 não é incompatível com a cardiomiogênese *in vitro*, mas caracteriza estágios de diferenciação intermediários.

Por fim, a expressão do marcador CD45 foi analisada. O CD45 é uma proteína tirosina fosfatase encontrada em todas as células de linhagem linfóide e mielóide, com exceção de eritrócitos e plaquetas. É uma proteína de membrana que apresenta diferentes isoformas que se encontram distribuídas de maneira uniforme pela célula, a não ser em regiões de contato com linfócitos T e B, nas quais elas se acumulam. A função de CD45 nas células é a de transdução de sinais, sendo que CD45 regula cinases Src, envolvidas na formação de segundos mensageiros (Kung *et al.*, 2000). CD45 não é expresso em cardiomiócitos, portanto, a princípio, o aumento na expressão deste marcador seria um indício de um desvio da cardiomiogênese. Ainda considerando o trabalho de Zhang, porém, é possível que cardiomiócitos desdiferenciados apresentem marcadores da linhagem hematopoiética. Apesar de CD45 não ter sido investigado, marcadores como c-kit, presentes nas CTH, estavam presentes nos cardiomiócitos desdiferenciados. É possível sugerir novamente que a cardiomiogênese das CTM não se apresenta no estágio final, mas em estágio intermediário, possivelmente passando por um estágio de célula progenitora cardíaca.

Além das proteínas de superfície, proteínas importantes à função cardíaca foram investigadas. A primeira delas constituiu a proteína de citoesqueleto α -actinina.

A α -actinina é uma proteína de citoesqueleto, pertencente à superfamília das espectrinas, ubiquitadamente expressa em 4 isoformas descritas atualmente. Dentre elas, as isoformas 1 e

4 estão presentes em células não-musculares enquanto as isoformas 2 e 3 (α -actininas sarcoméricas) estão presentes em células musculares esqueléticas e cardíacas (Shao *et al.*, 2010). Nas células em geral, a α -actinina interliga filamentos de actina e contribui pra eventos como contração, migração, função de canais de membrana, sinalização e espalhamento, dentre outros (Shao *et al.*, 2010). O presente trabalho visou detectar as isoformas 2 e 3 da α -actinina nas CTM cultivadas nos meios cardiomiogênicos.

Como esperado, as CTM indiferenciadas não apresentaram α -actininas sarcoméricas quando indiferenciadas. Os meios cardiomiogênicos utilizados, porém, foram capazes de induzir a expressão dessas isoformas da α -actinina nas CTM após 14 dias de cultivo. É importante evidenciar que a marcação da α -actinina mostrou o padrão típico de organização de citoesqueleto esperado em células musculares, indicando que essa proteína não foi apenas expressa, mas foi inserida corretamente no contexto celular. Mesmo evento não foi observado com canais de cálcio nucleares de Rianodina, que não apresentaram distribuição esperada nas CTM. A possibilidade de esta observação decorrer de problemas técnicos como a qualidade do anticorpo utilizado e a falta de realização de ensaios que confirmassem a observação inicial fizeram com que este ensaio não fosse incluído no presente trabalho.

A presença das isoformas sarcoméricas da α -actinina são essenciais à função muscular, inclusive determinando a largura dos discos Z, que indiretamente determinam o perfil das fibras musculares rápidas e lentas em miócitos esqueléticos (Luther, 2009). Deste modo, o fato de que as CTM passaram a apresentar isoformas sarcoméricas de α -actinina indicam o seu potencial de gerar cardiomiócitos funcionais.

Obviamente a função cardiomiogênica não depende apenas da presença de isoformas sarcoméricas de α -actinina, portanto a presença de outra proteína essencial à função cardíaca foi avaliada: a presença da proteína Conexina-43.

A conexina-43, também chamada proteína de junções do tipo GAP isoforma α 1, faz parte, como o próprio nome implica, de uma estrutura chamada junção do tipo GAP. Essas junções são responsáveis pela base da comunicação intercelular, pois constituem, muito basicamente, um canal entre duas células adjacentes no qual transitam diversas moléculas de baixo peso molecular, como moléculas de sinalização, fatores de sobrevivência celular e íons. A conexina-43 é expressa em diversos órgãos, sendo importante, por exemplo, para a formação da barreira hematotesticular (Li *et al.*, 2010). Considerando-se o tecido cardíaco, a conexina é essencial à sincronização do tecido mesmo, sendo que hoje se sabe que não só

a quantidade total dessa proteína, mas também a sua distribuição determina a normalidade da propagação dos impulsos e função ventricular (Salameh *et al.*, 2010). Curiosamente a expressão de conexina-43 é constante, já que a meia-vida desta proteína varia de 1,5 a 5hs. Corroborando com estes dados, os ensaios de imunofluorescência indicaram que esta proteína está presente não só na MP, onde exerce sua função, mas também na região do Golgi e em vesículas intracelulares, onde permanece sendo continuamente produzida, modificada, transportada e degradada (Leithe e Rivedal, 2004).

As CTM induzidas à seguir a cardiomiogênese expressaram conexina-43, e talvez mais importante, apresentaram conexina-43 corretamente localizada no ambiente celular. É possível, porém, que estiramento mecânico constitua um estímulo fisiológico essencial para que os cardiomiócitos se orientem e a conexina-43 tenha localização ótima, nos discos intercalares, de modo a promover contrações eficientes. Novamente, as CTM demonstraram o potencial de gerar cardiomiócitos funcionais *in vitro*.

Apesar dos ensaios prévios indicarem a possibilidade de terem sido gerados cardiomiócitos a partir de CTM *in vitro*, os resultados dos experimentos de eletrofisiologia demonstraram o contrário. Assim como os cardiomiócitos desdiferenciados de Zhang, as CTM induzidas não apresentaram correntes significativas de entrada e saída e não produziram potenciais de ação quando estimuladas.

A comprovação da diferenciação cardiomiogênica na literatura diverge, portanto, apesar das CTM não terem apresentado perfil eletrofisiológico semelhante ao de cardiomiócitos, alguns trabalhos teriam classificado-as como cardiomiócitos, devido à presença de expressão gênica de GATA-4, Nkx2-5, cadeias pesadas das miosinas α e β , presença da expressão protéica de α -actinina sarcomérica e conexina-43 (Gwak *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010).

Por outro lado, autores como Rose e colaboradores, Mummery, Davis e Krieger, dentre outros, defendem que a diferenciação cardiomiogênica deve ser atestada comprovando-se a funcionalidade da célula gerada e excluindo-se a possibilidade dos resultados positivos obtidos *in vivo* serem consequência de fusão celular.

No meio termo destas opiniões divergentes, é possível defender que foram gerados cardiomiócitos *in vitro*, porém evidenciando-se que estes não são funcionais. Diante dos resultados apresentados, é possível argumentar que as CTM induzidas apresentaram: 1. morfologia semelhante à de cardiomiócitos neonatais; 2. níveis diminuídos de proliferação

celular, típico de células diferenciadas; 3. Baixos níveis de FA, semelhante aos cardiomiócitos; 4. baixos níveis de produção de colágeno total; 5. expressão de GATA-4; 7. expressão de Nkx2-5; 8. expressão do genes da cadeia pesada da miosinas α ; 9. expressão do gene da cadeia pesada da miosina β ; 10. expressão protéica de α -actinina sarcomérica e 11. expressão protéica da conexina-43.

Como descrito no trabalho de Zhang, cardiomiócitos cultivados fora do seu nicho *in vivo*, passam por processos de descaracterização e de desdiferenciação. As CTM induzidas a gerarem cardiomiócitos *in vitro*, por sua vez, nunca passaram pelo ambiente cardíaco, obviamente muito mais rico em estímulos cardiomiogênicos. Ao contrário do ambiente bidimensional utilizado no presente trabalho, o nicho cardíaco contém não apenas fatores solúveis, mas estímulos mecânicos de estiramento e contração, componentes da MEC cardíaca, dentre outros fatores sabidamente importantes para a organização de citoesqueleto, da localização correta de proteínas como a conexina-43, e até para a capacidade de contração.

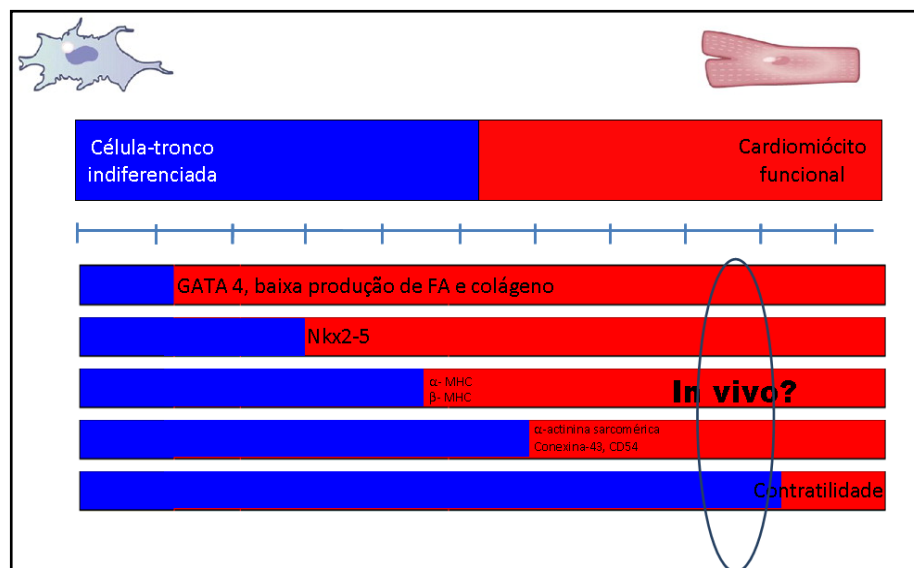


FIGURA 16: Hipótese de que as CTM diferenciadas originam cardiomiócitos que só apresentarão funcionalidade *in vivo*.

Seguindo este raciocínio, é possível argumentar ainda que o real potencial cardiomiogênico das CTM só poderá ser revelado após inserção no ambiente *in vivo*, e que é possível que as CTM induzidas tenham gerado cardiomiócitos adaptados à cultura bidimensional, mas que,

uma vez inseridos no ambiente cardíaco, prontamente originarão cardiomiócitos funcionais (figura 16).

Contra os argumentos de que os níveis de expressão gênica dos genes analisados diferiram dos níveis apresentados por cardiomiócitos, é possível defender que a presença da expressão desses genes garante o fenótipo de cardiomiócito, porém evidenciando-se que os níveis seriam indicativos de cardiomiócitos ainda não funcionais. Contra os argumentos de que o perfil fenotípico das CTM induzidas difere do perfil descrito na literatura para cardiomiócitos, é possível ainda contra-argumentar, defendendo que o perfil fenotípico das CTM que foi obtido 1. foi resultado da análise de uma população heterogênea de CTM em graus de diferenciação diferentes e com variáveis capacidades de resposta aos estímulos dos meios e 2. nenhuma das alterações fenotípicas observadas são incompatíveis com o perfil cardiomiogênico, já que, como demonstrou Zhang, cardiomiócitos cultivados *in vitro* originam células de perfil fenotípico semelhante ao fenótipo obtido no presente trabalho. Por fim, o presente trabalho evidencia a importância de técnicas quantitativas de análise fenotípica e de expressão gênica, importantes para evitar-se falsos positivos. A reação em cadeia da polimerase é uma técnica extremamente sensível, chegando a amplificar transcritos presentes na freqüentes na amostra na concentração de 1 cópia em 1 milhão. Deste modo, é importante quantificar-se os dados para que dados insignificantes biologicamente não sejam igualados a resultados significativos.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que a comparação entre estratégias de diferenciação é importante no aumento da eficiência do processo de cardiomiogênese. Uma vez que não há consenso entre os protocolos atuais de promoção da cardiomiogênese, é necessário comparar-se a eficiência de cada um, de modo a se estabelecer alguma estratégia mais promissora. A comparação entre as fontes de células-tronco mesenquimais utilizadas também se mostra importante, uma vez que a heterogeneidade dessa classe de células refletiu também no comportamento da mesma quando cultivada em meios indutores.

O meio cardiomiogênico I foi mais eficiente na promoção da cardiomiogênese *in vitro*, e as CTM-TA foram mais responsivas aos estímulos dos meios. Apesar dos indícios de diferenciação obtidos, não foram observadas células funcionais geradas a partir de CTM.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

As perspectivas do presente trabalho incluem:

- A investigação dos canais de membrana presentes nas CTM diferenciadas;
- Averiguar se são geradas células progenitoras cardíacas nos protocolos estudados;
- A inserção das CTM diferenciadas no ambiente *in vivo*, de modo a analisar-se o potencial das CTM em originar cardiomiócitos funcionais;
- A realização de mudanças nos meios cardiomiogênicos a fim de se obter aumento na expressão dos genes analisados;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Sociedade Brasileira de Cardiologia, disponível em <http://cientifico.cardiol.br/>, acessado em 27 de dezembro de 2010.

Ministério da Saúde, disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_ar ea=124&CO_NOTICIA=10817, acessado em 15 de novembro de 2010.

AHUJA, P.; SDEK, P.; MACMELLAN, W. R. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. **Physiol Reviews**, v. 87, p. 521–544, 2007.

AFOUDA, B.A.; MARTIN, J.; LIU, F.; CIAO-UITZ, A.; PATIENT, R.; HOPPLER, S. GATA transcription factors integrate Wnt signalling during heart development. **Development**, v.135, n.19, p.3185-90, 2008.

ANTONITSIS P, IOANNIDOU-PAPAGIANNAKI E, KAIDOGLOU A, PAPAKONSTANTINOUC. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. **Interact Cardiovasc Thorac Surg**, n.6, n.5, p.593-7, 2007.

ASSIS, A.C.; CARVALHO, J.L.; JACOBY, B.A.; CASTANHEIRA, P.; DINIZ, S.O.; CARDOSO, V.N.; GOES, A.M.; FERREIRA, A.J. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. **Cell Transplantation**, v.19, n.2, p.219-30, 2010.

BAKER. Cell Therapy: being patient. **Nature**, v.455, p.586-588, 2008.

BAKSH D, DAVIES JE, ZANDSTRA PW. Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances *in vitro* CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. **Blood**, v,106, n.9, p.3012-9, 2005.

BALANA, B.; NICOLETTI, C.; ZAHANICH, I.; GRAF, E.M.; CHRIST, T.; BOXBERGER, S.; RAVENS, U. 5-Azacytidine induces changes in electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells. **Cell Res.**, v.12, p.949-60, 2006.

BARRON, M., GAO, M. AND LOUGH, J. Requirement for BMP and FGF signaling during cardiogenic induction in non-precardiac mesoderm is specific, transient, and cooperative. **Development Dynamics**, n.218, p.383-39, 2000.

BATLOUNI, M. Interação placa, endotélio, coagulação e isquemia aguda. **RSCESP**, v.3, n.2, p. 6-13, 1993.

BEQQALI, A.; KLOOTS, J.; WARD-VAN OOSTWAARD, D.; MUMMERY, C.; PASSIER, R. Genome-wide transcriptional profiling of human embryonic stem cells differentiating to cardiomyocytes. **Stem Cells**, v.24, n.8, p.1956-67, 2006.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A. O sistema cardiovascular **Fisiologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap.20-31, p. 451-472, 2004.

BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stromal stem cells:

nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v.19, n.3, p.180-92, 2001.

BOBIS S, JAROCHA D, MAJKA M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.44, n.4, p.215-30, 2006.

BOYD, J.H.; CHAU, E.H.; TOKUNANGA, C.; BATEMAN, R.M.; HALJAN, G.; DAVANI, E.Y.; WANG, Y.; WALLEY, K.R. Fibrinogen decreases cardiomyocyte contractility through an ICAM-1-dependent mechanism. **Critical Care**, v.12, n.1, 2008.

CHEFFER, A. Mecanismos de inibição do receptor nicotínico de acetilcolina $\alpha_3\beta_4$ pela tacrina. **Universidade de São Paulo**, 2008. Dissertação de Mestrado. Consulta eletrônica ao catálogo de teses da USP realizada em 20 de dezembro de 2010: visualização disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46131/tde-27072009-153623/pt-br.php>

CHENG Y, ZOU P, YANG H, YU Z, ZHONG Z. Induced differentiation of human cord blood mesenchymal stem/progenitor cells into cardiomyocyte-like cells *in vitro*. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, v.23, n.2, p.154-7, 2004.

CHOI, Y.S.; DUSTING, G.J.; STUBBS, S.; ARUNOTHAYARAJ, S.; HAN, X.L.; COLLAS, P.; MORRISON, W.A.; DILLEY, R.J. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. **J Cell Mol Med**, v.14, n.4, p.878-89, 2010.

CHLOPCÍKOVÁ, S.; PSOTOVÁ, J.; MIKETOVÁ, P. Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v.145, n.2, p.49-55, 2001.

COLOMBO, R.C.R.; AGUILLAR, A, M. Estilo de vida e fatores de risco de pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.5, n.2, 1997.

CRAWFORD, W.H. Basic Disease Process, p.57-68, 2007.

CRUZ, J.S.; MATSUDA, H. Depressive Effects of Arenobufagin on the Delayed Rectifier K⁺ Current of Guinea-pig Cardiac Myocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 266, p.317-325, 1994.

DANALACHE, B.A.; PAQUIN, J.; DONGHAO, W.; GRYGORCZYK, R.; MOORE, J.C.; MUMMERY, C.L.; GUTKOWSKA, J.; JANKOWSKI M. Nitric oxide signaling in oxytocin-mediated cardiomyogenesis. **Stem Cells**, v.25, n.3, p.679-88, 2007.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G.JR.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY, G.; SERRE, A.C.; SNYDER, E.Y.; YOO, J.J.; FURTH, M.E.; SOKER, S.; ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v.25, n.1, p.100-6, 2007.

DEPRE, C.; SHIPLEY, G.L.; CHEN, W.; HAN, Q.; DOENST, T.; MOORE, M.L.; STEPKOWSKI, S.; DAVIES P.J.A.; TAEGTMEYER, H. Unloaded Heart *in vivo* Replicates Fetal Gene Expression of Cardiac Hypertrophy. **Nature Medicine**, v. 4, p.1269 – 1275, 1998.

DI NARDO, P.; FORTE, G.; AHLUWALIA, A.; MINIERI, M. Cardiac Progenitor Cells: Potency and Control. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 3, p. 590-600, 2010.

DISCHER, D.E.; MOONEY, D.J.; ZANDSTRA, P.W. Growth Factors, Matrices, and Forces

Combine and Control Stem Cells. **Science**, v. 324, p.1673, 2009.

DJOUAD F, CHARBONNIER LM, BOUFFI C, LOUIS-PLENCE P, BONY C, APPARAILLY F, CANTOS C, JORGENSEN C, NOËL D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. **Stem Cells**, v.25, n.8, p.2025-32, 2007.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-7, 2006.

DUROCHER, D., WARREN, R., CHARRON, F., SCHWARTZ, R. J. AND NEMER, M. Nkx2-5 and GATA-4 physically and functionally interact to activate cardiac transcription. **EMBO J**, v.16, p.5687-569, 1997.

FAZEL, S. Bone Marrow Cell Therapy for Heart Disease: a Few Good Men and Women Wanted. **Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery**, v. 133, p. 599-600, 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium (Lavras)** 6, 36-41, 2008.

FIELD, L.J.; MURRY, C.E.; SOONPAA, NAKAJIMA, VIRAG, BARTELMEZ, P.; WILLIAMS, D. Haematopoietic Stem Cells do not Transdifferentiate into Cardiac Myocytes in Myocardial Infarcts. **Nature**, v. 428, n. 6983, p. 664-668, 2004.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v.160, n.2, p.171-7, 2006.

FREDJ, S.; BESCOND, J.; LOUAULT, C.; DELWAIL, A.; LECRON, J.C.; POTREAU, D. Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. **Journal of Cell Physiology**, v.204, n.2, p.428-36, 2005.

GENG, J.; PENG, F.; XIONG, F.; SHANG, Y.; ZHAO, C.; LI, W.; ZHANG, C. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v.11, n.7, p.849-63, 2009.

GILBERT, S.F. *Developmental Biology*, ed. Sinauer Associates, Inc. Cap 2, p.25-49, 2006.

GORMAN, R.C.; JACKSON, B.M.; BURDICK, J.A.; GORMAN, J.H. Infarct Restraint to Limit Adverse Ventricular Remodeling. **J Cardiovasc Transl Res.**, publicação online prévia à impressão, 2010.

GUO, Y.; ZHANG, X.Z.; WEI, Y.; GUO, C.; LI, R.X.; ZENG, Q.C.; ZHANG, Y.J. Culturing of ventricle cells at high density and construction of engineered cardiac cell sheets without scaffold. **Int Heart J.**, v.50, n.5, p.653-62, 2009.

GWAK, S.J.; BHANG, S.H.; YANG, H.S.; KIM, S.S.; LEE, D.H.; LEE, S.H.; KIM, B.S. *In vitro* cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-b1. **Cell Biochem Funct.**, v; 27, p.148–154, 2009.

HATZISTERGOS, K.; QUEVEDO, H.; OSKOU EI, B.N.; HU, Q.; FEIGENBAUM, G.S.; MARGITICH, I.S.; MAZHARI, S.; BOYLE, A.J.; ZAMBRANO, J.P.; RODRIGUEZ, J.E.; DULCE, R.; PATTANY, P.M.; VALDES, D.; REVILLA, C.; HELDMAN, A.W.; McNIECE, I.; HARE, J.M. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulate Cardiac Stem Cell

- Proliferation and Differentiation. **Circulation Research**, v.107, p.913-922, 2010.
- HE, Q.; TRINDADE, P.T.; STUMM, M.; LI, J.; ZAMMARETTI, P.; BETTIOL, E.; DUBOIS-DAUPHIN, M.; HERRMANN, F.; KALANGOS, A.; MOREL, D.; JACONI, M.E. Fate of Undifferentiated Mouse Embryonic Stem Cells Within the Rat Heart: Role of Myocardial Infarction and Immune Suppression. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, n.13, v.1, p.188-2012, 2009.
- HENNING, R.J. Stem cells in cardiac repair. **Future Cardiol.**, v.7, n.1, p.99-117, 2011.
- HIGUCHI, M.L.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S. Coração. In: Bogliolo, L. **Bogliolo Patologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.14 , p.345-392, 2000.
- HOKE, N. N.; SALLOUM, F. N.; LOESSER-CASEY, K.; KUKREJA, R. C. E. Cardiac Regenerative Potential of Adipose-tissue Derived Stem Cells. **Acta physiologica Hungarica**, v.96, n. 3, p. 251-65, 2009.
- HONG, K.H.; RYU, J.; HAN, K.H. Monocyte Chemoattractant Protein-1-Induced Angiogenesis is Mediated by Vascular Endothelial Growth Factor-A. **Blood**, v.105, n.4, p.1405-7, 2005.
- HUANG, Y.; JIA, X.; BAI, K.; GONG, X.; FAN, Y. Effect of fluid shear stress on cardiomyogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. **Arch Med Res**, v.41, n.7, p.497-505, 2010.
- JENS, M.N.; STEPHAN, J.; BREITBACH, SAWEN, P.; ROLL, W.; HESCHELER, J.; TANEERA, J.; FLEISCHMANN, B.K.; JACOBSEN, S.E.W. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. **Nature Medicine**, v.10, n.5, p.494-501, 2004.
- KAJSTURA, J.; GURUSAMY, N.; OGO'REK, B.; GOICHBURG, P.; CLAVO-RONDON, C.; HOSODA, T.; D'AMARIO, D.; BARDELLI, S.; BELTRAMI, A.P.; CESSALI, D.; BUSSANI, R.; del MONTE, F.; QUAINI, F.; ROTA, M.; BELTRAMI, C.A.; BUCHHOLZ, B.A.; LERI, A.; ANVERSA, P. Myocyte Turnover in the Aging Heart. **Circulation**, v. 107, n.11, p.1374-86, 2010.
- KICIC, A.; SHANLEY, A.C.; HALL, C.M.; RAKOCZY, P.E. Marrow stromal cells (MSC): a species comparison. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.533, p.407-14, 2003.
- KLABUNDE, R.E. **Cardiovascular Physiology Concepts**. editora: Lippincott Williams & Wilkins. Paginas: 1-8; 41-58, 2005.
- KNOBLICH, J. A.; Mechanisms of Assymetric Stem Cell Division. **Cell**, v. 132, n.4, p. 583-97, 2008.
- KOAY, E.J.; HOBEN, G.M.B.; ATHAUNASIOU, K.A. Tissue Engineering with Chondrogenically Differentiated Human Embryonic Stem Cells. **Stem cells**, v. 25, p.2183-2190, 2007.
- KONINCKX, R.; HENSEN, K.; DANIELS, A.; MOREELS, M.; LAMBRICHTS, I.; JONGEN, H.; CLIJSTERS, C.; MEES, U.; STEELS, P.; HENDRIKX, M.; RUMMENS, J.L. Human bone marrow stem cells co-cultured with neonatal rat cardiomyocytes display limited cardiomyogenic plasticity. **Cytotherapy**, v.11, n.6, p.778-92, 2009.
- KUNG C, PINGEL JT, HEIKINHEIMO M, KLEMOLA T, VARKILA K, YOO LI, VUOPALA K,

POYHONEN M, UHARI M, ROGERS M, SPECK SH, CHATILA T, THOMAS ML. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. **Nature Medicine**, v.6, n.3, p.343-5, 2000.

LABBAF, S.; TSIGKOU, O.; MULLER, K.H.; STEVENS, M.M.; PORTER, A.E.; JONES, J.R. Spherical bioactive glass particles and their interaction with human mesenchymal stem cells *in vitro*. **Biomaterials**, v.32, n.4, p.1010-8, 2011.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, v.62, n.5, p.509-25, 2007.

LEDENT, C.; JACOBSON, M.A.; OSSWALD, H.; THOMPSON, L.; ECKLE, K.T.; KRAHN, T.; GRENZ, A.; KOHLER, D.; MITTELBRONN, M.; UNERTL, ELTZSCHING, H.K. Cardioprotection by Ecto-5'-Nucleotidase (CD73) and A2B Adenosine Receptors **Circulation**, v.115, p.1581-1590, 2007.

LEITHE, E.; RIVEDAL, E. Epidermal growth factor regulates ubiquitination, internalization and proteasome-dependent degradation of connexin-43. **Journal of Cell Science**, v.117, p.1211-1220, 2004.

LI, T.S.; KOMOTA, T.; OHSHIMA, M.; QIN, S.-L.; KUBO, M.; UEDA, K.; & HAMANO, K. TGF-beta induces the differentiation of bone marrow stem cells into immature cardiomyocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.366, n.4, p.1074-1080, 2008.

LI, M.W.; MRUK, D.D.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.107, n.42, 2010.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-8, 2001.

LOSORDO, D.W.; YOON, Y.; PARK, J.S.; TKEBUCHAVA, T.; LUEDEMAN, C. Unexpected Severe Calcification After Transplantation of Bone Marrow Cells in Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 109, p. 3154-3157, 2004.

LUTHER, P.K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signaling. **J Muscle Res Cell Motil**, v.30, n.5-6, p.171-85, 2009.

MACMELLAN, W.R.; SCHNEIDER, M.D. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. **Annu Rev Physiol**, v.62, p.289-319, 2000.

MAKINO, S.; FUKUDA, K.; MIYOSHI, S.; KONISHI, F.; KODAMA, H.; PAN, J.; SANO, M.; TAKAHASHI, T.; HORI, S.; ABE, H.; HATA, J.I.; UMEZAWA, A.; OGAWA, S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. **J Clin Invest**, v.103, p.697-705, 1999.

MALTSEV, V.A.; ROHWEDEL, J.; HESCHELER, J.; WOBUS, A.M. Embryonic stem cells differentiate *in vitro* into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. **Mechanisms of Development**, v.44, n.1, p.41-50, 1993.

MANDAL, S.; LINDGREN, A.G.; SRIVASTAVA, A.S.; CLARK, A.T.; BANERJEE, U. Mitochondrial Function Controls Proliferation and Early Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**. Publicação online prévia à impressão, 2010

MARTIN, J.; AFOUDA, B.A.; HOPPLER, S. Wnt/beta-catenin signalling regulates cardiomyogenesis via GATA transcription factors. **J Anat.**, v.216, n.1, p.92-107, 2010.

MASTITSKAYA, S.; DENECKE, B. Human spongiosa mesenchymal stem cells fail to generate cardiomyocytes *in vitro*. **J Negat Results Biomed**, v.10, n.8, p.11, 2009.

MCTAGGART SJ, ATKINSON K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. **Nephrology**, v.12, n.1, p.44-52, 2007.

MEDRADO, G.C.; MACHADO, C.B.; VALERIO, P.; SANCHES, M.D.; GOES, A.M. The Effect of a Chitosan-Gelatin Matrix and Dexamethasone on the Behavior of Rabbit Mesenchymal Stem Cells. **Biomed Mater**, v.13, p.155-161, 2006.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v.407, p.796—801, 2000.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In Search of the *in vivo* Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p.2287–2299, 2008.

MIMEAULT, M.; BATRA, S.K. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue regeneration and Cancer Therapies. **Stem Cells**, v.24, p.2319-2345, 2006.

MORALES, M.M. **Terapias avançadas: Células-tronco terapia Gênica e nanotecnologia aplicada à Saúde**. 1ª edição, Editora Atheneu, p. 3-45, 2007.

MUMMERY, C. L.; DAVIS, R. P.; KRIEGER, J. E.; Challenges in Using Stem Cells for Cardiac Repair. **Science translational Medicine**, v. 2, n. 27, 27ps 17, 2010.

MURRAY, C.J.; LOPEZ, A.D.; BLACK, R.; MATHERS, C.D.; SHIBUYA, K.; EZZATI, M.; SALOMON, J.A.; VOS, L T. Global Burden of Diseases 2005: Call for collaborators. **Lancet**, v.370, n.9582, p.109-110, 2007.

MUTHUCHAMY, M.; PAJAK, L.; WIECZOREK, D.F. Induction of endogenous myosin light chain 1 and cardiac alpha-actin expression in L6E9 cells by MyoD1. **J Biol Chem**. v.267, n.26, p.18728-34, 1992.

NAQVI, S.; SAMIM, M.; ABDIN, M.; AHMED, F.J.; MAITRA, A.; PRASCHANT, C.; DINDA, A.K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **Int J Nanomedicine**, v.16, n.5, p.983-9, 2010.

NEURINGER, I.P.; RANDELL, S.H. Stem cells and repair of lung injuries. **Respir Res.**, v. 20, p.5:6, 2004.

OKUNO Y, IWASAKI H, HUETTNER CS, RADOMSKA HS, GONZALEZ DA, TENEN DG, AKASHI K. Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.99, n.9, p.6246-51, 2002.

OTTO, W.R.; RAO, J. Tomorrow's Skeleton Staff: Mesenchymal Stem Cell and the Repair of Bone and Cartilage. **Cell Proliferation**, v.37, p.97-110, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Página de dados, n. 317, atualizada em setembro de 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>, acessado em 12 de novembro de 2010.

PATHAK, M.; SARKAR, S.; VELLAICHAMY, E.; SEN, S. Role of myocytes in myocardial

collagen production. **Hypertension**. V.37, p. 830-840, 2001.

PEDEMONTE, E.; BENVENUTO, F.; CASAZZA, S.; MANCARDI, G.; OKSENBERG, J.R.; UCCELLI, A.; BARANZINI, S. The Molecular Signature of Therapeutic Mesenchymal Stem Cells Exposes the Architecture of the Hematopoietic Stem Cell Niche Synapse. **BioMed Central Genomics**, v. 8, n. 65, 2007.

PERL, L.; WEISSLER, A.; MEKORI, Y. A.; MOR, A. Cellular Therapy in 2010: Focus on Autoimmune and Cardiac Diseases. **The Israel Medical Association Journal**, v. 12, n. 2, p. 110-115, 2010.

PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. Experimental Observations and Clinical Implications. **Circulation**, v. 81, p. 1161-1172, 1990.

PFISTER, O.; OIKONOMOPOULOS, A.; SERETI, K.I., LIAO, R. Isolation of Resident Cardiac Progenitor Cells by Hoechst 33342 Staining. *Methods in Molecular Biology*. v. 660, p.53-63, 2010.

PHILLIPS, B.W.; CROOK, JM. Pluripotent human stem cells: a novel tool in drug discovery. **Biodrugs**, v.24, n.2, p.99-108, 2010.

PLOTNIKOV, E.Y.; KHRYAPENKOVA, T.G.; VASILEVA, A.K.; MAREY, M.V.; GALKINA, S.I.; ISAEV, N.K.; SHEVAL, E.V.; POLYAKOV, V.Y.; SUKHIKH, G.T.; ZOROV, D.B. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med*, v.5A, p.1622-31, 2007.

PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. *et al. Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 278p.,1992.

PU, W.T., ISHIWATA, T., JURASZEK, A.L., MA, Q., IZUMO, S. GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. **Developmental Biology**, v.275, p.235–244, 2004.

RANGAPPA, S.; FEN, C.; LEE, E.H; BONGSO, A.; WEI, E.S.K. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. **Ann. Thorac. Surg.**, v.75, p.775-779, 2003.

RAZEGHI, P.; ESSOP, M.F.; HUSS, J.M.; ABBASSI, M.; MANGA, N.; TAEGTMEYER, H.. Hypoxia-induced Switches of Myosin Heavy Chain iso-gene Expression in Rat Heart. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.303, n.4, p.1024-7, 2003.

REBELATTO, C.K.; AGUIAR, A.M.; SENEGAGLIA, A.C.; AITA, C.M.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; KULIGOVSKI, C.; OLANDOSKI, M.; MOUTINHO, J.A.; DALLAGIOVANNA, B.; GOLDENBERGM S.; BROFMAN, P.S.; NAKAO, L.S.; CORREA, A. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. **Biochem Biophys Res Commun**, v.378, n.3, p.456-61, 2009.

RIEKSTINA, U.; CAKSTINA, I.; PARFEJEVS, V.; HOOGDUIJN, M.; JANKOVSKIS, G.; MUIZNIEKS, I.; MUCENIECE, R.; ANCANS, J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. **Stem Cell Rev.**, v.5, n.4, p.378-86, 2009.

ROMAN-CAMPOS, D.; DUARTE, H.L.; GOMES, E.R.; CASTRO, C.H.; GUATIMOSIM, S.; Natali, A.J.; ALMEIDA, A.P.; PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; CRUZ, J.S. Investigation of the Cardiomyocyte Dysfunction in Bradykinin Type 2 Receptor Knockout Mice. **Life**

Science, v.18, n.87, p.715-723, 2010.

ROSCA, A.M.; BURLACU, A. The effect of 5-azacytidine: Evidence for alteration of the multipotent ability of mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, publicação online prévia à impressão, 2010.

ROSE, R.A.; JIANG, H.; WANG, X.; HELKE, S.; TSOPORIS, J.N.; GONG, N.; KEATING, S.C.; PARKER, T.G.; BACKX, P.H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes *in vitro*. **Stem Cells**, v.26, n.11, p.2884-92, 2008.

ROURA, S.; FARRÉ, J.; HOVE-MADSEN, L.; PRAT-VIDAL, C.; SOLER-BOTIJA, C.; GÁLVEZ-MONTÓN, C.; VILALTA, M.; BAYES-GENIS, A. Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Basic Res Cardiol**, v.105, n.3, p.419-30, 2010.

RUBART, M.; FIELD, L.J. Cardiac Regeneration: Repopulating the Heart. **Annual Reviews in Physiology**, v.68, p.29-49, 2006.

SAGER, R.; KOVAC, P. Pre-adipocyte determination either by insulin or by 5-azacytidine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.79, n.2, p.480-4, 1982.

SALAMEH, A.; WUSTMANN, A.; KARL, S.; BLANKE, K.; APEL, D.; ROJAS-GOMEZ, D.; FRANKE, H.; MOHR, F.W.; JANOUSEK, J.; DHEIN, S. Cardiomyocyte Orientation and Polarization of the Gap Junction Protein Connexin43. **Circulation Research**, v.106, n.1592, 2010.

SALUCCI, S.; BATTISTELLI, M.; BURATTINI, S.; SQUILLACE, C.; CANONICO, B.; GOBBI, P.; PAPA, S.; FALCIERI, E. C2C12 myoblast sensitivity to different apoptotic chemical triggers. **Micron**, v.41, n.8, p.966-73, 2010.

SHACTER, E.; ARZADON, G.K.; WILLIAMS, J.A. Stimulation of interleukin-6 and prostaglandin E2 secretion from peritoneal macrophages by polymers of albumin. **Blood**, v.82, n.9, p.2853-64, 1993.

SHAO, H.; WANG, JH-C.; POLLAK, M.R.; WELLS, A. α -Actinin-4 Is Essential for Maintaining the Spreading, Motility and Contractility of Fibroblasts. **PLoS ONE**, v.5, n.11, 2010.

SHINMURA, D.; TOGASHI, I.; MIYOSHI, S.; NISHIYAMA, N.; HIDA, N.; TSUJI H.; TSURUTA, H.; NAKAMIZO, H.; SEGAWA, K.; TSUKADA, Y.; OGAWA, S.; UMEZAWA, A. Pretreatment of Human Mesenchymal Stem Cells with Pioglitazone Improved Efficiency of Cardiomyogenic Transdifferentiation and Improved Cardiac Function. **Stem Cells**, publicação online prévia à impressão, 2010.

SIMEK, S.; LUBANDA, J.C.; ASCHERMANN, M.; HUMHAL, J.; HORK, J.; KOVARNIK, T.; PSENIKA, M.; GOLAN, L.; DANZIG, V.; MRAZEK, V. How does the time to treatment affects the long-term prognosis for patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty? **Polish Heart Journal**, v. 61, n. 8, p. 91-96, 2004.

STALL, F.J.T.; LUIS, T.C. Wnt Signaling in Hematopoiesis: Crucial Factors for Self-Renewal, Proliferation and Cell Fate Decisions. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, p.844-849, 2010.

SUGIURA F, KITO H, ISHIGURO N. Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells

after several passages. **Biochem Biophys Res Commun**, v.316, n.1, p.233-9, 2004.

TENQ, X.; NAGATA, I.; LI, H.P.; KIMURA-KURODA, J.; SANGO, K.; KAWAMURA, K.; RAISMAN, G.; KAWANO, H. Regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons after transplantation of olfactory ensheathing cells and fibroblasts prevents fibrotic scar formation at the lesion site. **JOURNAL OF NEUROSCIENCE RESEARCH**, v. 86, n.14, p.3140-50, 2008.

TZU-RI SHIH, D.; LEE, C.; CHEN, S.; TSAI, R.; HUANG, C.; TSAI, C.; EIN-YIAO, S.; CHIU, W. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. **Stem Cells**. v. 23, p. 1012-1020, 2005.

VALERIO P, PEREIRA MM, GOES AM, LEITE MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v.25, n.15, p.2941-8, 2004.

VAN DIJK, A.; NIESSEN, H.W.; DOULABI, B.; VISSER, F.C.; VAN MILLIGEN, F.J. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res.*, v.334, n.3, p.457-67, 2008.

VASCONCELOS, C.B. Qualidade de vida, ansiedade e depressão após infarto do miocárdio. Dissertação de mestrado, **Universidade Federal de Uberlândia**, 2007.
http://www.bdttd.ufu.br/tde_arquivos/7/TDE-2007-08-30T084102Z636/Publico/CBVasconcelosDISPRT.pdf

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell**, v.96, p.245–254, 1999.

VICKARYOUS, M.K.; HALL, B.K. Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v.81, n.3, p.425-55, 2006.

WAGNER W, WEIN F, SECKINGER A, FRANKHAUSER M, WIRKNER U, KRAUSE U, BLAKE J, SCHWAGER C, ECKSTEIN V, ANSORGE W, HO AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v.33, n.11, p.1402-16, 2005.

WANG, M.; TANG, J.; XIE, Q.; PAN, G.; WANG, J. Mesenchymal Stem Cells Participate in Angiogenesis and Improve Heart Function in Rat Model of Myocardial Ischemia Reperfusion. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 30, p. 353-361, 2006.

WEISS, A.J.; STAMBAUGH, J.E.; MASTRANGELO, M.J.; LAUCIUS, J.F.; BELLET, R.E. Phase I study of 5-azacytidine (NSC-102816). **Cancer Chemother Rep.**, v.56, n.3, p.413-9, 1972.

WILSON A, TRUMPP A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature Reviews Immunology**, n.6, v.2, p.93-106, 2006.

WOJAKOWSKI, W.; TENDERA, M.; KUCIA, M.; ZUBA-SURMA E, MILEWSKI K, WALLACE-BRADLEY D, KAZMIERSKI M, BUSZMAN P, HRYCEK E, CYBULSKI W, KALUZA G, WIECZOREK P, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. Cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived Oct-4+CXCR4+SSEA-1+ very small embryonic-like stem cells. **Int J Oncol**, v.37, n.2, p.237-47, 2010.

XIE, X.J.; WANG, J.A.; CAO, J.; ZHANG, X. Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells induced by myocardial medium under hypoxic conditions. **Acta Pharmacologica**

Sinica, v.27, n.9, p.1153-8, 2006.

XU, W.; ZHANG, X.; QIAN, H.; ZHU, W.; SUN, X.; HU, J.; ZHOU, H.; CHEN, Y. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. **Exp Biol Med**. v.229, n.7, p.623-31, 2004.

YANG, M.C.; WANG, S.S.; CHOU, N.K.; CHI, N.H.; HUANG, Y.Y.; CHANG, Y.L.; SHIEH, M.J.; CHUNG, T.W. The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches *in vitro*. **Biomaterials**, v.30, n.22, p.3757-65, 2009.

YE, N.G.; ZHANG, R.L.; ZHAO, Y.F.; FENG, X.; WANG, Y.M.; LUO, G.A.. Effect of 5-azacytidine on the Protein Expression of Porcine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells *in vitro*. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v.4, n.1, p.18-25, 2006.

YOSHIOKA, N.; HISANAGA, S.; KAWANO, H. Suppression of fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing blood-brain barrier repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain injury. **Journal of Comparative Neurology**, v. 51, n. 18, p. 3867-81, 2010.

YU, L.; JIAN, S.; WEIXIN, L.; YU, W.; XICHANG, C.; CHENGIUM, H. Growth and differentiation of rat bone marrow stromal cells: does 5-azacytidine trigger their cardiomyogenic differentiation? **Cardiovascular Research**, v.58, p.460–468, 2003.

ZEOLI, A.; DENTELLI, P.; ROSSO, A.; TOGLIATTO, G.; TROMBETTA, A.; DAMIANO, L.; DI CELLE, P.F.; PEGORARO, L.; ALTRUDA, F.; BRIZZI, M.F. Interleukin-3 promotes expansion of hemopoietic-derived CD45+ angiogenic cells and their arterial commitment via STAT5 activation. **Blood**, v.112, n.2, p.350-61, 2008.

ZHANG, Y.; LI, T.S.; LEE, S.T.; WAWROWSKY, K.A., CHENG, K. Zhang Y, Li T-S, Lee S-T, Wawrowsky KA, Cheng K. Dedifferentiation and Proliferation of Mammalian Cardiomyocytes. **PLoS ONE**, v.5, n.9, p.12559, 2010.

ZHU, W.; HASSINK, R.J.; RUBART, M.; FIELD, L.J. Cell-cycle-based strategies to drive myocardial repair. **Pediatr Cardiol**. v.30, n.5, p.710-5, 2009.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W. KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v.7, n.2, p.211-28, 2001.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v.13, n.12, p.4279-95, 2002.