

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

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *NEPH* EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DIFERENCIADAS PARA O FENÓTIPO NEURONAL *IN VITRO***

MARIA CECILIA KOHLER

Florianópolis
2009

MARIA CECILIA KOHLER

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *NEPH* EM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DIFERENCIADAS PARA O FENÓTIPO NEURONAL *IN VITRO***

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

Orientador: PROF.DR. MARCIO ALVAREZ SILVA

Florianópolis
2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador, prof.Dr. Márcio Alvarez Silva por aceitar me orientar no aprendizado experimental, por dispor de suas horas preciosas para me ensinar. Fazendo parte dessa mesma equipe, prof^a.Dra. Andréa Trentin, esse trabalho não seria possível sem as suas dedicações e competências, muito obrigada.

É muita pretensão quem pensa que realiza seu trabalho sozinho, portanto agradeço a todos os integrantes do laboratório. Não vou citar nome por nome, cada um de vocês sabe da sua real contribuição para a conclusão dessa dissertação. Muitos me auxiliaram diretamente ou indiretamente durante essa jornada, mas todos com igual importância, pois nossos “happy hours” foram essenciais para tornar minha estada longe de casa mais suportável.

Não posso deixar de mencionar a minha gratidão às mães doadoras, pois essa obra não se concretizaria apenas com a nossa vontade, era preciso que muitos acreditassem nela e em nós.

São muitas as pessoas que passam por nós, mas apenas as que nos amam compreendem por vezes, nossa ausência, nosso desafeto, nossa ingratidão. Pai, Mãe, muito obrigada por tudo e desculpa alguma coisa.

Rafa, meu namorado, agradeço pelos bons dias que não retribuí, pelos beijos que não lhe correspondi, pelas várias tarefas que reivindicou para me atender, pelas vezes que não atendi os seus pedidos tão carinhosos por companhia, enfim pelo amor inesgotável, sem cobranças que sempre me dedicou.

Minha única, inigualável, maravilhosa maninha, Ana, obrigada por sempre acreditar em mim. Quantas horas de conversas no skype me incentivando sempre com aqueles discursos positivos. Saudades, volta logo.

Aos meus “velhos” amigos quero crer que estive em pensamento, pois sei que muito tenho culpa pelo nosso afastamento. Neste momento, é inevitável a vontade de poder voltar atrás, e com isso, talvez, ter dado mais valor às amizades, sabendo com isso abdicar por alguns momentos das horas de estudo. É pela compreensão da minha maneira de ser que só tenho a agradecer por vocês existirem em minha vida.

Sendo assim, espero que todo esforço tenha valido a pena!

“Somente a esperança em um futuro mais promissor pode gerar força no presente. Portanto, é fundamental que a visão do seu dia de amanhã não seja a de mais um dia que o mundo vai lhe dar, mas sim a de um dia em que o mundo lhe ofereceu mais uma oportunidade de realizar algo que lhe dê satisfação e felicidade.”

(César Romão)

RESUMO

Além do papel essencial no desenvolvimento e nutrição fetal, a placenta humana oferece uma fonte de células tronco (CTs). CTs são definidas como células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e potencial para diferenciarem-se em pelo menos dois fenótipos. Essas características podem provar sua utilidade em terapia celular com aplicações clínicas. Contudo, sabe-se que para diferenciação *in vitro* das CTs são necessários alguns fatores indutivos que são utilizados de acordo com o fenótipo desejado. Quando busca-se um fenótipo neuronal, já bem descrito na literatura, o ácido *trans*-retinóico (ATRA) é uma excelente escolha. As ações do ácido retinóico (AR) são mediadas por receptores nucleares, os quais controlam a transcrição de genes através de diferentes elementos ligantes. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, muitas proteínas de membrana estão envolvidas nos vários processos biológicos das células neuronais. Um grupo dessas proteínas que tem sido pouco estudada, é a da família NEPH, sendo composta por três tipos: NEPH1; NEPH2 e NEPH3. Todos os membros da família NEPH são expressos no córtex renal porém, vários estudos relatam a expressão de *neph1* e *neph2* em diversos outros tecidos que apóiam a hipótese dessa expressão estar envolvida na diferenciação neuronal. No presente estudo realizamos a indução química das CTs mesenquimais derivadas da placenta humana (CTMph) ao fenótipo neuronal através da utilização de ATRA e β -mercaptoetanol, visando analisar a expressão de *neph* no processo de diferenciação. As CTMph apresentaram marcadores imunofenotípicos de células indiferenciadas e de células tronco mesenquimais (CTMs) com morfologia fibroblastóide característica. As CTMph tratadas *in vitro* apresentaram redução desses marcadores, além da mudança morfológica semelhante ao fenótipo neuronal, incluindo prolongamentos. Quanto a expressão de nestina, *gene relacionado* ao fenótipo neuronal, a expressão imunofenotípica não apresentou relevância estatística, mas uma tendência a diminuir os seus níveis quando comparadas ao controle (CTL). Por imunocitoquímica analisamos a expressão de neurofilamento (NF), um marcador de neurônio diferenciado. A expressão de NF diminuiu estatisticamente nas primeiras 24 horas nas CTMph tratadas em relação ao CTL. Porém, permaneceu essa tendência de redução sem significância estatística. Quanto a análise da expressão de *neph1* e *2*, por RT-PCR, essa expressão parece diminuir nas CTMph tratadas. Os resultados encontrados são consistentes com uma diferenciação neuronal, onde sugerimos que a expressão de *neph* pode estar relacionada a manutenção das CTMph em um estado indiferenciado ou até mesmo manutenção de um progenitor neuronal mais diferenciado.

Palavras-chave: Células tronco; Células tronco mesenquimais derivadas da placenta humana; Ácido *trans*-retinóico; *neph 1*; *neph 2*; *neph3*.

ABSTRACT

Human placenta plays a fundamental and essential role in fetal development and nutrition. This rudiment may also function as a reserve of stem cells (SCs). SCs are undifferentiated cells with self renewal capacity and capable of differentiating at least into two different tissues. These features could be useful for future cell therapy-based applications. However, SCs differentiation *in vitro* is induced by inductive factors that are used in accordance with the desired phenotype. To differentiate into neuronal phenotype under experimental cell culture conditions, the *all trans* retinoic acid (ATRA) is an excellent choice. The actions of retinoic acid (AR) are mediated by nuclear receptors that control the transcription of target genes. During the nervous system development many membrane proteins are involved in biological processes. A group of proteins poorly studied, are proteins of NEPH family, being composed of three types: NEPH1, NEPH2 and NEPH3. All the members of NEPH family are highly expressed in the renal cortex, however some studies describe the expression of *neph1* and *neph2* in other tissues as well in brain during development, that supports the hypothesis of these proteins may be involved in neuronal differentiation. In our study we induced morphological changes in mesenchymal SCs derived from human placenta (MSChp) to neuronal phenotype, with ATRA and β -mercaptoethanol, focusing the expression of *neph* in these model of differentiation. MSChp presented markers of pluripotent cells, like other MSCs. MSChp treated *in vitro* with ATRA presented decrease of these markers and similar morphological changes to neuronal phenotype, displaying neurites. When analyzed by RT-PCR the nestin expression dropped in MSChp treated with ATRA when compared to control cultures (CTL). The immunophenotype expression of nestin did diminish when compared to the CTL. Were performed Immunocytochemistry for the expression of the marker of mature neurons: neurofilament (NF). Its expression diminished in first the 24 hours in the MSChp treatment of ATRA when compared to the CTL. RT-PCR showed that the expression of *neph1* and *neph2*, diminished in the MSChp treated with ATRA. These results are consistent with a neuronal differentiation. We suggest that the expression of *neph* may be related the maintenance of the MSChp in a indifferiated state or that its expression may hold the maintenance of a neuronal progenitor phenotype.

Keywords: Stem cells; Human placenta mesenchymal stem cells; *All trans* retinoic acid; *neph 1*; *neph 2*; *neph3*.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

AR: Ácido retinóico CTs:

ATRA: Ácido *trans*-retinóico

CEAH: Células epiteliais amnióticas humanas

CEMAH: Células estromais mesenquimais amnióticas humanas

CEMCH: Células estromais mesenquimais coriônicas humanas

CT: Célula tronco

CTCH: Células trofoblásticas coriônicas humanas

CTEc: Células tronco embrionárias de camundongos

CTEh: Células tronco embrionárias de humanos

CTEs: Células tronco embrionárias

CTHs: Células tronco hematopoiéticas

CTL: Controle

CTMph: Células tronco mesenquimais derivadas da placenta humana

CTMs: Células tronco mesenquimais

CTNs: Células tronco neurais

CTs: Células tronco

CTSs: Células tronco Somáticas

DAPI: 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etileno-dinitrilo-tetracético

FITC: Fluoresceína isotiocianato

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

hEEN: Enolase específica de neurônios humano

IgSF: Superfamília das imunoglobulinas (*immunoglobulin superfamily*)

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium

NF: Neurofilamento

PBS: Salina tamponada por fosfato

RAR: Receptor ácido retinóico

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

RXR: Receptor X retinóide

SBF: Soro bovino fetal

SMA: Actina de músculo liso

SNC: Sistema Nervoso Central

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

TXRD: *Texas Red*

UFC-F: Unidade Formadora de Colônia-Fibroblastóide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões da placenta humana.....	12
Figura 2. Característica da autorrenovação de CTs por divisão simétrica e assimétrica.. ..	13
Figura 3. Origem e potencialidade das CTs.	14
Figura 4. Morfologia das CTMs <i>in vitro</i> obtidas da placenta humana.....	16
Figura 5: Regiões distintas da placenta humana e células que as caracterizam.	19
Figura 6. Diagrama dos possíveis mecanismos de diferenciação das CTs.	20
Figura 7. Efeitos do AR na formação de homodímeros e heterodímeros, na regulação gênica para fenótipo adipocítico.	22
Figura 8. Esquema da região da placenta coletada para cultura de CTMs.....	26
Figura 9. Morfologia das CTMph.	31
Figura 10. Expressão de marcadores de CTs indiferenciadas e mesenquimais, em CTMph.	32
Figura 11. Morfologia das CTMph após indução ao fenótipo neuronal.	32
Figura 12. Expressão de marcadores de CTs indiferenciadas e mesenquimais, em CTMph e CTMph tratadas.....	33
Figura 13. Expressão de nestina em CTMph e CTMph tratadas.....	34
Figura 14. Quantificação da expressão de CTMph tratadas nestina positivas.	35
Figura 15. Expressão de nestina nas CTMph tratadas em diferentes tempos de cultura.	35
Figura 16. Quantificação da expressão de CTMph tratadas, neurofilamento positivas	36
Figura 17. Expressão de neurofilamento nas CTMph tratadas em diferentes tempos de cultura.....	37
Figura 18. Expressão da família de genes <i>neph</i> em CTMph e CTMph tratadas.	38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PLACENTA HUMANA	11
1.1.1 Desenvolvimento e estrutura anatômica	11
1.2 CÉLULAS TRONCO	12
1.2.1 Características	12
1.2.2 Células tronco embrionárias	14
1.2.3 Células tronco somáticas	15
1.2.4 Células tronco mesenquimais	15
1.2.5 Células tronco obtidas de placenta humana	17
1.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO <i>IN VITRO</i>	20
1.3.1 Ácido retinóico	21
1.3.2 Papel dos genes <i>neph</i> na diferenciação neural	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 PLACENTA HUMANA	26
3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA	27
3.3 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DAS CTMS PELO TRATAMENTO COM ÁCIDO <i>TRANS-RETINÓICO</i> E B-MERCAPTOETANOL.....	27
3.4 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA E FENOTÍPICA.....	28
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	31
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO OBTIDAS DE PLACENTA HUMANA.....	31
4.2 EFEITO DA INDUÇÃO NEURONAL NAS CTMph.....	32
4.2.1 Análise morfológica	32
4.2.2 Análise da expressão gênica e imunofenotípica	33

4.3 INFLUÊNCIA DA FAMÍLIA DE GENES <i>NEPH</i> NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTM _{ph} PARA O FENÓTIPO NEURONAL.....	37
5 DISCUSSÃO	39
5.1 EFEITO DA INDUÇÃO NEURONAL NAS CTM _{ph}	40
5.2 INFLUÊNCIA DA FAMÍLIA DE GENES <i>NEPH</i> NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTM _{ph} PARA O FENÓTIPO NEURONAL.....	43
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 PLACENTA HUMANA

1.1.1 Desenvolvimento e estrutura anatômica

Em humanos, após a fertilização, por volta do sexto-sétimo dia o blastocisto é implantado e inicia o desenvolvimento da placenta. Neste estágio o blastocisto é achatado e composto de uma parede externa, o trofoblasto. A cavidade blastocística é composta por um pequeno grupo de células maiores, a camada celular interna, que dará origem ao embrião, cordão umbilical e epitélio amniótico (PAROLINI *et al.*, 2008).

Já no oitavo-nono dia após a fertilização, as células trofoblásticas proliferam, gerando uma forma de trofoblasto bilaminar. O exterior das duas camadas transforma-se em sincíotrofoblasto pela fusão de células trofoblásticas, visto que as células internas (citotrofoblásticas) permanecem temporariamente sem fundir. Esses citotrofoblastos proliferando e o sincíotrofoblasto formam um sistema de trabéculas intermediárias a colunas hemáticas. A partir dessas trabéculas são originadas as primeiras vilosidades que são distribuídas por toda a periferia da membrana coriônica. As vilosidades em contato com o decídua basal proliferam para dar forma ao córion (PAROLINI *et al.*, 2008). Essa rápida proliferação trofoblástica e desenvolvimento do saco coriônico e das vilosidades coriônicas caracterizam o início do desenvolvimento da placenta (MOORE; PERSAUD, 2008) (Figura 1).

Ao final da terceira semana, o arranjo anatômico necessário para as trocas fisiológicas entre a mãe e o feto, já está estabelecido (MOORE; PERSAUD, 2000).

Após o seu completo desenvolvimento, a placenta humana apresenta uma

forma discóide, com diâmetro variável entre 15 e 20 centímetros e uma espessura entre dois e três centímetros (PAROLINI *et al.*, 2008).

Além do papel essencial no desenvolvimento e nutrição fetal, a placenta humana oferece uma fonte de células tronco (CTs) (PAROLINI *et al.*, 2008).

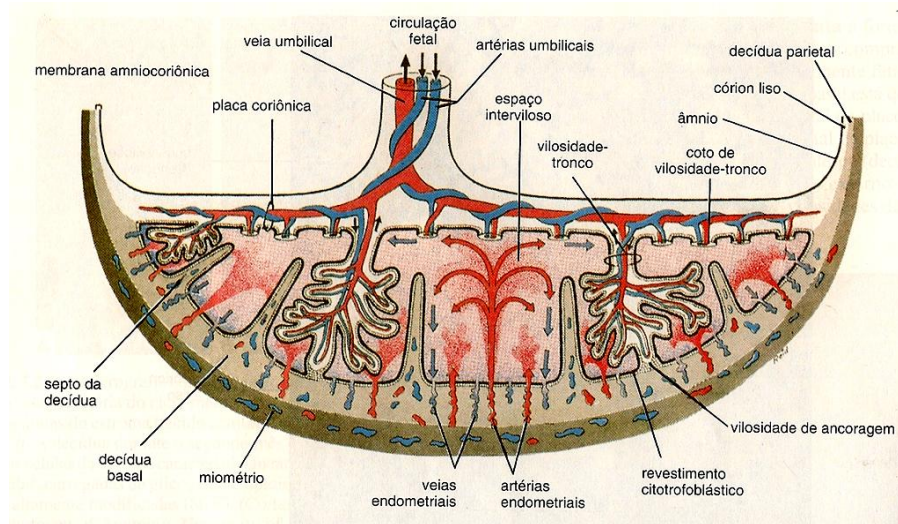


Figura 1. Regiões da placenta humana. Relação do córion viloso (parte fetal da placenta) com o decídua basal (parte materna da placenta).

Fonte: Adaptado de Moore e Persaud (2008).

1.2 CÉLULAS TRONCO

1.2.1 Características

CTs são definidas como células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação e obrigatoriamente apresentam potencial para diferenciarem-se em pelo menos dois fenótipos. A característica de autorrenovação é mantida tanto por divisões simétricas quanto assimétricas. Quando há divisão simétrica, as duas novas células geradas, células filhas, são idênticas à célula tronco (CT) de origem ou precursora; na divisão assimétrica, somente uma célula será idêntica a CT de origem e a outra seguirá na via para a diferenciação (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). A via para diferenciação envolve primeiramente a diferenciação de uma célula filha subsequente denominada de célula progenitora, a qual prolifera antes da

diferenciação propriamente dita. Devido à sua multiplicação durante a fase de proliferação, os progenitores são frequentemente denominados de células em trânsito de amplificação (Figura 2) (RAFF, 2003).

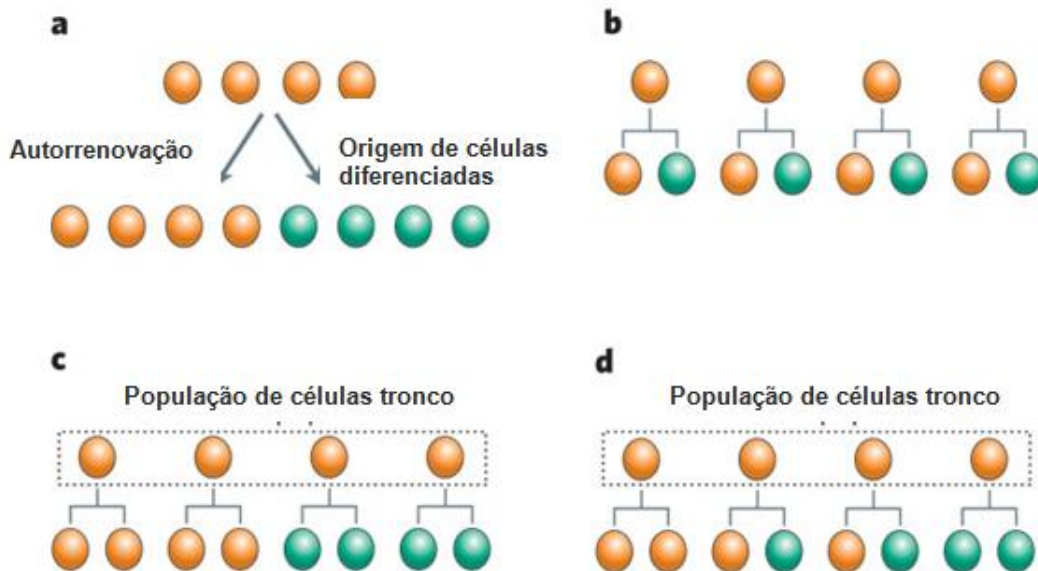


Figura 2. Característica da autorrenovação de CTs por divisão simétrica e assimétrica. a) CTs (laranja) apresentam a característica de autorrenovação e proliferação de células diferenciadas (verde). b-d) Mecanismos de manutenção de um balanço de CTs e uma progênie de células diferenciadas. b) Divisão celular assimétrica, na qual a CT gera uma CT filha e uma destinada a diferenciação. c) Divisão celular simétrica: na qual a CT divide-se simetricamente, gerando duas CTs filhas ou duas células diferenciadas. d) Combinação das divisões celulares: CTs podem dividir-se tanto simetricamente quanto assimetricamente. Fonte: Adaptado de Morrison e Kimble (2006).

As CTs podem ser divididas em dois grandes grupos conforme o tecido de origem das mesmas, em: Células Tronco Embrionárias (CTEs) e Células Tronco Somáticas (CTsS). CTsS são originadas dos mais diversos tecidos adultos e fetais, após a fase de gastrulação, enquanto CTEs são derivadas da massa interna do blastocisto do embrião (Figura 3A) (TAUPIN, 2006).

Conforme a potencialidade de diferenciação, as CTs são classificadas em pluripotente ou multipotente. As CTEs são células pluripotentes porque podem originar todas as células do embrião, ou seja, são capazes de originar as três camadas germinativas: mesoderme, ectoderme e endoderme, porém não são consideradas totipotentes, pois não possuem a capacidade de gerar os tecidos extra embrionários necessários para o desenvolvimento fetal. Já as CTsS são CTs que dão origem a mais de um fenótipo sendo caracterizadas como multipotentes (Figura 3B) (RAFF, 2003; ULLOA-MONTOYA; VERFAILLIE; HU, 2005; TAUPIN, 2006).

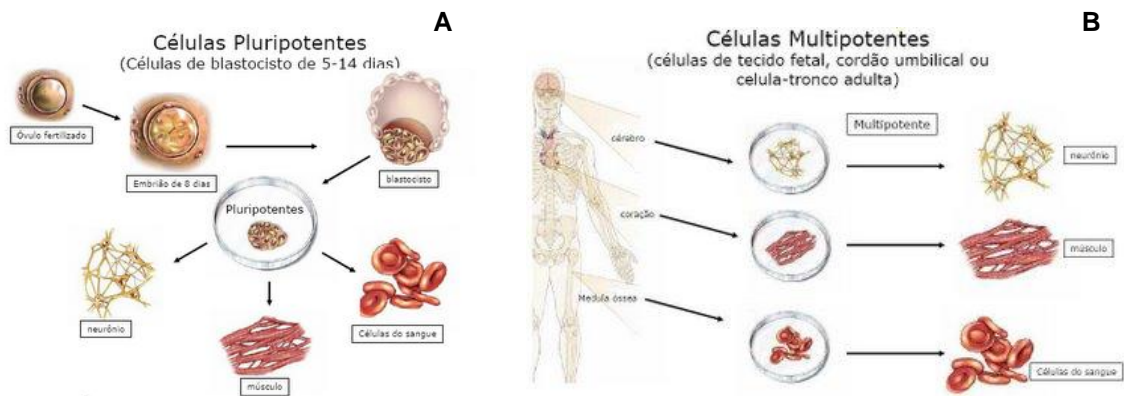


Figura 3. Origem e potencialidade das CTs. A) CTEs: CTs originadas da camada interna do blastocisto, pluripotentes. B) CTs: CTs originadas de tecidos fetais e adultos, multipotentes.
Fonte: Mingroni-Netto e Dessen (2009).

1.2.2 Células tronco embrionárias

Como anteriormente descrito, CTEs são células originadas da camada interna do blastocisto, capazes de diferenciarem-se em células das três camadas germinativas, sendo pluripotentes (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005; YEN *et al.*, 2005). Primeiramente estas células foram obtidas de camundongos e mais recentemente de humanos (MARTIN, 1981; THOMSON *et al.*, 1995; THOMSON *et al.*, 1998). Um aspecto marcante destas células tronco embrionárias de camundongos (CTEc) após expansão e manutenção destas *in vitro*, foi a capacidade de reintegrar a embriogênese quando injetadas antes da implantação do embrião, produzindo uma progênie diferenciada funcional em todos os tecidos e órgãos (SMITH, 2001 *apud* ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Em princípio, células tronco embrionárias de humanos (CTEh) podem ser capazes de produzir os mesmos resultados, contudo, por razões éticas, ainda não foi possível demonstrar. Porém, o que tem sido demonstrado é que tanto a injeção com CTEc quanto de CTEh, em animais adultos, geram tumores de diferentes tipos, denominados de teratomas (WOBUS; HOLZHAUSEN, 1984 *apud* ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). A presença de células das três camadas germinativas nestes tumores comprova a pluripotencialidade destas células.

É imprescindível a conquista da eliminação dessa gênese tumoral para alcançar uma aplicação terapêutica destas células. Bem como, exclusão de

problemas éticos que limitam sua utilização em decorrência de serem células originadas da camada celular interna do blastocisto.

1.2.3 Células tronco somáticas

As CTSs são também denominadas de células tronco adultas e atendem a todos os critérios que caracterizam uma CT. Porém, tanto a capacidade de autorrenovação quanto o potencial de diferenciação são mais restritos do que nas CTEs (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Dentre os vários tipos de CTSs, as células tronco hematopoiéticas (CTHs) são as mais bem estudadas. Sendo que se conhece já a descrição hierárquica do sistema hematopoiético com marcadores de superfície caracterizados para os progenitores e os oito tipos de células sanguíneas diferenciadas (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

Um número considerável de outras CTSs, têm sido estudadas, dentre elas: Células tronco neurais (CTNs) (GAGE, 2000 *apud* ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005); Células tronco mesenquimais (CTMs) diferenciando-se em fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipócitos e músculo esquelético (PITTENGER; MACKAY *et al.*, 1999; PROCKOP, 1997; FRIDENSHTEIN, 1982 *apud* ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005); Células tronco gastrointestinais (POTTEN, 1998); Células tronco epidermais (WATT, 1998); entre outras.

1.2.4 Células tronco mesenquimais

Um dos mais extensivos estudos de populações multipotentes de CTSs, têm sido de CTMs obtidas da medula óssea (PITTENGER; MACKAY, 1999 *apud* YEN *et al.*, 2005).

A medula óssea apresenta dois tipos de CTSs: As Células Tronco Hematopoiéticas (CTHs), que são responsáveis em formar a linhagem sanguínea; e as Células Tronco Não Hematopoiéticas, também denominadas de CTMs,

responsáveis pela manutenção do estroma medular (células diferenciadas: adipócitos, células endoteliais e fibroblastos) (ZHANG *et al.*, 2004; ABDEL AZIZ *et al.*, 2007).

Como descrito CTMs *in vitro*, além de formar o estroma medular podem se diferenciar em outros fenótipos, como: adipócitos, cardiomiócitos, células epiteliais, células gliais, hepatócitos, miócitos, osteoblastos e neurônios (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974; CAPLAN, 1994; DEANS *et al.*, 2000; MINGUELL *et al.*, 2000; PITTENGER *et al.*, 2004, CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; OHNISHI *et al.*, 2007 *apud* IN 'T ANKER *et al.*, 2004; PITTENGER *et al.*, 1999 *apud* ZHANG *et al.*, 2004; REYES *et al.*, 2001).

Alexander Friedenstein e Maureen Owen foram os primeiros a utilizar CTMs em transplantes de animais em laboratório. Em seus estudos, observaram que a CTMs quando plaqueadas em baixas densidades rapidamente aderem ao plástico e são facilmente separadas das células hematopoiéticas não aderentes por repetidas lavagens. Em condições apropriadas de cultura, CTMs são derivadas de um progenitor comum que formam colônias, a Unidade Formadora de Colônia-Fibroblastóide (UFC-F). Sendo, por fim, determinada a seguinte definição de CTMs obtidas da medula óssea *in vitro*, são rapidamente aderentes e clonogênicas, e capazes de extensa proliferação (BIANCO *et al.*, 2001).

As CTMs obtidas da medula óssea apresentam duas possíveis morfologias, uma alongada semelhante aos fibroblastos e outra mais poligonal semelhante a células epiteliais (Figura 4) (BIANCO *et al.*, 2001).

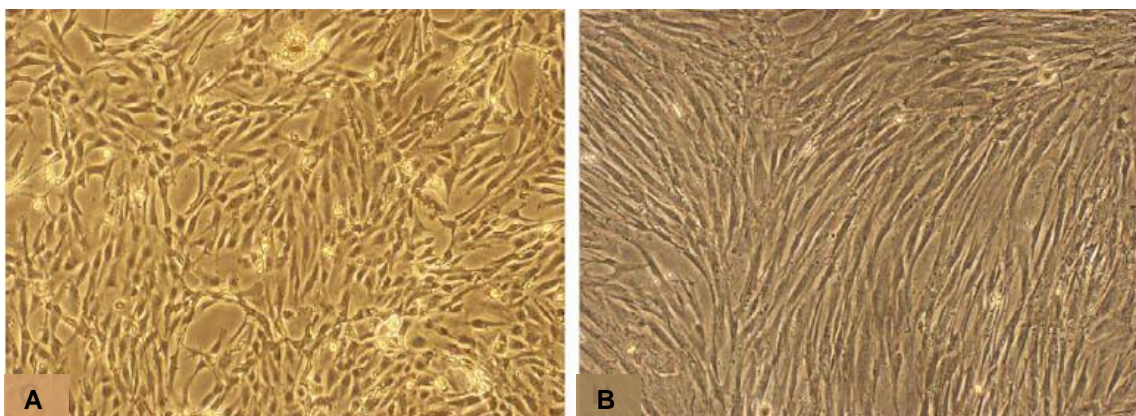


Figura 4. Morfologia das CTMs *in vitro* obtidas da placenta humana. A) Forma poligonal das CTMs. B) Forma achatada, fibroblastóide das CTMs.

Fonte: Adaptado de Muraglia, Cancedda e Quarto (2000).

Quanto aos marcadores de superfície celular que não estão presentes nas CTMs, há um consenso. Sendo os seguintes: CD11b (marcador celular imune);

CD45 (marcador de todas as células hematopoiéticas); CD34 (marcador primitivo de célula tronco hematopoiética) raramente expresso em CTMs humanas porém, positivo em CTMs de camundongo; CD31 (marcador de células hematopoiéticas e endoteliais); CD117 (marcador celular/progenitor tronco hematopoiético). Porém, não há um marcador positivo específico para as CTMs da medula óssea (KOLF *et al.*, 2007).

Conforme revisão de Kolf, Cho e Tuan (2007), a combinação de Stro-1 e CD106, formam um marcador humano para CTMs. Mas não se pode esquecer que esta expressão é muito variável com as condições *in vitro*, como por exemplo, comportamento da expressão durante a expansão da cultura. Existe um consenso na literatura sobre a expressão de genes específicos envolvidos na autorrenovação das CTMs que preservam o estágio indiferenciado: Oct-4; Sox-2 e Rex-1 (KOLF *et al.*, 2007). Sendo assim, a caracterização de CTMs *in vitro*, através de marcadores de superfície, é difícil e deve ser feito através de uma combinação de diferentes moléculas para avaliar a identidade da CTM.

Em contrapartida, as CTMs provenientes da medula óssea adulta são escassas e diminuem consideravelmente com a idade (FUKUCHI *et al.*, 2004; IN 'T ANKER *et al.*, 2004). Estima-se que as CTMs representam de 0,01-0,0001% da população das células nucleadas da medula óssea humana de adultos (MIAO *et al.*, 2006).

Recentes estudos demonstraram outras fontes de CTMs, com diferente frequência e variada capacidade de diferenciação. Essas fontes incluem: rins, pulmões e fígado; e tecidos fetais, tais como: sangue do cordão umbilical, fígado fetal e placenta (BATTULA *et al.*, 2007).

1.2.5 Células tronco obtidas de placenta humana

Vários grupos têm voltado suas atenções para a placenta humana como uma possível fonte de CTs devido a alguns fatores existentes neste tecido. Primeiro, pelo fato da placenta ser originada durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, reforça a possibilidade deste tecido conter células com algum grau de plasticidade, similar à células dos estágios mais precoces do

desenvolvimento embrionário, a partir das quais derivam. Segundo, pelo fato da placenta ser fundamental para a manutenção da tolerância feto-materna durante a gestação, sugere-se que células presentes neste tecido apresentam características imunomodulatórias. Assim, estas células poderão ser capazes de diferenciarem-se em diferentes tipos celulares e ainda, serem utilizadas em enxertos alogênicos (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

A hipótese de que o tecido da placenta apresenta células pluripotentes é devido a placenta ser originada antes da fase de gastrulação e às células embrionárias pré-gastrulação apresentarem o potencial para diferenciação em diferentes linhagens (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

Há quatro regiões distintas na placenta humana com populações de células diferentes. A região epitelial amniótica apresenta células epiteliais amnióticas humanas (CEAH); região mesenquimal amniótica contém células estromais mesenquimais amnióticas humanas (CEMAH); região mesenquimal coriônica com células estromais mesenquimais coriônicas humanas (CEMCH) e por fim, a região trofoblástica coriônica comporta células trofoblásticas coriônicas humanas (CTCH) (Figura 5). Essas células originadas de diferentes camadas, apresentam uma plasticidade variável. Sendo que, na literatura essa plasticidade tem sido utilizada para descrever células isoladas da placenta. Porém, nem todas as células derivadas desse tecido foram claramente evidenciadas quanto as características marcantes de CTs: autorrenovação e diferenciação fenotípica. Interessantemente CTs obtidas das diferentes regiões da placenta apresentam características semelhantes à células estromais mesenquimais derivadas de medula óssea, sendo elas, CEMAH e CEMCH (PAROLINI *et al.*, 2008).

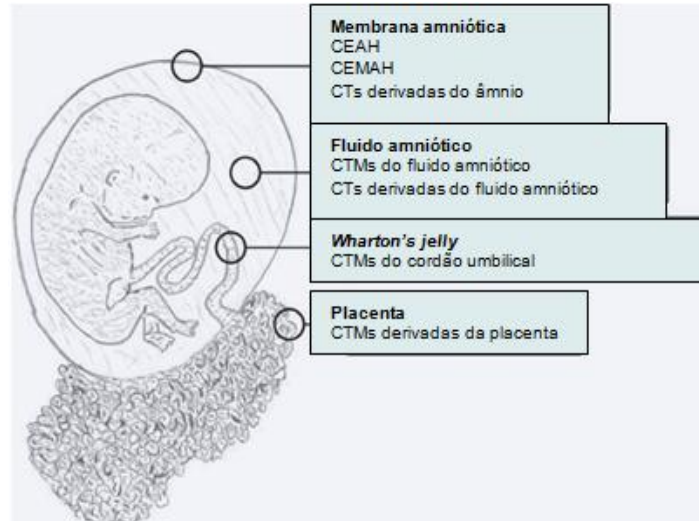


Figura 5: Regiões distintas da placenta humana e células que as caracterizam.

Fonte: Adaptado de Marcus e Woodbury (2008).

No primeiro *Workshop* Internacional de Células Tronco Derivadas da Placenta, em 2007, foram definidos alguns critérios para classificar as células tronco mesenquimais derivadas da placenta humana (CTMph), sendo os seguintes: aderência ao plástico, formação de UFC-F, expressão de marcadores de superfície como: CD90; CD73; CD105; origem fetal e capacidade de diferenciação em uma ou mais linhagens, incluindo osteogênica, adipogênica, condrogênica, e vascular/endotelial (PAROLINI *et al.*, 2008).

As CTMph apresentam características morfológicas semelhantes as provenientes da medula óssea humana, e representam linhagens de células provenientes da placenta por apresentarem marcadores de superfície celular correspondentes a essas linhagens. E ainda, expressam vários genes, incluindo marcadores de hemangioblastos, progenitores de CTHs e célula endotelial, similares aos das CTMs provenientes da medula óssea humana (FUKUCHI *et al.*, 2004).

Estudos recentes, tem demonstrado que as CTMph quando cultivadas, possuem a capacidade de diferenciação em dois ou mais fenótipos tais como, osteócitos e condrócitos (FUKUCHI *et al.*, 2004; MIAO *et al.*, 2006), tanto em neurônios como em células gliais (ZHANG *et al.*, 2004;ZHANG *et al.*, 2006).

Sendo assim, a placenta humana é uma atrativa e importante fonte de CTs multipotentes, já que este é um tecido temporário e descartado logo após o parto. Embora a placenta não apresente células tronco com o mesmo potencial de proliferação e diferenciação das CTEs, são ainda originadas do feto e sua plasticidade pode ser superior, em muitos aspectos, às CTs (YEN *et al.*, 2005).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO *IN VITRO*

Os mecanismos reguladores que determinam quando uma CT irá diferenciar-se, são ainda usualmente desconhecidos, mas em princípio, isto pode depender da interação célula-célula, e/ou dos fatores do microambiente (WATT; HOGAN, 2000; SPRANDING *et al.*, 2001 *apud* RAFF, 2003).

Por mais que não se saiba ao certo, quais os agentes reguladores desses mecanismos, algumas teorias são propostas, tais como: transdiferenciação, desdiferenciação e fusão celular.

A teoria da transdiferenciação é um mecanismo pelo qual o potencial das CTs pode contribuir para tipos celulares de diferentes linhagens. Esta conversão de linhagem ocorre diretamente pela ativação de um programa de diferenciação que não estava sendo expresso, para alterar a linhagem específica da célula (Figura 6A). Porém, a mudança de diferenciação a uma linhagem específica pode ocorrer pelo mecanismo da desdiferenciação, ou seja, a célula retorna ao nível mais indiferenciado (multipotente) e agora sim, poderá diferenciar em uma nova linhagem (Figura 6B) (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

E por fim, a teoria da fusão celular, defende que células diferentes se unem e essa nova célula formada sofre subsequente transdiferenciação (Figura 6C) (YAMAGUCHI *et al.*, 2006).

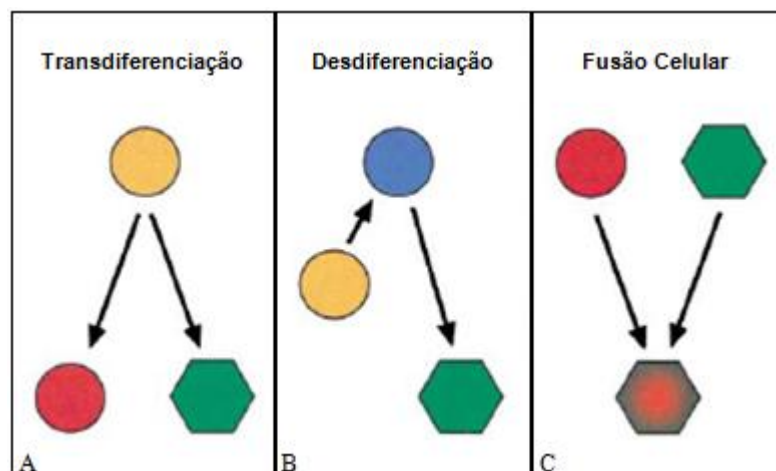


Figura 6. Diagrama dos possíveis mecanismos de diferenciação das CTs. CTs (Círculo laranja); CTs pluripotentes (Círculo azul) e Células diferenciadas (Círculo vermelho e hexágono verde). A) Teoria da transdiferenciação. B) Teoria da desdiferenciação. C) Teoria da fusão celular.

Fonte: Adaptado de Wagers e Weissman (2004).

Contudo, sabe-se que para diferenciação *in vitro* das CTMs são necessários alguns fatores indutivos que são utilizados de acordo com o fenótipo desejado.

Para a indução do fenótipo neuronal, um dos objetivos deste trabalho, como bem descrito na literatura, utiliza-se o Ácido *trans*-retinóico (ATRA). Conforme Zhang *et al.* (2006), o ATRA em altas concentrações induz as CTMs ao fenótipo neural e reprime a diferenciação em linhagens mesodermiais.

1.3.1 Ácido retinóico

As ações do ácido retinóico (AR) são mediadas por receptores nucleares, os quais controlam a transcrição de genes através de diferentes elementos ligantes. Há duas famílias distintas desses receptores: Receptor ácido retinóico (RAR) ativados pelo *all-trans* e *9-cis* ácido retinóico (os dois maiores isômeros naturais do AR) e Receptor X retinóide (RXR) responsivo somente ao *9-cis* ácido retinóico (MILLS *et al.*, 1996; MARK; GHYSELINCK; CHAMBON, 2009). Os dois isômeros do AR são encontrados *in vivo*, porém o mais abundante é o *all-trans*-AR (ATRA). Enquanto o *13-cis*-AR é detectado em baixas concentrações, tanto em camundongos quanto humanos, o *9-cis*-AR nunca foi detectado *in vivo* (ZIOUZENKOVA; PLUTZKY, 2008).

Os receptores nucleares para AR apresentam uma estrutura modular com seis diferentes domínios. A família RAR consiste em três subtipos de receptores: RAR- α , RAR- β e RAR- γ . Assim como a família RAR, a família RXR também apresenta três isotipos genéticos (MARK; GHYSELINCK; CHAMBON, 2009).

A complexidade das vias de sinalização do AR é decorrente, pelo menos *in vitro*, da ligação de RAR aos seus elementos responsivos, resultarem na formação tanto de homodímeros quanto de heterodímeros (Figura 7) (MARK; GHYSELINCK; CHAMBON, 2009).

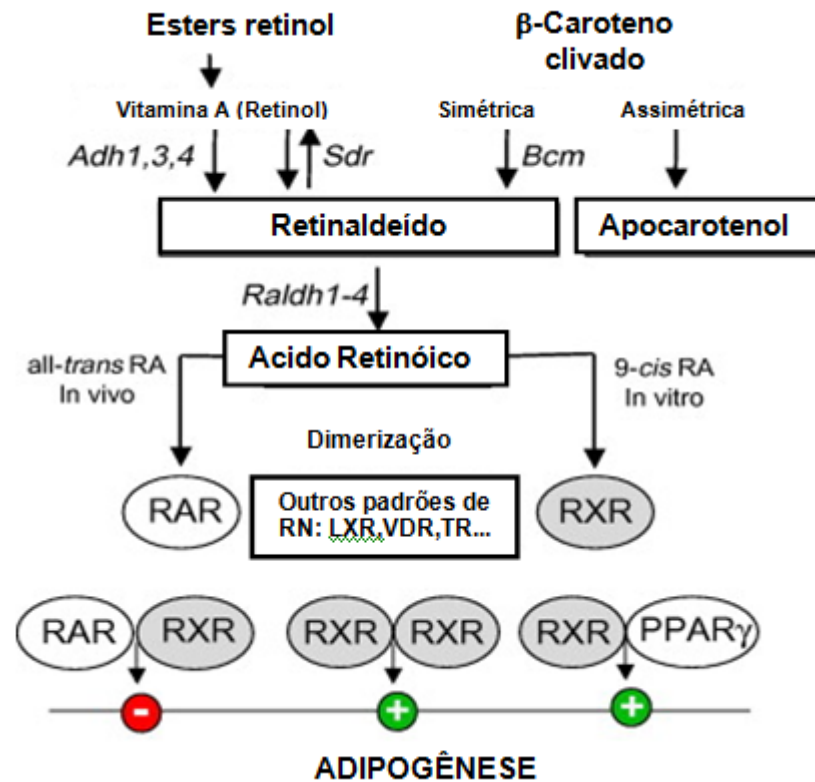


Figura 7. Efeitos do AR na formação de homodímeros e heterodímeros, na regulação gênica para fenótipo adipocítico.

Fonte: Adaptado de Ziouzenkova e Plutzky (2008).

O ATRA e seus derivados são essenciais tanto para o desenvolvimento embrionário, quanto para o crescimento e diferenciação de muitos tipos celulares em organismos adultos (MILLS *et al.*, 1996; ROSS *et al.*, 2000).

A ativação de genes que contém elementos responsivos ao ácido retinóico estão envolvidos em diversos processos biológicos interconectados, tais como: embriogênese, crescimento e diferenciação celular (ROSS *et al.*, 2000).

Alguns estudos têm relatado a influência do ATRA na indução do fenótipo neural de CTMs. Yamaguchi *et al.* (2006) revelaram que a utilização de uma combinação de fatores indutivos, incluindo ATRA, promoveu a expressão de genes e marcadores relacionados com o fenótipo neuronal e supressão dos marcadores mesodermiais em células mesenquimais de medula óssea de camundongos. Ainda, o ATRA induziu paralelamente, apoptose e diferenciação das células sobreviventes em uma linhagem de células neuronais olfatórias imortalizadas (LAKARD *et al.*, 2007). Em outro estudo, em uma linhagem de CTNs, o ATRA foi capaz de induzir a expressão de transportadores de aminoácidos do Sistema Nervoso Central (SNC) (BIANCHI *et al.*, 2008).

Assim, o ATRA parece ser um importante sinal indutivo extrínseco na diferenciação neural *in vitro*.

1.3.2 Papel dos genes *neph* na diferenciação neural

Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, muitas proteínas de membrana estão envolvidas nos vários processos biológicos das células neuronais, tais como diferenciação celular, migração neuronal, orientação axonal e formação sináptica. Sendo que a própria manutenção e função neuronal requer vários processos regulatórios de diferenciação neural (ROUGON; HOBERT, 2003). Para esses processos há o envolvimento de diferentes proteínas de membrana, sendo uma delas a superfamília das imunoglobulinas (*immunoglobulin superfamily*- IgSF) (ROUGON; HOBERT, 2003; TAMURA *et al.*, 2005).

A identificação e caracterização dos genes que codificam proteínas de membrana IgSF ajudarão no melhor entendimento dos mecanismos moleculares de muitos processos biológicos importantes e poderão oferecer-nos meios de intervenção nestes processos pelo desenvolvimento de moléculas que interagem com proteínas IgSF (SUN *et al.*, 2003).

Um grupo dessas proteínas pertencente à classe das IgSF que tem sido pouco estudada, é a da família NEPH, sendo composta por três tipos: NEPH1; NEPH2 e NEPH3. Todos os membros da família NEPH são expressos no córtex renal (SELLIN *et al.*, 2003).

NEPH1 contém cinco domínios extracelulares tipo imunoglobulina, é abundantemente presente nos rins e sua ausência em camundongos resulta em proteinúria grave e morte pós natal precoce (DONOVIEL *et al.*, 2001; HUBER *et al.*, 2003). Ainda, a expressão de *neph1* é encontrada nas membranas fetais e placenta de ratos (BEALL *et al.*, 2005).

A expressão de *mkirre* (homólogo do gene *neph2*, em mamíferos) em células estromais de medula óssea de camundongos, é responsável pela manutenção das CTHs em um estágio indiferenciado (UENO *et al.*, 2003; GERKE *et al.*, 2005). Sendo que, em camundongos adultos *mkirre* é detectado nas células estromais da medula óssea e cérebro, tanto no desenvolvimento quanto na fase

adulta, e não nos músculos esqueléticos (UENO *et al.*, 2003; TAMURA *et al.*, 2005).

Ainda, tem sido demonstrado que o *mKirre* é expresso em neurônios primários sensoriais durante o desenvolvimento de órgãos sensoriais como cóclea, gânglios trigeminiais, retina e epitélio olfatório (MORIKAWA *et al.*, 2007). O mRNA de *mKirre* é largamente expresso em populações neuronais tanto no cérebro de embriões, quanto no cérebro adulto, em regiões onde novas sinapses se formam (TAMURA *et al.*, 2005). O mRNA de *Kirrel3* (também homólogo do gene *neph2*, em mamíferos) é expresso em células do gânglio da raiz dorsal durante o desenvolvimento em camundongos, sugerindo um papel importante na geração de conexões sinápticas (KOMORI *et al.*, 2008)

Kirrel2 (homólogo do gene *neph3*, em mamíferos) codifica uma proteína com cinco domínios tipo Ig que é predominantemente expressa no pâncreas (SUN *et al.*, 2003; GERKE *et al.*, 2005)

Com base nessas observações, há uma forte evidência que a expressão destes genes possa estar envolvida na diferenciação neuronal, assim como no desenvolvimento e formação de rede sináptica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de *neph* no processo de diferenciação das CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol para indução de fenótipo neuronal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Observar mudanças morfológicas nas CTMs submetidas a tratamento químico com ATRA e β -Mercaptoetanol;
- b) Verificar a expressão de marcadores neuronais nas CTMs, em células controle e tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol, através da técnica de imunocitoquímica e de RT-PCR;
- c) Observar a expressão de *neph* nas CTMs, em culturas controle e tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol, em diferentes tempos, através da técnica de RT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PLACENTA HUMANA

A placenta foi obtida através da colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no qual pacientes saudáveis doaram suas placentas, após concordância com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A). O TCLE teve como objetivo esclarecer às doadoras, a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta foi realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através de número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG.

A placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril, contendo salina tamponada por fosfato (PBS) e encaminhada para cultura no Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular-UFSC. Para a realização das culturas, utilizamos apenas a região da placenta localizada na parte fetal do anexo embrionário, próxima ao cordão umbilical (Figura 8).

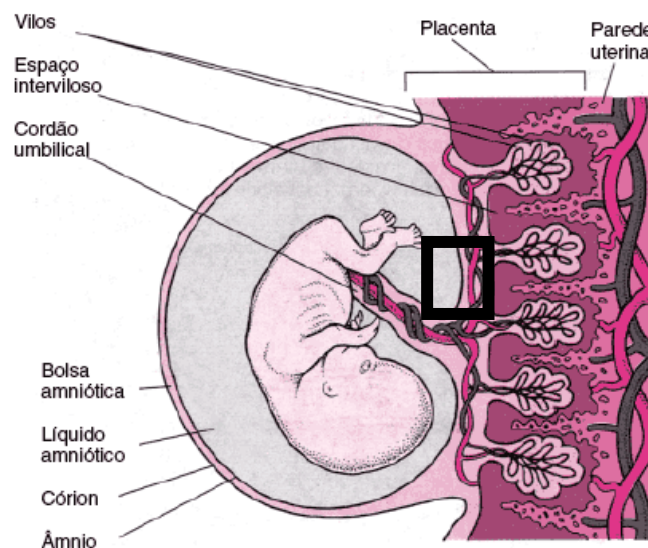


Figura 8. Esquema da região da placenta coletada para cultura de CTMs. A região destacada no quadrado é utilizada para cultura de CTMph.

Fonte: Adaptado de Berkow (2009).

3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA

A placenta foi dissociada mecanicamente e digerida enzimaticamente com pancreatina e tripsina, por aproximadamente 20 minutos, em temperatura ambiente. O tecido dissociado homogeneamente foi submetido à centrifugação (500g) durante cinco minutos e o *pellet* ressuspenso em IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab), penicilina/estreptomicina (ambas Invitrogen) conforme orientações do fabricante. Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning) e mantidas em estufa úmida, a 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO₂. Após três dias, o meio de cultura foi trocado e as células não aderidas descartadas. A troca do meio ocorreu periodicamente (três-quatro dias), sempre havendo remoção das células não aderentes, selecionando assim, as CTMs por sua adesão ao plástico.

Após duas semanas de cultura, quando a monocamada estava confluenta (80 a 90%), as células aderentes foram retiradas usando solução de 0,05% tripsina (Invitrogen) e 0,1 M ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Invitrogen), em seguida lavadas com PBS e re-plaqueadas na concentração de 1x10⁵ células/mL em IMDM suplementado com 10% de SBF e penicilina/estreptomicina (passagem 1).

3.3 DIFERENCIAÇÃO NEURONAL DAS CTMS PELO TRATAMENTO COM ÁCIDO TRANS-RETINÓICO E B-MERCAPTOETANOL

Usamos células com passagem superior a cinco, em nossos experimentos. As células foram plaqueadas em placas de 35mm (Corning). Após 24 horas, as células foram tratadas com 1 µM ATRA (Calbiochem) e 100 µM de β-Mercaptoetanol (Sigma) e mantidas por 24 horas (hs); 48hs e 72hs. Como controle, as células foram tratadas com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) utilizado para diluir o ATRA, no mesmo volume usado no tratamento com ATRA e β-Mercaptoetanol.

3.4 ANÁLISE IMUNOCITOQUÍMICA E FENOTÍPICA

As culturas foram fixadas com 4% paraformaldeído (Sigma) e submetidas à reação de imunocitoquímica, utilizando-se marcadores específicos para os fenótipos neuronais.

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente, sendo lavadas posteriormente com PBS. Tais células foram permeabilizadas com Triton X-100 durante 20 minutos e lavadas três vezes com PBS Tween-20 (ambos Sigma). Sítios não específicos foram bloqueados com 10% de SBF. Logo após, estas células foram incubadas *overnight*, a 20°C, com anticorpos primários específicos humanos. Após serem lavadas com PBS Tween-20, as células foram incubadas com anticorpo secundário durante uma hora, em temperatura ambiente.

O núcleo das células foi visualizado com o corante nuclear 4',6- diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI). Para identificação de precursores de neurônios usamos o anticorpo primário anti-nestina (Santa Cruz). Para a identificação dos neurônios, utilizamos o anticorpo anti-neurofilamento (Sigma). Utilizamos anticorpos secundários anti-imunoglobulinas específicas de camundongo ou coelho, ligados à fluoresceína isotiocianato (FITC) ou ao *Texas Red* (TXRD) (ambos Sigma). A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Olympus IX71.

3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE VIA TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

As culturas foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e após respectivos tempos de tratamento (24hs; 48hs e 72hs) foram analisadas as expressões de genes, através da extração de RNA total para ensaios de RT-PCR. O meio de cultura foi removido e os RNAs totais destas amostras extraídos utilizando reagente TRIZOL™ (Invitrogen), de acordo com as orientações do fabricante. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada a partir do RNA total, obtido pela extração do RNA, utilizando um Kit para transcrição reversa:

ThermoScript RT-PCR System (Promega), conforme especificações do fabricante. Para a RT-PCR foi utilizado o cDNA sintetizado. Estudamos a expressão dos genes: *neph*, assim como de genes marcadores de células tronco indiferenciadas: *Nanog* e *Oct4*; células tronco mesenquimais: *CD90*; e neuronais: *Nestina* e *Enolase específica de neurônios humano (hEEN)*. Utilizamos *primers* específicos para estas reações conforme tabela 1. As amostras foram desnaturadas a 94°C/cinco minutos, seguida por ciclo de 94°C/30 segundos para desnaturação, 54-62°C/um minuto dependendo do *primer* (temperatura de anelamento), 72°C por três minutos para extensão, por 35 ciclos. Os resultados foram normalizados utilizando-se como padrão interno à expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Os produtos foram separados em gel a 2 % de agarose (Invitrogen), corado com brometo de etídio (Sigma), e fotografado.

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAm por RT-PCR.

Primer	Sequência	Temperatura de anelamento (°C)
CD90	Sense: GAGAATACCAGCAGTTCACCCATC Anti sense: AGGATCTCTGCACTGGAAGTTGAG	58
Enolase específica de neurônios humano	Sense: TGAACACAGACGCTATGCGCTCAG Anti sense: CACCTTTATGTGAGTGGACACAGA	59
GAPDH	Sense: ATGAGGTCCACCACCCTGTT Anti sense: ATCACTGCCACCCAGAAGAC	60
Nanog	Sense: TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT Anti sense: GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC	54
Neph 1	Sense: CTGCCACCATCATCTGGTTC Anti sense: GTGCTGACATTGGTGCTTCC	56,3
Neph 2	Sense: CATCATCTCCAGCACCCAGA Anti sense: TGCCATAAGGACGAGGAAGG	56,6
Neph 3	Sense: ATTTCTGCAACAGCCAGA Anti sense: CAGGGTTAAGGTGCTCTCCA	55,6
Nestina	Sense: CAGCTGGCGCACCTCAAGATG Anti sense: AGGGAAGTTGGGCTCAGGACTGG	62
Oct4	Sense: CTCCTGAAGCAGAAGAGGATCAC Anti sense: CTTCTGGCGCCGGTTACAGAACCA	58

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em triplicata e a ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi verificada através da análise de variância (ANOVA). Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Bonferroni foi utilizado. Em todas as medidas a significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO OBTIDAS DE PLACENTA HUMANA

Para nosso estudo utilizamos a placenta como tecido fonte de células tronco, as CTMph. Ao isolarmos e cultivarmos essas células, conforme metodologia descrita, observamos uma intensa proliferação. Porém, com aumento no número de passagens essa taxa de proliferação diminui, mantendo culturas viáveis até no máximo a passagem 15.

As CTMph de passagem inferior à cinco, apresentaram tanto morfologia fibroblastóide quanto mais poligonal (Figura 9A) . Enquanto as CTMph de passagem superior a cinco, demonstraram predomínio da morfologia fibroblastóide (Figura 9B).

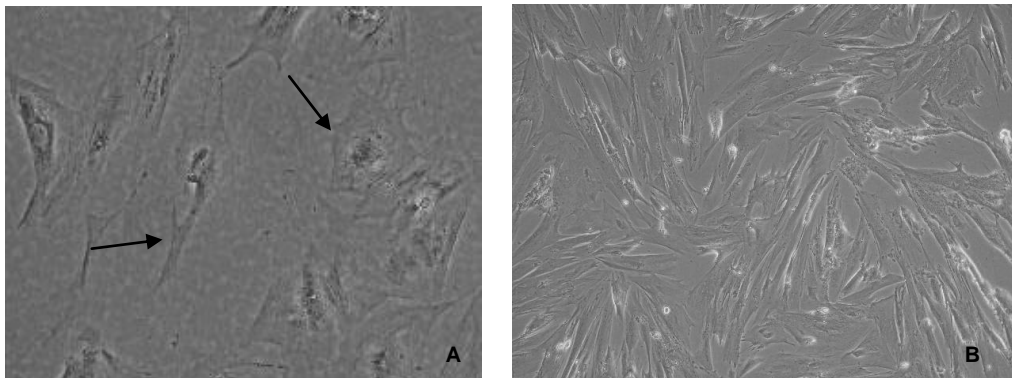


Figura 9. Morfologia das CTMph. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase, de CTMph. A) CTMph de passagem 1. As setas indicam as diferentes morfologias. B) CTMph de passagem 10. Aumento: 100X.

Em relação a expressão fenotípica, através de RT-PCR, observamos a expressam de CD90, marcador de CTMs; Nanog e Oct-4, marcadores de células indiferenciadas (Figura 10A-D).

A multipotencialidade das CTMph foi descrita pelo grupo de pesquisa do laboratório, em trabalho submetido. As CTMph foram capazes de diferenciar em adipócito, condrócito e osteócito (MARTINI, 2008).

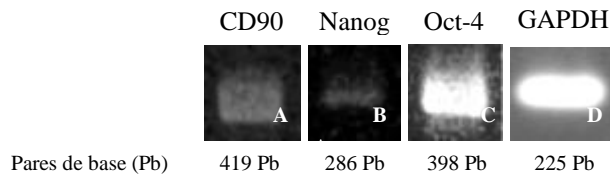


Figura 10. Expressão de marcadores de CTs indiferenciadas e mesenquimais, em CTMph. Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiro em gel de agarose, evidenciando a expressão de marcadores de CTMs (CD90) (A) e de CTs indiferenciadas Nanog (B) e Oct4 (C). GAPDH: padrão interno (D).

4.2 EFEITO DA INDUÇÃO NEURONAL NAS CTMph

4.2.1 Análise morfológica

Para indução do fenótipo neuronal utilizamos CTMph com passagem igual ou superior a cinco. Essas CTMph foram tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 24hs, 48hs e 72hs.

As CTMph apresentaram mudanças morfológicas, ainda no período de 24 horas de tratamento, permanecendo durante todos os tempos de cultura, ou seja, durante 48hs e 72hs. As células tornaram-se menores, apresentando prolongamentos, semelhantes a neuritos que caracterizam uma morfologia neuronal (Figura 11A-B).

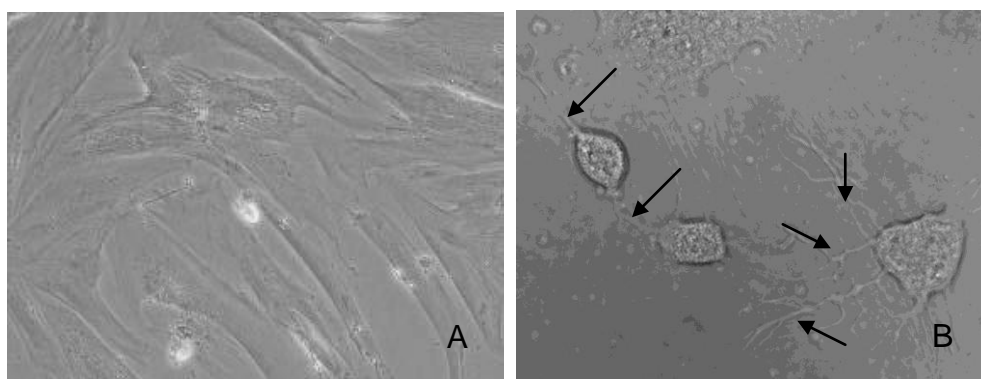


Figura 11. Morfologia das CTMph após indução ao fenótipo neuronal. Fotografias representativas em microscópio de contraste de fase, de CTMph. A) Células Controle. Aumento: 100X. B) CTMph tratadas com ATRA e β -mercaptoetanol, 24 horas. Setas indicam neuritos *in vitro*. Aumento 400X.

4.2.2 Análise da expressão gênica e imunofenotípica

Após observarmos as alterações morfológicas nas CTMph tratadas com indutores neuronais, verificamos os níveis de expressão tanto de genes relacionados a células indiferenciadas e CTM, quanto ao fenótipo neuronal.

Observamos que nas CTMph tratadas parece ocorrer uma redução na expressão de marcadores como CD90, Nanog e Oct4, quando comparados com células na presença apenas do veículo e células controle, em todos os períodos de tratamento em cultura (Figura 12A-D).

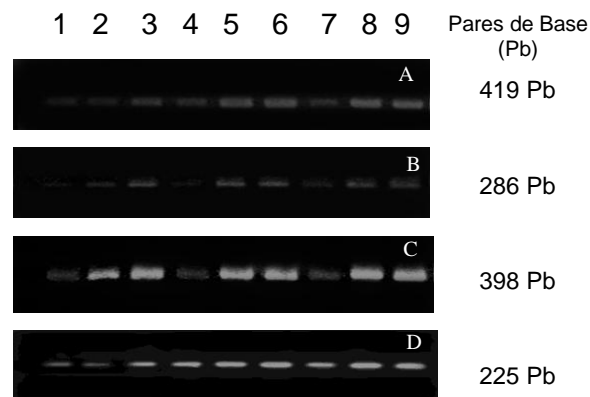


Figura 12. Expressão de marcadores de CTs indiferenciadas e mesenquimais, em CTMph e CTMph tratadas. Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiro em gel de agarose, evidenciando a expressão de marcadores de CTMs (CD90) (A) e de CTs indiferenciadas, Nanog (B) e Oct4 (C), em 1. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 24 horas; 2. CTMph em DMSO durante 24 horas; 3. CTM durante 24 horas; 4. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 48 horas; 5. CTMph em DMSO durante 48 horas; 6. CTM durante 48 horas; 7. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 72 horas; 8. CTMph em DMSO durante 72 horas; 9. CTM durante 72 horas. GAPDH: padrão interno (D).

Portanto, as células tratadas para o fenótipo neuronal apresentaram uma tendência a diminuir a expressão de marcadores de células indiferenciadas e CTMs. Sendo assim, avaliamos a expressão de gene precursor neural (nestina) e neurônio diferenciado (hEEN).

Tanto as CTMph, quanto as CTMph tratadas expressaram nestina, mas nestas a expressão parece ser menor (Figura 13A-B). A expressão de hEEN não foi observada em nenhuma das condições experimentais (dados não demonstrados).

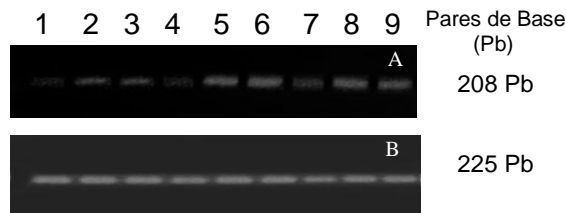


Figura 13. Expressão de nestina em CTMph e CTMph tratadas. Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiro em gel de agarose, evidenciando a expressão de precursor neural, Nestina (A) em 1. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 24 horas; 2. CTMph em DMSO durante 24 horas; 3. CTM durante 24 horas; 4. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 48 horas; 5. CTMph em DMSO durante 48 horas; 6. CTM durante 48 horas; 7. CTMph tratadas com ATRA e β -Mercaptoetanol durante 72 horas; 8. CTMph em DMSO durante 72 horas; 9. CTM durante 72 horas. GAPDH: padrão interno (B).

A partir daqui, como tanto as CTMph submetidas a indução do fenótipo neuronal quanto as células controle intrigantemente expressaram nestina, fomos investigar as diferenças na quantidade, bem como o comportamento morfológico de expressão.

Nossos resultados, através de imunocitoquímica, demonstraram que não houve significância estatística no número de CTMph tratadas positivas para nestina quando comparadas com as células controle. As CTMph apresentaram expressão próxima a 100% em todas as condições experimentais, apresentando uma tendência a diminuir a expressão nas CTMph tratadas (Figura 14). Tanto as CTMph apresentaram uma marcação perinuclear, quanto as CTMph tratadas durante todos os períodos de tratamento. E ainda, claramente houve uma mudança morfológica nas CTMph induzidas ao fenótipo neuronal. Essas células perderam a morfologia fibroblastóide característica de CTMs e adquiriram uma forma mais arredondada com prolongamentos, assemelhando-se ao fenótipo neuronal (Figura 15).

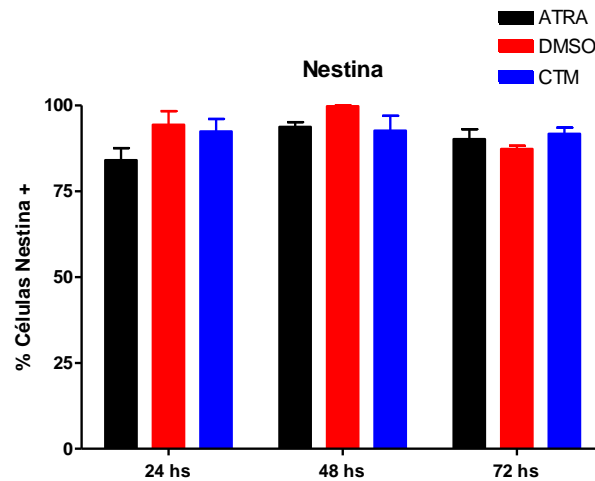


Figura 14. Quantificação da expressão de CTMph tratadas nestina positivas. Representação gráfica da quantidade de células que expressam nestina após 24, 48 e 72 horas. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de 20 campos de cada condição de cultura em três experimentos independentes. Estatística por ANOVA duas vias seguido do teste de Bonferroni.

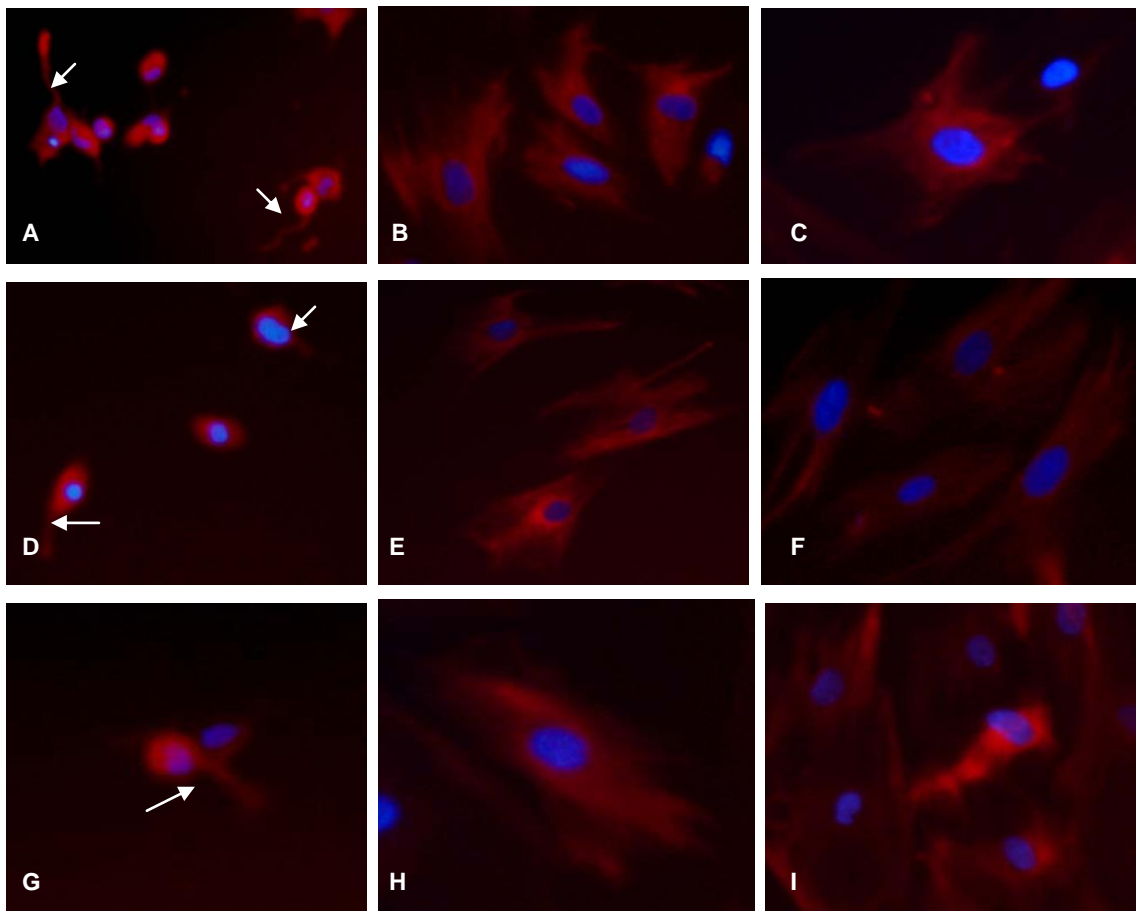


Figura 15. Expressão de nestina nas CTMph tratadas em diferentes tempos de cultura. Fotografias representativas de imunofluorescência para nestina, precursor neural. Em vermelho células nestina. Em azul núcleo celular. Células nestina positivas - 24 horas de tratamento (A). Células nestina positivas - 24 horas - Veículo (B). Células nestina positivas - 24 horas - Controle (C). Células nestina positivas - 48 horas de tratamento (D). Células nestina positivas - 48 horas - Veículo (E). Células nestina positivas - 48 horas - Controle (F). Células nestina positivas - 72 horas de tratamento (G). Células nestina positivas - 72 horas - Veículo (H). Células nestina positivas - 72 horas - Controle (I). Setas indicam neuritos *in vitro*. Aumento: 200X.

Até o momento constatamos que CTMph tratadas parecem reduzir a expressão de marcadores de células indiferenciadas e CTMs. Ainda, há uma tendência em diminuir a expressão gênica de precursor neural, nestina, mas sem significância estatística na marcação imunofenotípica. Porém, apresentam morfologia neuronal. Sendo assim, surgiu-nos a dúvida: Pode ter ocorrido diferenciação neuronal em grandes proporções que expliquem essas reduções? Para tentarmos resolver nossa hipótese, avaliamos a expressão de um marcador de neurônio diferenciado, neurofilamento (NF) através de imunocitoquímica.

A expressão de NF foi evidenciado tanto nas CTMph tratadas quanto nas células controle. Nas primeiras 24 horas, essa expressão nas CTMph tratadas é estatisticamente menor quando comparadas com as CTMph na presença apenas do veículo e com as CTMph controle. Apesar da inexistência de significância estatística, as CTMph tratadas nos dois períodos seguintes apresentam uma tendência em diminuir a expressão de neurofilamento quando comparadas aos controles (Figura 16). Da mesma forma que na expressão de nestina, as CTMph tratadas mantém o mesmo padrão de marcação que as CTMph, apresentaram também mudança morfológica na marcação de NF (Figura 17).

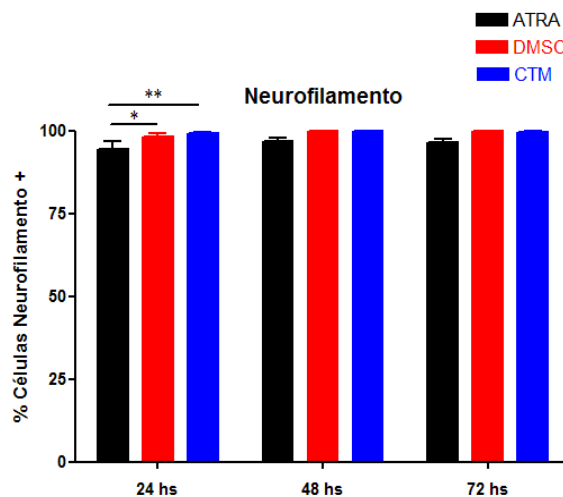


Figura 16. Quantificação da expressão de CTMph tratadas, neurofilamento positivas. Representação gráfica da quantidade de células que expressam neurofilamento após 24, 48 e 72 horas. Foram analisadas imagens de imunofluorescência de 20 campos de cada condição de cultura em três experimentos independentes. Estatística por ANOVA duas vias seguido do teste de Bonferroni.

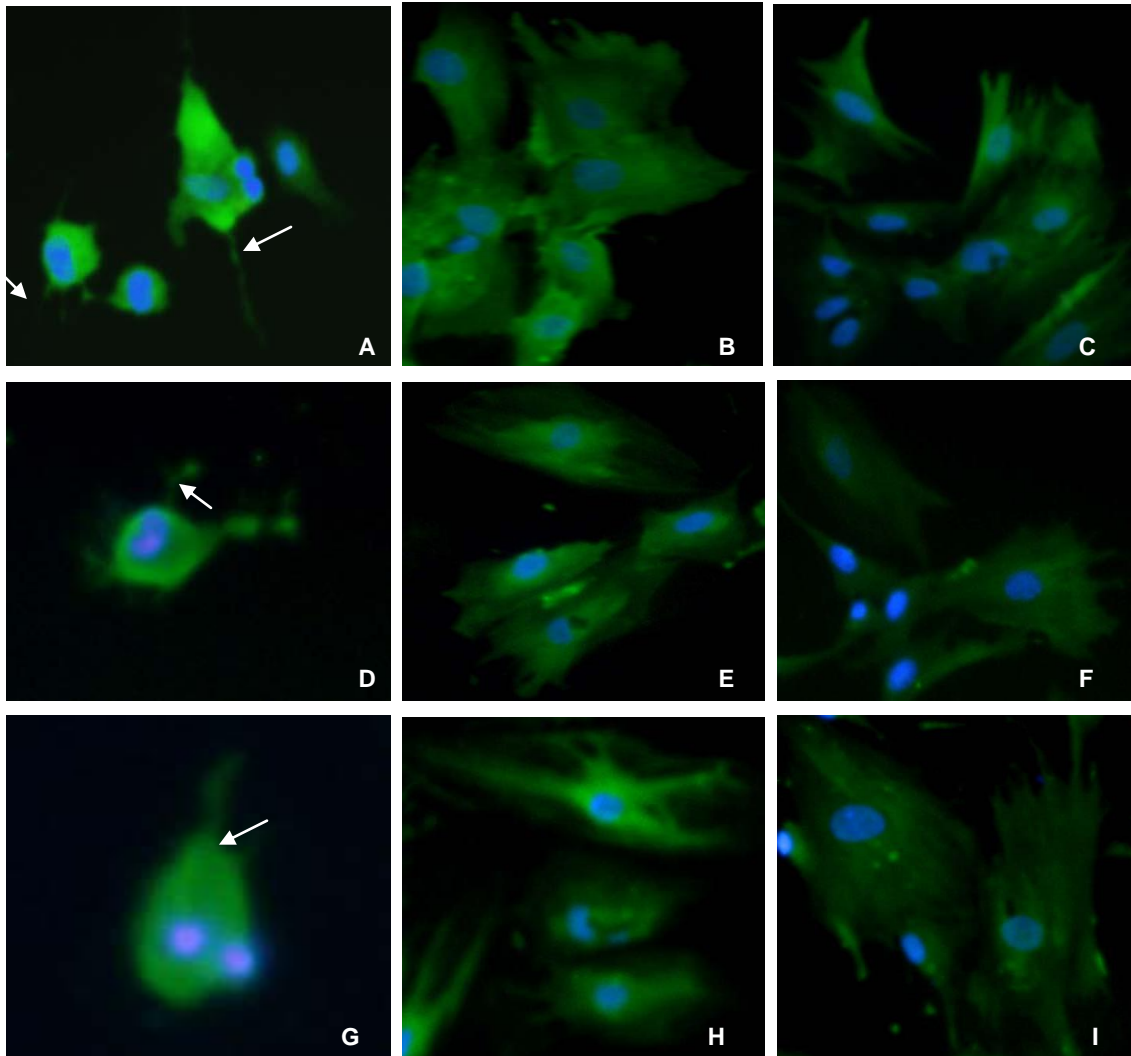


Figura 17. Expressão de neurofilamento nas CTMph tratadas em diferentes tempos de cultura. Fotografias representativas de imunofluorescência para neurofilamento, neurônio diferenciado. Em verde células neurofilamento positivas. Em azul: núcleo celular. Células neurofilamento positivas - 24 horas de tratamento (A). Células neurofilamento positivas - 24 horas - Veículo (B). Células neurofilamento positivas - 24 horas - Controle (C). Células neurofilamento positivas - 48 horas de tratamento (D). Células neurofilamento positivas - 48 horas - Veículo (E). Células neurofilamento positivas - 48 horas - Controle (F). Células neurofilamento positivas - 72 horas de tratamento (G). Células neurofilamento positivas - 72 horas - Veículo (H). Células neurofilamento positivas - 72 horas - Controle (I). Setas indicam neuritos *in vitro*. Aumento: 200X.

4.3 INFLUÊNCIA DA FAMÍLIA DE GENES *NEPH* NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTMph PARA O FENÓTIPO NEURONAL

Como descrito na literatura, há inúmeras proteínas da família das IgSF envolvidas no processo de diferenciação neuronal, sendo uma delas ainda pouco estudada, a família NEPH.

Para comprovar nossa hipótese de que a família de genes *neph* esta

envolvida nesse importante processo de diferenciação celular, utilizamos a técnica de RT-PCR. Verificamos que tanto *neph1* quanto *neph2*, são expressos nas CTMph. Porém, essa expressão parece ser suprimida após o tratamento de indução ao fenótipo neuronal (Figura 18A-C). A expressão de *neph3* não foi detectada em nenhuma condição experimental (dados não demonstrados).

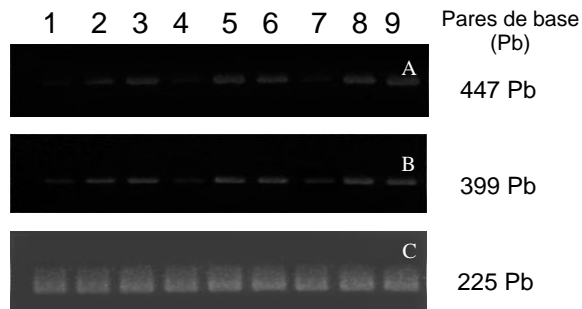


Figura 18. Expressão da família de genes *neph* em CTMph e CTMph tratadas. Fotografias representativas de produtos de RNA mensageiros em gel de agarose, evidenciando a expressão de gene *neph1* (A) e *neph2* (B), em 1. CTMph tratadas com ATRA e β-Mercaptoetanol durante 24 horas; 2. CTMph em DMSO durante 24 horas; 3. CTM durante 24 horas; 4. CTMph tratadas com ATRA e β-Mercaptoetanol durante 48 horas; 5. CTMph em DMSO durante 48 horas; 6. CTM durante 48 horas; 7. CTMph tratadas com ATRA e β-Mercaptoetanol durante 72 horas; 8. CTMph em DMSO durante 72 horas; 9. CTM durante 72 horas. GAPDH: padrão interno (C).

5 DISCUSSÃO

Tecidos extra embrionários como a placenta, quando utilizados como reservatórios de CTs oferecem muito mais vantagens do que outras fontes dessas células como, fontes de CTEs e CTSs. Após o nascimento esses tecidos extra embrionários são rotineiramente descartados, não apresentando problemas éticos como os decorrentes do uso de outras fontes de CTs. A natureza dessas células facilitam o isolamento e eliminam o risco a pacientes doadores. Ainda, esses tecidos são abundantes e de fácil manipulação, aumentando teoricamente o número de CTs que podem ser isoladas (MARCUS; WOODBURY, 2008).

Nessa mesma linha de discussão, CTEs requerem destruição do embrião humano e estão associadas com alta taxa de indução tumoral (teratomas). Também, as CTSs apresentam aspecto negativo quanto ao risco que apresentam de infecção viral ao doador e diminuem sua quantidade e capacidade de diferenciação com o aumento da idade do doador. O fato da placenta ser um tecido originado durante o desenvolvimento embrionário sustenta a hipótese de que esse tecido possa conter células com plasticidade semelhantes as CTEs (EVANGELISTA *et al.*, 2008).

As CTMph são obtidas a partir da dissociação do tecido da placenta e posterior seleção através da sua aderência ao plástico, técnica essa largamente utilizada para o isolamento de CTMs. Não surpreendentemente, CTMph expressam numerosos marcadores de superfície mesenquimal, incluindo CD29 e CD44 (MARCUS; WOODBURY, 2008). Vários grupos de pesquisa, identificaram que CTMph dissociadas e cultivadas em meio contendo soro, são células CD90/CD105/CD71 positivas e CD34/CD45 negativas, consistente com o fenótipo de CTMph (YEN *et al.*, 2005; EVANGELISTA *et al.*, 2008). Nossos estudos corroboram para essa ideia, no qual verificamos a expressão de CD90.

CTMph apresentam morfologia fibroblastóide e são altamente proliferativas *in vitro*, podendo ser mantidas por pelo menos 20 passagens. Em condições permissivas *in vitro*, as CTMph podem diferenciar em osteoblastos e adipócitos (MARCUS; WOODBURY, 2008). Outros estudos demonstram uma maior variedade de diferenciação, podendo as CTMph diferenciar nas três linhagens germinativas: ectoderme (neural), mesoderme (músculo esquelético, cardiomiócito e endotelial) e endoderme (pancreática) (PAROLINI *et al.*, 2008). A partir dessas duas

características apresentadas pelas CTMph, proliferação e multipotencialidade, há comprovação que essas células formam populações verdadeiras de CTs (MARCUS; WOODBURY, 2008). Nossos resultados evidenciaram essas propriedades acima especificadas, na qual obtivemos culturas que foram mantidas até 15 passagens. E ainda, a multipotencialidade foi comprovada por outro trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, submetido à publicação. As CTMph foram capazes de diferenciar em adipócito, condrócito e osteócito quando submetidas aos meios permissivos a estas condições (MARTINI, 2008).

Conforme descrito por vários autores, a manutenção da multipotencialidade das CTMph pode ser indicada pela expressão de alguns genes embrionários específicos, SSEA-3, SSEA-4 e Oct-4 (EVANGELISTA *et al.*, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008). Em nosso estudo verificamos a expressão de Oct-4 e Nanog nas CTMph. Sendo que o potencial multidiferenciado das CTMph foi demonstrado pela expressão de marcador neural (nestina) e actina de músculo liso (SMA) porém sem diferenciação espontânea durante a expansão das culturas (dados não publicados, JEREMIAS, 2009).

Consistente com nossos resultados, as CTMph inicialmente apresentam duas morfologias distintas: uma população com característica fibroblastóide e outra mais poligonal, semelhante a epitelial. Com aumento no número de passagens, a população epitelial rapidamente desaparece adquirindo uma morfologia homogênea fibroblastóide (YEN *et al.*, 2005; MIAO *et al.*, 2006; PAROLINI *et al.*, 2008).

5.1 EFEITO DA INDUÇÃO NEURONAL NAS CTMph

São numerosos os estudos tanto em *in vitro* quanto *in vivo* que demonstram, em particular, a diferenciação de CTMs em células neurais (MARESHI *et al.*, 2006; SCINTU *et al.*, 2006).

Sabe-se, porém, que são necessários fatores indutivos adequados ao fenótipo desejado. Já extensamente descrito na literatura, o ATRA apresenta papel importante durante a embriogênese. Sendo sua ação imprescindível para o desenvolvimento neural nas fases iniciais do desenvolvimento do sistema nervoso central de mamíferos (LAKARD *et al.*, 2007).

Nós utilizamos a associação de duas substâncias químicas, ATRA e β -mercaptoetanol, já conhecidas classicamente como indutores neurais. A morfologia das CTMph mudaram logo após as 24 horas, adquirindo uma forma menor e com prolongamentos, semelhante ao fenótipo neuronal. Estudo de Mareschi *et al.* (2006), corrobora com nossos resultados, onde verificaram que CTMh após poucas horas de incubação com β -mercaptoetanol, formaram prolongamentos finos e alongados. Em uma linhagem de células neuronais olfatórias imortalizadas a adição de 10 μ L de ATRA induziu um aumento no número de células bipolares já após 24 horas da indução (LAKARD *et al.*, 2007).

Contraditório, em outro trabalho de indução das CTMph ao fenótipo neuronal, a morfologia semelhante a neurônio só foi evidenciada após seis-14 dias desta indução (YEN *et al.*, 2005). Da mesma forma, CTMs induzidas ao fenótipo neuronal, onde houve a presença de ATRA na indução química, apresentaram após cinco-seis dias, corpos celulares esféricos com processos bipolares até multipolares (YAMAGUCHI *et al.*, 2006). Outro trabalho, onde células CTMs foram tratadas com ATRA e β -mercaptoetanol, também não houve essa rápida e dramática mudança morfológica. As mudanças morfológicas só foram visualizadas após três dias de tratamento (SCINTU *et al.*, 2006).

Concomitante com a mudança morfológica, as CTMph parecem diminuir a expressão de genes relacionados a CTM (CD90) e a células indiferenciadas (Oct-4 e Nanog). Avaliamos ainda, a expressão de nestina (precursor neural) e observamos uma tendência na diminuição da expressão desse gene nas células induzidas ao fenótipo neuronal. Evidenciando assim, uma possível diferenciação das CTMph. Como suporte a esta interpretação, outros pesquisadores observaram que nas condições experimentais com β -mercaptoetanol, ao realizarem análise por PCR em tempo real, houve redução gênica para nestina, NF, MAP2 e GFAP nas CTMs (MARESHI *et al.*, 2006). Em outro estudo, a imunomarcagem tanto de CTMs obtidas da medula óssea e as CTMs induzidas com ATRA para a diferenciação neuronal, foram positivas para nestina, NF e MAP2 (ZHANG *et al.*, 2006).

Para Scintu *et al.* (2006), CTMs tratadas com ATRA e β -mercaptoetanol não apresentaram mudanças nos níveis na marcação para nestina em relação ao controle, por RT-PCR. Mas, o ATRA leva a uma diminuição significativa de vimentina, enquanto os níveis de GFAP, NF e hEEN não foram modificados.

Nossos resultados até o momento suportam a hipótese de uma diferenciação neuronal, para a confirmação da mesma avaliamos se houve mudança quantitativa e qualitativa na marcação para precursor neural (nestina) e neurônio diferenciado (NF). Quanto a imunomarcação de nestina, não houve mudança estatística mas parece haver uma tendência a diminuir a quantidade de células nestina positivas das CTMph tratadas quando comparadas ao controle. Continuaram apresentando a mesma morfologia. Da mesma forma, outro trabalho que induziu CTMs ao fenótipo neuronal através da utilização de ATRA e β -mercaptoetanol, observou a marcação constitutiva nas CTMs para nestina e o tratamento parece não influenciar essa marcação (SCINTU *et al.*, 2006). Esta diferença funcional pode ser um reflexo da origem da CTM utilizada nos trabalhos experimentais. Possivelmente uma consequência do microambiente ao qual a CTM está inserida em diferentes tecidos, visto que apesar de ser encontrada em diferentes tecidos as CTMs apresentam diferenças funcionais significativas (SILVA; CHAGASTELLES; NARDI, 2006)

Por outro lado, no trabalho de Mareschi *et al.* (2006), as CTMs após 24 horas, expressaram imunomarcação de aproximadamente 50% para nestina. Em estudo de Yamaguchi *et al.* (2006), as CTMs induzidas com ATRA, como uma das substâncias químicas utilizadas para o fenótipo neuronal, apresentaram 56% de imunorreatividade contra nestina.

Se as CTMph tratadas apresentam aparente redução de marcadores mesenquimais, indiferenciados bem como precursor neural (nestina), concomitante com morfologia neuronal, pode ter ocorrido diferenciação neuronal em proporções que expliquem essas reduções? Para tentar resolver essa hipótese, avaliamos a marcação de NF (marcador de neurônio diferenciado).

Intrigantemente, as CTMph apresentaram uma redução estatística na marcação de NF nas primeiras 24 horas de tratamento quando comparadas ao controle. Não permanecendo essa diferença estatística, mas uma tendência na diminuição dessa marcação, sendo que a mudança morfológica permaneceu. Partilhando mesma ideia, no trabalho de Yamaguchi *et al.* (2006), não houve imunorreatividade contra NF nas CTMs induzidas quimicamente.

Em contrapartida, estudo de CTMs induzidas ao fenótipo neuronal com ATRA e β -mercaptoetanol, o tratamento determinou forte expressão de GFAP e NF nessas células após sete dias de incubação (SCINTU *et al.*, 2006).

Contrariamente ao interpretado, essa mudança morfológica e diferenciação podem ser decorrentes de uma rápida formação de *corpos constritos* e após as 24 horas essas células parecem altamente estressadas com uma paralela diminuição na quantidade celular (MARESCHI *et al.*, 2006).

Nós não realizamos ensaios de viabilidade celular ou de proliferação celular, o que não nos permite afirmar se o tratamento modificou a taxa mitótica da célula. Em nosso modelo experimental, através da marcação com DAPI, parece que houve um declínio no número de células em função do tempo, 24, 48 e 72 horas quando incubadas com β -mercaptoetanol, e com ATRA. Foi demonstrado que CTMs tratadas com β -mercaptoetanol tiveram uma redução na proliferação entretanto quando tratadas com ATRA não foram observados efeitos significativos (MARESCHI *et al.*, 2006). Novamente, estas diferenças experimentais podem ser derivadas das diferentes fontes de CTMs utilizadas nos experimentos.

Para Mareschi *et al.* (2006), as mudanças morfológicas e imunomarcações para marcadores neurais das CTMs após indução química podem ser devido à toxicidade celular, retração celular e mudanças no citoesqueleto. Ainda, tem sido discutido qual o papel do tratamento de CTMs com agentes indutores, incluindo DMSO, pois o mesmo pode determinar vários eventos, como morte celular (YAMAGUCHI *et al.*, 2006). Independente dessa discussão, tem sido observado o uso crescente desses indutores nos ensaios de diferenciação celular, assim como teste de fármacos.

5.2 INFLUÊNCIA DA FAMÍLIA DE GENES *NEPH* NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTM_{ph} PARA O FENÓTIPO NEURONAL

Apesar de nossos resultados demonstrarem que as CTM_{ph} expressam genes de CTMs, de estágio indiferenciado e apresentam morfologia fibroblastóide, a diferenciação neuronal, obtida com indutores foi avaliada com base na expressão protéica e sua morfologia. Não avaliamos a funcionalidade, que tem sido um requisito importante para caracterizar a diferenciação neuronal (MARESCHI *et al.*, 2006). Entretanto nossa abordagem experimental sugere fortemente uma resposta ao ATRA que tem sido um indutor neuronal importante através da indução de genes

regulatórios (YAMAGUCHI *et al.*, 2006). Assim, as CTMph são capazes de responder ao tratamento, possivelmente através da modificação na expressão de genes regulatórios importantes para o equilíbrio entre o estado de CT e célula precursora/diferenciada. Como para Yamaguchi *et al.* (2006) é difícil determinar o exato mecanismo pelo qual as CTMs diferenciam-se em células neuronais, mas é imprescindível que o perfil gênico seja alterado para determinar esse fenótipo. Em nosso trabalho, avaliamos se a família de genes *neph* poderia se alterar durante o curso da diferenciação, sugerindo um papel relevante dessas proteínas durante a indução com ATRA para o fenótipo desejado.

Nos nossos resultados, as CTMph expressaram tanto *neph1* quanto *neph2*, porém não *neph3*. Quando essas células foram submetidas à indução neuronal, essa expressão foi quase suprimida em todos os tempos de cultura avaliados.

Todas as três proteínas, NEPH1, NEPH2 e NEPH3, apresentam uma arquitetura comum com cinco domínios Ig, dentre estes um é domínio transmembrana e outro citoplasmático. Essa arquitetura sugere que participam de interações adesivas com outras células ou matriz extracelular. Nos resultados deste grupo de pesquisa, todos os três genes foram detectados por RT-PCR em uma linhagem de célula podócito glomerular humana (SELLIN *et al.*, 2003).

O gene *neph1* é expresso nas membranas fetais e placenta de ratos, onde os autores sugerem um papel potencial deste, na regulação do transporte de proteínas através do feto para o compartimento da mãe (BEALL *et al.*, 2005).

Em trabalho de Ueno *et al.* (2003), foi demonstrado que a proteína NEPH2 apresenta alguma função na regulação da manutenção das CTHs pelas células estromais. Essas células estromais apresentam um domínio extracelular de NEPH2, porém o mecanismo pelo qual *neph2* suportam as CTHs é desconhecido.

Ainda, foi observada a expressão de *neph2* em várias regiões do cérebro de camundongos adultos. Essa expressão foi grande na camada glomerular e células mitrales do bulbo olfatório, e na camada glomerular do cerebelo, regiões onde a formação sináptica ocorre durante a idade adulta. Da mesma forma, foi intensa a expressão de *neph2* no bulbo olfatório de neonatos, onde há intensa formação sináptica. Enquanto a expressão foi declinando no giro denteado do hipocampo de adultos, condizente com a redução de sinapses nessa fase. A sinaptogênese ocorre nas células granulares com início em P4, sendo completada aproximadamente até P25. Em resumo, esse padrão temporal de expressão de *neph2* pode contribuir para

a formação de sinapse em cérebro de camundongos o qual é comparado com o papel de IrreC-rst em invertebrados. Também, nessas regiões essa expressão parece estar envolvida na migração neuronal em direção a projeção axonal e, portanto formação de sinapse (TAMURA *et al.*, 2005).

Em drosófilas o gene homólogo IrreC-rst apresenta atividade de adesão celular, apresentando um papel crítico na composição do olho e desenvolvimento da antena. O que posiciona as células e as mantém em contato célula-célula. Portanto, uma possível, porém ainda não comprovada função de *neph2*, é a influência deste nas funções das células β pancreáticas pela manutenção da propriedade de contato célula-célula e comunicação das ilhotas através dessa atividade de adesão celular (SUN *et al.*, 2003).

O gene *neph3*, é expresso fortemente em células β pancreáticas, essa expressão restrita foi intensamente avaliada, visto que nesse trabalho vários tecidos humanos foram analisados, incluindo a placenta. No desenvolvimento do cérebro de camundongo sua expressão também é observada. As várias linhagens de células oriundas do cérebro e de retinoblastoma apresentam a expressão de *neph3*, além do pâncreas, assim como outros tecidos neuroendócrinos tais como a glândula hipófise, Além do desenvolvimento, a expressão de *neph3* é observado no curso de doenças (SUN *et al.*, 2003).

Estas observações sugerem um papel importante da família NEPH para a manutenção do estado de diferenciação e adesão célula-célula. Possivelmente modificações nos níveis dessas proteínas podem remeter a célula a um estado de diferenciação alterado. Portanto consideramos relevante uma abordagem mais profunda no papel do NEPH para indução de diferenciação de CTMph.

A utilização da placenta sob muitos aspectos deve ser considerada. Normalmente é um tecido que tem como destino o expurgo após o parto. Sendo assim não existe um impedimento ético na sua utilização sob ponto de vista clínico. CTs advindas de um tecido de origem fetal, de fácil acesso e sem implicações éticas e legais é de grande importância.

Tem sido demonstrado que CTMs isoladas de placenta assim como de cordão umbilical apresentam baixo risco de rejeição pelo sistema imune já que as células têm potencial imunossupressor e, portanto baixa antigenicidade (LE BLANC; RINGDEN, 2007; CHO *et al.*, 2008)

O potencial de utilização de CTMph é relevante, visto que nossos estudos

sugerem uma plasticidade das mesmas para diferenciação em células neuronais com possível utilidade nas crescentes desordens neurológicas até o momento sem cura como, Parkinson, Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas.

6 CONCLUSÕES

A partir dos nossos resultados concluímos:

- a) CTMph apresentam marcadores de células indiferenciadas e mesenquimais; ainda, apresentam morfologia fibroblastóide e multipotencialidade, caracterizando-as como verdadeiras CTs;
- b) As CTMph apresentam constitutivamente marcadores neurais como, nestina e neurofilamento;
- c) O ATRA foi capaz de induzir a diferenciação das CTMph nesse modelo experimental;
- d) No nosso modelo experimental as CTMph induzidas ao fenótipo neuronal, apresentaram morfologia característica;
- e) As CTMph parecem ser sensíveis a variações nos níveis gênicos de marcadores indiferenciados (*Nanog* e *Oct4*); de CTMs (CD90); e precursor neural (*Nestina*);
- f) Uma possível função dos genes, *neph1* e *neph2*, é a manutenção de CTMph em um estágio indiferenciado;
- g) Outra função que pode ser atribuída aos genes, *neph1* e *neph2*, seria uma intrínseca regulação de progenitores pré destinados ao fenótipo neuronal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL AZIZ, M. T.; ATTA, H. M.; MAHFOUZ, S.; FOUAD, H. H.; ROSHDY, N. K.; AHMED, H. H.; RASHED, L. A.; SABRY, D.; HASSOUNA, A. A.; HASAN, N. M. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. **Clin Biochem**, v. 40, n. 12, p. 893-899, 2007.

BATTULA, V. L.; BAREISS, P. M.; TREML, S.; CONRAD, S.; ALBERT, I.; HOJAK, S.; ABELE, H.; SCHEWE, B.; J UST, L.; SKUTELLA, T.; BUHRING, H. J. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. **Differentiation**, v. 75, n. 4, p. 279-291, 2007.

BEALL, M. H.; AMIDI, F.; GAYLE, D. A.; WANG, S.; BELOOSESKY, R.; ROSS, M. G. Placental and fetal membrane Neph1 and Neph1 gene expression: response to inflammation. **J Soc Gynecol Investig**, v. 12, n. 5, p. 298-302, 2005.

BERKOW, R. et al. Gravidez. In: Berkow, R. et al. (Eds.) **Manual Merck de informação médica**: saúde para a família. Seção 22. Cap. 243. Disponível em: <http://www.msd-brasil.com/msd43/m_manual/mm_sec22_243.htm>. Acesso em: 13 out. 2009.

BIANCHI, M. G.; GAZZOLA, G. C.; TOGNAZZI, L.; BUSSOLATI, O. C6 glioma cells differentiated by retinoic acid overexpress the glutamate transporter excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). **Neuroscience**, v. 151, n. 4, p. 1042-1052, 2008.

BIANCO, P. *et al.* Concise review: bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p. 180-192, 2001.

CHO, P. S.; MESSINA, D. J.; HIRSH, E. L.; CHI, N.; GOLDMAN, S. N.; LO, D. P.; HARRIS, I. R.; POPMA, S. H.; SACHS, D. H.; HUANG, C. A. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 430-438, 2008.

DONOVIEL, D. B.; FREED, D. D.; VOGEL, H.; POTTER, D. G.; HAWKINS, E.; BARRISH, J. P.; MATHUR, B. N.; TURNER, C. A.; GESKE, R.; MONTGOMERY, C. A.; STARBUCK, M.; BRANDT, M.; GUPTA, A.; RAMIREZ-SOLIS, R.; ZAMBROWICZ, B. P.; POWELL, D. R. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 14, p. 4829-4836, 2001.

EVANGELISTA, M.;SONCINI, M.; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 33-42, 2008.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potencial. **Stem cell**, v. 22, n. 5, p. 649-658, 2004.

GERKE, P.; SELLIN, L.; KRETZ, O.; PETRASCHKA, D.; ZENTGRAF, H.; BENZING, T.; WALZ, G. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with Nephtrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. **Nephrol**, v. 16, p. 1693–1702, 2005.

HUBER, T. B.; SCHMIDTS, M.; GERKE, P.; SCHERMER, B.; ZAHN, A.; HARTLEBEN, B.; SELLIN, L.; WALZ, G.; BENZING, T. The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. **J Biol Chem**, v. 278, n. 15, p. 13417-13421, 2003.

IN 'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; DE GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, 2004.

JEREMIAS, T. da S. **Efeito dos fatores FGF-2, EGF e beta-catenina no potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais de placenta humana**. 2009. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2009

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007.

KOMORI, T.; GYOBU, H.; UENO, H.; KITAMURA, T.; SENBA, E.; MORIKAWA, Y. Expression of kin of irregular chiasm-like 3/mKirre in proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia and its interaction with nephrin in muscle spindles. **J Comp Neurol**, v. 511, n. 1, p. 92-108, 2008.

LAKARD, S.; LESNIEWSKA, E.; MICHEL, G.; LAKARD, B.; MORRAND-VILLENEUVE, N.; VERSAUX-BOTTERI, C. In vitro induction of differentiation by retinoic acid in an immortalized olfactory neuronal cell line. **Acta Histochem**, v. 109, n. 2, p. 111-121, 2007.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **J Intern Med**, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

MARCUS, A. J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

MARESCHI, K.; NOVARA, M.; RUSTICHELLI, D.; FERRERO, I.; GUIDO, D.; CARBONE, E.; MEDICO, E.; MADON, E.; VERCELLI, A.; FAGIOLI, F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural marker. **Exp Hematol**, v. 34, n.11, p.1563-1572, 2006.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; CHAMBON, P. Function of retinoic acid receptors during embryonic development. **Nuclear Receptor Signaling**, n. 7, p. 1-15, 2009.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MARTINI, M. M. **Diferenciação in vitro de células tronco mesenquimais de placenta humana em fenótipo neural** : modelo de co-cultura. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2008.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biol Int**, v. 30, n. 9, p. 681-687, 2006.

MILLS, K. J. et al. Regulation of retinoid- induced differentiation in embryonal carcinoma PCC4.azal R Cells: effects of retinoid-receptor selective ligands. **Cell Growth & Differentiation**, v. 7, p. 327-337, 1996.

MINGRONI-NETTO, R. C.; DESSEN, E. M. B. **Genética na escola**. Disponível em: < <http://biossintese.blogspot.com/search/label/C%C3%A9lulas-tronco> >. Acesso em: 13 set. 2009.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro:

Elsevier, 2008.

MORIKAWA, Y.; KOMORI, T.; HISAOKA, T.; UENO, H.; KITAMURA, T.; SENBA, E. Expression of *mKirre* in the developing sensory pathways: Its close apposition to nephrin-expressing cells. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 880-886, 2007.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Assymmetric and symmetric stem cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p.1068-1074, 2006.

MURAGLIA, A.;CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **J Cell Sci**, v. 113 (Pt 7), p. 1161-1166, 2000.

OHNISHI, S.; SUMIYOSHI, H.; KITAMURA, S.; NAGAYA, N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. **FEBS Lett**, v. 581, n. 21, p. 3961-3966, 2007.

PAROLINI, O.; et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta outcome of the first international workshop on placenta derived stem cells. **Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PITTINGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p.143-147, 1999.

POTTEN, C. S. Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 353, n. 1370, p. 821-830, 1998.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Annu.Rev.Cell Dev.Biol**, v. 19, p. 1-22, 2003.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C. M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, n. 9, p. 2615-2626, 2001.

ROSS, S. A. *et al.* Retinoids in embryonal development. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 1021-1054, 2000.

ROUGON, G.; HOBERT, O. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 26, p. 207–238, 2003.

SCINTU, F.; REALI, C.; PILLAI, R.; BADIALI, M.; SANNA, M. A.; ARGIOLOU, F.; RISTALDI, M. S.; SOGOS, V.. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. **BMC Neuroscience**, v. 7, n. 14, p. 1- 12, 2006.

SELLIN, L.; HUBER, T. B.; GERKE, P.; QUACK, I.; PAVENSTADT, H.; WALZ, G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. **Faseb J**, v. 17, n. 1, p. 115-117, 2003.

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

SUN, C.; KILBURN, D.; LUKASHIN, A.; CROWELL, T.; GARDNER, H.; BRUNDIERS, R.; DIEFENBACH, B.; CARULLI, J. P. Kirrel2, a novel immunoglobulin superfamily gene expressed primarily in beta cells of the pancreatic islets. **Genomics**, v. 82, n. 2, p. 130-142, 2003.

TAMURA, S.; MORIKAWA, Y.; HISAOKA, T.; UENO, H.; KITAMURA, T.; SENBA, E. Expression of *mKirre*, a mammalian homolog of *Drosophila kirre*, in the developing and adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 615-624, 2005.

TAUPIN, P. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 4, p. RA75-78, 2006.

THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; BECKER, R. A.; HEARN, J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 17, p. 7844-7848, 1995.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p.1145-1147, 1998.

UENO, H.; SAKITA-ISHIKAWA, M.; MORIKAWA, Y.; NAKANO, T.; KITAMURA, T.; SAITO, M. A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p. 457-463, 2003.

ULLOA-MONTOYA, F.;VERFAILLIE, C. M.; HU, W. S. Culture systems for pluripotent stem cells. **J Biosci Bioeng**, v. 100, n. 1, p. 12-27, 2005.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WATT, F. Epidermal stem cells: markers patterning and the control of stem cell fate. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci**, v. 353, p. 831-37, 1998.

YAMAGUCHI, S.; KURODA, S.; KOBAYASHI, H.; SHICHINOHE, H.; YANO, S.; HIDA, K.; SHINPO, K.; KIKUCHI, S.; IWASAKI, Y. The effects of neuronal induction on gene expression profile in bone marrow stromal cells (BMSC)--a preliminary study using microarray analysis. **Brain Res**, v. 1087, n. 1, p. 15-27, 2006.

YEN, B. L.; HUANG, H. I.; CHIEN, C. C.; JUI, H. Y.; KO, B. S.; YAO, M.; SHUN, C. T.; YEN, M. L.; LEE, M. C.; CHEN, Y. C. Isolation of multipotent cells from human term placenta. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 3-9, 2005.

ZHANG, X.; SODA, Y.; TAKAHASHI, K.; BAI, Y.; MITSURU, A.; I GURA, K.; SATOH, H.; YAMAGUCHI, S.; TANI, K.; TOJO, A.; TAKAHASHI, T. A. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 351, n. 4, p. 853-859, 2006.

ZHANG, Y.; LI, C. D.; JIANG, X. X.; LI, H. L.; TANG, P. H.; MAO, N. Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. **Chin Med J (Engl)**, v. 117, n. 6, p. 882-887, 2004.

ZIOUZENKOVA, O.; PLUTZKY, J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR–RXR complex. **FEBS Letters**, v. 582, p. 32–38, 2008.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
LABORATÓRIO DE NEUROBIOLOGIA E HEMATOLOGIA CELULAR
E MOLECULAR, BEG-CCB, UFSC

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: *Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho.*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL (ORIENTADOR): Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Jeremias, Maria Cecilia Kohler, Rossana Simão.

Você está sendo convidado para participar da pesquisa : *Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho*, sob a responsabilidade do pesquisador Responsável Prof. Dr. Marcio Alvarez da Silva (orientador) e dos Pesquisadores Principais: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Jeremias, Maria Cecilia Kohler e Rossana Simão.

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender como células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta podem ser utilizadas para aumentar o número de outras células tronco como as encontradas no sangue do cordão umbilical, as células tronco hematopoéticas.

O TCLE será obtido por um dos pesquisadores responsáveis que serão os profissionais que isolarão e farão a manutenção das CTMs obtidas da placenta.

Na sua participação você será convidado a doar a placenta com um pedaço do cordão umbilical para que esta pesquisa possa ser conduzida. Iremos isolar as CTMs de placenta para estudar como poderemos manipular *in vitro* no Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular. As células obtidas serão utilizadas exclusivamente neste trabalho, não serão utilizadas para outros fins ou comercializadas. Neste sentido somente os profissionais envolvidos terão acesso ao material doado.

Em nenhum momento você será identificado. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar na pesquisa.

Neste procedimento não existem riscos para o paciente nem para o recém nato. Em nenhum momento serão utilizados procedimentos invasivos.

Você é livre para desistir de participar a qualquer momento deste Projeto, sem nenhum prejuízo para o senhor(a).

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor(a).

Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: (48) 3721 6905/5553, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular ou (48)99803643, nos fins de semana.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, garantimos que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior avaliação dentro do projeto que foi explicado acima.

Pesquisador Responsável:

Pesquisador Principal:

Eu _____, fui esclarecido (a) sobre a Pesquisa “*Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoéticas de placenta/cordão umbilical: efeitos do nicho.*” e aceito participar do projeto voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido. Concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical.

Florianópolis, _____ de _____ de 200____.

Assinatura: _____ RG: _____