



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**ANÁLISE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS (CTA) EM CULTURA DE  
CÉLULAS DE TECIDO EPITELIAL DE PEQUENOS ROEDORES (RODENTIA-  
STRICOGNATHI- SCIUROGNATHI)**

**JORGE DORES RISSINO**

Belém - Pará

Novembro - 2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**ANÁLISE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS (CTA) EM CULTURA DE  
CÉLULAS DE TECIDO EPITELIAL DE PEQUENOS ROEDORES (RODENTIA-  
STRICOGNATHI- SCIUROGNATHI)**

**JORGE DORES RISSINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará (UFPA), como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka

Belém - Pará  
Novembro - 2012

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**JORGE DORES RISSINO**

### **ANÁLISE DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS (CTA) EM CULTURA DE CÉLULAS DE TECIDO EPITELIAL DE PEQUENOS ROEDORES (RODENTIA- STRICOGNATHI- SCIUROGNATHI)**

Belém, 13 de Novembro de 2012

#### **BANCA EXAMINADORA**

---

**Orientador:** Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka

---

**Avaliador 1:** Prof. Dr. Moisés dos Santos Miranda

---

**Avaliador 2:** Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

---

**Avaliador 3:** Profa. Dra. Susana Suely Rodrigues Milhomem Paixão

---

**Suplente:** Profa. Dra. Cleusa Yoshiko Nagamachi

Belém – Pará  
Novembro - 2012

“É proibido não transformar sonhos em realidade, não  
viver cada dia como se fosse um último suspiro.”

**Pablo Neruda**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Julio C. Pieczarka muito obrigado pela oportunidade na pós-graduação acreditando que esse momento seria possível, pela orientação e confiança em mim depositada para realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Susana Milhomem por toda ajuda, ensinamentos, disposição, paciência e boa vontade e por ser sempre tão prestativa;

À Profa. Dra. Cleusa Nagamachi coordenadora do laboratório por acolher, ensinar e oferecer a oportunidade de trabalhar em sua equipe de pesquisa, pelo estímulo e apoio para que eu entrasse no mestrado e ter depositado em mim uma enorme confiança;

Às Profas. Dra. Renata Noronha e Dra. Regina Barros, pela amizade, apoio, ensinamentos, compreensão e incentivo para realizar este projeto;

À equipe do Laboratório de Citogenética, que de alguma maneira, contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, Em especial ao Danillo, Patrícia, Anderson, Ramon, Marlyson e Jaqueline pela indispensável ajuda não importando a hora na realização deste projeto;

Às funcionárias Conceição e Shirley pelos momentos de descontração e pela ajuda para manter a organização no laboratório, facilitando a realização dos nossos experimentos;

À Dra Nanci Beyer Nardi e aos membros do Centro de Pesquisa em Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da Universidade Luterana do Brasil - ULBRA pela ajuda na solução dos problemas na montagem dos testes de diferenciação das células-tronco;

Às instituições UFPA, FAPESPA e CNPq pelo apoio técnico, científico e financeiro;

Aos meus pais, Jorge e Ivete Heloisa (ambos *in memoriam*), pelo amor e esforço com que dirigiram a minha formação educacional, ética e moral dentro e fora de casa. Vocês são os grandes responsáveis pela pessoa e o profissional que sou hoje.

Aos meus quatro irmãos, Maria Ivete, Luis Otávio, Ana Lucia e Silvia, por toda ajuda e compreensão, me apoiando em todos os momentos da minha vida;

À Margareth, esposa, companheira, que já percorreu boa parte de sua vida ao meu lado, só tenho a agradecer o carinho, o respeito, a cumplicidade e seu amor;

Aos meus dois filhos, Jordan e Jonathan, por sempre terem me incentivado e estarem presentes na minha vida dividindo as alegrias e as tristezas desde o nascimento;

Ao meu cunhado, Luis Carlos Abranches de Miranda (*in memoriam*), pelo companheirismo e amizade. Sua honestidade e simplicidade me servem de inspiração. Pelo simples prazer de tê-lo como cunhado.

A conclusão deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta e indireta de muitas pessoas. Um muito obrigado.

## SUMÁRIO

<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 - INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 - REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1 - CULTIVO CELULAR.....	3
2.2 – AS CÉLULAS-TRONCO .....	5
2.3 - CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS.....	8
2.4 - CÉLULAS-TRONCO FETAIS .....	10
2.5 - CÉLULAS-TRONCO ADULTAS .....	10
2.6 - CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS .....	14
2.7 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS .....	15
<b>3 – JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4 - OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 - OBJETIVO GERAL .....	21
4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>5 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
5.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	22
5.2 - MÉTODOS .....	22
5.3 - COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
5.4 - TÉCNICA DE DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA .....	25
5.5 - REPIQUE DAS CELULAS OU PASSAGEM CELULAR .....	26
5.6 - CONGELAMENTO DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	27
5.7 - ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS CONGELADAS.....	27
5.8 - DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS .....	27
5.9 - ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA .....	28
5.10 - ANÁLISE CITOGENÉTICA PÓS- DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS EM CULTURA .....	28
5.11 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR: CURVA DE CRESCIMENTO 28	
<b>5.11.1 - Contagem das células, análise da viabilidade celular e número de células     semeadas em placa</b> .....	<b>29</b>
<b>5.11.2 - Método Azul de Tripán 0,4% (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.,     Grand Island, NY)</b> .....	<b>29</b>
5.12 - ENSAIO CLONOGÊNICO .....	30
5.13 - DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS -TRONCO ADULTAS.....	30
<b>5.13.1 - Diferenciação osteogenética</b> .....	<b>31</b>
<b>5.13.2 - Diferenciação condrogenética</b> .....	<b>31</b>
<b>5.13.3 - Diferenciação adipogenética</b> .....	<b>32</b>
<b>6 - RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
6.1 - ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA .....	33
6.2 - ANÁLISE DO PERFIL CITOGENÉTICO .....	36
6.3 - CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	41
6.4 - ENSAIO CLONOGÊNICO .....	47
6.5 - DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTA .....	49
<b>7 - DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>

<b>8 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>72</b>
<b>9 - RESUMO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>10 - CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>

**SIGLAS E ABREVIATURAS**

**AsAP 1000X** - Ácido ascórbico 2-fosfato

**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio

**Cl<sup>-</sup>** - Cloro

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**CP** - Células progenitoras

**CT** - Células-Tronco

**CTA** - Células-Tronco Adultas

**CTA-TA** – Célula-Tronco Adulta do Tecido Adiposo

**CTE** - Células-Tronco Embrionária

**CTF** - Células-Tronco Fetal

**CTH** - Células-Tronco Hematopoiéticas

**CTM** - Células-Tronco Mesenquimais

**CTMm** – Célula-Tronco Mesenquimal murina

**cm<sup>2</sup>** - Centímetro quadrado

**CFU-F** - Colony Forming Unit-Fibroblasts. Unidades formadoras de colônia semelhantes a fibroblastos

**CO<sub>2</sub>** - Dióxido de carbono

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Meio de Eagle modificado por Dulbecco's).

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**EGF** – Fator de crescimento epidermal

**PGF** – Fator de crescimento derivado de plaquetas

**TGF-β1**- Fator de crescimento transformador β1

**° C** - Graus Celsius

**KCl** - Cloreto de potássio.

**K<sup>+</sup>** - Potássio

**HBSS** – Hank's balanced salt solution. Solução salina balanceada

**HCO<sup>3-</sup>** - Bicarbonato de sódio

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

**ISCT** - International Society for Cellular Therapy. Sociedade Internacional de Terapia Celular

**Mg<sup>2+</sup>** - Magnésio

**µm** - Micrometro

**µL** - Microlitro

**mL** -Mililitro

**mm<sup>2</sup>** - Milimetro quadrado

**Na** - Sódio

**NIH** – National Institutes of Health. Instituto Nacional de Saúde

**O<sub>2</sub>** - Oxigênio

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

**pH** - Potencial de hidrogênio

**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>** - Fosfato

**Rosiglitazona** - Rosiglitazona

**ISCN** - Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana de 2005

**SBF** - Soro Bovino Fetal

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** - Sulfato

**TPP** - “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland

**TRYPLE EXPRESS 1X** - Tripsina.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da divisão celular assimétrica de célula-tronco. A célula-tronco (azul) se reproduz, originando duas células filhas diferentes. A primeira é idêntica à célula-mãe e permanece em estado de repouso até receber algum estímulo. A outra célula-filha (vermelha) é chamada célula progenitora, e pode se diferenciar em uma célula tecidual madura (com o núcleo em amarelo) ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras (VAZ, 2006). ..... 7
- Figura 2.** Representação esquemática da divisão celular simétrica das células progenitoras (auto-renovação). As células progenitoras derivam de uma célula-tronco e são parcialmente indiferenciadas. A célula progenitora (vermelha) se reproduz, originando duas células filhas idênticas a ela. Uma com o núcleo amarelo passa por um processo de diferenciação celular e se transforma em células teciduais diferenciadas (células maduras). A outra em vermelho se reproduz simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras que serão responsáveis pela formação dos mais variados tipos celulares que compõe os tecidos do organismo (VAZ, 2006). ..... 7
- Figura 3.** A partir de um blastocisto, células-tronco são extraídas e manipuladas *in vitro*, para que possam originar diferentes tecidos, com o potencial para serem transplantados (SCHWINDT et al., 2005). ..... 9
- Figura 4.** Representação esquemática da plasticidade das CTA da medula óssea e do cérebro. Tecidos originados a partir da Medula óssea e Cérebro. (CYTOTHERA, 2012). 12
- Figura 5.** Diferenciação de CTMm em cultura de longa duração. (A) Diferenciação osteogênica, passagem 8, presença de matriz extracelular rica em cálcio, coloração Alizarin Red S. (B) Diferenciação adipogênica, passagem 33, presença de vacúolos lipídicos coloração Oil Red O. (C) Cultura submetida a indução osteo, corada com Alizarin Red S e Sudam Black B, evidenciando diferenciação adipogênica junto com diferenciação osteogênica. (D) Diferenciação adipogênica espontânea, passagem 33 mantendo confluência por 4 semanas, coloração Oil Red O. (Modificado de Meirelles & Nardi, 2003). ..... 13
- Figura 6.** Diferenciação de AT-CTM. Diferenciação em linhagens celulares adipogênica, condrogênica e osteogênica. (A) Diferenciação adipogênica, presença de gotículas lipídicas intracelulares, coloração Oil Red O. (B) Diferenciação condrogênica, presença de proteoglicanos sulfatados, coloração Alcian Blue. (C) Diferenciação osteogênica, presença de matriz extracelular rica em cálcio, coloração Von Kossa. Barra A x B e C = 100 µm. (Modificado de Valorani et al., 2010). ..... 13
- Figura 7.** Representação esquemática de CTH da medula óssea. As células sanguíneas maduras surgem de um precursor comum (Célula-Tronco Hematopoética), através de várias etapas de maturação. A CTH possui capacidade de autorrenovação, esta capacidade é perdida ao longo do processo de diferenciação. CPM= Célula Progenitora Mielóide origina PME= Progenitores Megacariócitos/Eritrócitos (Megacariócitos, Eritrócitos e Plaquetas) e PGM= Progenitores Granulócitos/Monócitos (Granulócitos, Monócitos, Macrófagos, Neutrófilo, Basófilo, Eusínófilo); CPL=Célula Progenitora Linfóide origina (Células Dendríticas, Linfócitos T, B e NK). Ambos CPM e CPL originam a Célula Dendrítica. (UCCELI et al, 2007). ..... 15

- Figura 8.** Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens da CTM. As CTM são capazes de se proliferar intensamente antes da diferenciação em vários tipos de tecidos mesenquimais e tipos celulares como: osso, cartilagem, músculo, estroma, tendão e tecido adiposo (CAPLAN & BRUDER, 2001)..... 16
- Figura 9.** Células isoladas do tecido epitelial de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 60% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100 µm. .... 33
- Figura 10.** Células isoladas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 70% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100 µm. .... 33
- Figura 11.** Células isoladas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 60% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100 µm. .... 34
- Figura 12.** Células isoladas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl - 250, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 90% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100 µm. .... 34
- Figura 13.** Células isoladas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 70% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100 µm. .... 35
- Figura 14.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀) apresenta número diplóide com (2n=58) cromossomos. Corados por Giemsa. Barra = 10 um. .... 36
- Figura 15.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂) apresenta número normal de cromossomos (2n=30). Corados por Giemsa. Barra = 10 um. .... 37
- Figura 16.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂) apresenta número normal de cromossomos (2n=30). Corados por Giemsa. Barra = 10 um. .... 38
- Figura 17.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂) apresenta número normal de cromossomos (2n=54). Corados por Giemsa. Barra = 10 um. .... 39
- Figura 18.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂) apresenta número normal de cromossomos (2n=54). Corados por Giemsa. Barra = 10 um. .... 40
- Figura 19.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Oecomys concolor* (SMA-07, ♀), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL. .... 41
- Figura 20.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (SMA-09, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL. .... 42
- Figura 21.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL. .... 43

- Figura 22.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-250, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL. .... 44
- Figura 23.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-243, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL. .... 45
- Figura 24.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial dos cinco espécimes em estudo na terceira passagem. .... 46
- Figura 25.** Ensaio de CFU-F de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100 µm. .... 47
- Figura 26.** Ensaio de CFU-F de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100 µm. .... 47
- Figura 27.** Ensaio de CFU-F de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100 µm. .... 48
- Figura 28.** Ensaio de CFU-F de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-250, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100 µm. .... 48
- Figura 29.** Ensaio de CFU-F de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-243, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100 µm. .... 48
- Figura 30.** Diferenciação osteogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. 50
- Figura 31.** Diferenciação osteogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. 51
- Figura 32.** Diferenciação osteogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. 52
- Figura 33.** Diferenciação osteogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. 53
- Figura 34.** Diferenciação osteogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. 54
- Figura 35.** Diferenciação condrogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. .... 55

- Figura 36.** Diferenciação condrogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x Barra = 25 µm. .... 56
- Figura 37.** Diferenciação condrogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. .... 57
- Figura 38.** Diferenciação condrogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. .... 58
- Figura 39.** Diferenciação condrogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25 µm. .... 59
- Figura 40.** Diferenciação adipogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25µm. .... 60
- Figura 41.** Diferenciação adipogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25µm. .... 61
- Figura 42.** Diferenciação adipogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25µm. .... 62
- Figura 43.** Diferenciação adipogênica de de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25µm. . 63
- Figura 44.** Diferenciação adipogênica de de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 µm. (B, D) 400x, Barra = 25µm. . 64

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Resumo das informações das espécies coletadas.....	22
<b>Tabela 2.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de <i>Oecomys concolor</i> (SMA-07, ♀), na terceira passagem.....	41
<b>Tabela 3.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de <i>Proechimys roberti</i> (SMA-09, ♂), na terceira passagem.....	42
<b>Tabela 4.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de <i>Proechimys roberti</i> (Fsl-238, ♂), na terceira passagem.....	43
<b>Tabela 5.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de <i>Hylaeamys megacephalus</i> (FSL-250, ♂), na terceira passagem.....	44
<b>Tabela 6.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de <i>Hylaeamys megacephalus</i> (FSL-243, ♂), na terceira passagem.....	45
<b>Tabela 7.</b> Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial dos cinco espécimes em estudo na terceira passagem.....	46

## RESUMO

As células-tronco adultas (CTA) são células multipotentes e não especializadas encontradas na medula óssea, no sangue periférico, na córnea, na retina, no cérebro, no músculo esquelético, na polpa dental, no fígado, no pâncreas, no epitélio da pele, no sistema digestivo, no cordão umbilical e na placenta. Estas células podem se renovar e reproduzir indefinidamente e, sob certos estímulos, se transformar em células especializadas de diferentes tecidos ou órgãos. O presente trabalho tem como objetivo a obtenção de CTA a partir de tecido epitelial de roedores silvestres de espécies diferentes (*Oecomys concolor* - um exemplar fêmea, *Proechimys roberti* - dois exemplares machos, *Hylaeamys megacephalus* - dois exemplares machos). A metodologia para isolamento e cultivo *in vitro* de amostras do tecido epitelial foi estabelecida, a partir de protocolos já descritos, avaliando aspectos morfológicos, estabilidade genômica, contagem e análise da viabilidade celular, potencial clonogênico e indução de diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Todas essas análises foram feitas pós-criopreservação das culturas. As CTA foram caracterizadas como população homogênea de células que proliferam *in vitro*, como células aderentes à superfície do plástico, tendo morfologia semelhante a fibroblastos e formato fusiforme, com alta taxa de crescimento e proliferação celular por várias passagens sucessivas, onde a autorrenovação celular foi avaliada por ensaios clonogênicos. Na análise para examinar a estabilidade genômica na P3, todas as amostras apresentaram cariótipo com número diplóide normal e estável. A metodologia empregada nos ensaios para diferenciação das CTA em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, apresentou resultados satisfatórios, onde as células mostraram a marcação desejada através das colorações Alizarin Red S, Alcian Blue e Oil Red O, respectivamente. Todas as amostras testadas apresentam capacidade de proliferação e diversidade de diferenciação, sendo potencialmente fornecedores de CTA provenientes da pele e podendo ser utilizados como organismos modelos de estudos em CT.

Palavras-chave: Células-tronco adulta (CTA), Rodentia, Stricognathi, Sciurognathi.

**ABSTRACT**

The Adult Stem Cells (ASC) are non-specialized multipotent cells found in the bone marrow, peripheral blood, cornea, retina, brain, muscles, dental pulp, liver, pancreas, skin epithelium, digestive system, umbilical cord and placenta. These cells can indefinitely reproduce and renew themselves and, under some stimulation, to change into specialized cells of different tissues or organs. The present work had the aim of obtaining ASC from epithelial tissues from wild rodents of different species (*Oecomys concolor* – one female, *Proechimys roberti* – two males, *Hylaeamys megacephalus* – two males). The methodology for isolation and *in vitro* culture of epithelial tissue following the previously described protocols, as well as the analysis after cryopreservation of morphology, genome stability, counting and cells viability, clonogenic potential and differentiation on osteocytes, chondrocytes and adipocytes. The ADC were characterized as a homogeneous population of *in vitro* growing cells adherent to plastic surfaces, which has a morphology similar to fibroblasts and with fusiform shape, with high growing rate and cell proliferation form many successive passages, where the clonogenic assays evaluated the cell renewing. On checking the genome stability on P3, the entire sample had stable karyotypes with the correct diploid number. The methodology for ASC differentiation into osteocytes, chondrocytes and adipocytes cell lines was satisfactory and the cells demonstrated the staining with Alizarin Red S, Alcian Blue and Oil Red O, respectively. The entire sample had capacity of proliferation and differentiation, being a potential source of skin ASC. These species can be used as models for ASC studies.

Key-words: Adult Stem Cell, Rodentia, Stricognathi, Sciurognathi.

## 1 - INTRODUÇÃO

Células-tronco (CT) (do inglês “stem cells”), também conhecidas como células-mãe ou células estaminais, são células que possuem a melhor capacidade de se dividir dando origem a células semelhantes às progenitoras e de se transformar, num processo conhecido por diferenciação celular, podendo originar uma variedade de tipos de tecidos do corpo, como osso, tecido adiposo, muscular, neuronal, entre outros (WATT & HOGAN, 2000; BERNÁ et al., 2001; ODORICO et al., 2001; GRITTI et al., 2002). Tais células podem ser classificadas em Células-Tronco Embrionárias (CTE), Células-Tronco Fetais (CTF), Células-Tronco Adultas (CTA), Células-Tronco Hematopoiéticas (CTH) e Células-Tronco Mesenquimais (CTM) (SCHWINDT et al., 2005).

As CT podem ser obtidas da camada interna de blastocistos, do encéfalo de fetos, do tecido neuronal maduro (substância cinzenta periventricular ou giro denteado do hipocampo) ou de tecidos maduros não-neuronais (como medula óssea, sangue periférico, córnea, retina, cérebro, músculo esquelético, polpa dental, fígado, pâncreas, epitélio da pele, sistema digestivo, cordão umbilical e placenta). Cada fonte de células apresenta vantagens e desvantagens (LINDVALL & KOKAIA, 2006).

As limitações relativas ao transplante de órgãos direcionam os pesquisadores para caminhos alternativos de tratamento. Uma das opções é a engenharia tecidual, a qual tem apresentado resultados promissores buscando reparar, substituir ou regenerar órgãos e tecidos específicos (GRIFFITH et al., 2002). Esta alternativa terapêutica tem como objetivo principal tratar a consequência das doenças, cujos tecidos não apresentam capacidade de regeneração própria (ARMANDOLA, 2003).

Pesquisadores passaram a investigar várias populações celulares, como células-tronco embrionárias, células do cordão umbilical e células-tronco mesenquimais, sugerindo que podem ser utilizadas principalmente em terapias celulares (YEH et al., 2003).

Em 1998, pesquisadores isolaram pela primeira vez células-tronco embrionárias de humanos a partir de um blastocisto (THOMSON et al., 1998; . SHAMBLOTT et al., 1998). O estabelecimento destas linhagens celulares representa uma ferramenta importante para o estudo da "biologia de células-tronco" e enorme potencial para a produção *in vitro* dos mais variados tipos celulares para a realização de terapia celular, teste de novas drogas e estudo de sua toxicidade.

Atualmente, vários tipos de células-tronco têm sido estudadas devido a sua capacidade de diferenciação em diversos tecidos, tais como fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrointestinal, coração e músculo esquelético (HERZOG et al., 2003). O isolamento, quantificação e expansão dessas células permitem que a terapia celular seja utilizada na tentativa de tratamento em patologias que afetam o homem e os animais (BARKER et al., 2003).

Todavia, existem inúmeras questões éticas referentes às CTE a respeito do seu isolamento e cultivo. A retirada das células em embriões com poucos dias de desenvolvimento é feita na maioria das vezes com o sacrifício do embrião, o que estabelece um dilema ético (MCHUGH, 2004; SANDEL, 2005).

As questões éticas assumem uma dimensão distinta quando se advoga, em função das suas potenciais vantagens, o uso de CTE que implica na destruição de embriões, por comparação com a utilização de células-tronco não embrionárias, obtidas de seres humanos adultos e sob o seu consentimento (MCHUGH, 2004; SANDEL, 2005).

O recente avanço na área da pesquisa de CTMs da medula óssea de adulto sugere que tais células replicam-se, possibilitando transplante autólogo e possuem a capacidade de se diferenciar em células especializadas, como cardiomiócitos, células endoteliais, condrócitos, osteócitos, tecido adiposo e células musculares esqueléticas (LEE et al., 2004).

Desta forma, este trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre células-tronco, com destaque para o isolamento das CTA a partir de tecido epitelial realizando o cultivo *in vitro*, estudando os mecanismos de expansão, aspectos morfológicos, caracterização e diferenciação nas culturas de células de roedores silvestres para confirmar que as células isoladas são as células com que se deseja trabalhar.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - CULTIVO CELULAR

Uma das maiores dificuldades no manuseio de células animais é a manutenção de culturas livres de contaminação *in vitro*, necessitando de técnicas assépticas rígidas. Após a descoberta em 1940 de antibióticos tais como penicilina e estreptomicina, a incorporação dos mesmos ao meio de cultura de células animais contribuiu para minimizar a ocorrência de contaminação. Entretanto, um significativo avanço na habilidade para iniciar culturas de células livres de tecido foi o uso da tripsina, também empregada posteriormente em subculturas de células dependentes de ancoramento. Esta técnica foi completamente desenvolvida até 1950, quando possibilitou o estabelecimento de populações de células homogêneas. Isto encorajou um maior emprego da cultura de células em laboratório, após uma variedade de cultivos mostrarem características de ótimo desenvolvimento *in vitro*. Os avanços técnicos e o aparecimento de um grande número de companhias comerciais que investiram no desenvolvimento de meios, soros e uma gama de outros produtos necessários para as culturas de células, fizeram do cultivo celular uma tecnologia viável (FRESHNEY, 1994).

Para o cultivo celular em meio líquido é possível controlar precisamente o ambiente e a composição do meio de cultivo. Em um cultivo podem ser controlados todos os fatores físicos-químicos (pH, temperatura, pressão osmótica, níveis de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) e fisiológicos (hormônios, fatores de crescimento, densidade celular) (FRESHNEY, 1994).

A influência do ambiente na cultura é expressa por quatro fatores: 1) natureza do substrato ou a fase em que cada célula cresce, isto é um substrato sólido, monocamada de crescimento em plástico; 2) meio semi-sólido com gel de colágeno ou agar de acordo com a constituição fisiológica e físico-química do meio; 3) cultura líquida em suspensão de acordo com a constituição da fase de gás; 4) temperatura de incubação (FRESHNEY, 1994).

A temperatura e o pH são algumas das condições operacionais que devem ser acompanhadas durante o cultivo de células. A temperatura é fator de grande importância para a célula, pois influencia no metabolismo, na síntese e na degradação de proteínas secretadas no produto. Células de mamíferos são cultivadas a 37° C, aves entre 38° e 40° C e anfíbios, peixes, insetos e répteis entre 20° e 36° C. Dependendo da cultura celular, a

diminuição de temperatura ao longo do cultivo acarreta em perdas nas taxas de síntese protéica. O pH do meio deve ser ajustado entre 7.2 e 7.4. Para pequena escala, até 1L de meio de cultura, bons resultados para o controle do pH podem ser obtidos apenas agindo sobre as mudanças de coloração do indicador vermelho de fenol presente nos meios. Ele é vermelho quando o pH é 7.4; torna-se laranja com o pH 7.0; amarelo com 6.5; amarelo limão quando o pH está abaixo de 6.5; rosa no pH de 7.6 e púrpura com 7.8. Algumas linhagens de fibroblastos proliferam em meio com pH entre 7.4 e 7.7, células diferenciadas proliferam em pH entre 7.0 e 7.4, enquanto algumas células epidérmicas podem ser mantidas em pH 5.5 (FRESHNEY, 1994).

O correto suprimento de gases essenciais como oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) é importante para a obtenção de um alto rendimento de produto, pois estes gases possuem funções metabólicas. O dióxido de carbono ( $CO_2$ ) contribui para o controle do pH do meio e o oxigênio ( $O_2$ ) é considerado nutriente chave do meio de cultura. O dióxido de carbono ( $CO_2$ ) desempenha um papel mais complexo que o oxigênio ( $O_2$ ) dentro do meio de cultivo, pelo fato de suas ações estarem inter-relacionadas, como por exemplo, o aumento da concentração de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) diminui o pH do meio de cultivo das células (FRESHNEY, 1994).

Em geral, para garantir um bom crescimento em cultivo de células é necessário acrescentar ao meio: glicose como fonte de carbono e energia, aminoácidos, soro bovino fetal (SBF), sais e antibióticos. O uso de antibióticos em meios para cultivo celular deve ser considerado mais como uma medida adicional de segurança, mas não como um método de esterilização de meio de cultura (FRESHNEY, 1994).

A presença de aminoácidos essenciais, ou seja, aqueles que não são sintetizados pelo organismo, são fundamentais para o desenvolvimento da cultura. A concentração dos mesmos usualmente limita a obtenção da concentração máxima de células, podendo influenciar na sua sobrevivência e na taxa de crescimento. Cistina, glutamina, isoleucina e serina são os aminoácidos utilizados mais rapidamente pelas células e, portanto, são os primeiros a serem consumidos (FRESHNEY, 1994).

Os sais contendo íons  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{3-}$  e  $HCO_3^-$  são os principais componentes que contribuem para a osmolaridade (pressão osmótica) do meio. Os íons  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$  regulam o potencial de membrana, enquanto que os íons

$\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{HCO}_3^-$  são precursores nutricionais de moléculas além de reguladores da carga intracelular (FRESHNEY, 1994).

O meio de cultivo é produzido comercialmente na forma em pó e líquida. Na forma em pó ele tem a vantagem de se manter estável por mais de 24 meses se conservado bem fechado e em freezer à  $-20^\circ\text{C}$ . Deve conter uma grande reserva de nutrientes essenciais para suportar o crescimento das células, principalmente no ciclo final da cultura, onde usualmente mais de  $10^6$  células/mL estão presentes. O meio DMEM (Meio Essencial Mínimo de Dulbecco) destina-se a cultura de mamíferos (células humanas e tecidos ou células animais) e é o mais indicado quando se está trabalhando com uma alta densidade de células, possivelmente devido ao fato da concentração de certos aminoácidos essenciais e vitaminas ser muito superior aos dos demais meios de cultura (FRESHNEY, 1994).

Para o cultivo de células adiciona-se soro bovino fetal, devido a grande quantidade de fatores presentes no mesmo, que estimulam o crescimento celular. O soro é, usualmente, um componente essencial para a cultura de células e sua ausência pode ocasionar uma baixa taxa de crescimento. Ele possui duas funções. A primeira consiste em auxiliar a adesão das células as superfícies das garrafas de culturas. A segunda é promover a proliferação de células devido à presença de citocinas, hormônios e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) responsável por estimular a divisão celular (TAPP et al., 2009).

A maioria das culturas *in vitro* de células de vertebrados cresce em monocamada ou sobre substrato artificial. O crescimento espontâneo em suspensão é restrito às células hematopoiéticas, especialmente tumores de roedores e alguns tumores, inclusive de humanos (FRESHNEY, 1994).

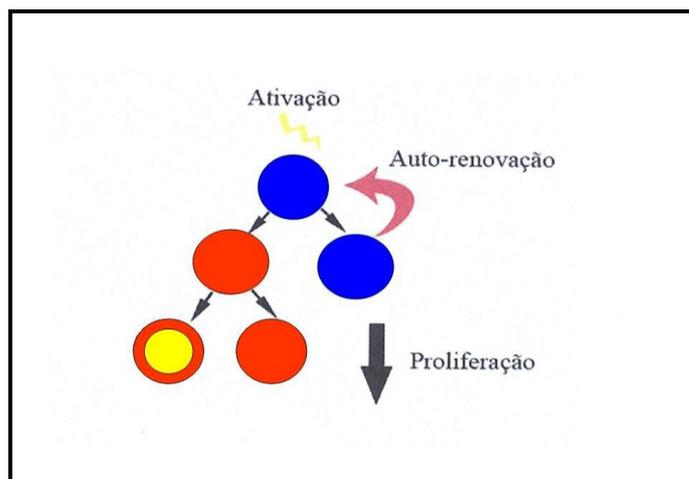
## 2.2 – AS CÉLULAS-TRONCO

Célula-tronco é um tipo especial de célula que tem a capacidade de indiferenciação, por não apresentar função específica nos tecidos e ser capaz de se proliferar, originando outras células-tronco e mantendo-se em estado indiferenciado por longos períodos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. Esta propriedade mantém a população de células-tronco ao longo do tempo. Também apresenta capacidade de se diferenciar em células maduras, originando unidades especializadas com atividade funcional normal como as demais do tecido

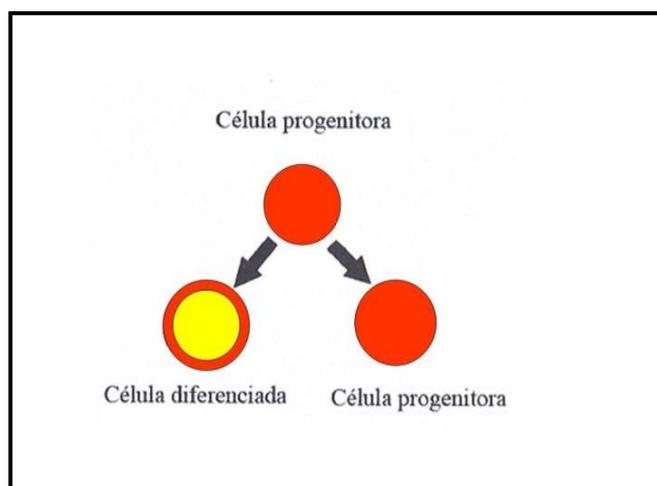
particular em que se encontram, sendo esta propriedade denominada de diferenciação (NARDI & AFONSO, 2006; COLOMÉ, 2007; GOMPERTS & STRIETER, 2007; BYDLOWSKI et al., 2009; NIH, 2009).

As células-tronco são células em repouso que apresentam diferentes padrões de divisão celular conhecidas como divisão celular assimétrica e divisão celular simétrica também conhecida como processo de auto-renovação (MUSCHLER & MIDURA, 2002). Na divisão celular assimétrica, a célula-tronco é ativada por algum sinal ou evento que induz a saída do seu estado de repouso e a sua reprodução originando duas células filhas diferentes. A primeira é idêntica à célula-mãe e permanece em estado de repouso até receber algum estímulo. A outra célula-filha é chamada célula progenitora, e pode se diferenciar em uma célula tecidual madura ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras (Figura 1) (VAZ, 2006). Na divisão celular simétrica (auto-renovação) uma célula-tronco prolifera simetricamente produzindo duas células filhas idênticas a ela. As células progenitoras derivam de uma célula-tronco e são parcialmente indiferenciadas. Elas podem passar por um processo de diferenciação celular e se transformar em células teciduais diferenciadas (células maduras) ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras que serão as responsáveis pela formação dos mais variados tipos celulares que compõe os tecidos do organismo (Figura 2) (VAZ, 2006). Acredita-se que a proliferação celular esteja relacionada à regulação da atividade da enzima telomerase, a qual é responsável pela manutenção do comprimento dos telômeros e pela estabilidade estrutural cromossômica de células eucariontes. Telômero é a porção terminal de cromossomos eucarióticos (sequência TTAGGG) que os protege contra fusão e mistura de material genético (BODNAR et al., 1998; TAM et al., 2007).

O papel da telomerase na manutenção da proliferação celular é o que difere a célula-tronco de outros tipos celulares. Na maior parte das células somáticas essa enzima é apenas ativa durante a embriogênese, sendo suprimida após o nascimento. Em células-tronco e células progenitoras a telomerase se mantém ativa estimulando a reposição e auto-renovação celular (GREIDER & BLAKBURN, 1985; TAM et al., 2007). A diminuição de sua atividade resulta no encurtamento do telômero, diminuição da taxa de proliferação celular e posterior senescência da célula (NUGENT et al., 1998; TAM et al., 2007).



**Figura 1.** Representação esquemática da divisão celular assimétrica de célula-tronco. A célula-tronco (azul) se reproduz, originando duas células filhas diferentes. A primeira é idêntica à célula-mãe e permanece em estado de repouso até receber algum estímulo. A outra célula-filha (vermelha) é chamada célula progenitora, e pode se diferenciar em uma célula tecidual madura (com o núcleo em amarelo) ou se reproduzir simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras (VAZ, 2006).



**Figura 2.** Representação esquemática da divisão celular simétrica das células progenitoras (auto-renovação). As células progenitoras derivam de uma célula-tronco e são parcialmente indiferenciadas. A célula progenitora (vermelha) se reproduz, originando duas células filhas idênticas a ela. Uma com o núcleo amarelo passa por um processo de diferenciação celular e se transforma em células teciduais diferenciadas (células maduras). A outra em vermelho se reproduz simetricamente, produzindo um grande número de células progenitoras que serão responsáveis pela formação dos mais variados tipos celulares que compõe os tecidos do organismo (VAZ, 2006).

Dessa forma, as células-tronco podem ser definidas segundo três propriedades: I) auto-renovação, ou seja, capacidade de originar outra célula-tronco com características idênticas; II) habilidade de se diferenciar em células maduras com morfologia e função específicas e, III) capacidade de repor células mortas ou danificadas durante o remodelamento tecidual, processo altamente regulado e organizado (SLACK, 2000; ULLOA-MONTOYA et al., 2005; LAKSHMIPATHY & VERFAILLIE, 2005; MOORE et al., 2006; DALERBA et al., 2007).

As células-tronco podem ainda ser classificadas segundo a sua potencialidade em:

I) Totipotentes: células capazes de gerar todos os tipos de celulares embrionários e extra-embrionários, com o zigoto e o blastômero (ZHANG et al., 2006).

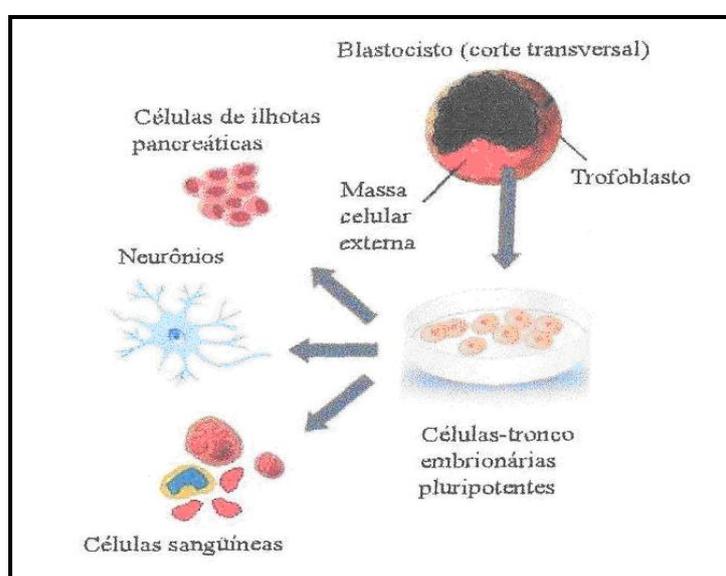
II) Pluripotentes: compreendem uma classe de células-tronco capaz de originar os mais de 200 tipos de células conhecidas do corpo humano. Uma única célula-tronco pluripotente pode dar origem a células que se formam a partir das três camadas germinativas (mesoderma, endoderma e ectoderma) de onde os tecidos do corpo são originados. As únicas fontes conhecidas de células-tronco pluripotentes são aquelas isoladas e cultivadas de embriões humanos e do tecido fetal destinado a fazer parte das gônadas (crista gonadal) (ZHANG et al., 2006).

III) Multipotentes: são células isoladas de vários órgãos adultos autorrenováveis com capacidade de diferenciação mais limitada, mas ainda capazes de originar múltiplos tipos celulares de órgãos específicos, que originam células de um sub-grupo de linhagens celulares do mesmo folheto embrionário, como as células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco neurais (ZATZ, 2004; MEIRELES et al., 2006; NARDI & MEIRELES, 2006).

### 2.3 - CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS

As células-tronco embrionárias são derivadas de um grupo de células presentes em um dos estágios mais precoces do desenvolvimento do embrião humano chamado blastocisto, cinco dias após a fertilização (BISWAS & HUTCHINS, 2007; FOYGEL et al., 2008). Ele é utilizado para a captação de CTE, que são derivadas da massa celular interna. Deste modo, um embrião humano normal de 5 dias é formado por 200 a 250 células, das quais a maioria pertence ao trofoectoderma (ZHANG et al., 2006). Por meio de uma micro-cirurgia ou imuno-cirurgia, as células da massa interna são captadas (número médio

de 30 a 34 células) e podem ser expandidas em cultura na presença de fatores que impeçam a sua diferenciação (Figura 3). O uso de fatores tróficos é essencial, visto que, na sua ausência, as CTE podem se diferenciar espontaneamente em todos os tipos de tecidos, inclusive em células germinativas. Elas são consideradas pluripotentes (GAGE, 2000) e são capazes de gerar células maduras dos três folhetos embrionários. Entretanto, e até em consequência de seu elevado potencial de diferenciação, possuem altíssimo poder replicativo, o que torna extremamente difícil o controle de seu crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo*.



**Figura 3.** A partir de um blastocisto, células-tronco são extraídas e manipuladas *in vitro*, para que possam originar diferentes tecidos, com o potencial para serem transplantados (SCHWINDT et al., 2005).

O estabelecimento de culturas de linhagens celulares pluripotentes a partir de blastocistos de camundongos foi primeiramente descrito no início da década de 80. Estas linhagens demonstravam capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo* (EVANS & KAUFMAN, 1981). Tais células são extraídas em sua fase embrionária, ou seja, antes de iniciada a organogênese.

Thomsom et al., (1998); Shablott et al., (1998) e Reubinoff et al., (2000) descreveram, um método que permite isolar e cultivar CTE humanas. O estabelecimento destas linhagens celulares estimulou a investigação em células-tronco de origem humana e sugeriu a sua aplicação potencial como recurso terapêutico.

Em teoria, as CTE podem ser cultivadas e tratadas para se diferenciarem em qualquer tecido ou célula do corpo. Em resposta a estímulos extracelulares apropriados, as células-tronco possuem o potencial de auto-renovação através de divisões simétricas e diferenciação em linhagens celulares específicas por intermédio de divisões assimétricas.

Para obtenção de cultura das CTE, Evans & Kaufman (1981) consideraram que o sucesso depende de três fatores: o estágio exato das células existentes no embrião, a retirada do número suficiente de células e as condições de cultivo que conduzam mais à multiplicação do que a diferenciação.

No entanto, há importantes questões éticas envolvidas na extração de tais células de humanos, como já mencionado (MCHUGH, 2005; SANDEL, 2005).

#### 2.4 - CÉLULAS-TRONCO FETAIS

As CTF são uma fonte alternativa de células tronco e podem ser isoladas do próprio feto e de estruturas extra-fetais de suporte, como o cordão umbilical e o seu sangue, a membrana amniótica, o líquido amniótico e a placenta (BOSSOLACO, 2004). Assim como as CTA, as CTF não se diferenciam espontaneamente e ainda apresentam outras vantagens: estão presentes em abundância por todo o organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de auto-renovação. Existe um crescente interesse na utilização de células fetais em engenharia tecidual, para tratamento de diversos defeitos congênitos (FUCHS et al., 2003). A maioria destas células prolifera mais rapidamente, em meio de cultura, quando comparadas às células após o nascimento com grande potencial de uso para terapia celular (FINE, 1994; BARTLEY et al., 2005; LUAN et al., 2005; QU et al., 2005).

#### 2.5 - CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

São células indiferenciadas encontradas em todos os órgãos e tecidos pós-natais (MEIRELLES et al., 2008), que podem se renovar e reproduzir indefinidamente e, sob certos estímulos, se transformar em células especializadas de diferentes tecidos ou órgãos.

Estas células são encontradas na medula óssea, sangue periférico, córnea, retina do olho, cérebro, músculo esquelético, polpa dental, fígado, pâncreas, epitélio da pele, sistema digestivo, cordão umbilical e placenta (KERKIS et al., 2004; TARNOWSKI & SIERON, 2006; SANTOS et al., 2004; MEIRELES et al., 2006; NARDI & MEIRELES, 2006). Elas possuem determinada duração de plasticidade e capacidade de auto-renovação e

diferenciação mais limitada do que as CTE, sendo assim multipotente e usualmente de linhagens específicas, possuindo menor potencial teratogênico quando comparado às CTE (BAJADA et al., 2008; PRESTON et al., 2003; ULLOA-MONTOYA et al., 2005).

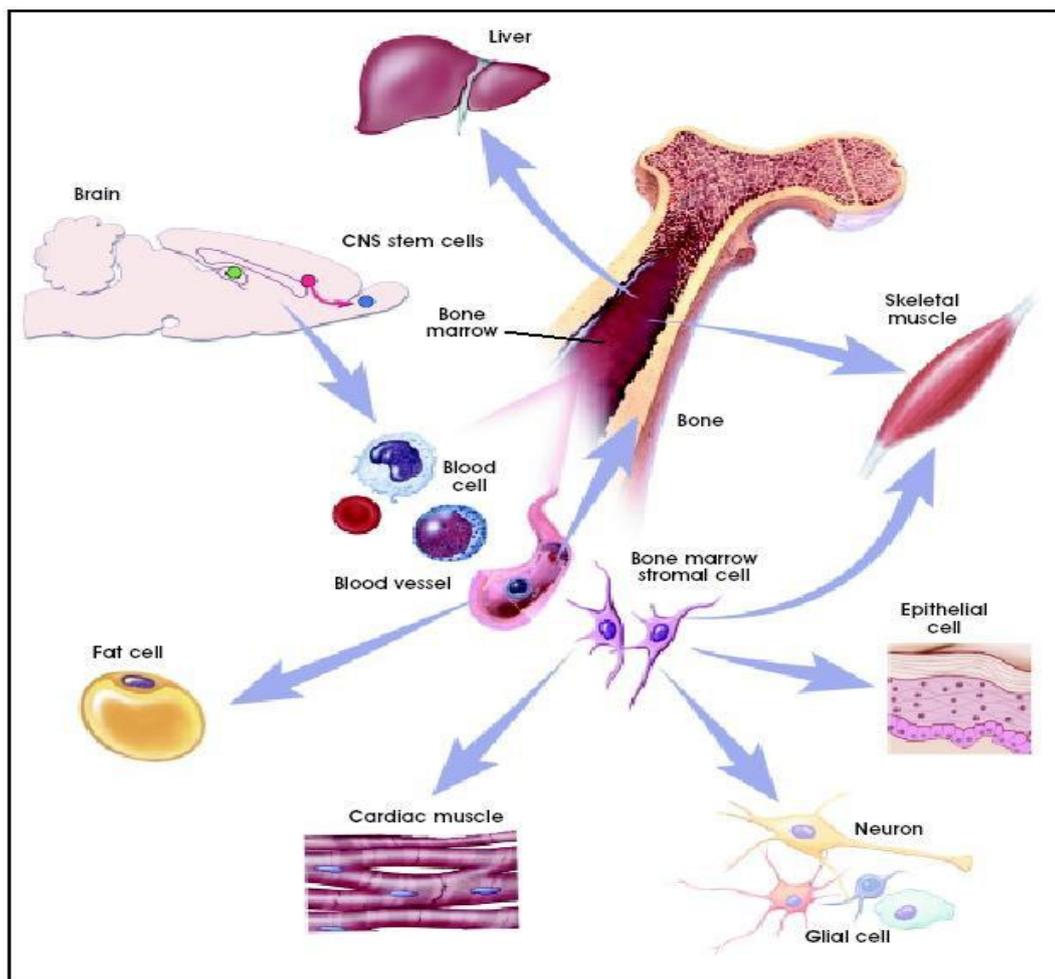
As CTA não são capazes de manter suas propriedades por longos períodos em culturas e podem ser induzidas à diferenciação com a administração de fatores de crescimento apropriados ou outros sinais externos (WURMSER et al., 2004; NIH, 2001; NIH 2009). Uma das fontes mais utilizadas para a extração de CTA é a medula óssea, amplamente estudada face ao uso clínico em transplantes em humanos.

Nesse tecido, encontramos dois tipos de células-tronco: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM) (SCHWINDT et al., 2005; CARSTANJEN et al., 2006; NAKAGE & SANTANA, 2006).

As CTA da medula óssea além de poder fazer a reconstituição hematopoiética, podem tornar-se precursores de células neurais (BRAZELTON et al., 2000; MEZEY et al., 2000; EGLITIS & MEZEY, 1997; KREBSBACH & ROBEY, 2002), células hepáticas e dos três tipos de músculo: cardíaco, esquelético e liso (BONILLA et al., 2005; FERRARI et al., 1998; MINGUELL et al., 2000; PETERSEN et al., 1999; SCHWARTZ et al., 2002).

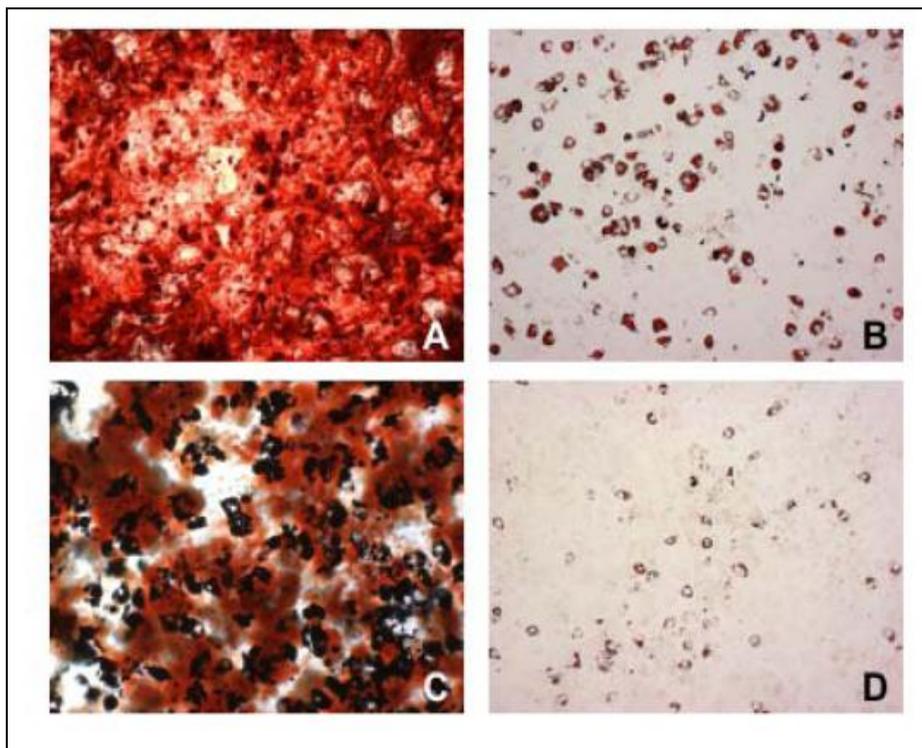
As células-tronco adultas têm sido isoladas, com grande sucesso, de uma grande variedade de tecidos (BLAU et al., 2001; MEIRELLES et al., 2006; ZUK et al., 2002; NIXON et al., 2008; BUNNELL et al., 2008; MARCHENKO & FLANAGAN, 2007; GOLDRING et al., 2002; BLANPAIN et al., 2007; GRITTI et al., 1996; MEIER et al., 2009) e foi comprovado o seu potencial de diferenciação. Por exemplo, estas células podem dar origem a linhagens de células ósseas, cartilaginosas, adiposas, musculares, hepáticas, endoteliais, epiteliais e neurogênicas (BROOKE et al., 2007.; PERONI et al., 2008.; MARCHENCO & FLANAGAM, 2007; GOLDRING et al., 2002.; BLANPAIN et al., 2007; LAGASSE et al., 2000; GRITTI et al., 1996).

Há evidentes demonstrações de que algumas populações de células-tronco isoladas de tecidos adultos apresentam certa plasticidade, de acordo com os sinais do ambiente extracelular, propriedade conhecida como transdiferenciação (WAGERS et al., 2004) e podem diferenciar-se em tipos celulares não relacionados ao seu tecido de origem quando transplantadas em receptores (SCHWINDT et al., 2005; VERFAILLIE et al., 2002; WATT & HOGAN, 2000; MARTIN & WATT, 2003; RAFF, 2003; BOCELLI-TYNDALL et al., 2007; LI et al., 2009; GOMPERTS & STRIETER, 2007; LERI et al., 2006) (Figura 4).

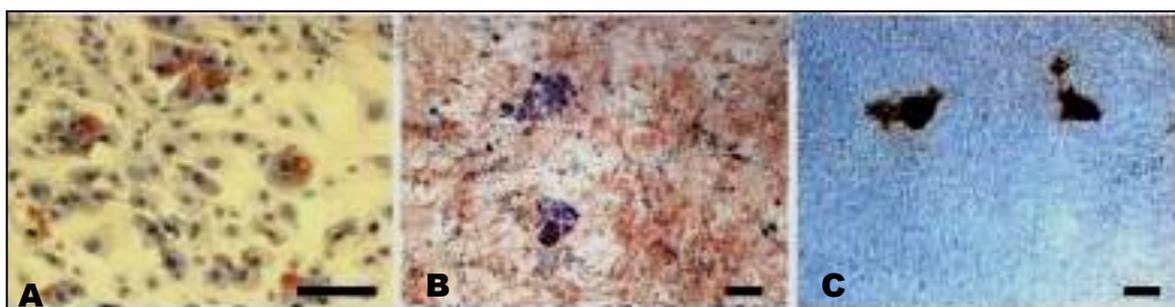


**Figura 4.** Representação esquemática da plasticidade das CTA da medula óssea e do cérebro. Tecidos originados a partir da Medula óssea e Cérebro. (CYTOTHERA, 2012).

Estudos com CTA da medula óssea de camundongos demonstram a caracterização destas células após indução *in vitro* em osteócitos, condrócitos e adipócitos (Figuras 5 e 6). (MEIRELLES & NARDI, 2003; VALORANI et al., 2010).



**Figura 5.** Diferenciação de CTMm em cultura de longa duração. (A) Diferenciação osteogênica, passagem 8, presença de matriz extracelular rica em cálcio, coloração Alizarin Red S. (B) Diferenciação adipogênica, passagem 33, presença de vacúolos lipídicos coloração Oil Red O. (C) Cultura submetida a indução osteo, corada com Alizarin Red S e Sudam Black B, evidenciando diferenciação adipogênica junto com diferenciação osteogênica. (D) Diferenciação adipogênica espontânea, passagem 33 mantendo confluência por 4 semanas, coloração Oil Red O. (Modificado de Meirelles & Nardi, 2003).

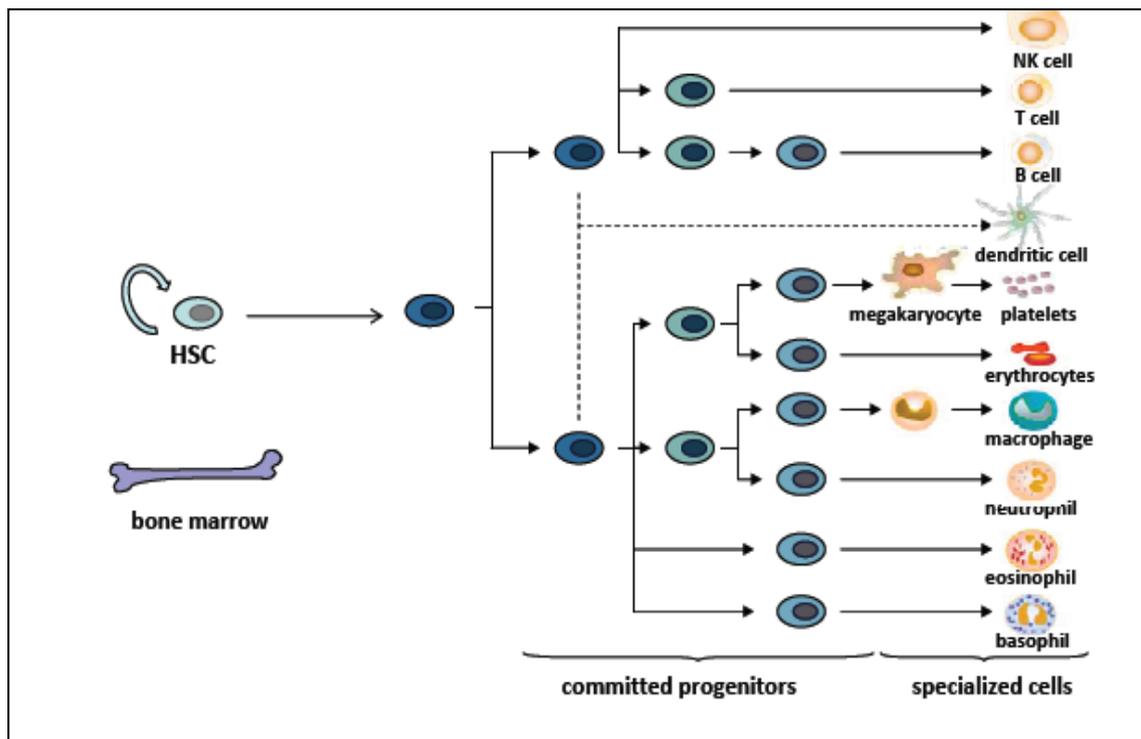


**Figura 6.** Diferenciação de AT-CTM. Diferenciação em linhagens celulares adipogênica, condrogênica e osteogênica. (A) Diferenciação adipogênica, presença de gotículas lipídicas intracelulares, coloração Oil Red O. (B) Diferenciação condrogênica, presença de proteoglicanos sulfatados, coloração Alcian Blue. (C) Diferenciação osteogênica, presença de matriz extracelular rica em cálcio, coloração Von Kossa. Barra A x B e C = 100  $\mu$ m. (Modificado de Valorani et al., 2010).

## 2.6 - CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

As CTH são CTA encontradas na medula óssea, multipotente, com grande capacidade de autorrenovação e potencial proliferativo, o que possibilita a sua diferenciação em células progenitoras (CP) de todas as linhagens sanguíneas e a reconstituição da população hematopoiética a partir de uma única célula (GROTTO & NORONHA, 2003). Foram conhecidas como CT há mais de 40 anos e são responsáveis pela formação de todos os tipos de células sanguíneas. A frequência de CTH na medula óssea é cerca de 1 em cada  $10^4$  células, constituindo cerca de 0,05% a 0,1% da medula óssea, sendo o restante composto por células estromais (CTM), células progenitoras (CP) e células sanguíneas (NIH, 2001; RATHJEN & RATHJEN, 2004; LODISH et al., 2005).

As CTH, ao realizarem divisão celular, originam uma célula indiferenciada (auto-renovação), igual à CTH, e uma célula progenitora capaz de formar as células sanguíneas. As células progenitoras (CP) são células derivadas da CTH que se encontram comprometidas com o processo de diferenciação celular, porém possuem capacidade de auto-renovação reduzida em relação às CTH. As células precursoras, derivadas das (CP), são reconhecidas pelas características morfológicas, possuem baixa capacidade de auto-renovação e elevada atividade mitótica produzindo as células maduras das CTM (MINTZ et al. 1984; LEMISCHKA et al. 1986) (Figura 5).

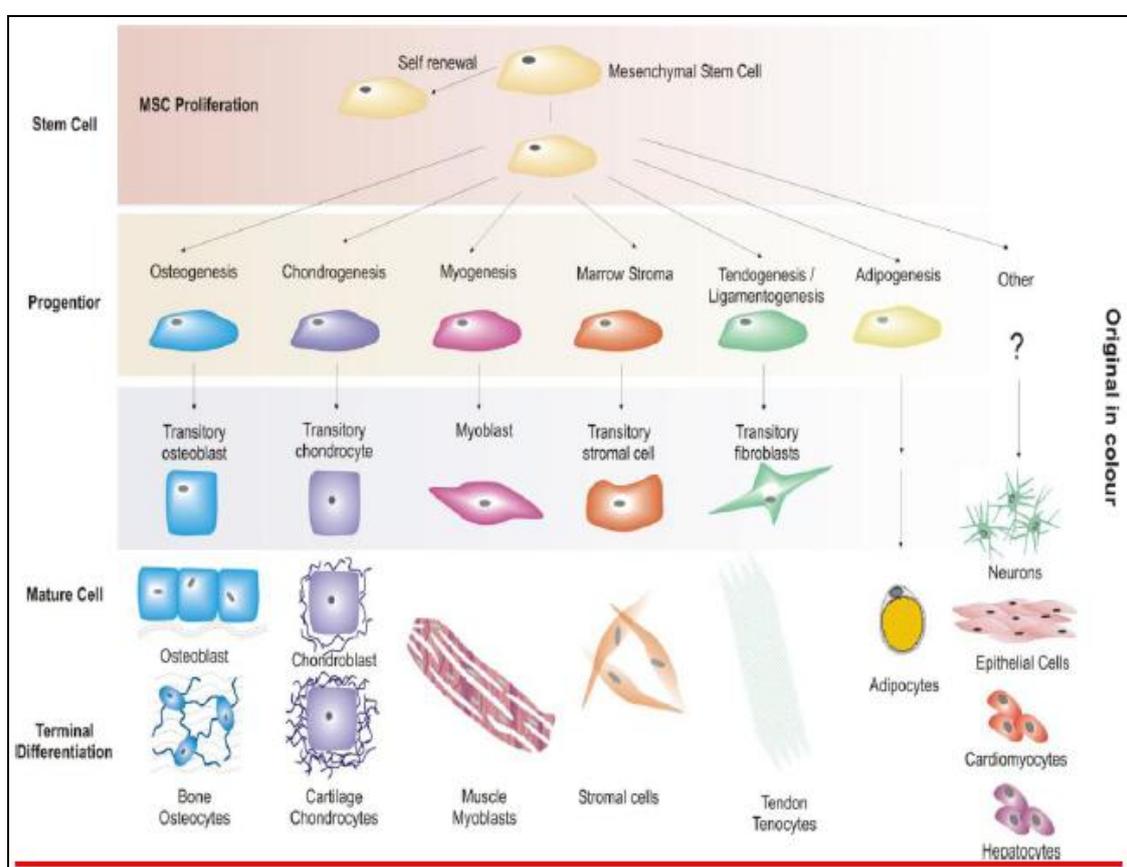


**Figura 7.** Representação esquemática de CTH da medula óssea. As células sanguíneas maduras surgem de um precursor comum (Célula-Tronco Hematopoética), através de várias etapas de maturação. A CTH possui capacidade de autorrenovação, esta capacidade é perdida ao longo do processo de diferenciação. CPM= Célula Progenitora Mielóide origina PME= Progenitores Megacariócitos/Eritrócitos (Megacariócitos, Eritrócitos e Plaquetas) e PGM= Progenitores Granulócitos/Monócitos (Granulócitos, Monócitos, Macrófagos, Neutrófilo, Basófilo, Eusínófilo); CPL=Célula Progenitora Linfóide origina (Células Dendríticas, Linfócitos T, B e NK). Ambos CPM e CPL originam a Célula Dendrítica. (UCCELI et al, 2007).

## 2.7 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As CTM derivadas da medula óssea, também conhecidas como células-tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea (PROCKOP et al., 2003) ou, como recentemente sugerido pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (ABDALLAH et al., 2008, HORWITZ et al., 2005), células estromais mesenquimais multipotentes presentes em todos os órgãos do corpo com capacidade de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e não mesodérmico originando diversos tecidos, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo, miócitos, neurônios e astrócitos *in vitro* e *in vivo* (POUNTOS & GIANNOUDIS, 2005; GIORDANO et al., 2007) (Figura 6), sendo que há evidências de que a frequência dessas células na medula óssea de seres humanos declina com a idade (FIBBE, 2002).

Constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (PITTENGER et al., 1999), mas que pode ser facilmente isolada, cultivada e manipulada *in vitro* (MEIRELLES & NARDI, 2003). Apresentam uma enorme plasticidade e um grande potencial terapêutico (ZAGO & COVAS, 2004; NARDI & MEIRELLES, 2006; BROOKE et al., 2007), portanto atrativas para utilização na terapia celular. Essas células apresentam alto poder replicativo e podem ser obtidas pela simples punção óssea, e assim servir como fonte de células para auto transplantes.



**Figura 8.** Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens da CTM. As CTM são capazes de se proliferar intensamente antes da diferenciação em vários tipos de tecidos mesenquimais e tipos celulares como: osso, cartilagem, músculo, estroma, tendão e tecido adiposo (CAPLAN & BRUDER, 2001).

A existência de células-tronco não hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Cohnheim, há mais de 130 anos. No entanto, foi com os achados de Friedenstein et al. (1974), que essa teoria veio a ser comprovada com a descoberta das células-tronco mesenquimais. Eles encontraram, em uma cultura de células da medula

óssea, uma população de células aderidas ao plástico com morfologia fusiforme, semelhantes a fibroblastos e também observaram que essas células possuíam capacidade para se diferenciar em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem. (FRIEDENSTEIN et al., 1974; PROCKOP, 1997).

As CTM da medula óssea tem algumas características que as distinguem das células hematopoiéticas. Esses dois tipos celulares são de fácil separação *in vitro*. Quando a medula óssea é dissociada e o material é coletado em um gradiente de concentração, as CTM, quando dispensadas em frascos próprios para cultivo, aderem-se a superfície dos frascos, enquanto as células-tronco hematopoiéticas não possuem essa capacidade de adesão (KIRSCHSTEIN, 2001).

Pesquisas revelaram que as células progenitoras mesenquimais (representadas coletivamente por CFU-F, do inglês *colony forming units fibroblast*, ou unidades formadoras de colônia semelhantes a fibroblastos) (LURIA et al., 1971; OWEN, 1988) originam populações heterogêneas funcionais de elementos estromais semelhantes a fibroblastos indiferenciados; tais elementos conservam seu potencial para se proliferar e diferenciar em tecidos especializados. Estas células podem representar um reservatório de populações de múltiplas linhagens de progenitores mesenquimais/estromais que se encontram em um estágio intermediário de diferenciação. Pesquisas são dedicadas ao entendimento dos mecanismos biológicos que são únicos à notável plasticidade destas células, as quais poderão ser utilizadas para tratar doenças genéticas e degenerativas, quando aliadas a terapia gênica, assim como regenerar tecidos (LA RUSSA et al., 2002).

O cultivo de CTM é feito selecionando-se as células com propriedade de adesão ao plástico, enquanto as células que permanecem em suspensão são facilmente removidas. Outros tipos celulares “contaminantes” (como macrófagos e linfócitos) são eliminados após determinado número de passagens (JAVAZON et al., 2004; HORWITZ et al., 2005; KEATING, 2006; OLSSON, 2009). Estas células *in vitro*, quando submetidas a diferentes estímulos, foram descritas como capazes de diferenciação em células das linhagens osteogênica (KULTERER et al., 2007; PARK et al., 2006), adipogênica (DE GEMMIS et al., 2006), condrogênica (HASHIMOTO et al., 2006), neurogênica (ANISIMOV et al., 2007) e cardiogênica (AMADO et al., 2005).

O sangue periférico e o cordão umbilical também são fontes de CTM, todavia apresentam pouca quantidade desse tipo celular, comparado com a medula óssea

(WEXLER et al., 2003), além de ainda não estarem bem estabelecidas as condições ideais de cultivo.

A capacidade de expansão das CTM em culturas tem facilitado o desenvolvimento de ensaios clínicos para avaliar a segurança, as características e a eficácia do transplante dessas células para uma variedade de doenças (DEVINE, 2002).

### 3 – JUSTIFICATIVA

Atualmente, estudos demonstram que CTA podem ser isoladas dos mais diferentes tipos de tecidos humanos e de outros modelos animais, sendo a principal fonte e as mais estudadas as da medula óssea que, sob certos estímulos, se transformam em células especializadas de diferentes tecidos ou órgãos.

Estudos com CTA têm demonstrado que possuem habilidade para se diferenciar em várias linhagens de células do tipo mesodérmico (POUNTOS & GIANNOUDIS 2005; KIM et al., 2007; KUNISAKI et al., 2006; KUNISAKI et al., 2007; ZHENG et al., 2008) e não mesodérmico (DONALDSON et al., 2008; MIMURA et al., 2004; MEIER et al., 2009; BLANPAIN et al., 2007).

O uso clínico de CTA em terapia celular para o tratamento de doenças crônico-degenerativas vem sendo desenvolvida. Essa terapia consiste na utilização de células-tronco com capacidade de se diferenciar em uma ampla variedade de células pertencentes a tecidos conectivos (GIORDANO et al., 2007; KIM et al., 2007).

Após a exposição das características da CTA fica demonstrada a capacidade de heterogeneidade e plasticidade destas células. Entretanto, ainda são necessários protocolos para um melhor entendimento de seus métodos de diferenciação.

Diante do exposto, fica evidenciado a importância e justificativa para a continuação dos estudos nas CTA e em todas as vertentes, inclusive em animais da Biodiversidade da Amazônia.

Sendo assim, nesta dissertação, o conjunto de experimentos realizados e os resultados obtidos irão contribuir para a determinação das condições ideais para cultivo e estabelecimento das culturas de CTA *in vitro* a partir de tecido epitelial dos roedores silvestres.

As culturas foram utilizadas para análise da morfologia, avaliação do crescimento celular através da curva de crescimento, ensaio clonogênico, estudo citogenético, indução de diferenciação em osteócitos, condrócitos, adipócitos e identificação das células diferenciadas em linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas.

Modelos animais representam uma importante ferramenta à pesquisa biológica (RUSSEL, 1992). Quando o foco de maior interesse é o homem, modelos em espécies animais de mamíferos permitem inúmeras abordagens em situações normais ou patológicas. Neste contexto, roedores são de grande utilidade na pesquisa da biologia e

áreas médicas, decidimos desenvolver prioritariamente toda essa metodologia para isolar e cultivar *in vitro* CTA de roedores silvestres proveniente do nosso biorrepositório de células.

O Laboratório de Citogenética da UFPA, onde esta dissertação foi desenvolvida, possui recursos para o projeto “Bioprospecção de células-tronco mesenquimais na biodiversidade brasileira” cujo objetivo principal é a implantação da técnica de bioprospecção de células-tronco mesenquimais (MSC) a partir de linhagens de células existentes em nosso biorrepositório de células. Estas linhagens são provenientes de outros projetos de pesquisas, como o de “Estudo da biodiversidade de vertebrados da Amazônia” que visa a caracterização citogenética de espécies.

## **4 - OBJETIVOS**

### **4.1 - OBJETIVO GERAL**

Desenvolver metodologia para isolar, cultivar, avaliar a multipotencialidade, e caracterizar CTA derivadas do tecido epitelial de roedores silvestres da Amazônia (RODENTIA -STRICOGNATHI - SCIUROGNATHI) no Laboratório de Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

### **4.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1 - Padronizar o cultivo de CTA do tecido epitelial de roedores silvestres pelo método enzimático da colagenase;
- 2 - Analisar as células isoladas sob os aspectos morfológicos, citogenéticos e de diferenciação celular;
- 3 - Avaliar do crescimento celular;
- 4 - Fazer o ensaio clonogênico;
- 5 - Induzir a diferenciação celular em osteócitos, condrócitos e adipócitos;
- 6 - Indicar modelos animais para estudo de CT.

## 5 - MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras do presente estudo foram constituídas de material biológico de cinco espécimes descritos na Tabela 1.

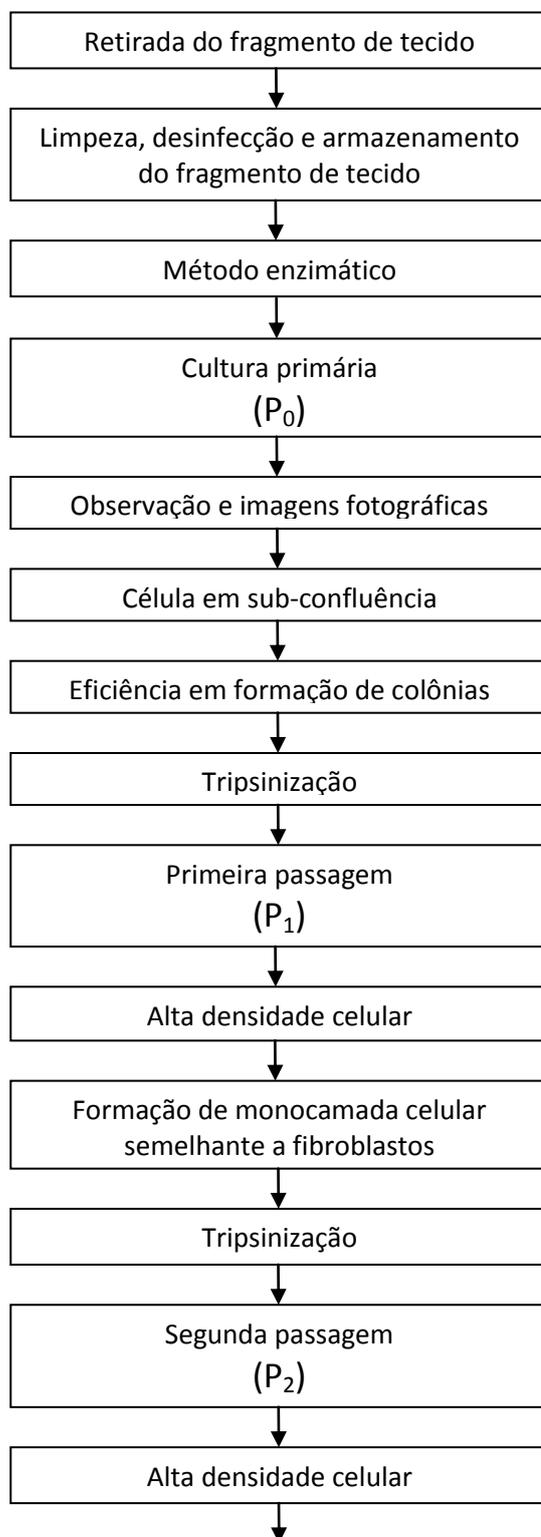
**Tabela 1.** Resumo das informações das espécies coletadas.

<b>Espécie</b>	<b>Protocolo</b>	<b>Localização</b>
<i>Oecomys concolor</i>	Sma-07, ♀	Serra do Apiaú-RO
<i>Proechimys roberti</i>	Sma-09, ♂	Serra do Apiaú-RO
<i>Proechimys roberti</i>	Fsl-238, ♂	Fazenda Nsa. Sra. do Carmo, Monte do Carmo-TO
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	Fsl-250, ♂	Fazenda Nsa. Sra. do Carmo, Monte do Carmo-TO
<i>Hylaeamys megacephalus</i>	Fsl-243, ♂	Fazenda Nsa. Sra. do Carmo, Monte do Carmo-TO

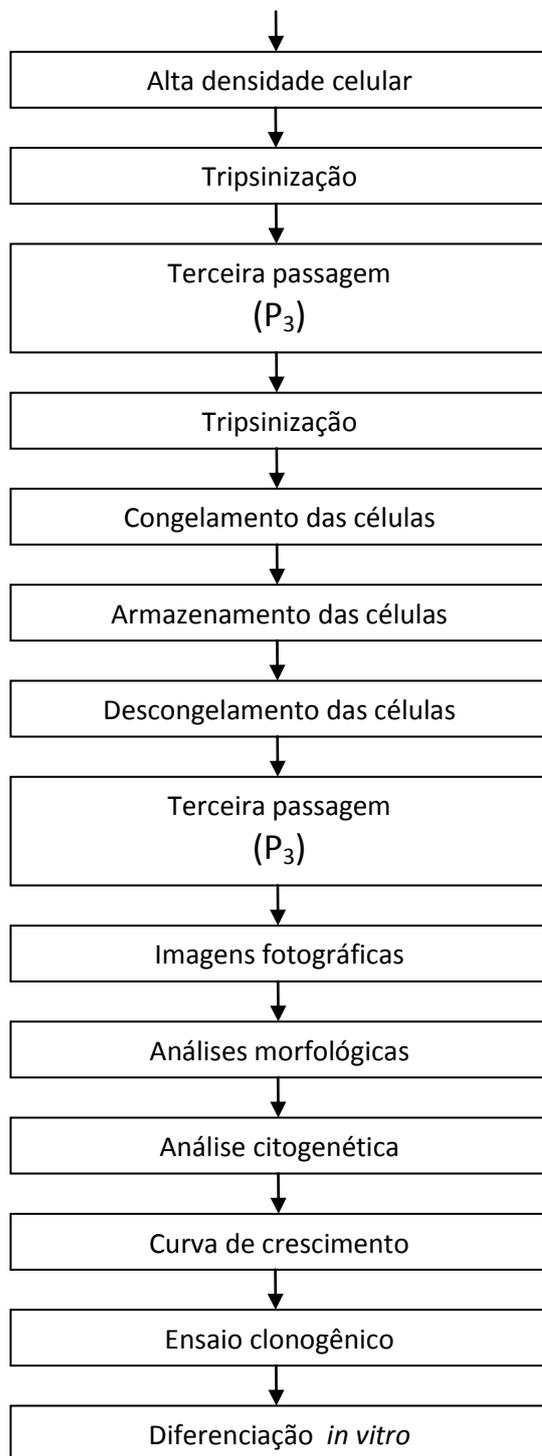
### 5.2 - MÉTODOS

Nos fluxogramas de trabalho 1 (p. 23) e 2 (p. 24), estão apresentados a sequência dos experimentos executados. Os detalhamentos dos métodos utilizados do fluxograma de trabalho 1 estão descritos nos itens 5.3 até 5.5. E os detalhamentos dos métodos utilizados do fluxograma de trabalho 2 estão descritos nos itens 5.5 até 5.13.3.

## Fluxograma de trabalho -1



## Fluxograma de trabalho - 2



### 5.3 - COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas amostras de tecido epitelial dos animais. Os procedimentos de coleta foram realizados por biólogos ou técnicos da instituição responsável pelos animais, conforme licença permanente número 13248-1 do IBAMA. Foi feita assepsia na orelha ou pele de animais de onde foi retirada a biópsia com três banhos sucessivos com algodão embebido em álcool iodado, posteriormente o local foi limpo com álcool 70% para a retirada do iodo, pois o mesmo é antimicrobiano. Com auxílio de bisturi e pinça estéreis, a biópsia foi colocada em tubo de centrifuga de 15 mL com meio enriquecido com (SBF) e antibióticos em concentração dobrada.

### 5.4 - TÉCNICA DE DISSOCIAÇÃO ENZIMÁTICA

O método descrito por Cole e Paul (1966) e Waymouth (1974) utilizava tripsina. O método de Freshney (1972); Lasfargues (1973); Chen et al. (1989); Kralovanszky et al. (1990) e Heald et al. (1991) utilizava colagenase para dissociar células. O método da colagenase com modificações foi utilizado na técnica de dissociação enzimática das células em nosso experimento para obtenção das culturas celulares.

Em um fluxo laminar a biópsia (pele ou orelha) foi transferida do frasco para uma placa de Petri de 4 cm de diâmetro, estéril. Em seguida foi acrescentado 2 mL de colagenase tipo I a 0,1%. A biópsia passou por uma dissociação mecânica onde foi fragmentada várias vezes com auxílio de bisturi e pinça estéreis, sendo produzidos fragmentos menores. Os fragmentos assim obtidos foram transportados juntamente com a enzima para um tubo de centrifuga de 15 mL (TPP) com auxílio de uma pipeta Pasteur estéril. Em seguida o material foi mantido em estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub> no ar para manutenção do pH onde permaneceu até a dissociação das células formando uma suspensão viscosa. O material foi centrifugado a uma força centrífuga relativa de 112 - FCR, durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e colocado 5 mL de meio completo DMEM (Gibco) suplementado com 20% de SBF e novamente ressuspensionado o material. Em seguida o material foi transferido para um frasco de cultura com área de 25 cm<sup>2</sup> (TPP - "Techno Plastic Products", Trasadingen, Switzerland) e retornou a estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub> no ar para manutenção do pH para ocorrer proliferação das células. Após 24 horas o frasco foi observado ao microscópio invertido para serem avaliados os seguintes fatores:

aderência das células no frasco de cultura, crescimento celular, necrose ou contaminação. Houve observações diárias para acompanhar a multiplicação celular pelo preenchimento de espaços vazios no frasco (monocamada) e capacidade de formação de colônias, através da observação individualizada de uma célula e sua multiplicação por consecutivas mitoses. A observação de colônias foi feita pela marcação de uma região do frasco de cultivo com caneta hidrográfica, acompanhando um agrupamento celular originado de uma única célula, quando as células cresceram em amontoados. O material passou por tripsinização (WAYMOUTH, 1974), cujo objetivo é desprender as células que estavam aderidas à parede inferior de crescimento do frasco de cultivo. A técnica consiste na utilização de uma enzima tripsina (Tryple Express 1x - Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY), a qual lisa o citoesqueleto celular que fornece sustentação às células para se aderirem à parede do frasco. A manutenção do cultivo, que compreende a troca do meio DMEM (Gibco) foi realizada a cada três dias. A tripsinização também foi utilizada para a repicagem da cultura e congelamento para montagem do banco de células.

#### 5.5 - REPIQUE DAS CELULAS OU PASSAGEM CELULAR

Após atingirem 80-85% de confluência, as células foram tripsinizadas e expandidas para mais frascos de cultura segundo método descrito por Waymouth (1974) com modificações, sendo este procedimento denominado de repique celular ou passagem celular.

Foi desprezado o meio de cultura do frasco e as células foram lavadas duas vezes com Hank's, sendo posteriormente adicionada tripsina (Tryple Express) e incubado durante 5 minutos na estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub>. O frasco foi agitado vigorosamente para as células se soltarem da superfície onde estavam aderidas. Foi adicionado meio DMEM suplementado com 20% de (SBF) para bloquear a ação da tripsina. Observou-se no microscópio invertido para se certificar de que as células se desprenderam. As células foram transferidas para novos frascos de cultura e retornaram à estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub> para ocorrer proliferação das células.

## 5.6 - CONGELAMENTO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Amostras de  $1 \times 10^6$  células de culturas *in vitro* de roedores foram congeladas para a realização de experimentos futuros. As células passaram por um procedimento da dissociação através da tripsina, desprendendo as células do frasco, em seguida foi feito o congelamento das mesmas em um meio que continha 90% de SBF (GIBCO) e 10% de DMSO (Dimetil Sulfoxido, Sigma, St. Louis, U.S.A) (LOVELOCK & BISHOP, 1959; MERYMAN, 2007) gelados previamente para permanecer em baixa temperatura antes do congelamento. Os tubos criogênicos foram identificados com os dados: tipo de célula, passagem e data. Foi feito um congelamento progressivo, colocando os tubos em Nalgene® Mr. Frosty™ Cryo 1° C Freezing container, -1° C/min. Rate of cooling (LEIBO & MAZUR, 1971; HARRIS & GRIFFITHS, 1977) (Figura 7) e guardados em ‘Deep Freezing’ -80° C. Os tubos criogênicos permaneciam pelo menos três horas nessa etapa de congelamento. Após esse período foram transferidos para o container de nitrogênio líquido a -196° C onde permaneceram armazenados.

## 5.7 - ARMAZENAMENTO DAS CÉLULAS CONGELADAS

As células foram armazenadas em container de nitrogênio líquido na temperatura de -196° C (GREEN et al., 1967; DONNENBERG et al., 2002; BROXMEYER et al., 2003). A posição de armazenamento das ampolas congeladas foi anotada em protocolo de controle de amostras congeladas, para facilitar a sua localização.

## 5.8 - DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS

Foi preparado meio DMEM (Gibco) mantido a 37° C, enriquecido com 20% de SBF. Os tubos criogênicos foram retirados do reservatório de nitrogênio líquido e aquecidos imediatamente em banho-maria a 37° C. O material criogênico foi transferido para um tubo de centrifuga contendo o meio já aquecido. O material foi centrifugado a uma força centrífuga relativa de 112 - FCR, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado 5 mL de meio DMEM (Gibco) enriquecido com 20% de SBF e distribuído em um frasco de cultura para propagação da cultura (ROLLIG et al., 2002).

### 5.9 - ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

Após o isolamento, cultivo e expansão celular das CTA, o processo de análise morfológica foi iniciado. Imagens fotográficas do desenvolvimento das células em cultura foram feitas utilizando-se um microscópio invertido Zeiss Axiovert 200 com objetiva de aumento de 10 vezes.

### 5.10 - ANÁLISE CITOGENÉTICA PÓS- DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS EM CULTURA

As preparações cromossômicas foram obtidas com células em P-3 na fase exponencial de crescimento, tratadas com 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Kariomax diluídas na proporção 1:10 em solução salina tamponada (PBS) e mantidas em frascos de cultura em estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5%  $\text{CO}_2$  por uma hora. Após este período, as células foram transferidas dos frascos de cultura para tubos de centrifuga (TTP) de 15 mL e tratadas com solução hipotônica 0,075M de KCl por 10 minutos e então fixadas com fixador Carnoy 4:1 (4 partes de Metanol (Merck) - 1 parte de Ácido acético (Merck)). Na preparação citológica das lâminas foi utilizada micropipeta para pingar 10  $\mu\text{L}$  da suspensão celular em lâmina previamente lavada e seca. Para a análise convencional das lâminas ao microscópio, o material fixado foi corado com o corante Eosina Azul de Metileno, segundo Giemsa (Merck). Para cada lâmina foi utilizado 0,4 mL do corante diluído em 3 mL de tampão fosfato pH 6,8 durante 10 minutos. Passado este tempo, as lâminas foram lavadas com água destilada e secas a temperatura ambiente.

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana de 2005 (ISCN, 2005). A análise dos cromossomos foi realizada através de coloração convencional com GIEMSA e as imagens foram capturadas no microscópio Olympus BX40, câmera Imagelink, programa - Cytoview.

### 5.11 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR: CURVA DE CRESCIMENTO

Com a finalidade de avaliar a capacidade de expansão e replicação celular *in vitro* das CTA isoladas a partir do tecido epitelial foi realizada a curva de crescimento (NIH, 2008).

### **5.11.1 - Contagem das células, análise da viabilidade celular e número de células semeadas em placa**

A contagem das células foi realizada com o objetivo de calcular a viabilidade celular e o número de células semeadas em placa para fazer a curva de crescimento.

Após a tripsinização as células foram contadas pelo método de Azul de Tripán 0,4% e foi preparada uma suspensão contendo células para cada amostra em estudo.

Foram semeadas 100.000 células viáveis em triplicata na passagem P3 em placas de poliestireno estéreis, descartáveis (TPP - “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland), com área de crescimento de 9,6 cm<sup>2</sup> de diâmetro e as mesmas foram avaliadas diariamente em um período de 6 dias (NIH, 2008).

### **5.11.2 - Método Azul de Tripán 0,4% (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)**

O Azul de Tripán (Gibco) é um “corante vital” que atravessa a membrana de células mortas, mas não de células vivas, por este motivo é bastante utilizado para a avaliação da viabilidade celular. Este teste baseia-se no fato de que nas células viáveis a membrana celular íntegra impede a entrada do corante Azul de Tripán. Nas células mortas o corante penetra através da membrana celular, conferindo-lhes uma coloração azul escura.

A diluição da amostra de células com o Azul de Tripán 0,4% foi preparada na proporção de 1:1, (50 microlitros do concentrado de células-tronco e 50 microlitros de Azul de Tripán). Este preparado foi colocado na câmara de Neubauer (hemocitometro), preenchendo-a completamente e deixando-a em repouso por 5 minutos em câmara úmida. O número de células nucleadas foi contado nos quatro quadrantes laterais, separando-se a contagem em um grupo de células viáveis e outro de células morta.

O cálculo do número de células, viabilidade celular e número de células semeadas em placa foram realizados de acordo com as seguintes fórmulas.

$$\text{N}^\circ \text{ de células por mL} = (\text{N}^\circ \text{ de células viáveis} / 4) \times \text{Fator de diluição (2)} \times 10^4.$$

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{N}^\circ \text{ de células viáveis} \times 100 / \text{Total de células (células viáveis} + \text{células mortas)}.$$

**N° de células por mL** ----- **Volume de meio ressuspendido (1000 µL)**  
**N° de células desejadas (100.000)** ----- **X**

### 5.12 - ENSAIO CLONOGÊNICO

Para avaliar a capacidade de formar colônia nas culturas de CTAs a partir de tecido epitelial dos roedores, realizamos o ensaio de CFU-F (Unidades formadoras de colônia semelhantes a fibroblastos) (FRIEDENSTEIN et al., 1976).

Foram semeadas  $10^3$  células em frascos de cultura com área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup> (TPP - “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland).

Os frascos de cultura foram mantidos em estufa umidificada a 37° C e atmosfera gasosa com 5% de CO<sub>2</sub> por 10 dias em cultivo. O meio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) foi trocado a cada 3 dias. O meio de cultura foi retirado dos frascos e estes foram lavados duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% e coradas com solução de cristal violeta 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A) diluída em Metanol (Merck, Darmstadt, Germany), durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas em posição invertida sobre papel toalha até a secagem completa (protocolo adaptado de NARDI & MEIRELLES, 2006).

### 5.13 - DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DAS CÉLULAS -TRONCO ADULTAS

As culturas de células dos roedores em estudo após cultivo e expansão *in vitro* foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em três linhagens da mesoderme: osteogênica, condrogênica e adipogênica baseado no protocolo adaptado de Nardi & Meirelles (2006).

Foram semeadas 42.000 células entre P3 e P4 em duplicata nas placas de poliestireno estéreis, descartáveis (TPP - “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland) com área de crescimento de 2 cm<sup>2</sup> de diâmetro.

Após 24 horas foi retirado o meio DMEM e adicionado meio com ou sem indutores. O meio foi trocado a cada três dias e as células foram fotografadas e analisadas para alterações morfológicas.

### **5.13.1 - Diferenciação osteogênica**

O meio para a diferenciação osteogênica foi composto de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  Dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$   $\beta$ -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  AsAP 1000x (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluídos em DMEM contendo 10% SBF. O meio foi trocado a cada três dias durante um período de 21 dias. As células controle foram mantidas durante o mesmo período com meio DMEM suplementado com 10% de SBF.

Após o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído por 20 minutos, em seguida foi removido o paraformaldeído e lavadas novamente com água destilada. As células foram coradas durante 5 minutos com “Alizarin Red S” com pH 4,1 em temperatura ambiente. Após este período o corante foi removido e as células foram lavadas várias vezes com água destilada para posteriormente serem observadas em microscópio invertido. O fundamento deste teste baseia-se no fato de que as células (osteócitos) secretam uma matriz extracelular rica em cálcio, que pode ser corada com Alizarin Red S. O acúmulo de cálcio nestas células deixa as mesmas com coloração vermelha o que caracteriza a diferenciação osteogênica.

### **5.13.2 - Diferenciação condrogênica**

O meio para a diferenciação condrogênica foi composto de 2,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 0,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de AsAP 100x (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluídos em DMEM contendo 10% SBF. O meio foi trocado a cada três dias durante um período de 21 dias. As células controle foram mantidas durante o mesmo período com meio DMEM suplementado com 10% de SBF.

Após o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído por 20 minutos, em seguida foi removido o paraformaldeído e lavadas novamente com água destilada. As células foram coradas durante 5 minutos com “Alcian Blue” com pH 2,5 em temperatura ambiente. Após esse período o corante foi removido e as células foram lavadas várias vezes com água destilada para em seguida serem observadas em microscópio invertido. As células (condrócitos) secretam glicosaminoglicanos sulfatados, potente indutor de condrogênese induzindo a formação de

matriz extracelular constituinte da cartilagem que podem ser corados com Alcian Blue deixando as células com coloração azul o que caracteriza a diferenciação condrogênica.

### **5.13.3 - Diferenciação adipogênica**

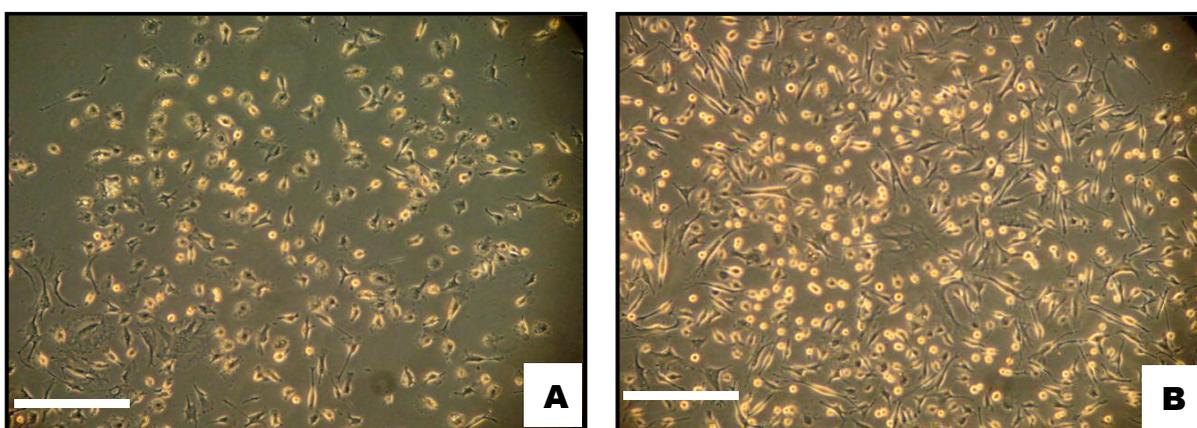
O meio para a diferenciação adipogênica foi composto de 0,7  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Rosiglitazona (GlaxoSmithKline, London), 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de Dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diluídos em DMEM contendo 10% SBF. O meio foi trocado a cada três dias durante um período de 10 a 15 dias. As células controle foram mantidas durante o mesmo período com meio DMEM suplementado com 10% de SBF.

Após o período de diferenciação as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído por 1 hora, em seguida foi removido o paraformaldeído e lavadas novamente com água destilada. As células foram coradas durante 5 minutos com “Oil Red O” em temperatura ambiente. Após esse período o corante foi removido e as células foram lavadas várias vezes com água destilada para em seguida serem observadas em microscópio invertido. O fundamento deste teste baseia-se no fato de que as células (adipócitos) apresentam vesículas lipídicas no citoplasma e que são corados pelo Oil Red O deixando as células com coloração vermelha caracterizando a diferenciação adipogênica.

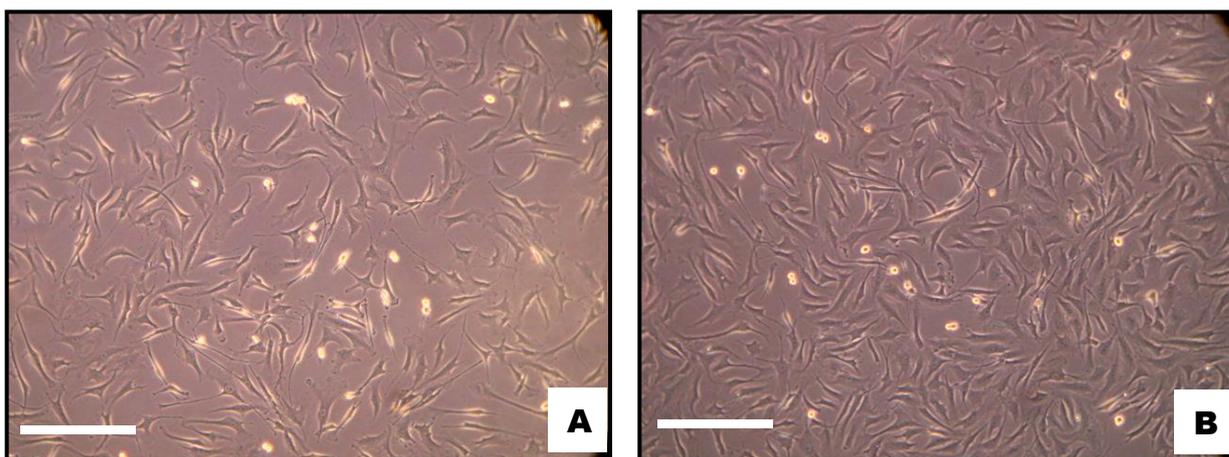
## 6 - RESULTADOS

### 6.1 - ANÁLISE MORFOLÓGICA MICROSCÓPICA

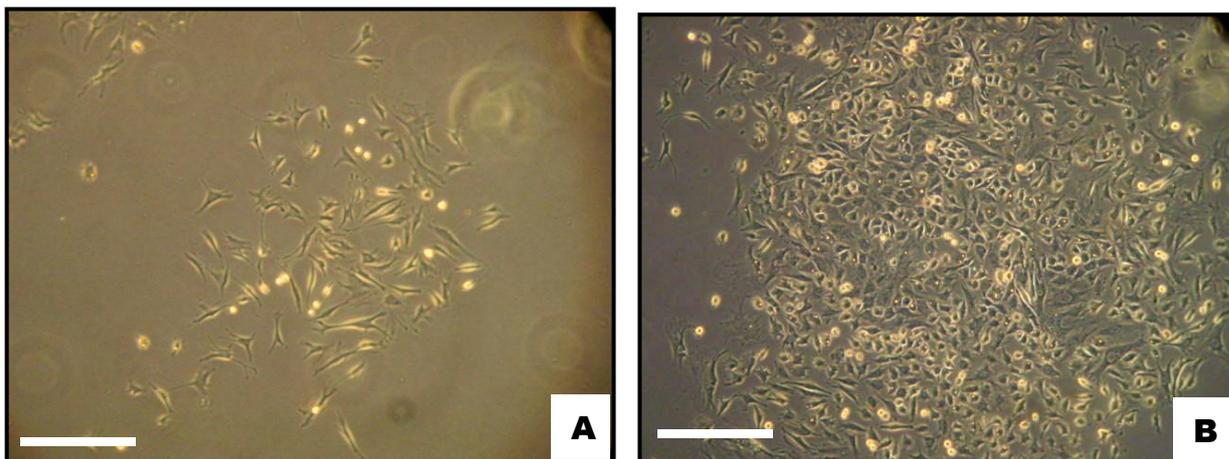
A descrição morfológica das células *in vitro* obtidas do tecido epitelial dos roedores apresentaram células com morfologia semelhante a fibroblastos com aspecto fusiforme, formando vários prolongamentos da membrana. Foi possível observar também as células em mitose, que são as refringentes, além de diferenças nos agrupamentos celulares nas figuras (9, 10, 11, 12 e 13).



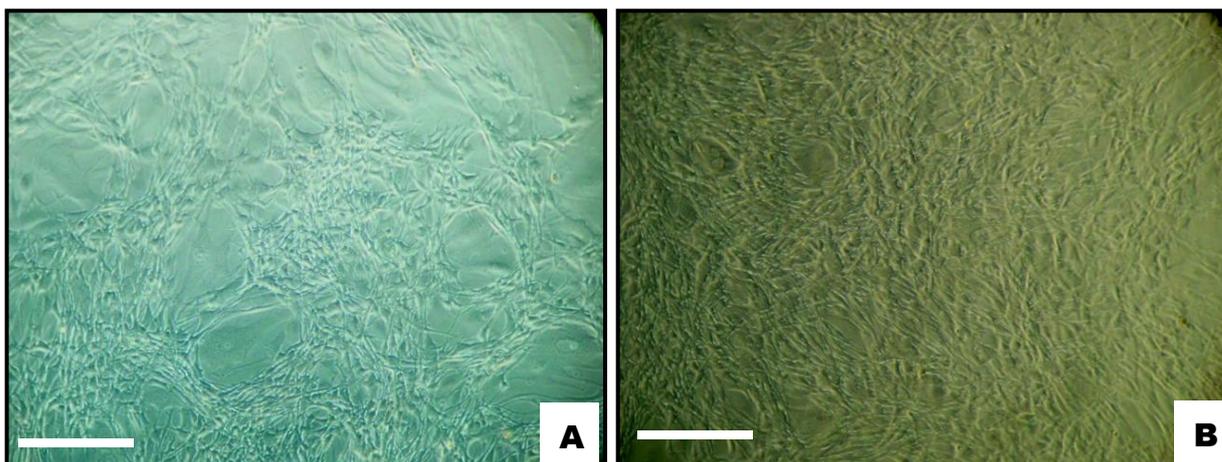
**Figura 9.** Células isoladas do tecido epitelial de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 60% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



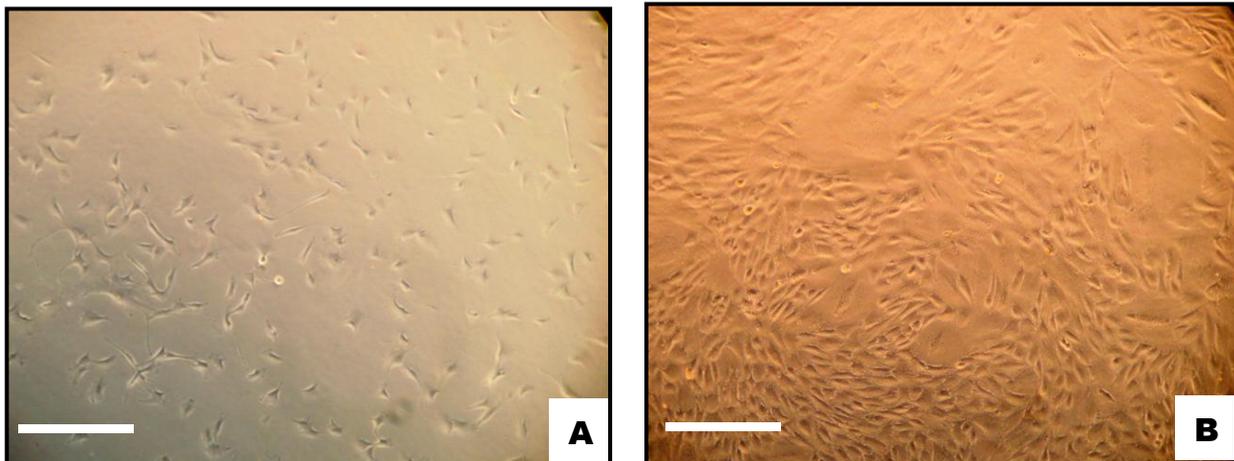
**Figura 10.** Células isoladas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 70% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



**Figura 11.** Células isoladas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 60% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



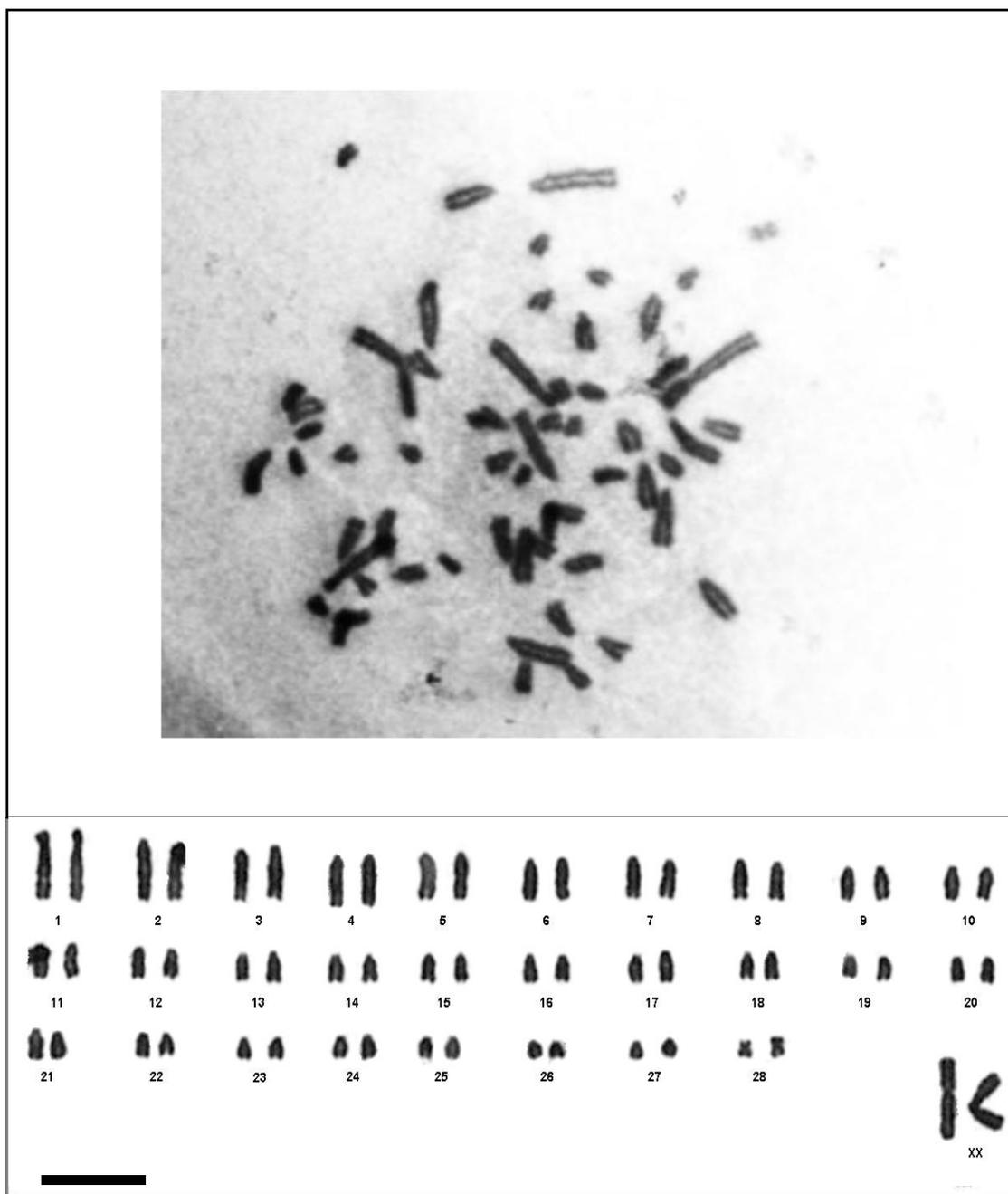
**Figura 12.** Células isoladas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl - 250, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 90% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



**Figura 13.** Células isoladas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). A - 4 dias de cultivo, B - 7 dias de cultivo com 70% de confluência. Aumento de 10x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.

## 6.2 - ANÁLISE DO PERFIL CITOGENÉTICO

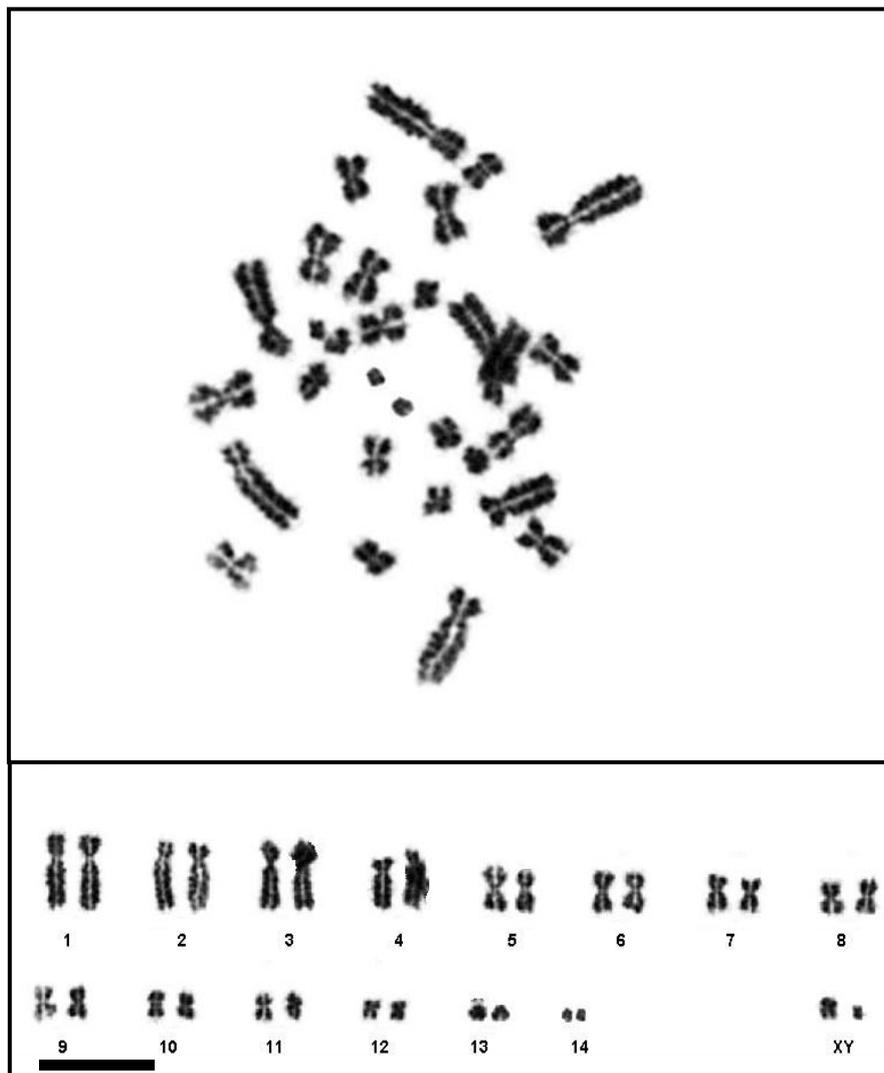
A fim de avaliar se as células das culturas dos roedores cultivadas em meio DMEM na terceira passagem induziram alguma alteração cromossômica, foi monitorada a estabilidade citogenética e as mesmas apresentaram um cariótipo sem alterações conforme as figuras (14, 15, 16, 17 e 18).



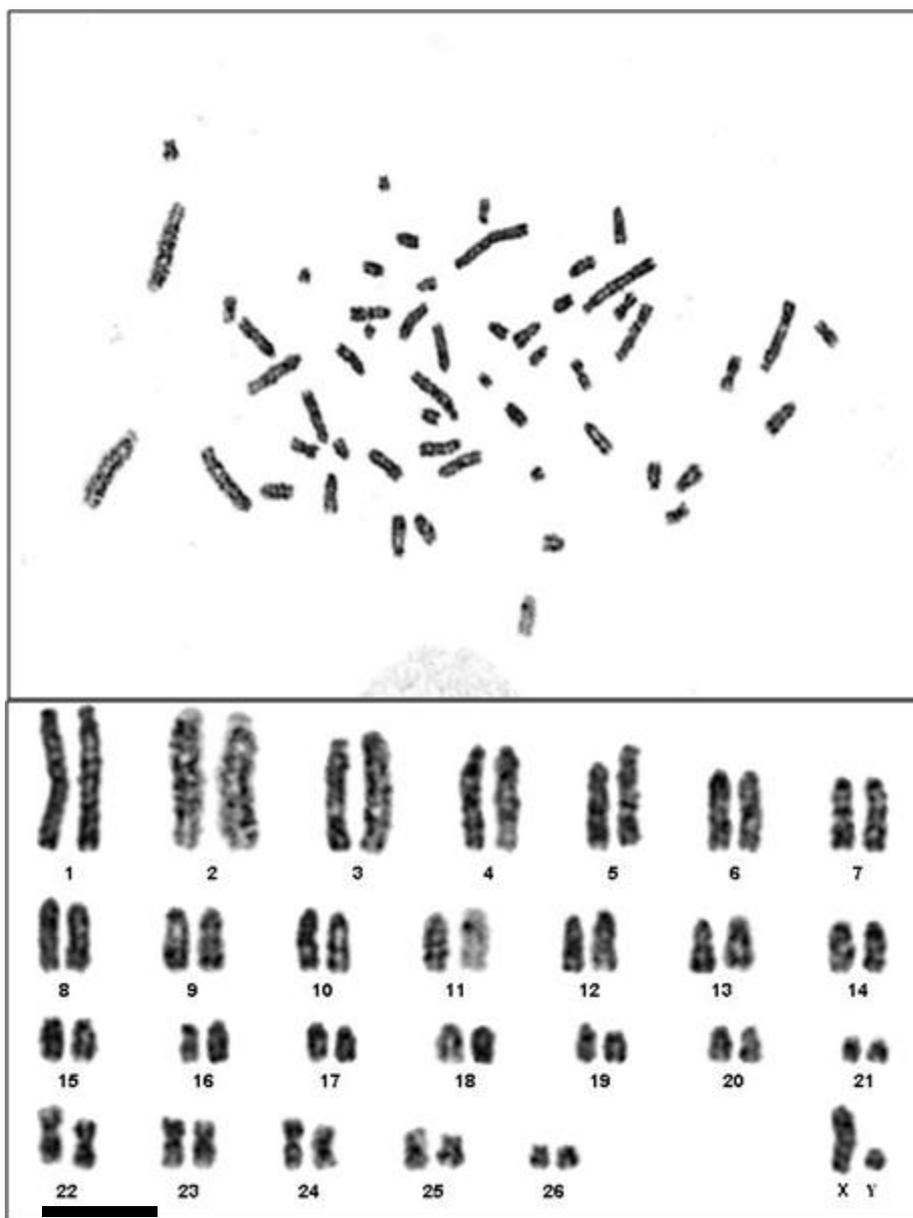
**Figura 14.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀) apresenta número diplóide com ( $2n=58$ ) cromossomos. Corados por Giemsa. Barra = 10 um.



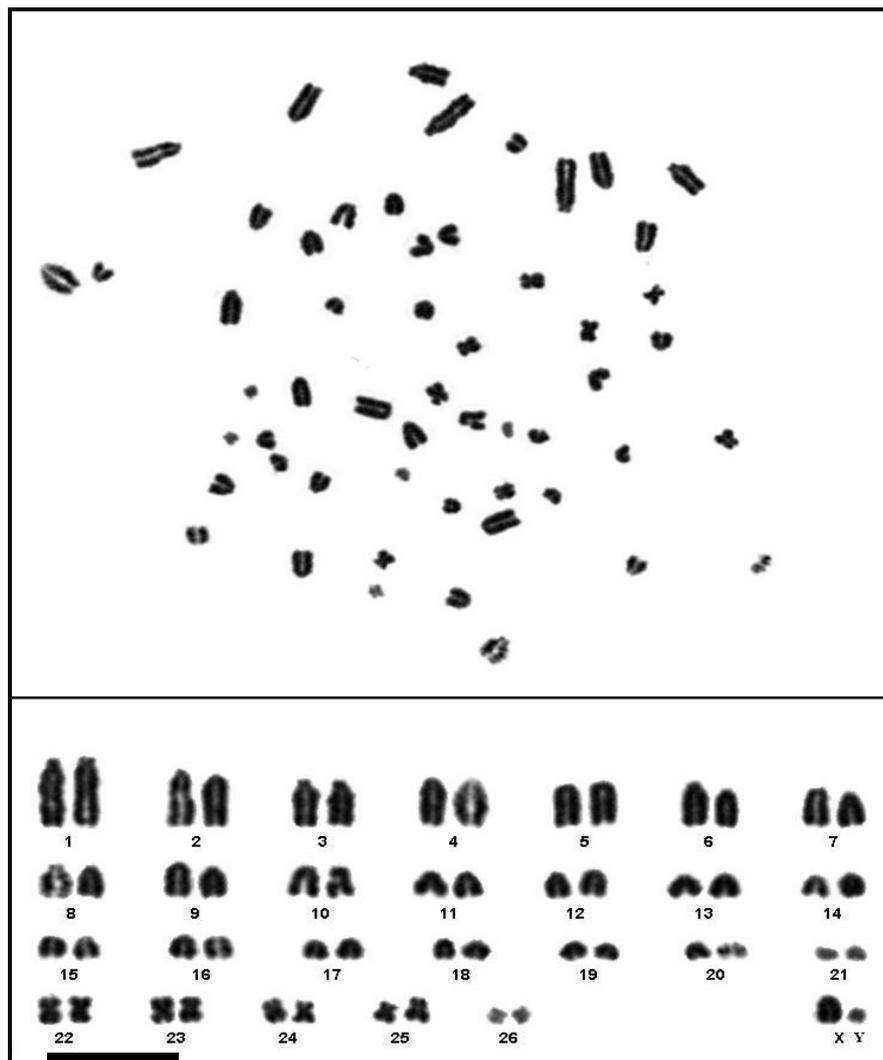
**Figura 15.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂) apresenta número normal de cromossomos ( $2n=30$ ). Corados por Giemsa. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 16.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂) apresenta número normal de cromossomos ( $2n=30$ ). Corados por Giemsa. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 17.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂) apresenta número normal de cromossomos ( $2n=54$ ). Corados por Giemsa. Barra = 10 um.



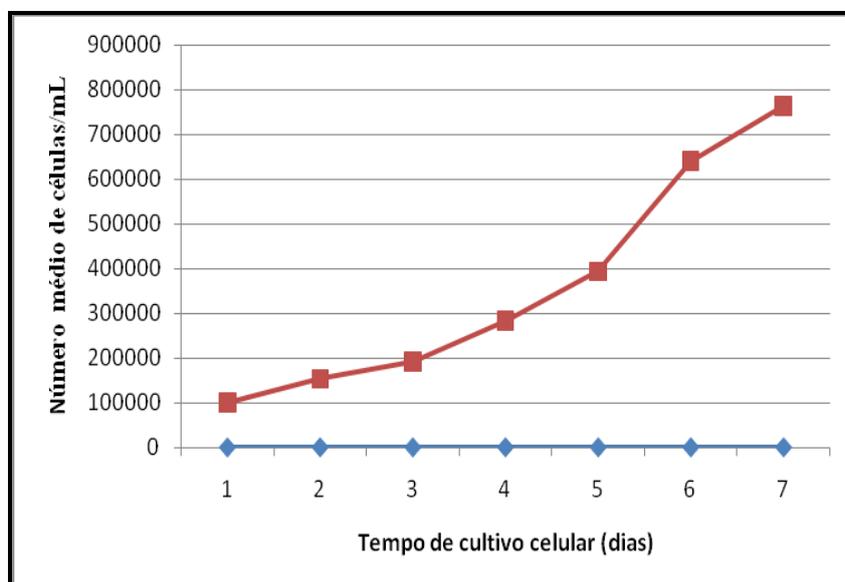
**Figura 18.** A análise cariotípica mostra que a espécie *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂) apresenta número normal de cromossomos ( $2n=54$ ). Corados por Giemsa. Barra = 10 um.

### 6.3 - CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR

No estudo realizado com as células de cultivo obtidas das amostras de roedores na terceira passagem, observou-se padrão de crescimento das células. Os resultados da contagem diária das células estão apresentados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e a análise da cinética de crescimento celular pela observação da curva descrita nos gráficos das figuras (19, 20, 21, 22, 23 e 24).

**Tabela 2.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Oecomys concolor* (SMA-07, ♀), na terceira passagem.

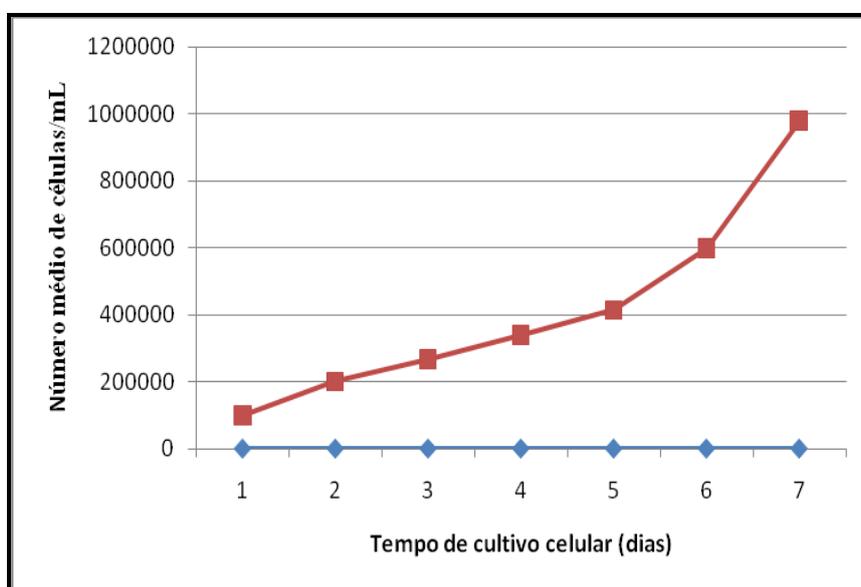
TEMPO (DIAS)	PLACAS (POÇOS)	Nº MÉDIO DE CÉLULAS/mL
1	1, 2 e 3	153.333
2	4, 5 e 6	191.333
3	7, 8 e 9	284.000
4	10, 11 e 12	393.466
5	13, 14 e 15	640.000
6	16, 17 e 18	763.333



**Figura 19.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Oecomys concolor* (SMA-07, ♀), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL.

**Tabela 3.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (SMA-09, ♂), na terceira passagem.

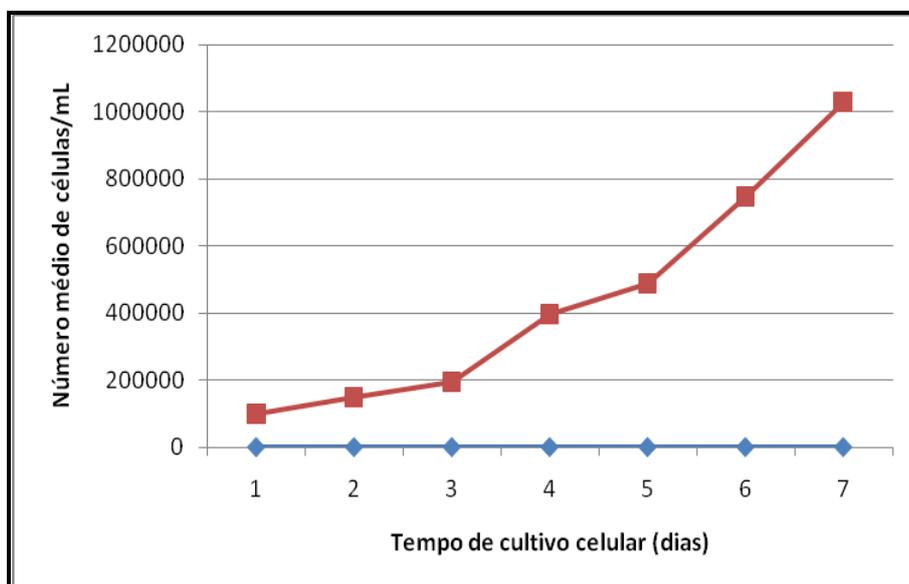
TEMPO (DIAS)	PLACAS (POÇOS)	Nº MÉDIO DE CÉLULAS/mL
1	1, 2 e 3	201.333
2	4, 5 e 6	268.000
3	7, 8 e 9	340.666
4	10, 11 e 12	414.666
5	13, 14 e 15	599.666
6	16, 17 e 18	980.000



**Figura 20.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (SMA-09, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL.

**Tabela 4.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂), na terceira passagem.

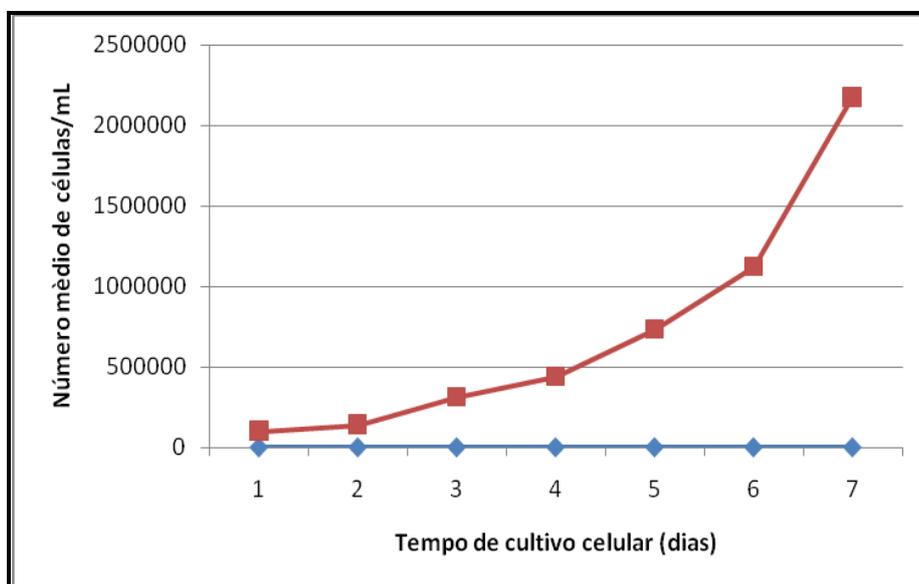
TEMPO (DIAS)	PLACAS (POÇOS)	Nº MÉDIO DE CÉLULAS/mL
1	1, 2 e 3	150.000
2	4, 5 e 6	196.666
3	7, 8 e 9	396.666
4	10, 11 e 12	490.000
5	13, 14 e 15	746.666
6	16, 17 e 18	1.030.000



**Figura 21.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL.

**Tabela 5.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-250, ♂), na terceira passagem.

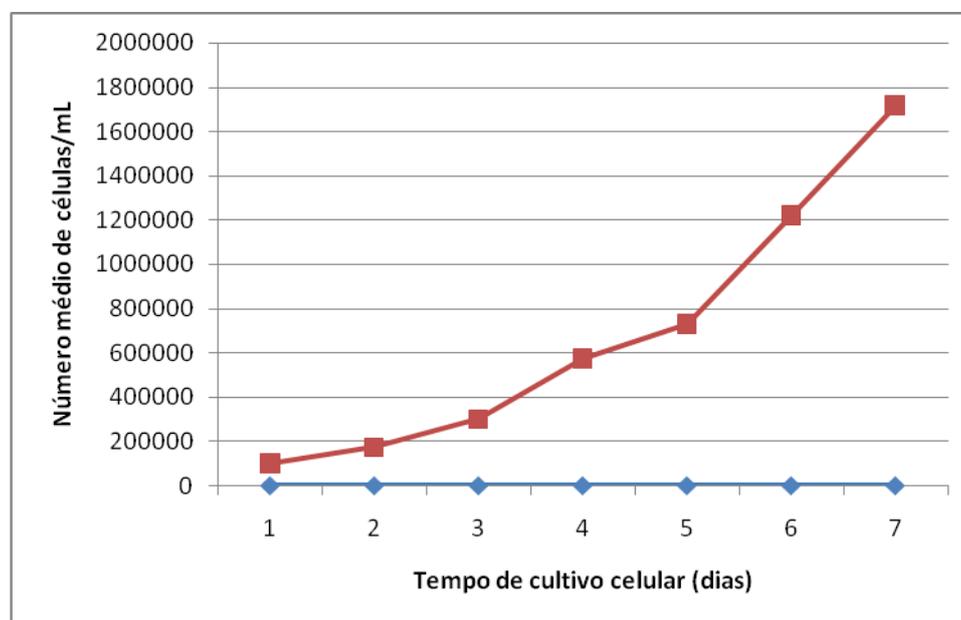
TEMPO (DIAS)	PLACAS (POÇOS)	N° MÉDIO DE CÉLULAS/mL
1	1, 2 e 3	140.000
2	4, 5 e 6	313.333
3	7, 8 e 9	440.000
4	10, 11 e 12	733.333
5	13, 14 e 15	1.123.333
6	16, 17 e 18	2.180.000



**Figura 22.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-250, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL.

**Tabela 6.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-243, ♂), na terceira passagem.

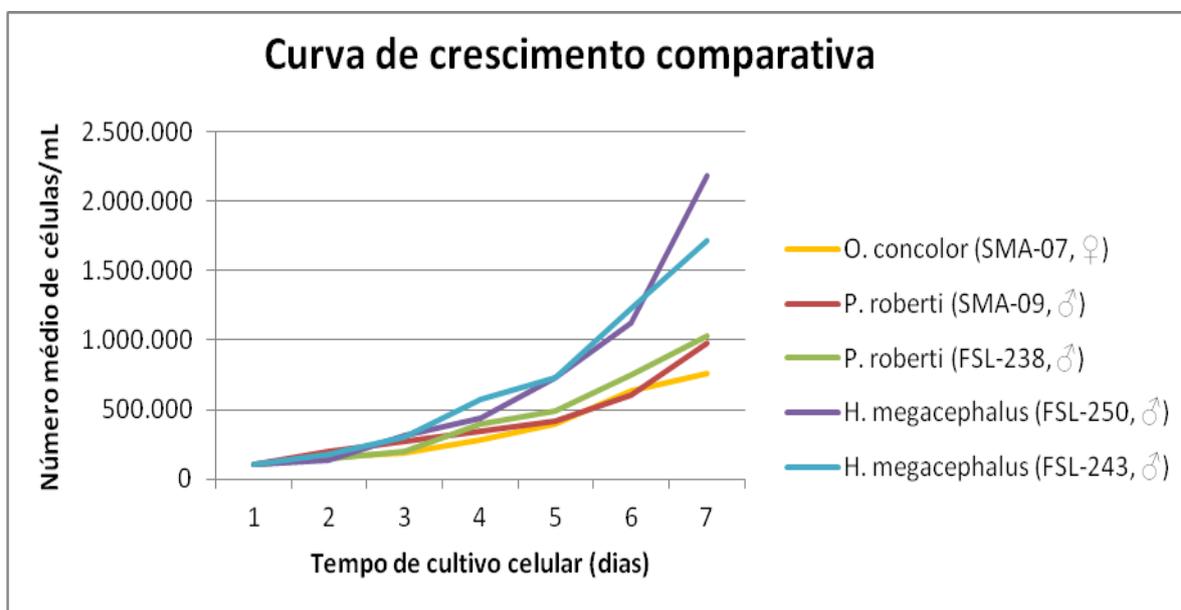
TEMPO (DIAS)	PLACAS (POÇOS)	Nº MÉDIO DE CÉLULAS/mL
1	1, 2 e 3	173.333
2	4, 5 e 6	300.000
3	7, 8 e 9	573.333
4	10, 11 e 12	730.000
5	13, 14 e 15	1.223.333
6	16, 17 e 18	1.720.000



**Figura 23.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-243, ♂), na terceira passagem. Em azul tempo em dias, em vermelho número de células por mL.

**Tabela 7.** Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial dos cinco espécimes em estudo na terceira passagem.

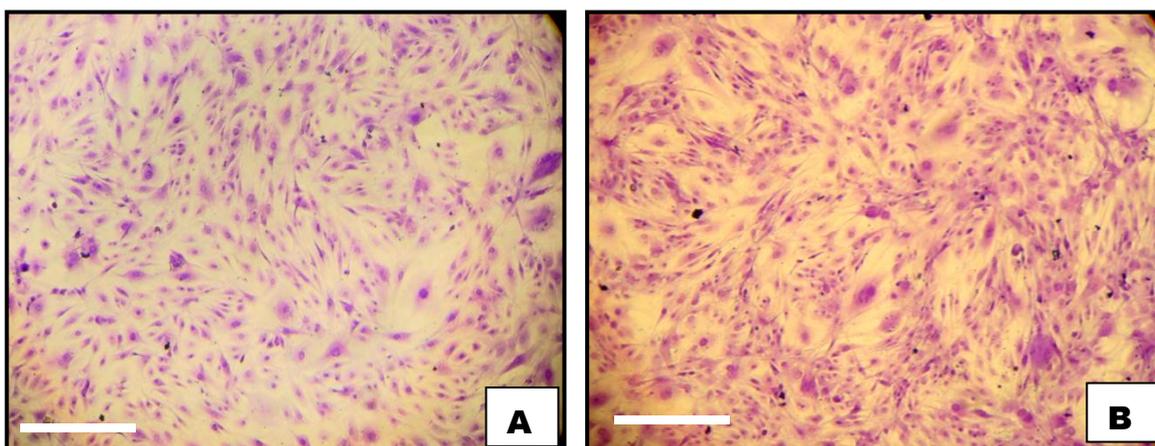
<b>Espécies</b> <b>Tempo em dias</b>	<i>O. concolor</i> (SMA-07, ♀)	<i>P. roberti</i> (SMA-09, ♂)	<i>P. roberti</i> (FSL-238, ♂)	<i>H. megacephalus</i> (FSL-250, ♂)	<i>H. megacephalus</i> (FSL-243, ♂)
1	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
2	153.333	201.333	150.000	140.000	173.333
3	191.333	268.000	196.666	313.333	300.000
4	284.000	340.666	396.666	440.000	573.333
5	393.466	414.666	490.000	733.333	730.000
6	640.000	599.666	746.666	1.123.333	1.223.333
7	763.333	980.000	1.030.000	2.180.000	1.720.000



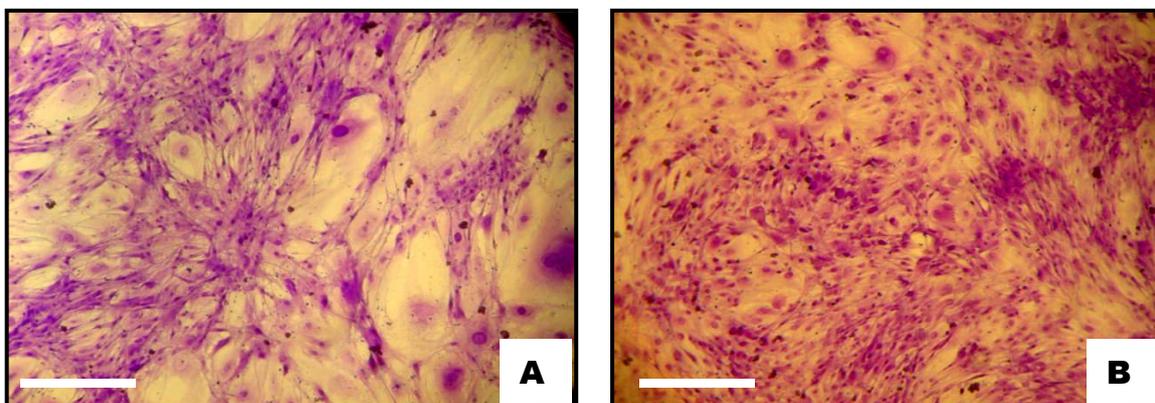
**Figura 24.** Curva de crescimento das células-tronco adultas do tecido epitelial dos cinco espécimes em estudo na terceira passagem.

#### 6.4 - ENSAIO CLONOGÊNICO

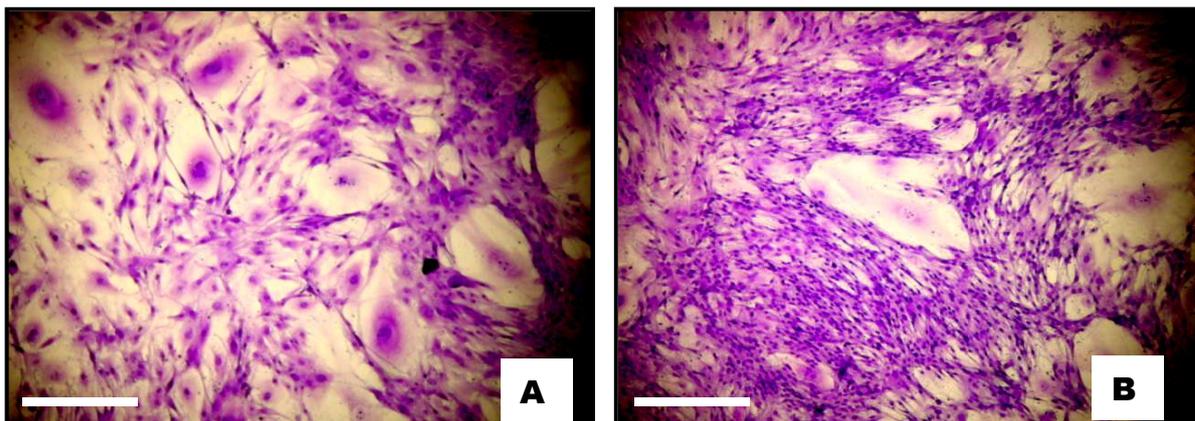
Foi observada a formação de colônias com alta densidade celular com morfologia fibroblastóide em todas as amostras na terceira passagem, obtidas a partir de  $10^3$  células em placas de cultivo com área de crescimento de  $9,6 \text{ cm}^2$  de diâmetro e coradas com Cristal Violeta (Figuras 25, 26, 27, 28 e 29).



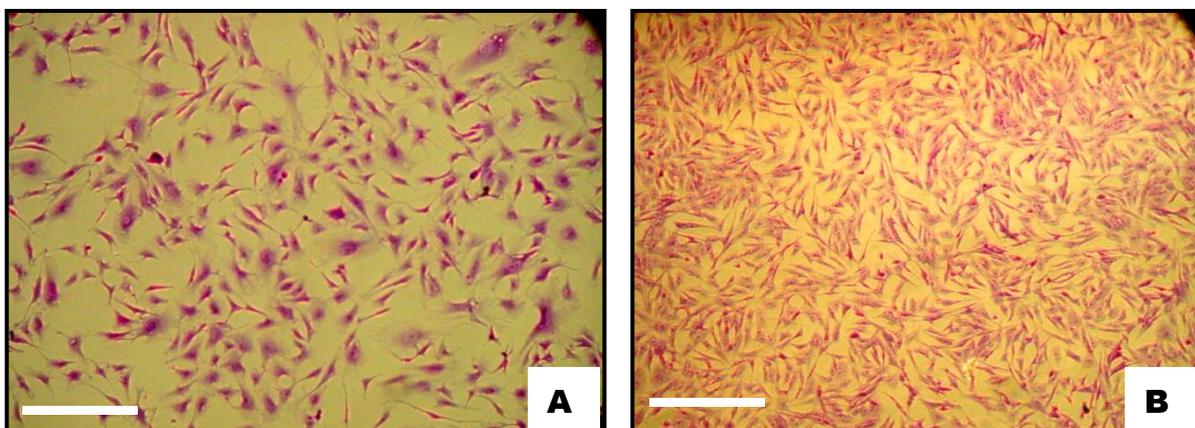
**Figura 25.** Ensaio de CFU-F de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100  $\mu\text{m}$ .



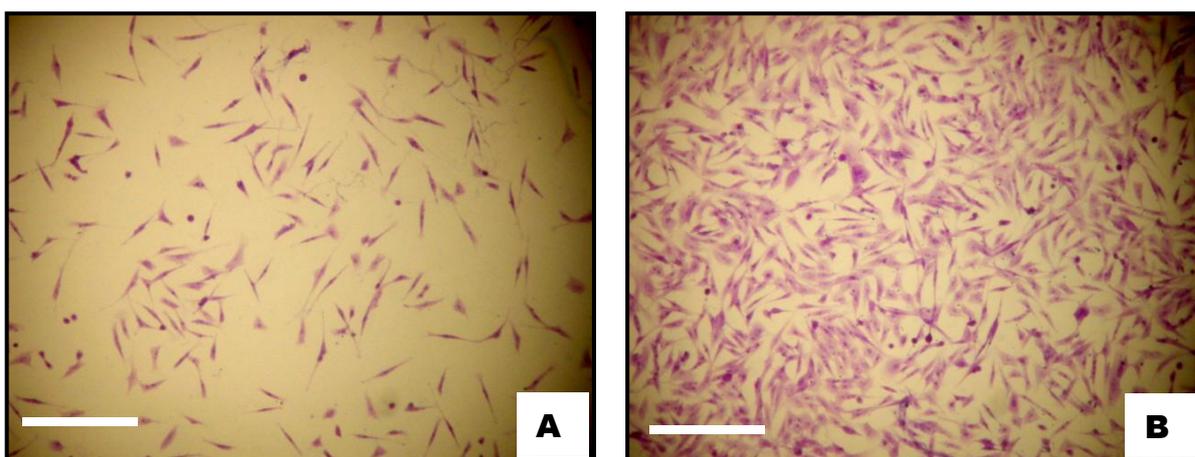
**Figura 26.** Ensaio de CFU-F de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 27.** Ensaio de CFU-F de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



**Figura 28.** Ensaio de CFU-F de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-250, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.



**Figura 29.** Ensaio de CFU-F de *Hylaeamys megacephalus* (FSL-243, ♂). Em A, colônias com baixa densidade celular. Em B, colônias com alta densidade celular após 10 dias de cultivo. Aumento de 100x. Barra A e B = 100  $\mu$ m.

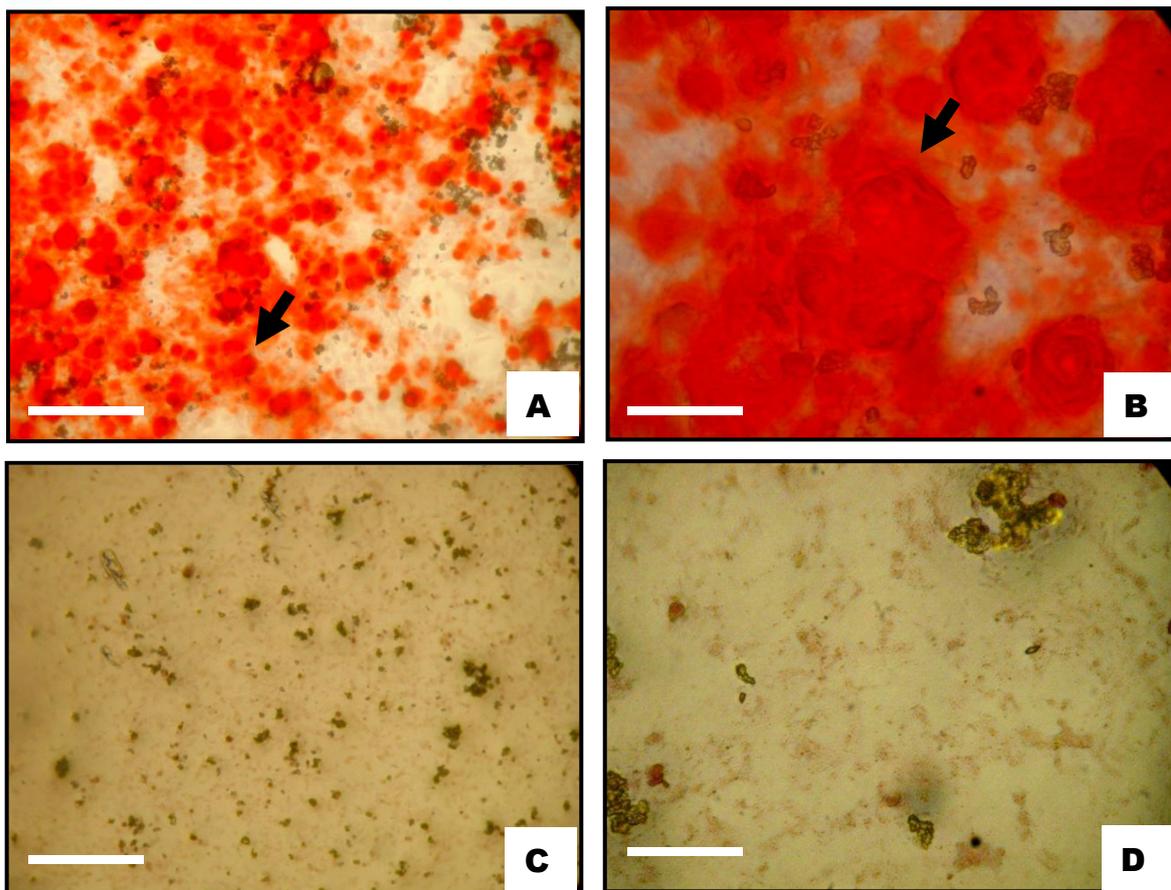
## 6.5 - DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTA

Com a metodologia empregada, e as concentrações de substâncias utilizadas em nossos testes as células isoladas das culturas de roedores na terceira passagem foram capazes de se diferenciarem em células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, em cultura com meios de cultivos específicos.

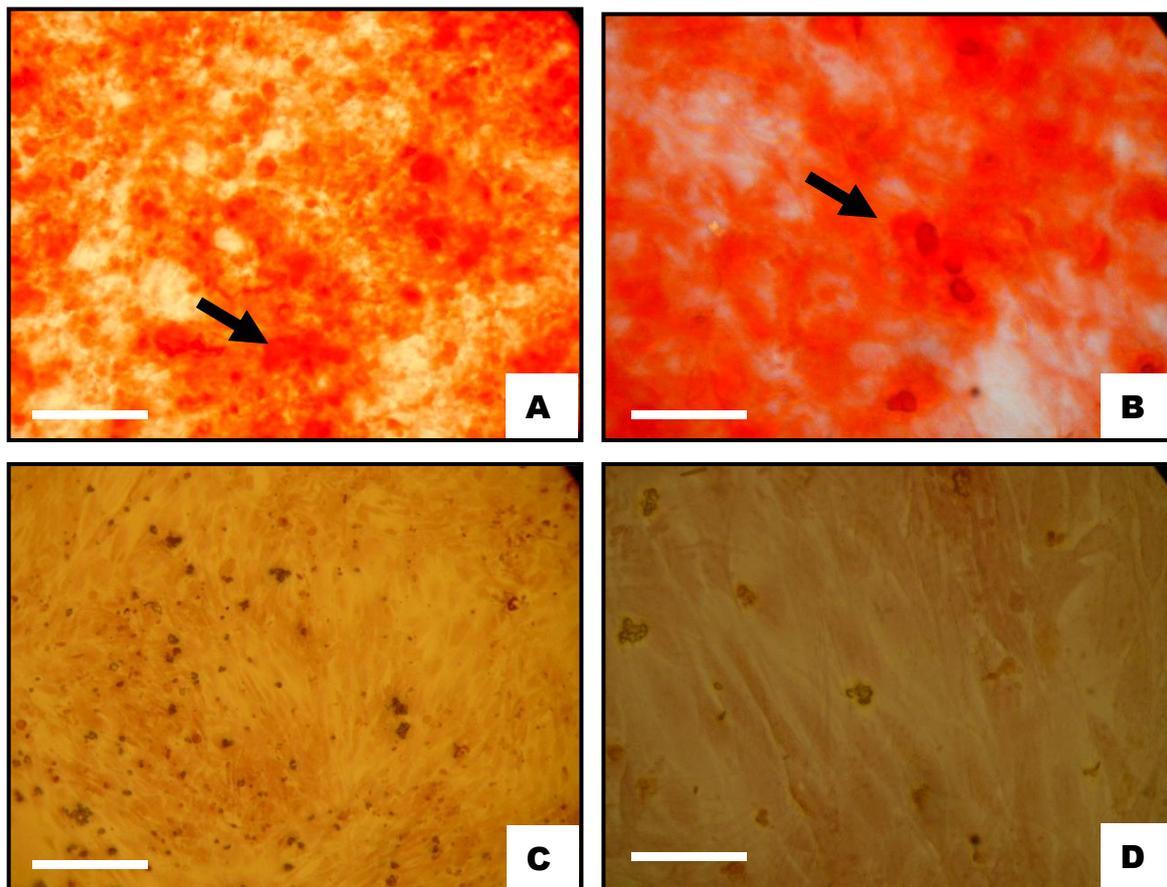
As células plaqueadas para diferenciação osteogênica foram mantidas por 21 dias em meio de indução específico, após este período foi observado depósitos de matriz extracelular. As células foram coradas com o corante “Alizarin Red S” para detecção desses depósitos. Foi possível observar diferenciação nas cinco amostras induzidas à diferenciação (Figuras 30, 31, 32, 33 e 34). Nas amostras controle não foi observada a presença de depósitos de matriz extracelular.

A diferenciação condrogênica também foi mantida por 21 dias em meio de diferenciação e foi observado a formação de mucopolissacarídeos da matriz intracelular (glicosaminoglicanos sulfatados) nas cinco amostras induzidas a diferenciação (Figuras 35, 36, 37, 38 e 39). As células foram coradas com o corante “Alcian Blue” para detecção desses depósitos. Não foi observado formação de mucopolissacarídeos da matriz intracelular nas amostras controle.

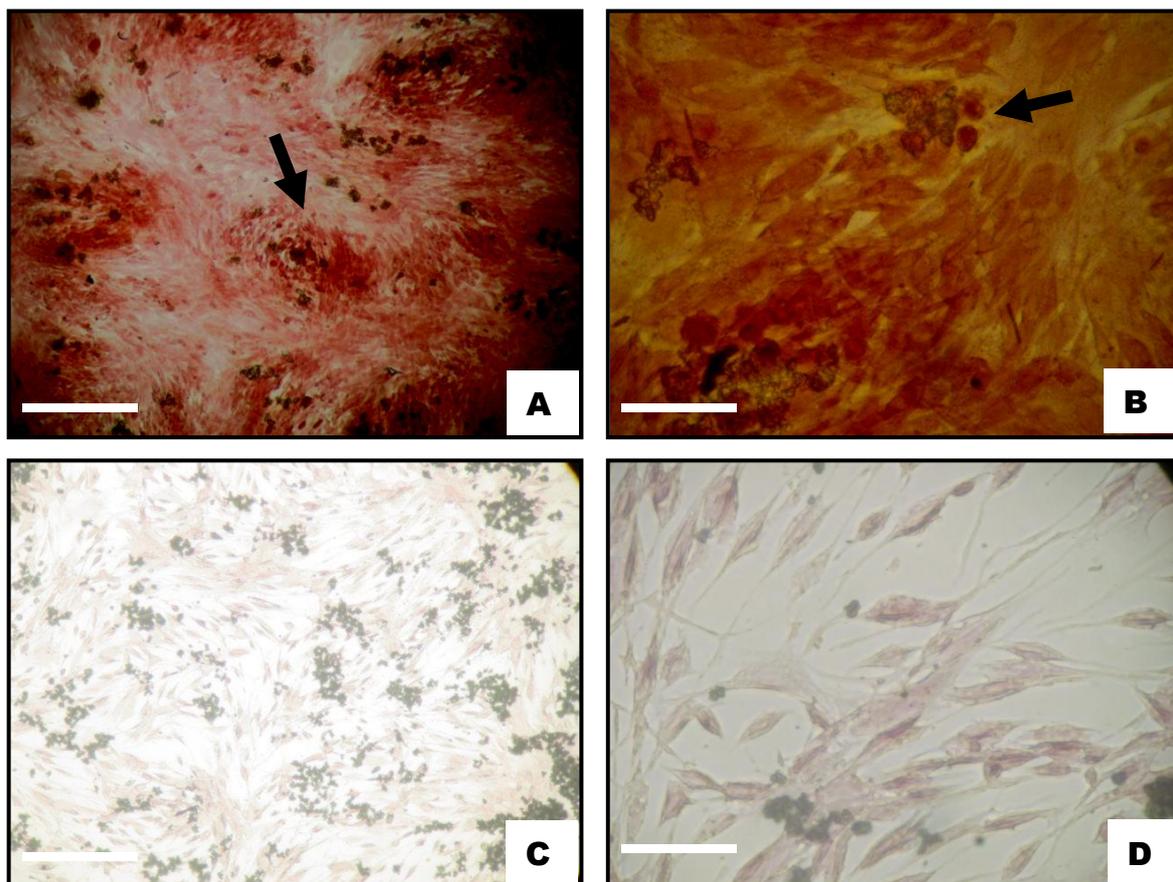
A diferenciação adipogênica foi mantida por um período de 10-15 dias em meio de indução para diferenciação e foi observada a formação de vacúolos lipídicos nas amostras testadas (Figuras 40, 41, 42, 43 e 44). As células foram coradas com o corante “Oil Red O” para detecção desses vacúolos. Não houve diferenciação nas amostras controle.



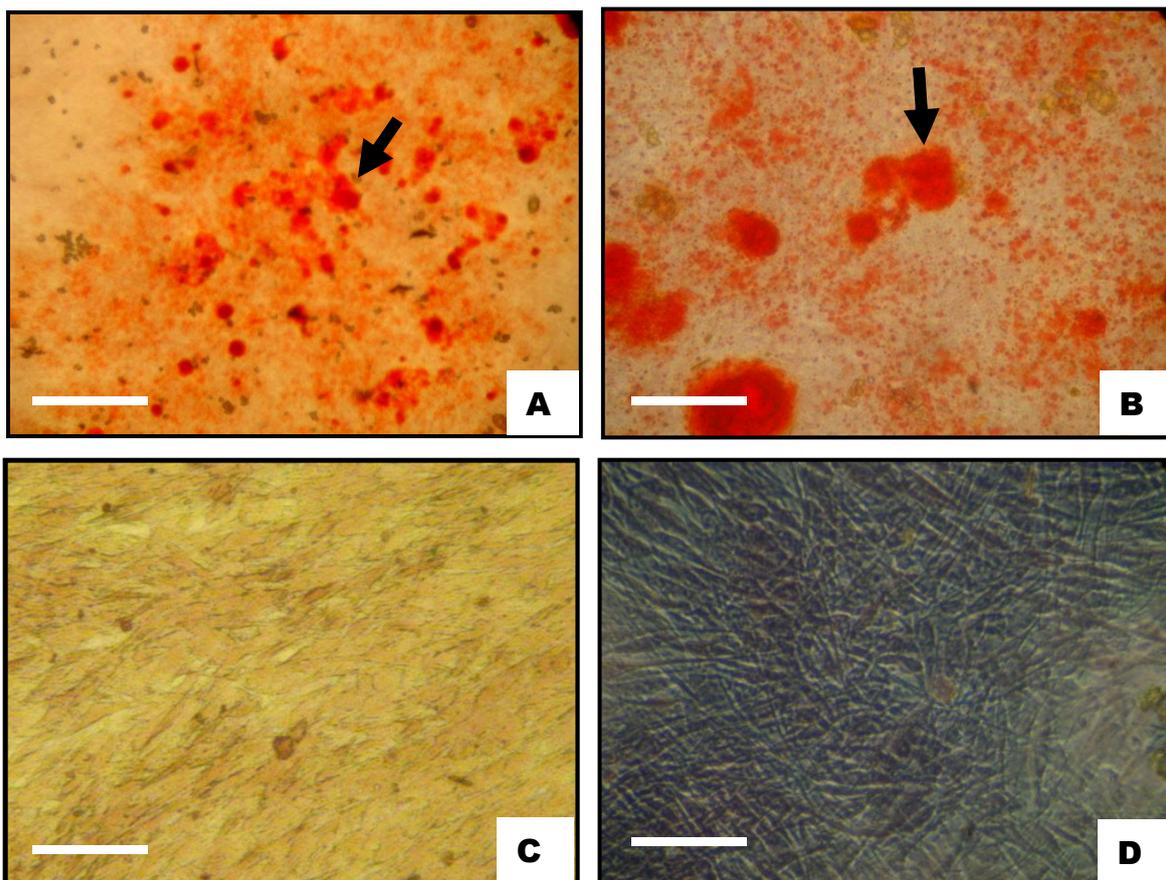
**Figura 30.** Diferenciação osteogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



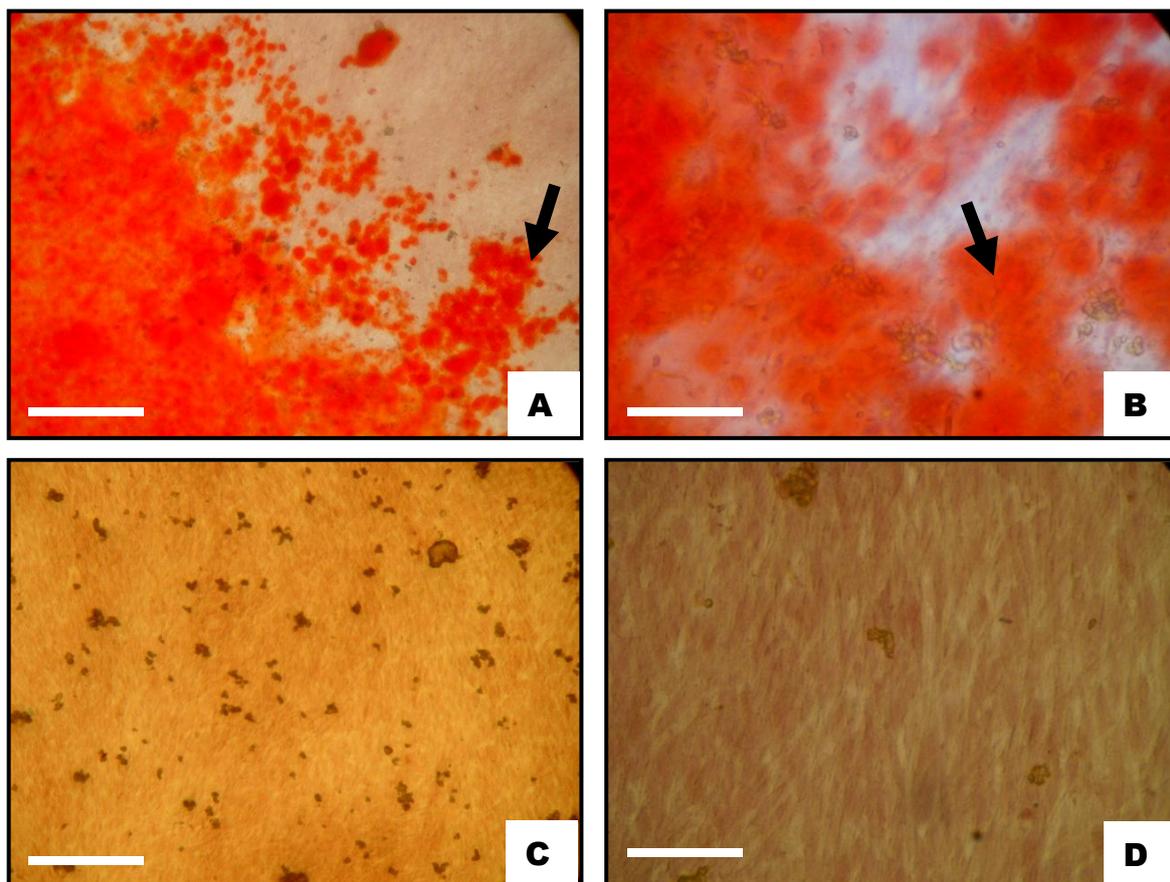
**Figura 31.** Diferenciação osteogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



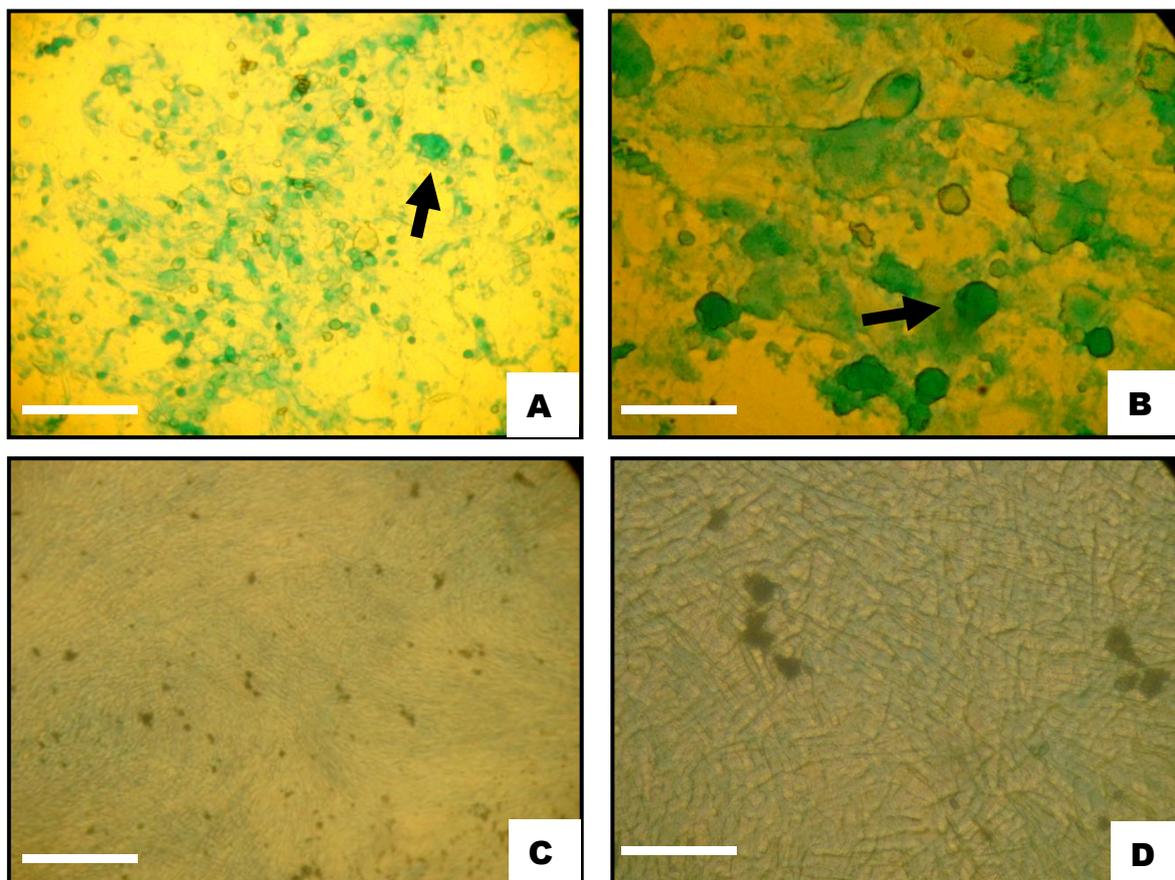
**Figura 32.** Diferenciação osteogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



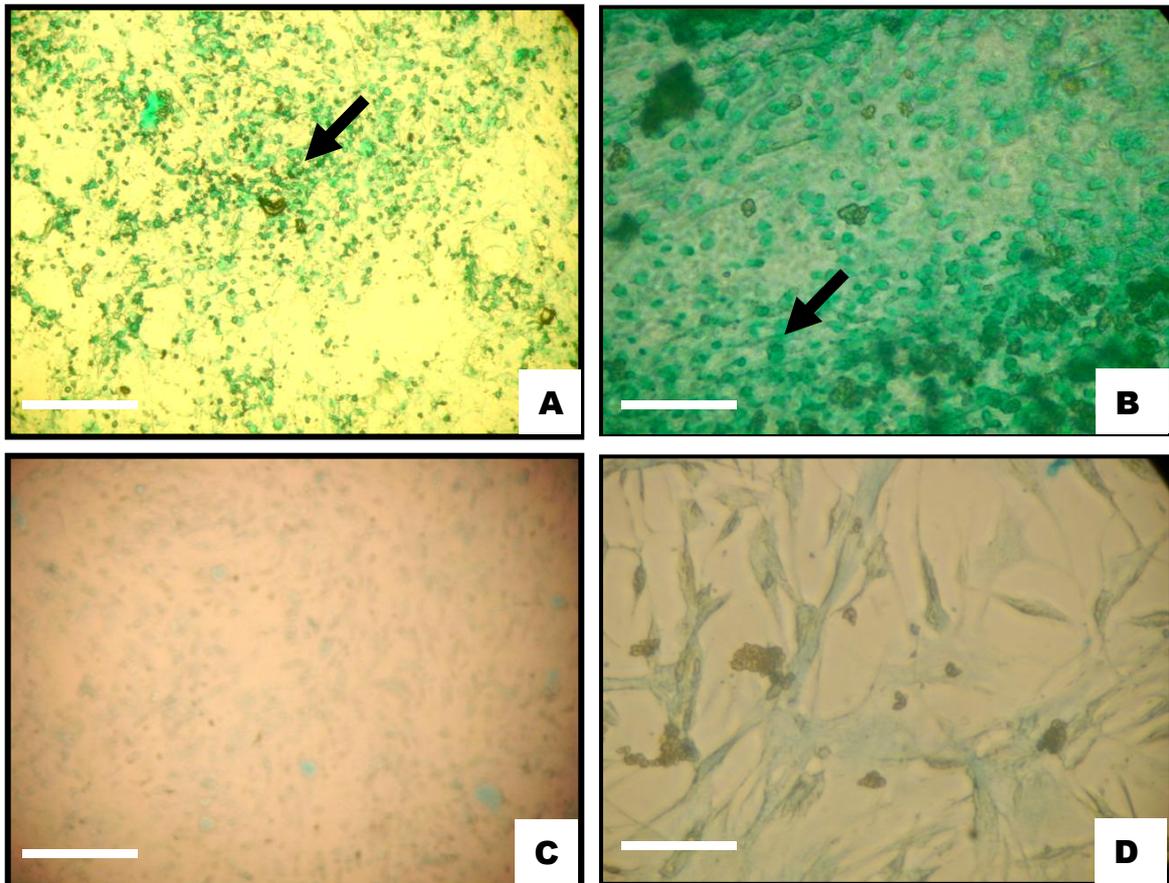
**Figura 33.** Diferenciação osteogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 μm. (B, D) 400x, Barra = 25 μm.



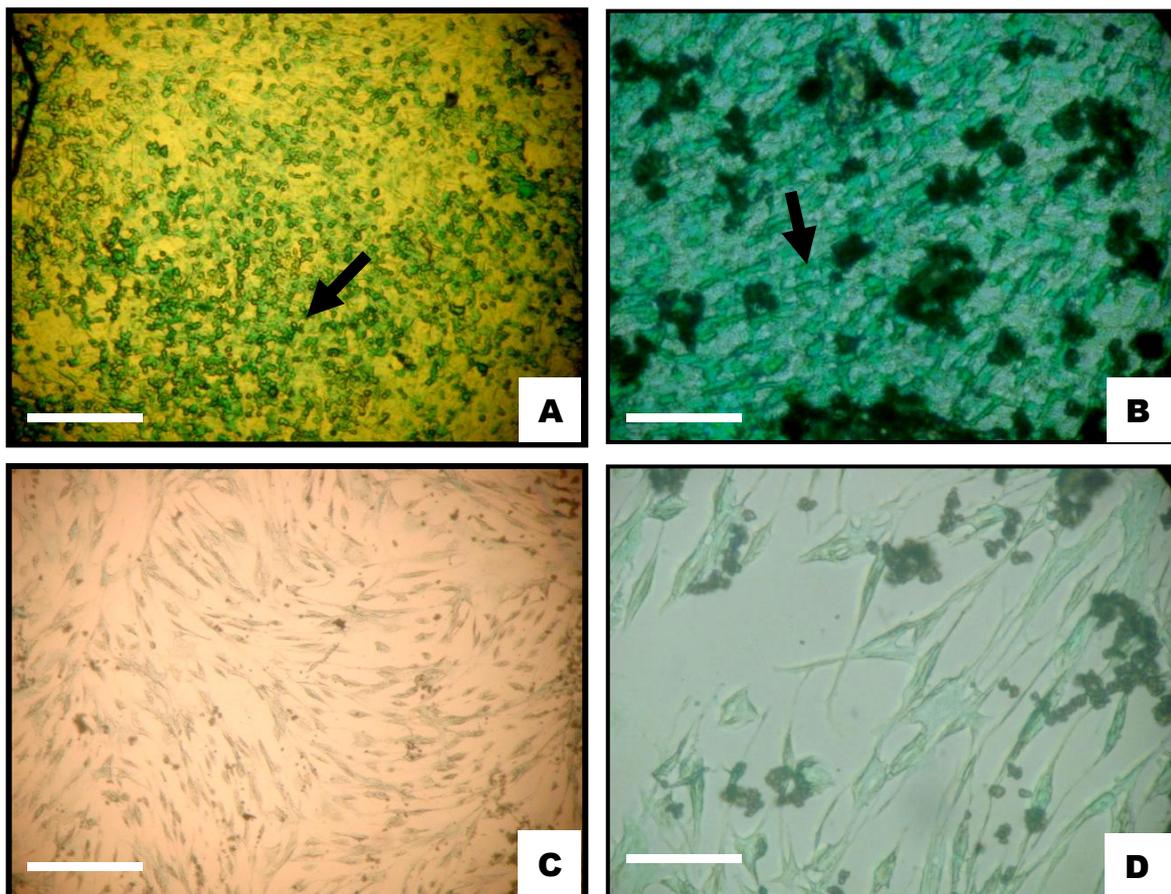
**Figura 34.** Diferenciação osteogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B, células diferenciadas em osteócitos, na seta depósitos de matriz extracelular. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 μm. (B, D) 400x, Barra = 25 μm.



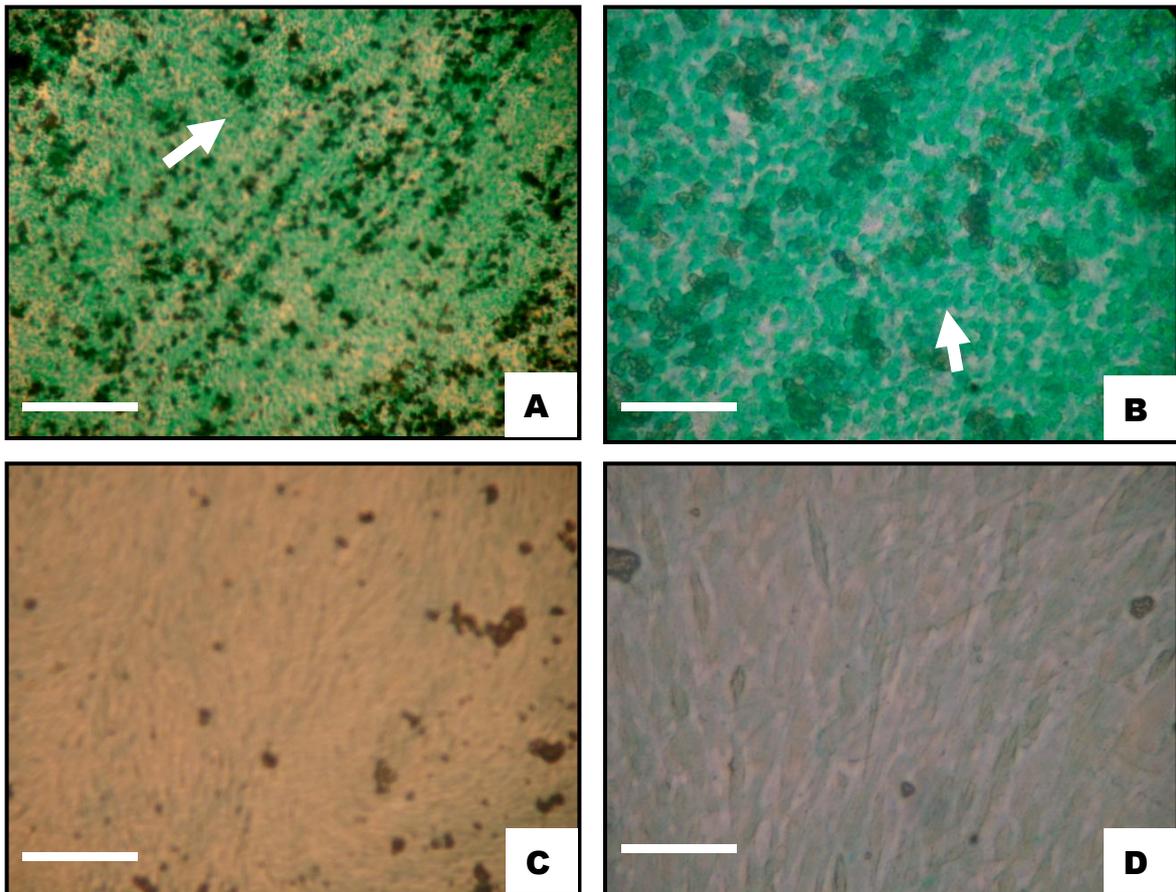
**Figura 35.** Diferenciação condrogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



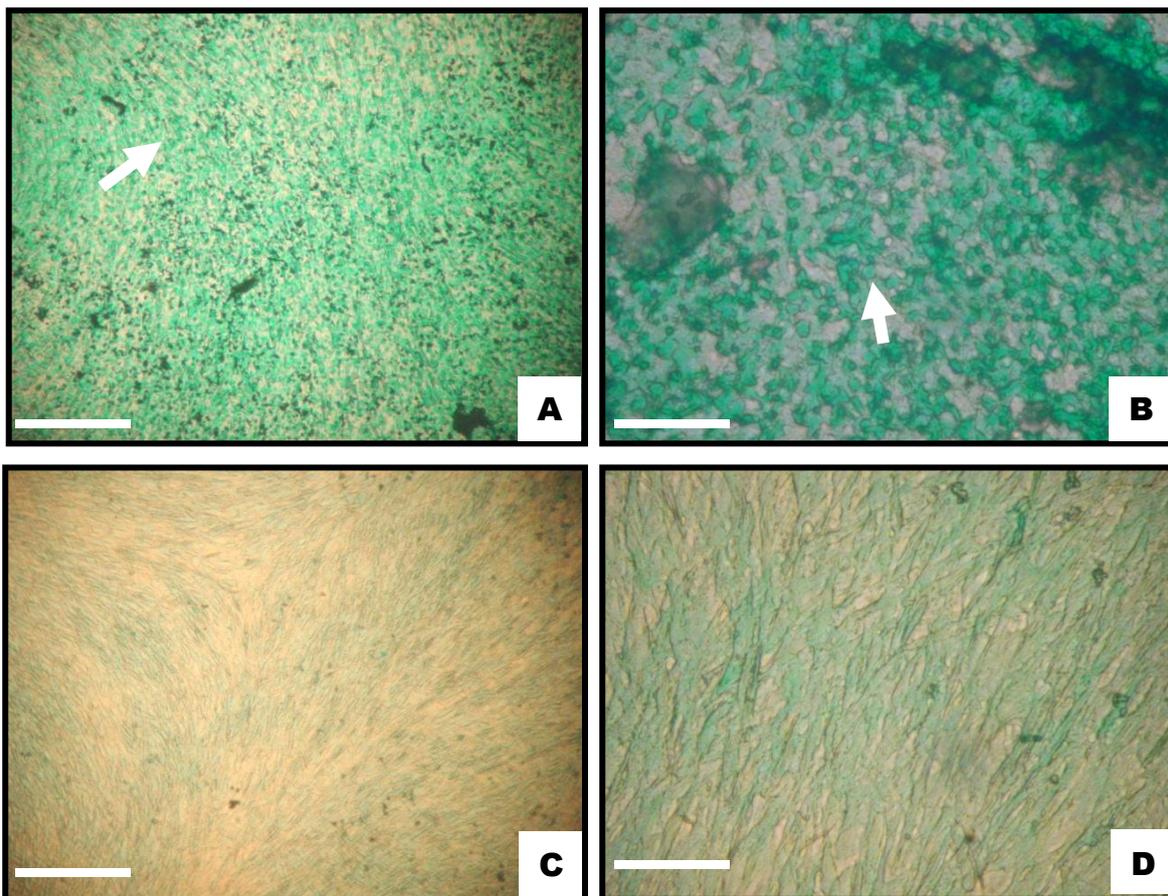
**Figura 36.** Diferenciação condrogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



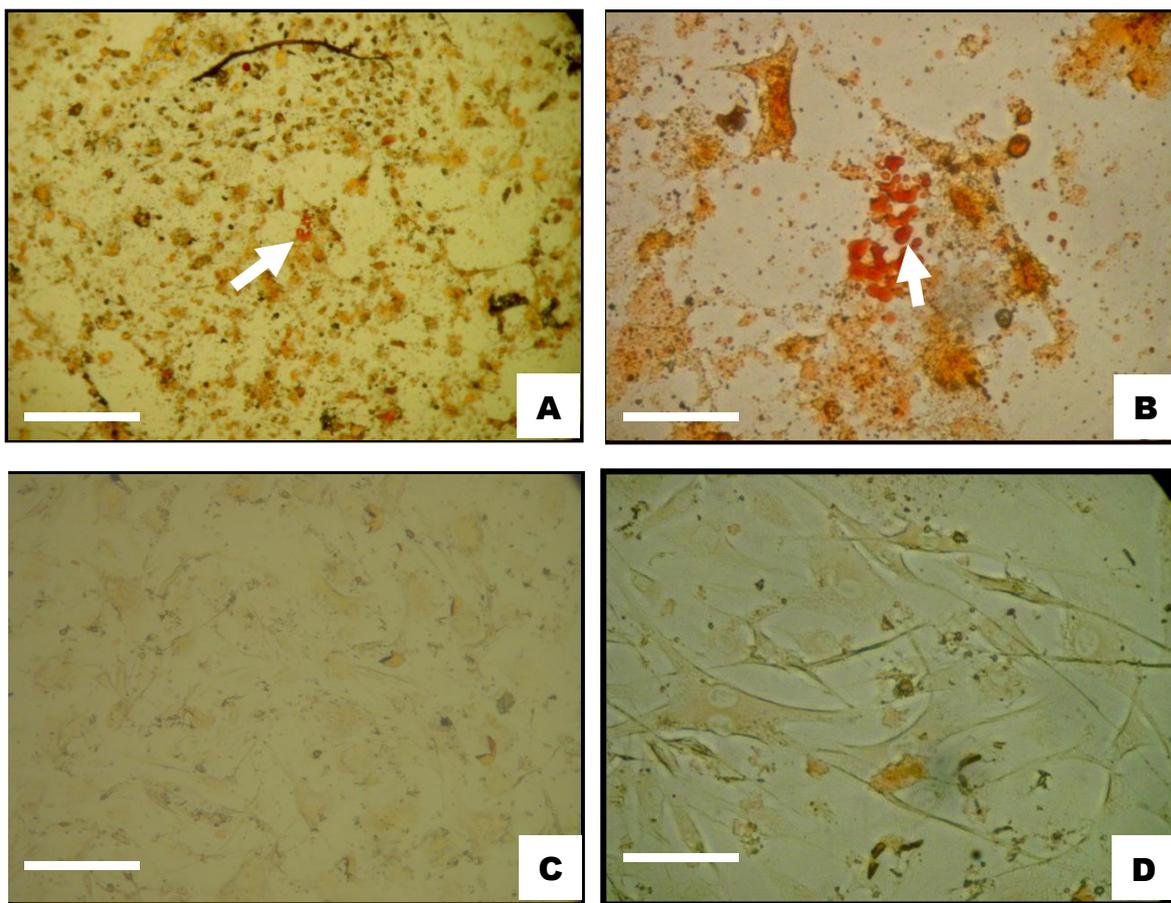
**Figura 37.** Diferenciação condrogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



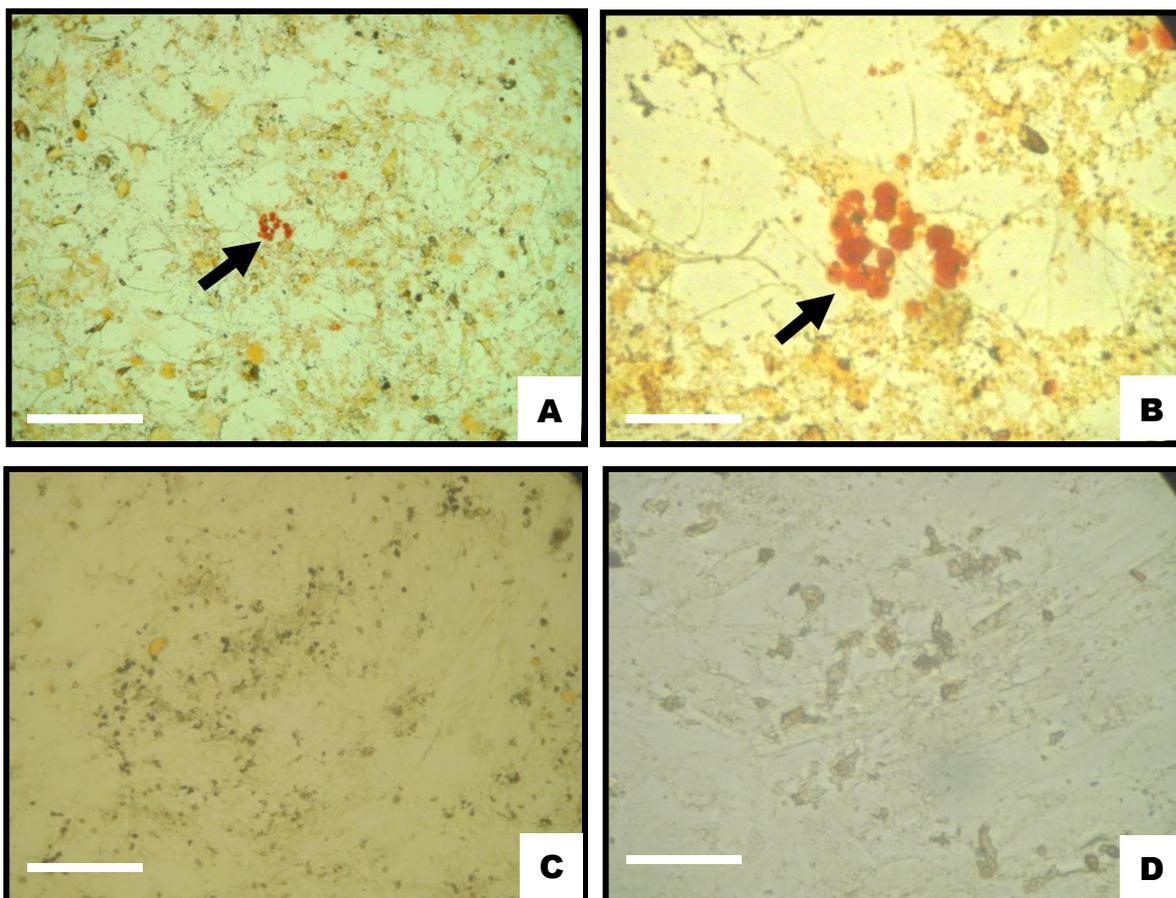
**Figura 38.** Diferenciação condrogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



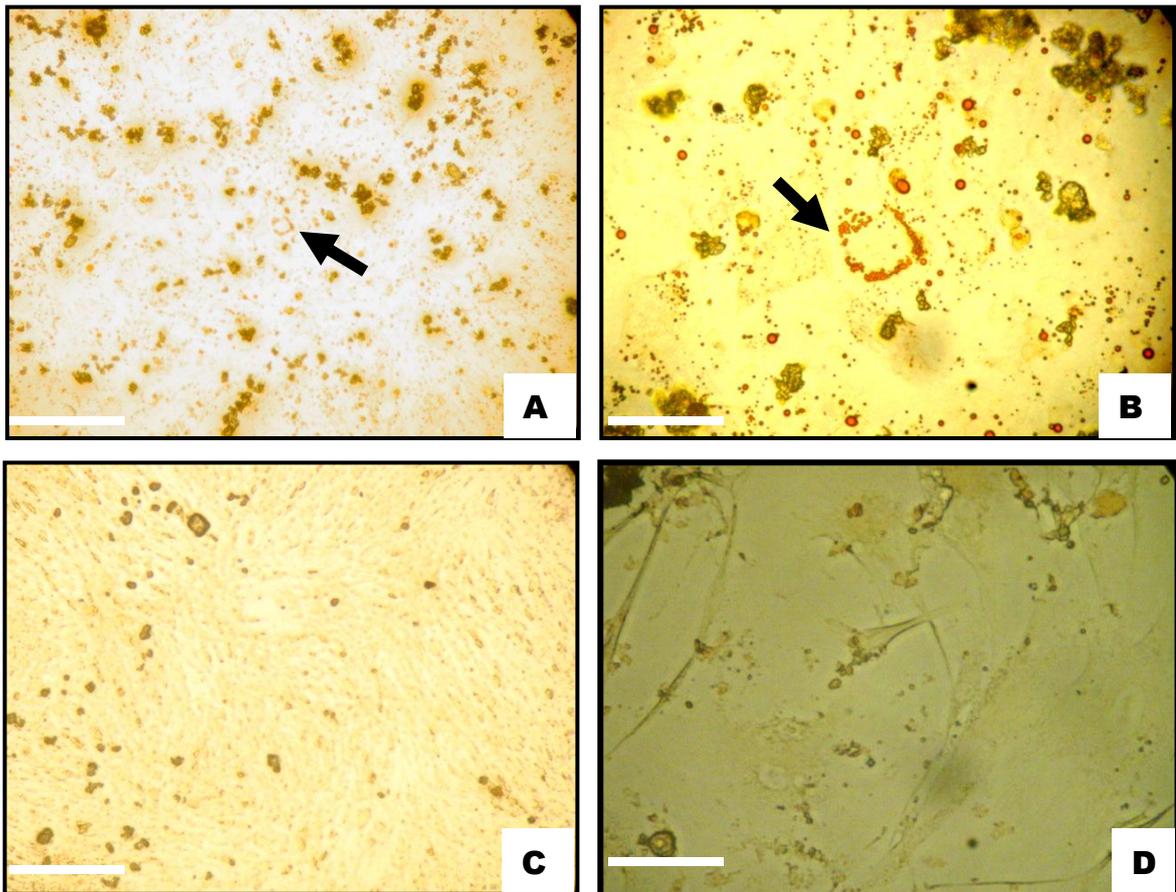
**Figura 39.** Diferenciação condrogênica de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B células diferenciadas em condrócitos, na seta depósitos de glicosaminoglicanos sulfatados. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



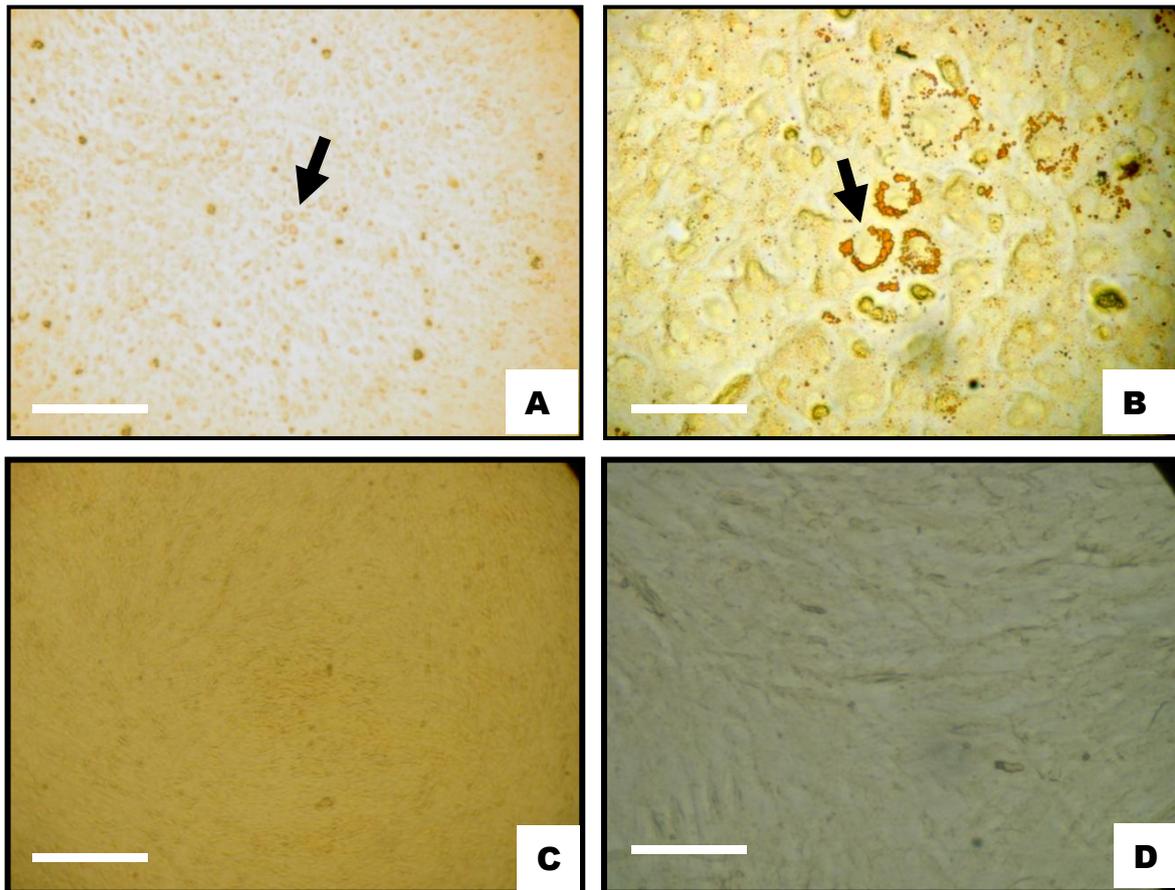
**Figura 40.** Diferenciação adipogênica de *Oecomys concolor* (Sma-07, ♀). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100 μm. (B, D) 400x, Barra = 25 μm.



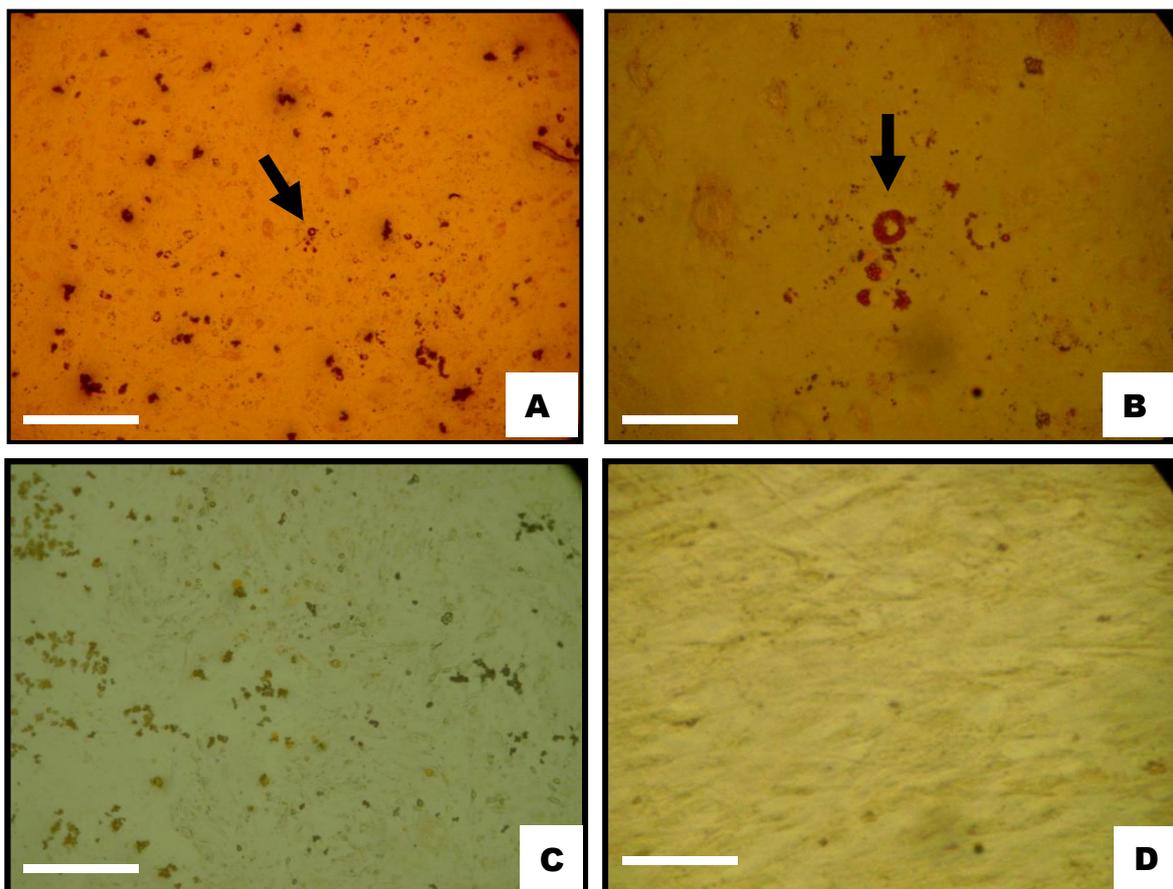
**Figura 41.** Diferenciação adipogênica de *Proechimys roberti* (Sma-09, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 42.** Diferenciação adipogênica de *Proechimys roberti* (Fsl-238, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25  $\mu\text{m}$ .



**Figura 43.** Diferenciação adipogênica de de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-250, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B, D) 400x, Barra = 25 $\mu\text{m}$ .



**Figura 44.** Diferenciação adipogênica de de *Hylaeamys megacephalus* (Fsl-243, ♂). Em A e B células diferenciadas em adipócito, na seta depósitos de vacúolos lipídicos. C e D controle negativo. Aumento: (A, C) 100x, Barra = 100  $\mu$ m. (B, D) 400x, Barra = 25 $\mu$ m.

## 7 - DISCUSSÃO

O presente estudo descreve algumas características das CTA obtidas de tecido epitelial de roedores silvestres incluindo a capacidade de proliferação, expansão *in vitro*, análise morfológica, estudo citogenético, capacidade de autorrenovação por ensaio clonogênico e indução a diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos.

A escolha do meio de cultivo adequado, substâncias e suplementos são um fator determinante para o sucesso do cultivo. O meio utilizado neste trabalho foi o DMEM (Meio Essencial Mínimo de Dulbecco), pois destina-se a cultura de mamíferos (células humanas e tecidos ou células animais) (FRESHNEY, 1994). Este meio de cultivo propiciou nos resultados aqui descritos células com morfologia semelhante a fibroblastos e uma melhor taxa de expansão *in vitro*.

Um aspecto determinante do ambiente de cultura é o soro bovino fetal (SBF), devido a grande quantidade de fatores presentes no mesmo, que estimulam o crescimento celular. O soro é, usualmente, um componente essencial para a cultura de células e sua ausência pode ocasionar um baixo crescimento de células. Ele possui duas funções vitais. A primeira consiste em auxiliar a adesão das células as superfícies das garrafas de culturas. A segunda é promover a proliferação de células devido à presença de citocinas, hormônios e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) (TAPP et al., 2009) responsável por estimular a divisão celular.

A metodologia proposta para obtenção das células *in vitro* de roedores silvestres, dissociação enzimática, método descrito por (FRESHNEY, 1972; LASFARGUES, 1973; CHEN et al., 1989; KRALOVANSZKY et al., 1990; HEALD et al., 1991) foi demonstrada com êxito neste trabalho.

As CTA são conhecidas por seu potencial e plasticidade em se diferenciar em vários tipos de células de um indivíduo (multipotência) (BJORNSON et al., 1999). Apesar deste potencial e plasticidade, são raras e comumente difíceis de identificar, isolar e purificar.

As CTA são normalmente comprometidas com as células maduras do tecido no qual elas estão localizadas. Em condições específicas, células-tronco isoladas de tecidos adultos apresentam certa plasticidade, de acordo com os sinais do ambiente extracelular, propriedade conhecida como transdiferenciação (WAGERS et al., 2004) e podem

diferenciar-se em tipos celulares não relacionados ao seu tecido de origem quando transplantadas em receptores (VERFAILLIE et al., 2002; WATT & HOGAN, 2000; MARTIN & WATT, 2003; RAFF, 2003).

A capacidade proliferativa das CTA *in vitro* é dependente de algumas variáveis, como a idade do tecido de onde são extraídas, a densidade de plaqueamento das células e a composição do meio de crescimento. Apesar de não serem imortais, tem a capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e multipotencialidade. O efeito da idade do tecido doador sobre a capacidade proliferativa das CTA é baseado em estudos que têm demonstrado que as células derivadas de doadores mais velhos apresentam menor taxa de proliferação *in vitro*, mesmo em passagens iniciais é menor que as obtidas de doadores mais jovens (BANFI et al., 2000; BAXTER et al., 2004; STOLZING et al., 2008; SHIBATA et al., 2007; ZHOU et al., 2008), e também quando comparadas com células obtidas de tecido fetal (GUILLOT et al., 2007).

Neste trabalho foi avaliada a capacidade de proliferação e expansão *in vitro*. O padrão de crescimento celular demonstrado na curva de crescimento (NIH, 2008), indicou uma elevada taxa de proliferação celular em todas as amostras. Em *H. megacephalus* (FSL-250) a potencialidade de crescimento celular foi muito maior em relação a todas as outras espécies, inclusive em relação ao outro exemplar de *H. megacephalus* (FSL-243), demonstrando que a proliferação celular é variável intra e inter-especificamente.

Os resultados encontrados na curva de crescimento das CTA do epitélio dos roedores em estudo são semelhantes aos encontrados para CTM de medula óssea em ratos (OLIVEIRA, 2010); CTM de humanos (PAULA, 2011) e para CTM de cães (PATRICIO, 2010), onde observou-se um aumento elevado no número de células na cinética de crescimento.

Para este trabalho houve total impossibilidade para montar um quadro estatístico comparativo (curva de crescimento) relacionado à idade dos animais em estudo, em virtude de os protocolos de coleta de campo não terem informações sobre idade das amostras coletadas. Isso ocorre devido os animais analisados terem sido coletados na natureza e não terem sido provenientes de biotérios e/ou cativeiros.

A densidade de plaqueamento é um importante fator determinante da capacidade proliferativa das células, uma vez que é necessário um número mínimo de células plaqueadas para iniciar e manter uma proliferação efetiva em cultura para determinar a

dinâmica do seu crescimento (BALIN et al., 2002). Nos experimentos descritos nesta dissertação, foram utilizadas  $10^5$  células para a curva de crescimento (NIH, 2008),  $10^3$  células para o ensaio clonogênico e  $4,2 \cdot 10^3$  células para os ensaios de diferenciação, protocolo adaptado de Nardi & Meirelles (2006).

As CTA *in vitro* apresentam morfologia fibroblastóide e diferentes entre si e podem ser mantidas em divisão por um determinado período de tempo, embora esta capacidade possa ser mais restrita quando comparada com CTE. A maioria das células adultas sofre no máximo 50 a 60 divisões antes de se tornar senescentes. Essa capacidade limitada replicativa das células é conhecida como “limite de Hayflick” (HAYFLICK, 1965). Com o acúmulo de divisões *in vitro* as células param de proliferar e se tornam maiores e mais achatadas (BRUDER et al., 1997), o que está possivelmente associado ao fenômeno da senescência *in vitro*. Um dos mecanismos que levam à senescência celular é o encurtamento dos telômeros sofrido durante o cultivo *in vitro*, que pode induzir a perda da expressão da enzima telomerase. A enzima telomerase é considerada um relógio biológico, um indicador que a senescência celular irá se instalar inevitavelmente nas células em cultivo e poderá levar ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, resultando em um processo neoplásico. Estudos em telômeros de CTM derivadas de doadores jovens são maiores que os de doadores velhos (BAXTER, et al., 2004; GUILLOT et al., 2007). Esses estudos comprovam que ocorre um encurtamento no tamanho dos telômeros a cada passagem *in vitro*, em torno de 1,5-2 kb, embora o tamanho original dos telômeros varie em cada doador.

Alterações cromossômicas estruturais, tais como deleções, translocações e inversões, representam um mecanismo importante pelo qual as células cancerígenas desenvolvem-se gradualmente, uma vez que estas alterações cromossômicas podem levar a uma expressão anormal de muitos genes, podendo assim desencadear o processo neoplásico (DUESBERG et al., 2005; MITALIPOVA et al., 2005). Situação similar foi observada em CTE humanas cultivadas como descrito em Draper et al. (2004).

Nos tecidos as CTA mantêm um balanço entre proliferação e apoptose. As células-tronco tem um papel fundamental na manutenção e reparo tecidual. Sua longevidade é dependente de um controle da expressão gênica, proliferação, ciclo celular e sinais de diferenciação. Em contrapartida as anormalidades genéticas, associadas à idade, sugerem

que a falta de reparação do DNA pode contribuir para o processo de envelhecimento (PARK & GERSON, 2005).

A reparação do DNA mantém a estabilidade genética e a falta desse mecanismo resulta na sua instabilidade e pode levar a um declínio da função celular. As CTA são extremamente importantes na manutenção dos tecidos ao longo da vida. Elas regeneram e renovam os tecidos em resposta a danos e substituem as células diferenciadas que já exerceram sua função. Devido ao longo tempo de exposição a agentes causadores de dano ao DNA, as células-tronco necessitam de um mecanismo de reparação apurado para assegurar a fidelidade à progênie (KENYON & GERSON, 2007).

Em CTE e CTA foram descritos anormalidades cromossômicas e alterações no padrão de expressão gênica, após múltiplas divisões *in vitro* (DRAPER et al., 2004; RUBIO et al., 2005).

Devido à necessidade de expansão *in vitro* das CTA, foi importante examinar a estabilidade cromossômica. O cariótipo é um indicador confiável para avaliar a estabilidade genética e a transformação das células cultivadas *in vitro* (ZHAO et al, 2007).

Neste trabalho, culturas de células *in vitro* derivadas do epitélio de roedores foram analisadas para estudos cromossômicos na terceira passagem e apresentaram cariótipo com número diplóide normal e estável após cultivo *in vitro*. Esse resultado pode ter ocorrido em virtude da passagem ser ainda inicial. Outra observação é a de que essas análises cromossômicas foram feitas após o descongelamento e mesmo assim as células mantiveram o número diplóide normal, demonstrando que essa metodologia não afetou a estabilidade genômica das culturas, mesmo sendo considerada uma técnica invasiva para as células em virtude da toxicidade do crioprotetor (DMSO) utilizado. Futuras análises em passagens posteriores poderão verificar a manutenção da estabilidade genômica ou não.

As CTM representam uma população de células presentes na medula óssea caracterizadas pelo seu formato fusiforme, aderência à superfície plástica e formação de colônias de células semelhantes a fibroblastos, chamadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F- *Colony Forming Unit-Fibroblasts*) (FRIEDENSTEIN et al., 1974), as quais possuíam capacidade para se diferenciar em colônias que produziam pequenos depósitos de osso ou cartilagem (PROCKOP, 1997; NARDI & MEIRELLES, 2006). Alguns fatores de crescimento podem estimular a proliferação de CFU-F *in vitro*, tais com fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento

epidérmico (EFG) (GRONTHOS & SIMMONS, 1995), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (BIANCHI et al., 2003).

Sendo assim, realizamos ensaios clonogênicos cultivando CTA das amostras do tecido epitelial dos roedores em baixa densidade celular ( $10^3$  células), onde a autorrenovação celular foi avaliada.

Os resultados do presente estudo demonstraram que as CTA do epitélio dos roedores quando comparados com ensaios de CUF-F de células derivadas de medula óssea (CTM) em camundongos (MEIRELLES & NARDI, 2003; SUNG et al., 2008) e para CTM de cães (NEUPANE et al., 2008) apresentam eficiência semelhantes na formação de colônias, morfologia homogênea semelhantes a fibroblastos e formato fusiforme com alta taxa de crescimento e proliferação celular por várias passagens sucessivas sugerindo que as mesmas possui indicativo de conteúdo potencial para a clonogenicidade.

Segundo a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), para caracterizar uma célula como sendo CTM, são três os requerimentos mínimos para uma população: capacidade de aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico, potencial para diferenciação *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos e que a expressão de proteínas de membrana CD105, CD73 e CD90 esteja presente em mais de 95% das células em cultura, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não estejam expressos em mais de 95% das células em cultura (HORWITZ et al., 2005; DOMICINI et al., 2006).

Como na caracterização das células existem vários marcadores de proteínas de membrana positivos descritos, porém nenhum deles específico ou exclusivo para animais silvestres, não foi possível realizar estes testes em nosso trabalho para determinar a presença ou não destes marcadores de proteínas de membrana nas células em estudo.

Neste trabalho desenvolvemos protocolos de diferenciação para confirmar a identificação das células estabelecidas a partir de tecido epitelial para as linhagens osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas, e garantir que nosso protocolo de estabelecimento é confiável.

As células isoladas de tecido epitelial apresentavam capacidade de aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico e potencial para diferenciação em osteócitos, condrocitos e adipócitos, quando submetidas a estímulo apropriado.

A metodologia empregada nos ensaios para diferenciação das células em cultura em linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica, para identificação das CTA apresentou resultados satisfatórios. As células apresentaram a marcação desejada através das colorações Alizarin Red S, Alcian Blue e Oil Red O, utilizadas para a visualização das células em cultura induzidas para osteócitos, condrócitos e adipócitos.

Durante o processo de diferenciação osteogênica as CTA cultivadas na presença de dexametasona,  $\beta$ -glicerolfosfato e AsAP 1000x diluídos em DMEM contendo 10% SBF passaram a apresentar a formação de determinados focos de agregados celulares rico em cálcio indicando sua diferenciação para osteoblastos. Os osteoblastos quando corados com Alizarin Red S apresentaram coloração vermelha devido à presença de depósito de cálcio o que caracteriza a diferenciação osteogênica. O tempo de indução para diferenciação osteogênica foi de 21 dias. A diferenciação osteogênica apresenta resultados semelhantes aos demonstrados para CTM de camundongos (MEIRELLES & NARDI, 2003), CTM de cães adultos (CSAKI et al., 2007) e para CTM do cordão umbilical de cães (SEO et al., 2009).

No processo de diferenciação condrogênica as CTA cultivadas na presença de insulina, fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ 1) e AsAP 100x diluídos em DMEM contendo 10% SBF secretam glicosaminoglicanos sulfatados, potente indutor de condrogênese, responsável pela formação de matriz extracelular constituinte da cartilagem indicando sua diferenciação para condroblastos. Os condroblastos quando corados com Alcian Blue apresentam coloração azul devido à presença de matriz extracelular constituinte da cartilagem o que caracteriza a diferenciação condrogênica. O tempo de indução para a diferenciação condrogênica foi de 21 dias. Os resultados encontrados na diferenciação celular condrogênica assemelham-se aos encontrados para a diferenciação celular condrogênica de CTM de cães adultos (CSAKI et al., 2007) e para CTM do cordão umbilical de cães (SEO, et al, 2009)

No processo de diferenciação adipogênica as CTA cultivadas na presença de Rosiglitazona, Insulina, Indometacina e Dexametasona diluídos em DMEM contendo 10% SBF apresentam vesículas lipídicas no citoplasma indicando sua diferenciação para adipócitos. Os adipócitos quando corados com Oil Red O apresentam coloração vermelha. O tempo de indução para a diferenciação adipogênica foi de 10 a 15 dias. Na diferenciação celular adipogênicas foram encontrados resultados semelhantes aos encontrados para a

diferenciação celular adipogênica de CTM de cães adultos (CSAKI et al., 2007), CTM do cordão umbilical de cães (SEO et al., 2009) e para CTM de camundongos (MEIRELLES & NARDI, 2003).

Sendo assim, foi possível comprovar a existência de outros animais da biodiversidade brasileira que possam atuar como modelos experimentais para o estudo das CTA, além da manutenção dessas CTA em um banco de células da biodiversidade ser de grande importância para a conservação genômica de espécies que futuramente possam estar em risco de extinção. Hayashi et al. (2011), inclusive, já conseguiram em camundongo a reconstituição do desenvolvimento de células germinativas primordiais semelhantes às células (PGCLCs) *in vitro* com capacidade para gametogênese, originando oócitos e espermatozóides a partir de embriões de células-tronco e os mesmos foram considerados viáveis. Caso seja necessário e caso essas metodologias de produção de células germinativas estejam bastante desenvolvidas, no futuro será possível auxiliar nos processos de reprodução de espécies ameaçadas de extinção, permitindo a sua manutenção a partir de um biorrepositório de células.

## **8 – PERSPECTIVAS FUTURAS**

1-Avaliar a estabilidade genômica, via cariotipagem, em passagens superiores às analisadas aqui neste manuscrito;

2-Publicar os dados em periódicos de circulação internacional;

3-Continuar aplicando as técnicas aqui implantadas em outras espécies de animais da Biodiversidade Amazônica.

## 9 - RESUMO DOS RESULTADOS

O conjunto de experimentos realizados e os resultados obtidos contribuíram para a determinação das condições ideais para o cultivo e o estabelecimento das culturas de CTA a partir de tecido epitelial dos roedores no Laboratório de Citogenética da UFPA, atuando como um marco nos estudos de células-tronco da biodiversidade da Amazônia.

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

- 1- Foi possível padronizar os métodos de isolamento, proliferação celular, expansão e caracterização dessas células em linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica;
- 2- Devido à necessidade de expansão *in vitro* das CTA, é importante examinar a estabilidade cromossômica. O cariótipo é um indicador confiável no controle citogenético, na determinação da instabilidade cromossômica e do processo neoplásico das CTA cultivadas;
- 3- Faltam mais estudos sobre métodos de purificação das CT *in vitro* e bons marcadores de superfície celular para acompanhar o desenvolvimento das células em espécies silvestres;
- 4- Três espécies de roedores silvestres da Amazônia apresentaram capacidade de proliferação e diversidade de diferenciação, sendo potencialmente fornecedores de CTA provenientes da pele, podendo ser utilizados como organismos modelos de estudos em CT.

## **10 - CONCLUSÃO**

Culturas regulares de células epiteliais de roedores silvestres possuem capacidade de proliferação e diferenciação em outros tipos celulares que indicam que:

- 1- O tecido epitelial de roedores abriga CTA indiferenciadas, passível de isolamento através da aderência ao plástico de cultivo e são encontradas em todos os órgãos e tecidos pós natais, porém raras e comumente difíceis de identificar, isolar e purificar;

## 11 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. **Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications.** Gene Ther. 2008; 15 (2): 109-16.

AMADO, L. C.; SALIARIS, A. P.; SCHULERI, K. H.; ST, JOHN. M.; XIE, J. S. CATTANEOS.; DURAND, D. J.; FITTON, T.; KUANG, J. Q.; STEWART, G.; LEHRKE, S.; BAUMGARTNER, W. W.; MARTIN, B. J.; HELDMAN.; A. W.; HARE, J. M. **Cardiac repair with intramyocardial injection of allogenic mesenchymal stem cells after myocardial infarction.** Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102 (32): 11474-9.

ANISIMOV, S. V.; CHRISTOPHERSEN, N. S.; CORREIA, A. S.; LI, J. Y.; BRUNDIN, P. **“NeuroStem Chip”; a novel highly specialized tool to study neural differentiation pathways in human stem cells.** BMC Genomics. 2007; 8:46.

ARMANDOLA, E. A. **Tissue regeneration and organ repair: Science or Science Fiction.** Highlights of the ACHEMA 27<sup>TM</sup> International Congress on Chemical Engineering, Environmental protection and Biotechnology. 2003; 19-24, Maio, Frankfurt am Main, Alemanha.

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. **Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine.** Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2008; v. 2, n. 4, p. 169-183.

BALIN, A. K.; FIHER A. J.; ANZELONE, M.; LEONG, I.; ALLEN, R. G. **Effects of establishing cell cultures and cell culture conditions on the proliferative life span of human fibroblasts isolated from different tissues and donors of different ages.** Exp Cell Res. 2002; 274: 275-287.

BANFI, A.; MURAGLIA, A.; DOZIN, B.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. **Proliferation Kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy.** Exp Hematol. 2000; 28: 708-715.

BARKER, J. N. **Umbilical cord Blood Transplantation: current Practice and future innovations.** Crit. REV. Oncol. Hematol. 2003; V. 48, n.1, p. 35-43.

BARTLEY, J; SOLTAU, T; WIMBORNE, H.; KIM, S.; MARTIN-STUDDARD, A.; HESS, D.; HILL, W.; WALLER, J.; CARROL, J. **BrdU-positive cells in the neonatal mouse hippocampus following hypoxic-ischemic brain injury.** BMC Neurosci. 2005; 6: 15.

BAXTER, M. A.; WYNN, R. F.; JOWITT, S. N.; WRAITH, J. E.; FAIRBAIRN, L. J.; BELLANTUONO, I. **Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion.** Stem Cells. 2004; 22: 675-682.

BERNÁ, G.; QUINTO-LEÓN, T.; ENSEÑAT-WASER, R.; MONTANYA, E.; MARTÍN, F.; SORIA, B. **Stem cells and diabetes**. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2001; v. 55, p. 206-212.

BIANCH, G.; BANFI, A.; MASTROGIACOMO, M.; NOTARO, R.; LUZZATO, L.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. **Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2**. *Exp Cell Res*. 2003; 287: 98-105.

BISWAS, A.; HUTCHINS, R. **Embryonic stem cells**. *Stem Cells Development*. 2007; v.16, n. 2, p. 213-222.

BJORNSON, C. R.; RIETZE, R. L.; REYNOLDS, B. A.; MAGLI, M. C.; VESCOVI, A. L. **Turnig brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo**. *Science*. 1999. 283 (5401): 534-7.

BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. **Epithelial stem cells: turning over news leaves**. *Cell*. 2007; 128 (3): 445-58.

BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN, J. M. **The evolving concept of a stem cell: entity or function?** *Cell*. 2001; 105 (7): 829-41.

BOCELLI-TYNDALL, C.; BRACCI, L.; SPAGNOLI, G.; BRACCINI, A.; BOUCHENAKI, M.; CEREDIG, R.; PISTOIA, V.; MARTIN, I.; TYNDALL, A. **Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and autoimmune diseases patients reduce the proliferation of autologous – and allogeneic-stimulated lymphocytes *in vitro***. *Reumatology*. 2007; 46: 403-408.

BODNAR, A. G.; OUELLETTE, M. FROLKIS, M. HOLT, S. E. CHIU, C. P. MORIN, G. B. et al. **Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells**. *Science*. 1998; 16279 (5349): 349-52.

BONILLA, S.; SILVA, A.; VALDÉS, L.; GEIJO, E.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; MARTINEZ, S. **Functional neural stem cells derived from adult bone marrow**. *Neuroscience*. 2005; 133: 85-95.

BOSSOLACO, P. **Characterization and multilineage differentiation of amniotic fluid cells**. Abstracts of the 2nd Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research. 2004: 218.

BRAZELTON, T. R.; ROSSI, F. M.; KESHET, G. I.; BLAU, H. M. **From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice**. *Science*. 2000; 290 (5497): 1775-9.

BROOKE, G.; COOK, M.; BLAIR, C.; HAN, R.; HEAZLEWOOD, C.; JONES, B.; KAMBOURIS, M.; KOLLAR, K.; MCTAGGART, S.; PELEKANOS, R.; RICE, A.; ROSSETTI, T.; ATKINSON, K. **Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells**. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, London. 2007; v 18, n.1, p. 846-858.

BROXMEYER, H. E.; SROUR, E. F.; HANGOC, G.; COOPER, S.; ANDERSON, S. A.; BIDINE, D. M. **High efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and**

**stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years.** Proceedings National Academy of Science of the United States of America. 2003; v. 100, n. 2, p. 645-650.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E. **Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.** J Cell Biochem. 1997; 64: 278-294.

BUNNELL, B. A.; FLAAT, M.; GAGLIARD, C.; PATEL, B.; RIPOL, C. **Adipose-derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation.** Methods. 2008; v. 45 (2), p. 115-120.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELI, L. M. F.; JANZ, F. L. **Características Biológicas das células-tronco mesenquimais.** Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, Rio de Janeiro. 2009; v. 31, supl. 1, p. 25-35.

CAPLAN, S.; BRUDER, P. S. **Mesenchymal stem cell: building blocks for molecular medicine in the 21 st century.** Trends in Molecular Medicine. 2001; n. 6, p. 259-64.

CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMAIT, M.; BEHR, L. **Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cell in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse.** Canadian Journal of veterinary Research, Ottawa. 2006; v. 70, n. 2, p. 143-147.

CHEN, T. C., CURTHOYS, N. P., LAGENAUAR, C. F., PUSCHETT, J. B. **Characterization of primary cell cultures derived from rat renal proximal tubules.** In Vitro Cell Dev Biol. 1989; 25: 714-722.

COLE, R. J.; PAUL, J. **The effects of erythropoietin on hem synthesis in mouse yolk sac and cultures foetal liver cells.** J. Embryol Exp Morphol. 1966; 15: 245-260.

COLOMÉ, L. M. **Avaliação do envolvimento de células-tronco autólogas de medula óssea em associação com técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração do nervo tibial de coelhos.** Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2007; 77 f.

CSAKI, C.; MATIS, U. A.; MOBASHERI, H. YE.; SHAKIBAEI, M. **Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study.** Histochemical Cell Biology. 2007; v. 128, p. 507-520.

DALERBA, P.; CHO, R.W.; CLARKE, M. F. **Cancer stem cells: models and concepts.** Annual Review Med. 2007; 58: 267-84.

DE GEMMIS, P.; LAPUCCI, C.; BERTELLI, M.; TOGNETTO, A.; FANIN, E.; VETTOR, R.; PAGANO, C.; PANDOLFO, M.; FABBRI, A. **A real-time PCR approach to evaluate adipogenic potential of amniotic fluid-derived human mesenchymal stem cells.** Stem Cells Dev. 2006; 15 (5): 719-28.

DEVINE, S. **Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic?** J cell Biochem. Suppl. 2002; 38: 73-9.

DOMICINI, M.; Le BLANCK, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8 (4): 315-7.

DONALDSON, A. E.; CAI, J.; YANG, M.; IACOVITTI, L. **Human Amniotic Fluid Stem Cells do not Differentiate into Dopamine Neurons In Vitro or After Transplantation In Vivo.** Stem Cells Dev. 2008; [Epubahead of print].

DONNENBERG, A. D.; KOCH, E. K.; GRIFFIN, D. L.; STANCZAK, H. M.; KISS, J. E.; CARLOS, T. M.; BUCHBARKER, D. M.; YEAGER, A. M. **Viability of cryopreserved BM progenitor cells stored for more than a decade.** Cytotherapy. 2002; v. 4, n. 2, p. 157-163.

DRAPER, J. S., K., SMITH.; GOKHALE, P.; MOORE, H. D.; MALTIBY, E.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; ZWAKA, T. P.; THOMSON, J. A.; ANDREWS, P. W.. **Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cell.** Nat Biotechnol. 2004; 22 (1): 53-4.

DUESBERG, P.; Li R.; FABARIUS, A.; HEHLMANN, R. **The chromosomal basis of cancer.** Cell Oncol. 2005; 27 (5-6): 293-318.

EGLITIS, M. A., MEZEY, E. **Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice.** Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 1594 (8): 4080-5.

EVANS, M. J & KAUFMAN, M. H. **Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.** Nature. 1981; 292 (5819): 154-156.

FERRARI, G.; CUSELLA-DE ANGELIS, G.; COLETTA, PAULUCCI E.; STORNAIUOLO, A.; COSSU, G.; MAVILIO, F. **Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.** Science. 1998; 279 (5356): 1528-3.

FIBBE, W. E. **Mesenchymal stem cell. A potential source for skeletal repair.** Annual Rheum Dis. 2002; 61 (Suppl II): ii 29-31.

FINE, A. **Transplantation of fetal cells and tissue: an overview.** Canadian Medical Association Journal. 1994; v. 15, n. 9, p. 1261-1268.

FOYGEL, K.; CHOI, B.; JUN, S.; LEONG, D. E.; LEE, A.; WONG, C. C.; ZUO, E.; ECKART, M.; REIJO, PERA, A.; WONG, W. H.; YAO, M. W. **A novel and critical Role for Oct4 as a regulator of the maternal-embryonic transition.** PLoS ONE. 2008; v. 3 n. 12.

FRESHEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique 4.** Ed. New York: wiley-liso. 1994.

- FRESHEY, R. I. **Tomour cells disaggregated in collagenase.** *Lancet.* 1972; 2: 488-489.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLASOVA, U. F.; KULAGINA, N. N.; PANASUK, A. F.; RUDACOWA, S. F.; LURIA, E. A.; RUADKOW, I. A. **Percursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells a detected by the in vitro colony assay method.** *Exp Hematol.* 1974; 2: 83-92.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J.F.; KULAGINA, N. N. **Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs.** *Experimental Hemetology.* 1976; v. 4, n. 5, p. 267-274.
- FUCHS, J. R.; HANNOUCHE, D.; TERADA, VACANTI, J.P.; FAUZA, D.O. **Fetal tracheal augmentation with cartilage engineered form bone marrow. Mesenchymal progenitor cells.** *Journal pediatric surgical.* 2003; v, 38, n. 6, p. 984-987.
- GAGE, F. H. **Mammalian neural stem cells.** *Science.* 2000; 287 (5457): 1433-1438.
- GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. **From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.** *Journal of Cellular Physiology.* 2007; v. 211, n. 1, p. 27-35.
- GOLDRING, K.; PARTRIDGE, T.; WATT, D. **Muscle stem cells.** *J Pathol.* 2002; 197 (4): 457-67.
- GOMPERTS, B. N.; STRIETER, R. M. **Stem Cell and chronic lung disease.** *Annual Review of Medicine.* Palo Alto. 2007; v.58, n.63, p. 285-300.
- GREEN, A. E.; ATHREYA, B.; LEHR, H. B.; CORIELL, L. L. **Viability of cell cultures following extended preservation in liquid nitrogen.** *Proc Soc Exp Biol Med.* 1967; 124: 1302-1307.
- GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. **Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts.** *Cell.* 1985; 43 (2 Pt 1): 405-13.
- GRIFFITH, L. G.; NAUGHTON, G. **Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities.** *Science.* 2002; 295: 1009-14.
- GRITTI, A.; PARATI, E. A.; COVA, L.; FROLICHSTHAL, P.; GALLI, R.; WANKE, E.; FARAVELLI, L.; MORASSUTTI, D. J.; RIOSEN, F.; NICKEL, D. D.; and VESCOVI, A. L. **Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and selfrenew in response to basic fibroblast growth factor.** *J. Neurosci.* 1996; 16:1091-100.
- GRITTI, A.; VESCOVI, A. L.; GALLI, R. **Adult neural stem cells plasticity and developmental potential.** *Journal of physiology Paris.* 2002; v. 96 (1-2), p. 81-89.
- GRONTHOS, S.; SIMMMONS, P. J. **The Growth factor requiriments of STRO-1<sup>+</sup> humam bome marrow stromal precursors under serum-deprived conditions.** *Blood.* 1995; 85: 929-940.

GROTTO, H. Z. W.; NORONHA, J. F. **A Identificação de células-tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado.** Revista brasileira de hematologia e hemoterapia. São José do Rio Preto. 2003; v. 25, n. 3.

GUILLOT, P. V.; GOTHERSTROM, C.; CHAN, J.; KURATA, H.; FISK, N. M. **Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow fast and have longer telomeres than adult MSC.** Stem Cells. 2007; 25: 646-654.

HARRIS, L. W.; GRIFFITH, J. B. **Relative effects of cooling and warming rates on mammalian cells during the freezethaw cycle.** Cryobiology. 1977; 14: 662-669.

HASHIMOTO, J.; KARIYA, Y.; MIYAZAKI, K. **Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332).** Stem cells. 2006; 24 (11): 2346-54.

HAYASHI, K.; OHTA, H.; KURIMOTO, K.; ARAMAKI, S.; SAITOU, M. **Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cell.** Cell. 2011; doi: 10. 1016/j. Cell. 2011. 06.052.

HAYFLICK, L. **The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains.** Exp. Cell Res. 1965; 37: 614-636.

HEALD, K. A.; HALL, C. A.; DOWNING, R. **Isolation of islets of langerhans from the weanling pig.** Diabets Res. 1991; 17: 7-12.

HERZOG, E. L.; CHAI, I, KRAUSE, D. S. **Plasticity of marrow-derived Stem cells.** Blood, 2003; v. 102, n.10, p. 3483-3493.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC. K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C et al. **Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytoterapy, Oxford. 2005; v. 7, n. 5, p. 393-395.

ISCN: **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Editoras. Lisa G. Shaffer, Niels Tommerup. 2005; p. 130.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. **Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging.** Exp Hematol, 2004; 32: 414- 25.

KEATING, A. **Mesenchymal stromal cells.** Current Opinion I Hematology, Philadelphia. 2006, v. 13, n. 6, p. 419-425.

KENYON, J. & GERSON, S. L. **The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells.** Nucleic Acids Research. 2007; 35 (22): 7557-7565.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; SUKOYAN, M.; PEREIRA, L. V.; CERRUTI, H. **Células-tronco: plasticidade e aplicação.** In: Biotecnologia e Saúde. 1ª ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa Ltda. 2004.

KIM, J.; LEE, Y.; KIM, H.; HWANG, K. J.; KWON, H. C.; KIM, S. K.; CHO, D. J.; KANG, S. G.; YOU, J. **Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells.** *Cell Prolif.* 2007; 40 (1): 75-90.

KIRSCHSTEIN, R. **Stem cells: scientific progress and future research.** Bethesda: The National Institute of Health. Department of Health and Human Services, NIH - 2001. Disponível em: [HTTP: //stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage](http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage). Acesso em: 20/10/2012.

KRALOVANSZKY, J.; HARRINGTON, F.; GREENWELL, A. **Isolation of viable intestinal epithelial cells and their use for in vitro toxicity studies.** *In vivo.* 1990; 4: 201.

KREBSBACH, P. H.; ROBEY, P. G. **Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration.** *J Dent Edu.* 2002; 66 (6): 766-73.

KULTERER, B.; FRIEDL, G.; JANDROSITZ, A.; SANCHES-CABO, F.; PROKESCH, A.; PAAR, C.; SCHEIDELER, M.; and TRAJANOSKI, Z. **Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation.** *BMC Genomics.* 2007; 8: 70.

KUNISAKI, S. M.; FUCHS, J. R.; STEIGMAN, S. A.; FAUZA, D. O. **A comparative analysis of cartilage engineered from different perinatal mesenchymal progenitor cells.** *Tissue Eng.* 2007; 13 (11): 2633-44.

KUNISAKI, S. M.; JENNINGS, R. W.; FAUZA D. O. **Fetal cartilage engineering from amniotic mesenchymal progenitor cells.** *Stem Cells Dev.* 2006; 15 (2): 245-53.

LA RUSSA, V. F.; Schwarzenberger, P.; Miller, A.; Agrawal, K.; Kolls, J.; Weiner, R. **Marrow stem cells, mesenchymal progenitors cells and stromal progeny.** *Cancer Invest.* 2002; 20 (1): 110-23.

LAGASSE, E.; CONNORS, H.; AL-DHALIMY, M.; REITSMA, M.; DOHSE, M.; OSBORNE, L.; WANG, X.; FINEGOLD, M.; WEISSMAN, I. L.; GROMPE, M. **Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo.** *Nat Med.* 2000; v. 6, 1229-1234.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. **Stem Cell Plasticity.** *Blood Rev.* 2005; 19 (1): 29-38.

LASFARGUES, E. Y. **Human mammary tumors.** In Kruse, P., Patterson, M. K. (eds.): **"Tissue Culture Methods and Applications"**. New York, Academic Press. 1973; p. 45-50.

LEE, M. S.; Lin, M.; Makkar, R. R. **Stem cell transplantation in myocardial infarction.** *Rev Cardiovasc Med.* 2004; 5 (2); 82-8.

LEIBO, S. P.; MAZUR, P. **The role of cooling rates in low temperature preservation.** *Cryobiology.* 1971; 8: 447-452.

LEMISCHKA, I. R.; RAULET, D. H.; MULLIGAN, R. C. **Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells.** Cell. 1986; v. 45, n. 6, p. 917-927.

LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. **Células da Medula Óssea e Reparo Cardíaco.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, São Paulo. 2006; v. 87, n. 2.

LI, G. D.; LUO, R.; ZHANG, J.; YEO, K. S.; XIE, F.; TAN, E. K. T.; CAILLE, D.; QUE, J.; KON, O. L.; SALTO-TELLEZ, M.; MEDA, P.; LIM, S. K. **Derivation of functional insulin-producing cell lines from primary mouse embryo culture.** Stem Cell Research, Kidlington. 2009; v. 2, n. 1, p. 29-40.

LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. **Stem cells for the treatment of neurological disorders.** Nature. 2006; 441: 1094-1096.

LODISH, H.; KAISER, C. A.; BERCK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P. **Origem, linhagem e morte celular.** In: LODISH, H.; KAISER, C. A.; BERK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P. Biologia celular e molecular. 2005; 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 22, p. 896-906.

LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. **Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide.** Nature. 1959; 183: 1394-1395.

LUAN, Z; YIN, G. C.; HU, X. H.; WU, N. H.; YAN, F. Q.; QUIAN, Y. M. **Treatment of na infant with severe neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy sequelae with transplantation of human neural stem cells into cerebral ventricle [abstract].** ZHONGHUA ER KE ZA ZHI. 2005; 43: 580-3.

LURIA, E. A.; PANASYUK, A. F.; FIEDENSTEIN, A. Y. **Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells.** Transfusion. 1971; v. 11, p. 345-349.

MARCHENKO, S.; FLANAGAN, L. **Passaging human neural stem cells.** J Vis Exp. 2007; (7): 263.

MARTIN-RENDON, E.; WATT, S. M. **Exploitation of stem cell plasticity** (review article). Transfusion Medicine. 2003; 13: 325-349.

MCHUGH, P. R. **Zygote and clonate – the ethical use of embryonic stem cells.** N Engl J Med. 2004; 351: (3) 209-211.

MEIER, K.; LEHR, C. M.; DAUM, N. **Differentiation potential of human pancreatic stem cells for epithelial and endothelial-like cell types.** Ann Anat. 2009; 191 (1): 70-82.

MEIRELLES, L. da S.; CAPLAN, A. L.; NARDI, N. B. **In search of the in vivo identify of mesenchymal stem cells.** Stem Cells. 2008; v. 9, n. 26, p. 2287-2299.

MEIRELLES, L. da S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. **Mesenchymal stem cells reside invirtually all post-natal organs and tissues.** Journal of Cell Science, London, v. 2006; 119, n. 11, p. 2204-2213.

MEIRELLES, L. da S.; NARDI, N. B. **Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion and characterization.** J Haematol. 2003; 123: 702-711.

MERYMAN, H. T. **Cryopreservation of living cells: principles and practice.** Transfusion. 2007; v. 47, n. 5, p. 935-945.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K. J.; HARTA, G.; MAKI, R.A.; MCKERCHER, S. R. **Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from marrow.** Science. 2000; 290 (5497): 1779- 82.

MIMURA, T.; DEZAWA, M.; KANNO, H.; SAWADA, H.; YAMAMOTO, I. **Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats.** J Neurosurg. 2004; 101: 806-12.

MINGUELLE, J. J.; CONGET, P.; ERICES, A: **Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells.** Braz J Med Biol Res. 2000; 33: 881-7.

MINTZ, B.; ANTHONY, K.; LITWIN, S. **Monoclonal derivation of mouse myeloid and lymphoid lineages from totipotent hematopoietic stem cells experimentally engrafted in fetal hosts.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1984; v. 81, n. 24, p. 7835-7839.

MITALIPOVA, M. M.; RAO, R. R.; HOYER, D. M.; JOHNSON, J. A.; MEISNER, L. F.; JONES, K. L.; DALTON, S.; STICE, S. L. **Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells.** Nature Biotechnology 2005; v. 23, n. 1, p. 19-20.

MOORE, K. E.; MILLS, J. F.; THORNTON, M. M. **Alternative sources of adult stem cells: a possible solution to the embryonic stem cells debate.** Grend Med. 2006; 3 (3); 161-8.

MUSCHLER, G. F.; MINDURA, R. J. **Connective Tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications.** Clin Orthop Relat Res. 2002; 395: 66-80.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. **Células-tronco hematopoiéticas em cães.** Ciência Rural, Santa Maria. 2006; v. 36, n. 1, p. 325-329.

NARDI, N. B. and MEIRELLES, L. da S. **Mesenchymal stem cells: isolation *in vitro* expansion and characterization.** Handbook Experimental Pharmacology, New York. 2006; 174, n. 6, p. 249-282.

NARDI, N. B.; AFONSO, Z. C. **Células-tronco hematopoiéticas.** In: Zago, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina.** São Paulo: Atheneu. 2006; p. 49-54.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. **Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell.** Tissue Engineering: Part A. 2008; v. 14, n. 6, p. 1007-1015.

NHI - National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2008. **Growth Curves.** In: Stem Cell Information. Disponível em: [HTTP://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/growthcurves](http://stemcells.nih.gov/research/nihresearch/scunit/growthcurves). Acesso em: 24 mar. 2012.

NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2001. **Stem Cell: Scientific progress and future research directions.** Disponível em: [HTTP://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage](http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage). Acesso em: 20 jun. 2010.

NIH - National Institutes of Health. Department of Health and Human Services, 2009. **Stem Cell Basics.** Disponível em: [HTTP://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage](http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage). Acesso em: 30 jun. 2010.

NIXON, A. J.; DAHLGREN, L. A.; HAUPT, J. L.; YEAGER, A. E.; WARD, D. L. **Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis.** American Journal of Veterinary Research, Chicago. 2008; v. 69, p. 928-937.

NUGENT, C. I.; BOSCO, G.; ROSS, L. O.; EVANS, S. K.; SALINGER, A. P.; MOORE, J. K. HABER, J. E.; LUNDBLAD, V. **Telomere maintenance is dependent on activities required for repair of double-strand breaks.** Curr boil. 1998; 8 (11): 657-60.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THONSON, J. A. **Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines.** Stem Cells. 2001; v. 19, p.193-204.

OLIVEIRA, L. F. **Avaliação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em ratos normotensos wistar-kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR).** Dissertação de Mestrado em Patologia Clínica - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. 2010; 91 f.

OLSSON, D. C. **Transplante de células-tronco com a fração total de células mononucleares autógenas da medula óssea na lesão iatrogênica aguda de tendão calcâneo de cães.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Centro de Ciências Rurais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria. Rio Grande do Sul. 2009; 110 f.

OWEN, M. **Marrow stromal stem cells.** J. Cell Sci Suppl. 1988; v. 10, p. 63-76.

PARK, K. S.; LEE, Y.S.; KANG, K. S. **In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood.** J Vet Sci. 2006; 7 (4): 343-8.

PARK, Y. & GERSON, S. L. **DNA repair defects in stem cell function and aging.** Annual Review of Medicine. 2005; 56: 495-508.

PATRICIO, L. F. L. **Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco mesenquimais de cães.** Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Paraná. 2010; 95 f.

PAULA, A. C. C. **Osteogênese de células-tronco humanas em matriz tridimensional de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato utilizando meio suplementado com soro**

**humano.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Imunologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais. 2011; 104 f.

PERONI, D.; SCAMBI, I.; PASINI, A.; LISI, V.; BIFARI, F.; KRAMPERA, M.; RIGOTTI, G.; SBARBATI, A.; GALIE, M. **Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells.** Experimental Cell Research. 2008; v. 314, n. 2, p. 603-615.

PETERSEN, B. E.; BOWEN, W. C.; PATRENE, K. D.; MARS, M.W.; SULLIVAN, A. K.; MURASE, N.; BOGGS, S. S.; GRENBERGER, J. S.; GOFF, J. P. **Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.** Science. 1999; 284 (5417): 1168-70.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D et al., **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** Science. 1999; Apr 2; v. 284, n. 5411, p. 143-147.

POUNTOS, I.; GIANNOUDIS, P. V. **Biology of mesenchymal stem cells.** International journal of the care of the injured. 2005; v. 36, p. 8-12.

PRESTON, S. L.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; DIREKZE, N. C.; POULSOM, R.; WRIGHT, N. A. **The new stem cell biology: something for everyone.** Mol Pathol. 2003; 56 (2): 86-96.

PROCKOP, D. J. **Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues.** Science. 1997; 276: 71-4.

PROCKOP, D. J.; GREGORY, C. A.; SPEES, J. L. **One strategy for cell and gene therapy; Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues.** Proc Natl Acad Sci. 2003; 100 Suppl 1: 11917-23.

QU, S. Q.; LUAN, Z.; YIN, G. C.; GUO, W. L.; HU, X. H.; WU, N. H.; YAN, F. Q.; QIAN, Y. M. **Transplantation of human fetal neural stem cells into cerebral ventricle of the neonatal rat following hypoxic-ischemic injury: survival, migration and differentiation [abstract].** ZHONGHUA ER KE ZA ZHI. 2005; 43: 576-9.

RAFF, M. **Adult stem cell plasticity: fact or artifact?** Annual review of cell developmental biology, Palo Alto. 2003, v; 19, n. 1, p. 1-22.

RATHJEN, J.; RATHJEN, P. D. **Embryonic stem cells isolation and application of pluripotent cells from the pregastrulation mammalian Embryo.** In: Sell, S. Stem cells handbook. Totowa: Human Press. 2004; cap. 3, p. 33-44.

REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C-Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. **Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro.** Nat Biotechnol. 2000; 18: 399-404.

ROLLIG, C.; BABATZ, J.; WAGNER, I.; MAIWALD, A.; SCHWARZE, V.; EHNINGER, G.; BORNHAUSER, M. **Thawing of cryopreserved mobilized peripheral blood-comparison between waterbath and dry warming device.** Cytotherapy. 2002; v. 4, n. 6, p. 551-555.

RUBIO, D.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTIN, M. C.; de La fuente, R.; CIGUDOSA, J. C.; LLOYD, A. C.; BERNARD, A. **“Spontaneous human adult stem cell transformation.”** Cancer Res. 2005; 65 (8): 3035-9.

RUSSEL, W. M. S. & BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique.** England: Universities Federation for Animal Welfare (UFAW). 1992.

SANDEL, M. J. **Embryo ethics – the moral logic of stem cell research.** N Engl J Med. 2005; 351: 207-209.

SANTOS, R. R.; SOARES, M. B. P.; CARVALHO, A. C. C. **Transplante de células da medula óssea no tratamento da cardiopatia chagásica crônica.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro. 2004; v. 37, n. 6, p. 490-495.

SCHWARTZ, R. E.; REYES, M.; KOODIEL, L.; JIANG, Y.; BLACKSTAD, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; JOHNSON, S.; HU, W. S.; VERFAILLIE, C. M. **Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.** J Clin Invest. 2002; 109: 1291-302.

SCHWINDT, T. T, BARNABÉ, G. F. MELLO, L. E. A. M. **Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco.** Jornal Brasileiro de Neurocirurgia, Rio de Janeiro. 2005, v. 16 (1), p. 13-19.

SEO, M.; JEONG, Y.; PARK, J.; PARK, S.; RHO, K. **Isolation and characterization of canine umbilical Cord blood-derived mesenchymal stem cells.** Journal Veterinary Science. 2009; v. 10, p. 181-187.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONAVAN, P. J.; BLUMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. **“Derivation of Pluripotent Stem Cells from Cultured Human Primordial Germ Cells”.** Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 1998; 95: 13726-13731.

SHIBATA, K. R.; AOYAMA, T.; SHIMA Y.; FUKIAGE, K.; OTSUKA, S.; FURU, M.; KOHNO, Y.; ITO, K.; FUGIBAYASHI, S.; NEO, M.; NAKAYAMA, T.; NAKAMURA, T.; TOGUCHIDA, J. **Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cell and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion.** Stem Cells. 2007; 25: 2371-2382.

SLACK, J. M. **Stem cells in epithelial tissues.** Science. 2000; 287 (5457): 1431-3.

STOLZING, A.; JONES, E.; MCGONALE, D.; SCUTT, A. **Age related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies.** Mech Ageing Dev. 2008; 129: 163-173.

SUNG, J. H.; YANG, H. M.; PARK, J. B.; CHOI, G. S.; JOH, J. W, KWON, C. H.; CHUN, J. M.; LEE, S. K.; KIM, S. J. **Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells.** Transplantation proceedings. 2008; v. 40, p. 2649-2654.

TAM, W. L.; ANG, Y. S.; LIM, B. **The molecular basic of ageing in stem cells.** Mech Ageing Dev. 2007, 128 (1): 137-48.

TAPP, H.; HANLEY JR, E.N.; PATT, J.C.; GRUBER, H.E. **Adipose-derived stem cells: characterization and current applications in orthopaedic tissue repair.** *Experimental Biology and Medicine.* 2009, v. 234, p. 1-9.

TARNOWSKI, M.; SIERON, A. L. **Adult stem cells and ability to differentiate.** *Med Sei Monit.* 2006; 12 (8): 154-163.

THOMSOM, J. A. J.; ISKOVITZ-ELDOR, S. S.; SHAPIRO, M. A.; WAKNITZ, J. J.; SWIERGIEL, V. S.; MARSHALL, J. M. JONES. **“Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.”** *Science.* 1998; 282: 1145-1447.

UCCELLI, A.; PISTOIA, V.; MORETA, L. **Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression?** *Trends Immunol.* 2007; 28, 219-226.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C. M.; HU, W. **Culture systems for pluripotent stem cells.** *J Biosci Bioeng.* 2005; 100 (1): 12-27.

VALORANI, M. G.; GERMANI, A.; OTTO, W. R.; HARPER, L.; BIDDLE, A.; KHOO, C. P.; LIN, W. R.; HAWA, M. I.; TROPEL, P.; PATRIZI, M. P.; POZZILLI, P.; ALISON, M. R. **Hypoxia increases Sca-1/CD44 co-expression in murine mesenchymal stem cells and enhances their adiogenic differentiation potential.** *Cell Tissue Res.* 2010; 341 (1) p. 111–120.

VAZ, C. E. S. **Avaliação do efeito do centrifugado osteogênico de medula óssea na consolidação de fratura: estudo experimental em coelhos.** (Tese) Doutorado em Ortopedia e Traumatologia - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2006; 109 f.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, F. M.; LANDSDORP, P. M. **Stem cell: hype and reality.** *Hematology.* 2002; 369-391.

WAGERS, A. J. and WIESSMAN, I. L. **“Pasticity of adult stem cells.”** *Cell.* 2004; 116 (5): 639-48.

WAYMOUTH, C. **To Disaggregate or not to disaggregate. Injury and cell disaggregation, transient or permanent?** *In Vitro.* 1974; 10: 97-111.

WEXLER, S. A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; PRICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J. M. **Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not.** *Br J Haematol.* 2003; 121: 368-74.

WHATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. **Out of Éden: Stem cells and their niches.** *Science.* 2000; v. 278, p. 1427-1430.

WURMSER, A. E.; PALMER, T. D.; GAGE, F. H. **Neuroscienc. Cellular interactions in the stem cell niche.** *Science.* 2004; 304: 1253-5.

Yeh ETH, ZHANG, S.; Wu, H. D.; KORBING, M.; WILLERSON, J. T.; ESTROV, Z. **Transdifferentiation of human peripheral blood CD34 – enriched cell population into**

**cardiomyocytes, endothelial and cell smooth muscle cell in vivo.** *Circulation*. 2003; 108 (17): 2070-73.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Pesquisas com células-tronco: Aspectos científicos, éticos e sociais.** In: Seminário do Instituto Fernando Henrique Cardoso, São Paulo. Anais... São Paulo: Instituto Fernando Henrique Cardoso, 2004; p. 23.

ZATZ, M. **Clonagem e célula-tronco.** Estudos avançados, São Paulo. 2004; v. 18, n. 51.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F. S.; MURAD, F.; Yeh, E.; BUJA, L. M.; De CATERINA, R.; WILLERSON, J. T.; GENG, Y. **Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, Methods, and clinical applications.** *Journal of Cardiothoracic-Renal Research*, 2006; 1: 3-14.

ZHAO, C. P.; ZHANG, C.; ZHOU, S. N.; XIE, Y. M.; WANG, Y. H.; HUANG, H.; SHANG, Y. C.; LI, W. Y.; ZHOU, C.; YU, M. J.; FENG, S. W. **Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice.** *Cytherapy*. 2007; 9: 414-426.

ZHENG, Y. B.; GAO, Z. L.; XIE, C.; ZHU, H. P.; PENG, L.; CHEN, J. H.; CONG, Y. T. **Charaterization and hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human amniotic fluid and human bone marrow: a comparative study.** *Cell Biol Int*. 2008; 32 (11): 1439-48.

ZHOU, S.; GREENBERGER, J. S.; EPPERLY, M. W.; GOFF, J. P.; ADLER, C.; LEBOFF, M. S.; GLOWACKI, J. **Age-related intrinsic derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts: changes in human bone marrow** *Aging Cell*. 2008; 7: 335-343.

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*. 2002; Vol. 13, 4279-4295.