

# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS MULTIPOTENTES MESENQUIMAIS ESTROMAIS DE MEDULA ÓSSEA PARA ESTUDO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO EM DOENÇAS CARDIOVASCULARES

NAYARA DE FREITAS MARTINS, FERNANDA BARRA FRANCO, FERNANDA SOUZA MARTINS, LAIS MARTINS DE AQUINO<sup>1</sup>  
PATRÍCIA FIDELIS DE OLIVEIRA<sup>2</sup>

## RESUMO

Células multipotentes mesenquimais estromais (MSC) de medula óssea são células com características de células-tronco. O presente estudo visou o estabelecimento da cultura de MSC, obedecendo critérios mínimos ditados pela *Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT)* para futuros ensaios terapêuticos em doenças cardiovasculares. A cultura de MSC foi feita por meio da extração da medula óssea total a partir dos fêmures e tíbias de ratos Wistar. O conteúdo medular total foi plaqueado e mantido em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37° C. Após a terceira passagem, as células foram submetidas aos protocolos de diferenciação em adipócito e osteócito. As condições adipogênicas (dexametasona 10<sup>-6</sup>M e insulina 10 µg/mL) e osteogênicas (dexametasona 10<sup>-7</sup>M, ácido ascórbico 200 µM e β-glicerolfosfato 10mM) foram mantidas por 28 dias (2 trocas/semana). As revelações da diferenciação em adipócitos e osteócitos foram feitas por meio das colorações de Oil Red O e Alizarin Red respectivamente. Culturas de fibroblastos cardíacos (FC) foram utilizadas como controle negativo da diferenciação. Após 28 dias de indução, observou-se vacúolos lipídicos e deposição de cálcio nas culturas de MSC, características sugestivas da diferenciação em adipócito e osteócito, respectivamente, enquanto que a cultura de FC não apresentou tal capacidade de diferenciação. O protocolo adotado mostra que a partir do plaqueamento de medula óssea total é possível identificar, dentro da população aderente estromal, células com capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos, características atribuídas à MSC e que estão de acordo com os critérios mínimos ditados pela *ISCT*.

**Palavras-Chave:** Células multipotentes mesenquimais, Medula óssea, Adipogênese e osteogênese.

---

<sup>1</sup> UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, ALUNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - CURSO BIOMEDICINA - INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS.

<sup>2</sup> UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU - DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA - ÁREA DE CONHECIMENTO: FISIOLÓGIA.

## ABSTRACT

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) from bone marrow are cells with characteristics of stem cells. The present study aimed at establishing culture of MSC, following minimum criteria dictated by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) for future therapeutic trials in cardiovascular disease. The MSC culture was obtained by extracting total bone marrow from femur and tibia of Wistar rats. The total bone marrow content was plated and maintained in DMEM with 10% fetal bovine serum in CO<sub>2</sub> incubator (5%) at 37 ° C. After the third passage, the cells were submitted to protocols of adipocyte and osteocytes differentiation. The adipogenic (dexamethasone 10<sup>-6</sup>M and insulin 10 mg/ml) and osteogenic (dexamethasone 10<sup>-7</sup>M, ascorbic acid 200 mM and β-glycerol phosphate 10mM) conditions were maintained for 28 days (two exchange / week). The revelations of differentiation into adipocytes and osteocytes were made by staining the culture with Oil Red O and Alizarin Red, respectively. Cardiac Fibroblast cultures (CF) were used as negative control of differentiation. After 28 days, lipid vacuoles and calcium deposition were observed in MSC cultures, features suggestive of adipocyte and osteocyte differentiation, respectively, while the CF culture showed no such capacity to differentiate. The present protocol shows that within stromal adherent cell population derived from whole bone marrow can be possible to identify cells capable of differentiation into adipocytes and osteocytes, features assigned to the MSC which are in accordance with the minimum criteria dictated by ISCT.

**Keywords:** Multipotent mesenchymal cells, Bone marrow, Adipogenesis and osteogenesis.

## INTRODUÇÃO

A célula-tronco é uma célula indiferenciada, sem especialização funcional e sem marcadores de diferenciação tecido-específico, com capacidade de proliferação, auto-renovação e plasticidade.

Considerando a classificação das células-tronco quanto à origem, as células-tronco adultas têm sido investigadas por diferentes autores (WEISS *et al*, 1996; ANVERSA; NADAL-GINARD, 2002) devido ao fato de apresentar vantagens de aplicação terapêutica em relação aos demais tipos de células-tronco tais como possibilidade de transplante autólogo, dispensa de imunossupressores e menor potencial teratogênico. Há evidências que esse tipo celular está presente em praticamente todos os tecidos adultos tais como hematopoiético (ORLIC, 2003), neural (WEISS *et al*, 1996), adiposo (PARKER *et al*, 2007), cardíaco (ANVERSA; NADAL-GINARD, 2002), gastrointestinal (WRIGHT; PIKE; ELIA, 1990), epidermal (JONES; WATT, 1993; JONES, 1996), hepático (JIANG Z-S *et al*, 2002), vascular (LERI *et al*, 2011), muscular (DEASY *et al*, 2002), pancreático (SPEES *et al*, 2003), de cordão umbilical (KIM *et al*, 2004; LEE *et al*, 2004), dentre outros. As células-tronco adultas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos, pelo reparo diante de lesões e pela remodelação tecidual (BARRY; MURPHY, 2004).

Dentre as fontes mais utilizadas para extração de células-tronco adultas tem-se a medula óssea justificada pelo fato destas células apresentarem a capacidade de se diferenciar *in vitro* em células oriundas da mesma camada germinativa (PITTENGER *et al*, 1999; PHINNEY *et al*, 1999), pela facilidade de obtenção a partir da crista ilíaca em humanos, por dispensar a necessidade de um doador compatível e poder ser obtida do próprio paciente (transplante autólogo), e ainda por dispensar o uso de imunossupressores (FUJIKAWA *et al*, 2005).

A medula óssea é composta por duas linhagens celulares distintas: a linhagem hematopoiética e a linhagem estromal. Estas duas populações formam um sistema cooperativo. As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) são responsáveis por dar origem às células da linhagem mielóide e linfóide. As células do estroma medular, por sua vez, compreendem uma população heterogênea constituída de reticulócitos endoteliais, fibroblastos, adipócitos e células precursoras osteogênicas que provêm o suporte trófico para manutenção de um microambiente de preservação das CTHs. Tais células foram primeiramente isoladas por Friedenstein *et al* (1976), baseando-se na propriedade que essas

células apresentam de aderência à superfície dos frascos de cultura. Essa população aderente ao frasco de cultura foi denominada em seu conjunto como Células de Estroma de Medula Óssea (CEMO). Dentro da população estromal encontram-se, em pequena porcentagem (0.0001 - 0.01%) (ROBERTS, 2004; PITTENGER *et al*, 1999) as células-tronco não hematopoiéticas. Atualmente, tais células são denominadas células-tronco multipotentes mesenquimais de medula óssea (MSC) devido a suas características de auto-renovação, proliferação e capacidade de diferenciação restrita a linhagem mesodermal (DELORME, *et al*, 2009). Diante das características atribuídas as MSC surgiu a proposta da terapia celular buscando uma melhora funcional do órgão após injúria por meio da diferenciação das MSC transplantadas em células do tecido receptor.

Especificamente em doenças cardiovasculares, de fato, diferentes grupos de pesquisa observaram resultados favoráveis em relação à melhora da função cardíaca em corações infartados que receberam transplante de MSC (AMADO *et al*, 2005; SHAKE *et al*, 2002). Em geral, os estudos mostram que o procedimento de implantação dessas células em animais (ORLIC *et al*, 2001a,b) e seres humanos (PERIN *et al*, 2003) é seguro, possível e efetivo em termos de melhorar a taxa de perfusão da área miocárdica infartada, sendo o mecanismo de diferenciação a hipótese imediata aventada para explicar a melhora funcional.

Apesar da proposta inicial da terapia celular ter sido baseada no princípio da diferenciação das células-tronco em células do tecido receptor (ORLIC *et al*, 2001a; SHAKE *et al*, 2002; AMADO *et al*, 2005), o mecanismo da diferenciação parece ser improvável, visto que há evidências de que pareça não ocorrer *in vivo* (WURMSER; GAGE, 2002; MURRY *et al*, 2004; NYGREN *et al*, 2004). Em adição, estudos genéticos detalhados mostraram que as células quando injetadas no tecido receptor apresentavam-se tetraplóides e hexaplóides, fato que sugeriu que a aparente diferenciação estava relacionada a um processo de fusão das células transplantadas com o tecido receptor (TERADA *et al*, 2002; YING *et al*, 2002; ALVAREZ-DOLADO *et al*, 2003; NYGREN *et al*, 2004). Entretanto, mesmo o processo de fusão seria insuficiente para explicar a melhora funcional após terapia celular, visto ser um evento que ocorre em baixa frequência (ALVAREZ-DOLADO *et al*, 2003).

Diante do debate entre diferenciação e/ou fusão, estudos mais recentes sugerem que a melhora funcional observada em coração infartado após a terapia celular seria devido à ação parácrina (KINNAIRD *et al*, 2004a,b; GNECCHI *et al*, 2005; MIROTSOU *et al*, 2011) mediada pelas MSC por meio da secreção de citocinas e fatores solúveis com efeito arteriogênico (KINNAIRD *et al*, 2004a,b), anti-apoptótico (GNECCHI *et al*, 2005) e

antinecrótico (Fidelis-de-Oliveira et al., 2012) que culminaria na melhora da contratilidade cardíaca (GNECCHI *et al*, 2005; UEMURA *et al*, 2006; Fidelis-de-Oliveira *et al*, 2012).

Apesar do grande número de estudos que investigam o uso de MSC em doenças cardiovasculares não havia, até recentemente, uma padronização quanto à obtenção, cultivo e nomenclatura destas células dificultando a comparação direta dos resultados experimentais (PHINNEY; PROCKOP *et al*, 2007) e a evolução das pesquisas nesta referida área.

Em 2006, diante de tal heterogeneidade na metodologia para obtenção destas células, a ISCT se pronunciou ditando os critérios de aderência ao frasco de cultura, fenótipo positivo para CD105, CD73 e CD90, fenótipo negativo para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e, HLA-DR e capacidade de diferenciação, *in vitro*, em osteoclastos, adipócitos e condroblastos como critérios mínimos para se denominar uma população como MSC (DOMINICI *et al*, 2006). Em adição, a ISCT recomenda que os laboratórios com linhas de pesquisas que envolvam MSC primeiramente validem seu método de obtenção por meio da caracterização segundo os critérios mínimos ditados por tal sociedade.

Dentro deste contexto, o presente estudo visou o estabelecimento da cultura de MSC no laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia – UFU seguindo alguns critérios ditados pela ISCT, com o intuito de fornecer subsídios primordiais para futuros estudos na área de terapia celular em doenças cardiovasculares visando avaliar a importância da via parácrina na cardioproteção mediada pelas MSC.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 ANIMAIS**

Para alcançar os objetivos propostos foram realizados 8 experimentos independentes, sendo cinco experimentos referentes à indução de diferenciação de MSC e três referentes à indução de diferenciação de fibroblastos cardíacos. Para tanto foram utilizados ratos Wistar fêmea de dois meses e meio, pesando entre 200-250g para obtenção da cultura de MSC e ratos Wistar neonatos (0-4 dias) fêmeas e machos.

Todos os animais foram fornecidos pelo depositário de animais da Área de Ciências Fisiológicas – ARFIS, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, onde permaneceram em condições de livre acesso a comida e água e ciclo claro-escuro de 12 horas até a realização dos experimentos.

O presente trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU sob o protocolo de registro CEUA/UFU 003/10.

## 2.2 EXTRAÇÃO DO CONTEÚDO TOTAL DA MEDULA ÓSSEA POR CENTRIFUGAÇÃO DIRETA DOS OSSOS

É comum na literatura encontrarmos duas formas para a obtenção do conteúdo medular murino: 1) lavagem manual do canal medular (flushing) (PHINNEY *et al*, 1999) ou 2) centrifugação direta dos ossos (DOBSON *et al*, 1999). Em experimentos prévios piloto, observou-se que a extração do conteúdo total da medula óssea por centrifugação direta dos ossos era mais vantajosa se comparada ao método de lavagem manual do canal medular visto que era obtido um número maior de células agregado a um menor tempo gasto com o procedimento e conseqüente menor risco de contaminação. Em adição, o método de centrifugação direta dos ossos auxilia na eliminação de variações entre diferentes experimentadores uma vez que o procedimento manual é minimizado e os parâmetros tais como tempo e velocidade de centrifugação são fixos. Portanto, o método escolhido para obtenção do conteúdo medular total foi à extração por centrifugação direta dos ossos.

Primeiramente os animais foram heparinizados com 0,2 mL de heparina sódica (5000 UI/mL), anestesiados com tiopental sódico (10mg/100g de peso corporal) e sacrificados por deslocamento cervical para retirada da tíbia e fêmur. Os ossos tiveram suas epífises cortadas, observando sempre o acesso efetivo ao canal medular por meio da inserção de uma agulha de gauge 22G1 (25x0,7 mm). Para aplicação do método de centrifugação houve a necessidade da construção de um dispositivo visando separar espacialmente os ossos do sedimento celular. Tal dispositivo era constituído de um tubo cônico do tipo falcon de 15 mL e um suporte para o osso confeccionado de forma artesanal utilizando uma ponteira de pipetador automático de 1000µl, o qual teve sua extremidade cônica inferior cortada em 1cm por um bisturi. Este suporte era colocado no interior do tubo e o conjunto era previamente autoclavado.

No momento do experimento e previamente à inserção dos ossos, um volume de 1 mL de DMEM sem soro era adicionado ao dispositivo com o objetivo de receber em condições fisiológicas o sedimento celular após a centrifugação dos ossos. Após retirada das epífises ósseas, cada osso era cuidadosamente posicionado no interior da ponteira e submetido à centrifugação de 700 *xg* por 10 minutos para a obtenção do sedimento celular. Após a centrifugação, os ossos permaneciam no interior da ponteira enquanto o sedimento celular depositava-se no fundo do tubo cônico. A ponteira com os ossos era então retirada com o

auxílio do pipetador automático, ficando no fundo do tubo somente o sedimento celular. O sedimento celular foi ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 5ml de DMEM com soro e, uma alíquota de 10µl da solução foi diluída 40 vezes em Solução Salina Balanceada (BSS) para a contagem e cálculo da viabilidade celular em hematocitômetro por meio da exclusão do corante azul de Trypan.

### 2.3 ENSAIO DE DENSIDADE DE PLAQUEAMENTO

Alguns estudos sugerem que a densidade de plaqueamento interfere no crescimento e manutenção da cultura de MSC (NEUHUBER *et al*, 2008). Portanto foram realizados experimentos investigando o efeito da densidade de plaqueamento na evolução da cultura de células de medula óssea até a terceira passagem com tripsina. Para análise da densidade ideal, foram utilizadas três diferentes densidade de plaqueamento: a) muito baixa densidade ( $2 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup>); b) baixa densidade ( $2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>) e c) alta densidade, ( $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^6$  células/cm<sup>2</sup>).

Todos os frascos de cultura foram mantidos nas mesmas condições ideais em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>, com trocas regulares de meio na frequência de duas vezes por semana. A densidade eleita foi aquela que possibilitou a expansão da cultura até a terceira passagem com tripsina, momento este em que as células são submetidas ao protocolo de diferenciação.

### 2.4 EXPANSÃO DA CULTURA DE MSC

Após escolha da alta densidade de plaqueamento como ideal, foram iniciados os experimentos de expansão da cultura visando o desenvolvimento do protocolo de diferenciação.

As células foram plaqueadas na alta densidade de  $8 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em garrafas de poliestireno de 25 cm<sup>2</sup> e mantidas em DMEM suplementado com 10% SFB, 2mM de L-glutamina e 1% de solução penicilina-estreptomicina (10.000U/mL-10mg/mL). As condições da cultura foram mantidas constantes em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a obtenção da população aderente ao frasco de cultura foram aguardados 7 dias após o plaqueamento inicial. Neste intervalo de tempo, ao completar 3 dias, o meio contendo o sobrenadante celular foi recolhido e centrifugado à 700 xg por 10 minutos. O sedimento

celular obtido foi ressuspenso e devolvido à garrafa de cultura. Com os 7 dias completos, o meio contendo as células mortas e não aderentes foi desprezado. As células aderentes foram mantidas em cultura em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e com trocas regulares de meio duas vezes por semana para reposição de nutrientes e retirada de resquícios de células hematopoiéticas não aderentes.

Atingida uma confluência de aproximadamente 80-90% as culturas foram submetidas à passagem com tripsina visando à purificação e expansão celular. A cada garrafa de 25 cm<sup>2</sup> foram adicionados 2ml de uma solução enzimática de tripsina (0,25%) por 5 minutos para promover a soltura das células do frasco de cultura. A partir de 3 minutos de ação da tripsina foi realizada ação mecânica com pipeta Pasteur para auxiliar na soltura das células.

Decorrido o tempo de ação da tripsina, a mesma era inativada pela adição de 6ml de DMEM com soro. O conteúdo com as células foi então coletado e submetido à centrifugação de 700xg por 10 minutos para a obtenção do sedimento celular. O sedimento foi ressuspenso em 5ml de DMEM com soro, sendo que deste volume foi retirada uma alíquota de 10µl para a contagem do número de células e cálculo da viabilidade celular em hematocitômetro por meio da técnica de coloração com o corante azul de Trypan. As células foram replaqueadas na densidade de 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%), a 37 °C.

Cada procedimento realizado com o uso da tripsina foi denominado passagem. Uma vez atingido novamente o estado de confluência de 80 a 90%, o procedimento de tripsinização e replaqueamento era repetido conforme descrito anteriormente. Foram realizadas três passagens com tripsina até o momento da indução à diferenciação.

## 2.5 OBTENÇÃO E EXPANSÃO DE FIBROBLASTOS CARDÍACOS

A cultura de Fibroblastos Cardíacos (FC) foi utilizada como controle negativo dos protocolos de diferenciação. Para tanto, foram utilizados ratos Wistar neonatos com 1-4 dias de nascimento. Os animais foram rapidamente sacrificados por decapitação e os corações removidos e colocados em béquer de 10mL contendo Solução de Fosfato Balanceada (PBS) gelada. Durante a remoção do coração, o corte foi feito de modo a retirar somente os ventrículos. Foi utilizada uma média de 10 a 12 corações por experimento. Em seguida, os corações foram transferidos para outro béquer preenchido com solução de dissociação (NaCl 136,7 mM; KCl 2,68 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,352 mM; NaHCO<sub>3</sub> 11,9 mM; Dextrose 11 mM) contendo pancreatina 1,25 mg/mL e Albumina Sérica Bovina (BSA) 3mg/mL. Os corações foram cortados em pequenos pedaços com auxílio de tesoura e pinça e transferidos para um



frasco contendo uma barra magnética e 5 mL de solução de dissociação. O conteúdo foi mantido por 5 minutos a 37° C em banho-maria posicionado sobre uma placa de aquecimento e agitação magnética.

Após os 5 minutos de digestão, o conteúdo digerido foi transferido para um tubo de 15 mL e a ação enzimática foi bloqueada adicionando-se 5 mL de DMEM com 10% SFB. Em seguida, o conteúdo dissociado era centrifugado a 700 *xg* por 5 minutos. Ao final de cada centrifugação o sedimento celular era ressuspenso em aproximadamente 1 mL de DMEM com 10% SFB e mantido em estufa a 37° C. Os conteúdos resultantes da primeira e segunda digestão são normalmente ricos em fibroblastos cardíacos e foram coletados para um pré-plaqueamento de 2 horas, mantendo-se as garrafas de cultura a 37° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Visto que os fibroblastos aderem mais rapidamente ao frasco de cultura, o pré-plaqueamento tem por objetivo isolar este tipo celular dos cardiomiócitos.

A cultura de FC foi mantida a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> com trocas regulares de meio. Quando atingiram de 80-90% de confluência, a cultura foi submetida à passagem com tripsina seguindo o mesmo protocolo utilizado para as MSC. Foram realizadas três passagens com tripsina até o momento da indução à diferenciação. A adipogênese e osteogênese foram induzidas utilizando os mesmos protocolos de diferenciação descritos para as MSC.

## 2.6 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO

Atingida a terceira passagem com tripsina (cerca de 35 dias após o plaquemanto inicial), as MSC e FC foram replaqueados em placa de 6 poços na densidade de  $2 \times 10^5$  células por poço ( $\sim 2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). As células foram mantidas em meio de cultura DMEM com 10% de SFB até atingirem uma confluência de 90% (aproximadamente 7 dias) e em seguida foram submetidas aos protocolos de diferenciação em adipócito e osteócito.

### 2.6.1 Adipogênese

A diferenciação adipogênica foi induzida cultivando-se as células por até 28 dias em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino suplementado com  $10^{-6}$  mol/L de dexametasona e 10µg/mL de insulina (modificação de PHINNEY *et al*, 1999, CARVALHO *et al*, 2008). Foram efetuadas trocas regulares do meio de indução com frequência de duas vezes por

semana durante 28 dias. Durante este período foram obtidas imagens digitais da cultura nos tempos de 0, 14 e 28 dias após o início da adipogênese.

A diferenciação em adipócito foi visualizada em microscópio óptico pela presença dos grandes vacúolos intracelulares contendo lipídeos neutros. Objetivando-se confirmar a diferenciação adipogênica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em solução tampão de fosfato por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram coradas por 50 minutos à temperatura ambiente com solução do corante Oil Red O (0,36% em isopropanol 60%), onde os vacúolos intracelulares foram corados em vermelho.

Para possível avaliação e comparação os poços controles foram mantidos em cultura por 28 dias em presença de DMEM com 10% de SFB, porém desprovidos de dexametasona e insulina. Ao final de 28 dias, os poços controles foram igualmente submetidos à coloração com o corante Oil Red O.

### **2.6.2 Osteogênese**

A diferenciação osteogênica foi induzida cultivando-se as células por até 28 dias em meio de cultura DMEM com 10% de SFB suplementado com  $10^{-7}$  mol/L de Dexametasona, 200  $\mu$ M de ácido ascórbico 2-fosfato e 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato (PHINNEY *et al*, 1999). Foram efetuadas trocas regulares do meio de indução com frequência de duas vezes por semana por um período de 28 dias. Durante este período foram retiradas fotos 0, 14 e 28 dias após o início da osteogênese. Para observar a deposição de cálcio, característica sugestiva de diferenciação em osteócito, a cultura foi lavada uma vez com PBS e corada por 30 minutos em temperatura ambiente com o corante Alizarin Red (2% p/v), pH 4.2 ajustado com hidróxido de amônio. O excesso de corante foi removido por lavagens sucessivas com água destilada e os osteócitos e a matriz extracelular contendo depósito de cálcio foram corados em vermelho alaranjado.

A condição controle foi estabelecida cultivando-se as células em meio DMEM com 10% de SFB na ausência dos fatores osteogênicos. Após 28 dias na condição controle, a cultura foi submetida igualmente ao protocolo de coloração com Alizarin Red.

## **2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A avaliação do número de células obtidas em cada passagem foi feita utilizando análise de variância de uma via (ANOVA ONE WAY) para medidas repetidas, seguida de

pós-teste de Bonferroni. A avaliação do processo de diferenciação foi feita de forma qualitativa.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ENSAIO DE DENSIDADE DE PLAQUEAMENTO

As culturas plaqueadas em muito baixa densidade ( $2 \times 10^2$  células/  $\text{cm}^2$ ) e baixa densidade ( $2 \times 10^3$  células/  $\text{cm}^2$ ) não apresentaram crescimento adequado e não foram capazes de expandir até a terceira passagem. Tal fato pode ser visualizado nas figuras 1A e 1B que mostram uma baixa confluência da cultura de células da medula óssea quando plaqueadas em muito baixa e baixa densidade, respectivamente.

Porém, quando as células de medula óssea total foram plaqueadas em alta densidade,  $2 \times 10^5$  células/  $\text{cm}^2$ , a cultura apresentou confluência próxima de 95% (avaliação qualitativa) duas semanas após o plaqueamento inicial (FIGURA 1C). Logo, a alta densidade de plaqueamento foi escolhida para desenvolvimento do presente estudo.

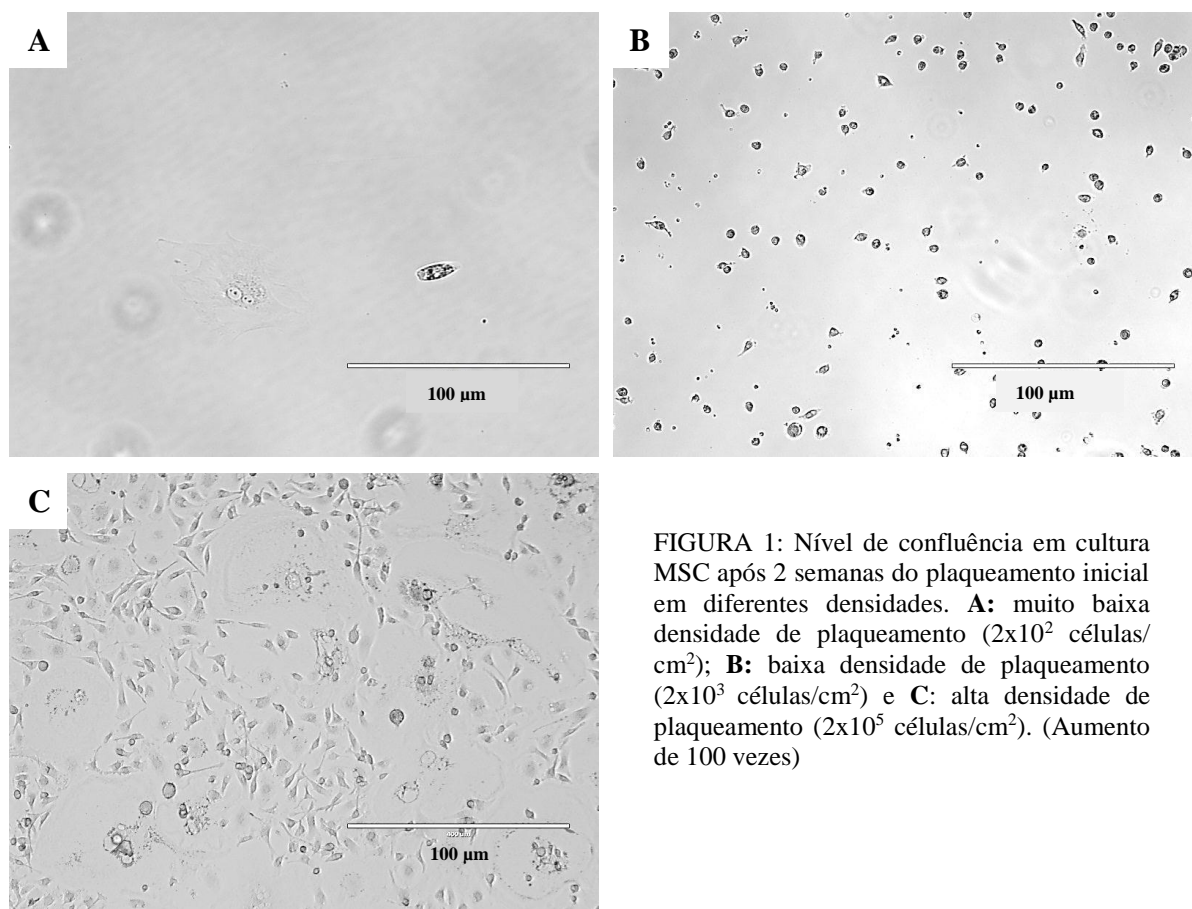


FIGURA 1: Nível de confluência em cultura MSC após 2 semanas do plaqueamento inicial em diferentes densidades. **A:** muito baixa densidade de plaqueamento ( $2 \times 10^2$  células/  $\text{cm}^2$ ); **B:** baixa densidade de plaqueamento ( $2 \times 10^3$  células/  $\text{cm}^2$ ) e **C:** alta densidade de plaqueamento ( $2 \times 10^5$  células/  $\text{cm}^2$ ). (Aumento de 100 vezes)

### 3.3 OBTENÇÃO E EXPANSÃO DA CULTURA DE MSC

Após a obtenção do conteúdo medular total pelo método de centrifugação direta dos ossos, as células foram plaqueadas em alta densidade ( $8 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) e mantidas em condições padrão de cultura (37° C com 5% de CO<sub>2</sub>). As células foram fotografadas ao longo do estudo para avaliação e registro da morfologia e nível de confluência. O critério de aderência ao frasco de cultura é o primeiro ditado pela *ISCT* para a definição de MSC. Após uma semana de cultura, a população não aderente foi desprezada e passamos a trabalhar somente com a população aderente ao frasco de cultura.

Inicialmente, todas as células plaqueadas apresentaram aspecto arredondado. No entanto, foi possível observar que, após uma semana (FIGURA 2A), parte das células da população aderente começa a apresentar aspecto fibroblástico o qual se mostrou mais nítido ao final de duas semanas de plaqueamento (FIGURA 2B). A aderência ao frasco de cultura e a morfologia fibroblástica são características comuns às MSC.

Quando as culturas atingiram confluência de 80-90%, cerca de duas semanas após o plaqueamento inicial, estas foram submetidas à passagem com tripsina buscando a purificação e expansão celular. Foi observada variação quanto ao número de células obtidas nas passagens com tripsina para cada cultura independente de MSC (Figura 3A). A figura 3B mostra que não houve diferença entre o número médio de células em cada passagem com tripsina (P1 =  $18 \times 10^5 \pm 5$ ; P2 =  $32 \times 10^5 \pm 13$ ; P3 =  $62 \times 10^5 \pm 35$ ) para as cinco culturas independentes de MSC.

A figura 4 mostra fotos representativas de uma cultura de MSC em diferentes passagens com tripsina. Observa-se que a morfologia fibroblástica foi mantida ao longo das três passagens.

As culturas de MSC foram repicadas até atingirem a terceira passagem, onde foram então replaqueadas em placas de 6 poços na densidade aproximada de  $2 \times 10^5$  células por poço ( $\sim 2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Após alcançada a confluência de 80-90%, as culturas foram submetidas ao processo de indução de diferenciação em adipócito e osteócito, critério também ditado pela *ISCT*.

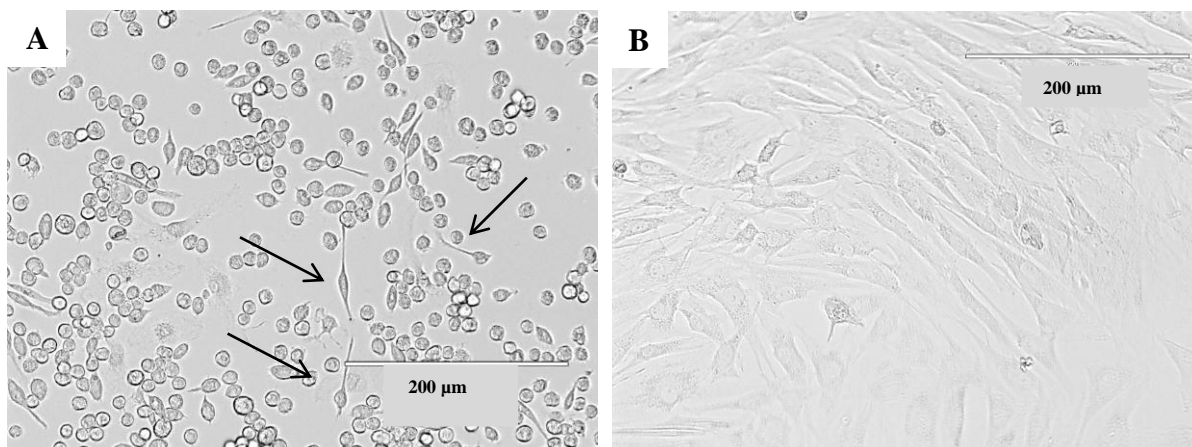


FIGURA 2: Aspecto morfológico da cultura de MSC plaqueada em alta densidade ( $8 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>) após 1 (A) e 2 (B) semanas do plaqueamento inicial. Observa-se a evolução do aspecto fibroblástico com o passar do tempo. As setas em A indicam células com prolongamentos citoplasmáticos e em evolução para assumir o aspecto fibroblástico já melhor observado em B. (Aumento de 200 vezes)

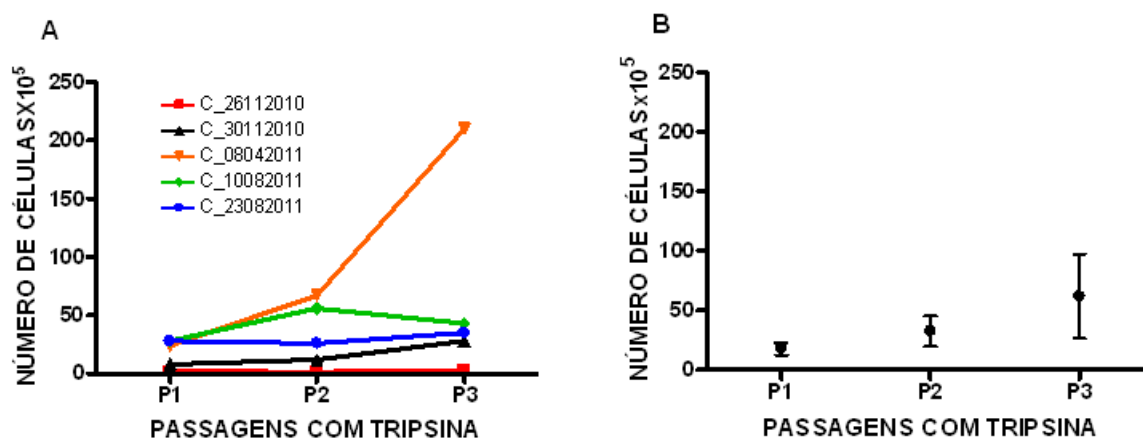


FIGURA 3: Número de células MSC obtidas em cada procedimento de passagem com tripsina. **A**: Número de células em cada passagem com tripsina nas cinco culturas independentes de MSC. **B**: Número médio de células  $\pm$  erro padrão da média ( $n=5$ ) em cada passagem com tripsina ( $p>0,05$ ).

### 3.4 OBTENÇÃO E EXPANSÃO DE FIBROBLASTOS CARDÍACOS (FC)

A cultura de FC apresentou-se semelhante à cultura de células de MSC com células arredondadas inicialmente e com aspecto fusiforme após adesão ao frasco de cultura. A população aderente foi mantida por duas semanas nas mesmas condições iniciais, onde apresentaram uma confluência de 80-90% indicando a necessidade da realização de passagem com tripsina.



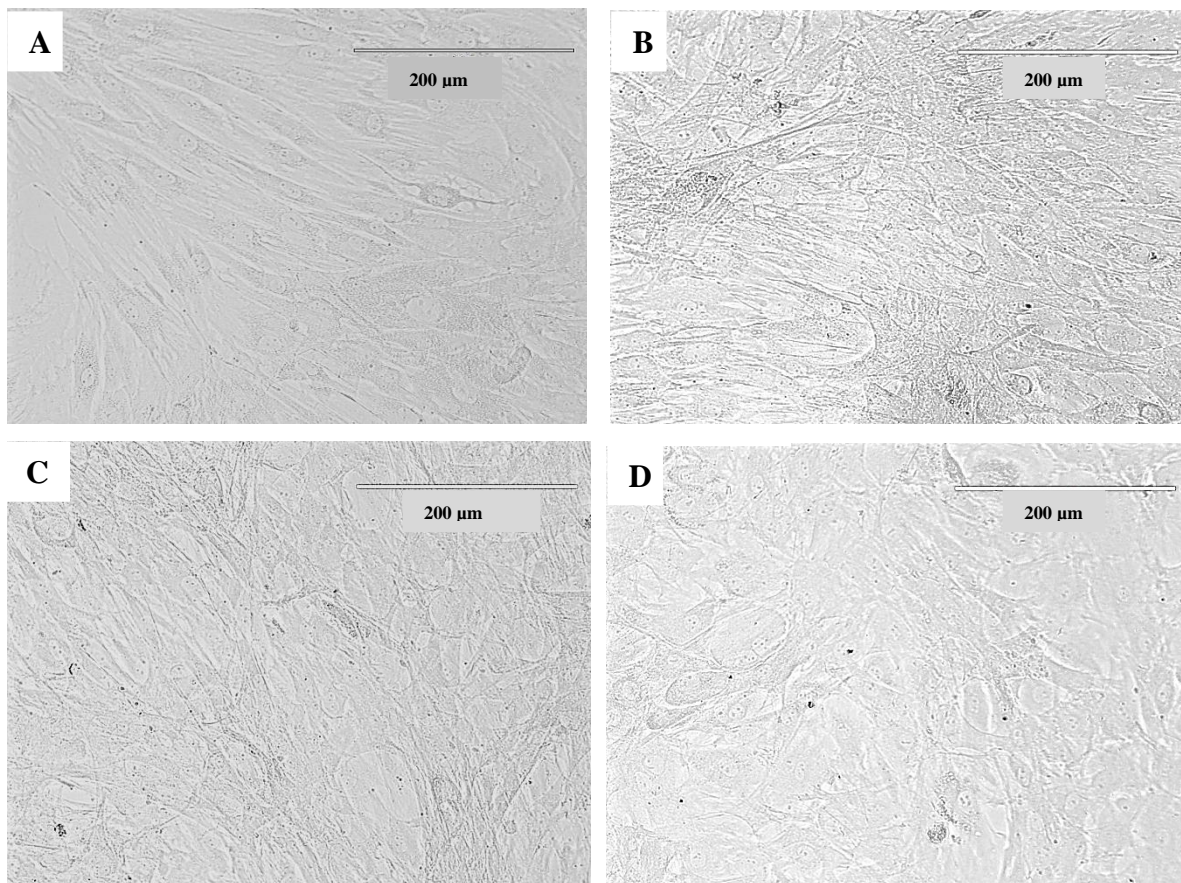


FIGURA 4: Aspecto da cultura de MSC ao longo das passagens com tripsina. **A:** Cultura de células da medula total sem passagem e após 2 semanas do plaqueamento em alta densidade; **B:** após a primeira passagem; **C:** após a segunda passagem; **D:** após terceira passagem. (Aumento de 200 vezes)

A figura 5 mostra uma cultura representativa de FC (FIGURA 5A) e outra de MSC (FIGURA 5B) estando ambas as culturas em terceira passagem com tripsina. Observa-se semelhança morfológica entre os dois tipos celulares.

### 3.5 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO

As culturas, tanto de MSC quanto de FC, quando atingiram confluência de 80-90% em placa de 6 poços, foram induzidas à adipogênese e osteogênese, ambas seguindo os mesmo protocolos.

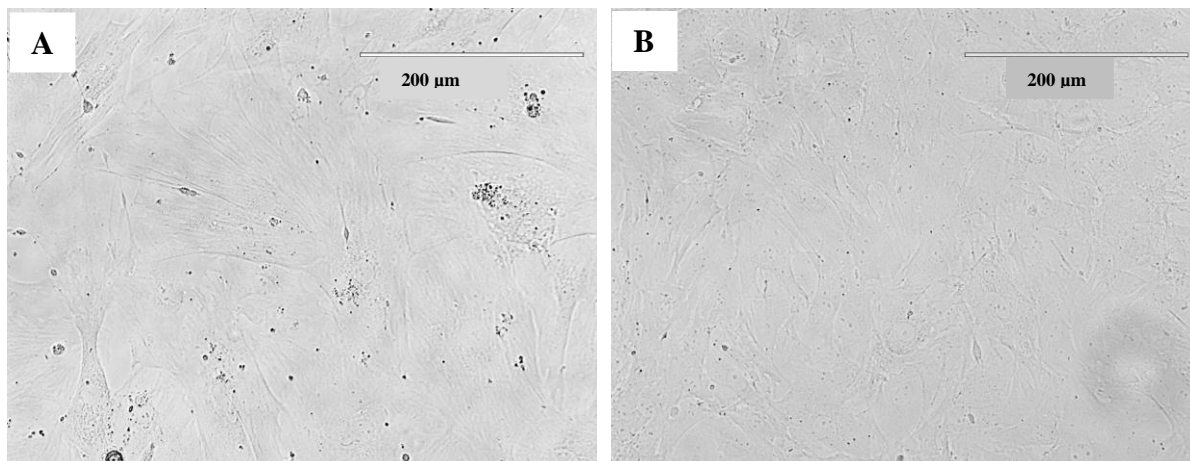


FIGURA 5: Fibroblastos cardíacos (A) e MSC (B) em terceira passagem com tripsina e previamente à indução de diferenciação. (Aumento de 200 vezes)

### 3.5.1 Adipogênese

As culturas de MSC utilizadas para a indução da adipogênese, no dia 0 referente ao início do protocolo de diferenciação, apresentaram-se confluentes e com aspecto fibroblastóide. Após 14 dias da indução já era possível visualizar vacúolos no interior das células. Ao final dos 28 dias os vacúolos apresentaram-se em maior quantidade e foram melhor visualizados. Na condição controle, na qual as MSC permaneceram por 28 dias em meio de cultura desprovido de fatores adipogênicos, não foram observados, como esperado, tais vacúolos sugestivos de diferenciação. Após a finalização do protocolo, foi feita a revelação da diferenciação pelo método de coloração com Oil Red O, responsável pela coloração dos vacúolos lipídicos em vermelho (FIGURA 6). A condição controle de MSC mesmo após adição do corante Oil Red O não apresentou células contendo vacúolos lipídicos, fato que retrata a ausência de diferenciação quando o meio de cultura é desprovido dos fatores de indução, dexametasona e insulina (FIGURA 6, Painel superior esquerdo). Diferentemente, as células que foram mantidas por 28 dias em meio adipogênico apresentaram vacúolos lipídicos marcados em vermelho pelo corante Oil Red O (FIGURA 6, Painel inferior esquerdo).

A cultura de FC induzida à diferenciação em adipócito, no dia 0, início do protocolo, apresentava aspecto semelhante à cultura de MSC no que se refere à confluência e morfologia. No 14º e 28º dia de indução, foi possível notar um aumento na densidade celular, porém sem a presença de vacúolos intracelulares que sugerissem diferenciação em adipócitos. Após revelação com o corante Oil Red O não foram observados vacúolos lipídicos, fato que



mostra que os fibroblastos cardíacos não apresentam potencial para se diferenciar em adipócitos, mesmo em condições adipogênicas (FIGURA 6, Painel direito).

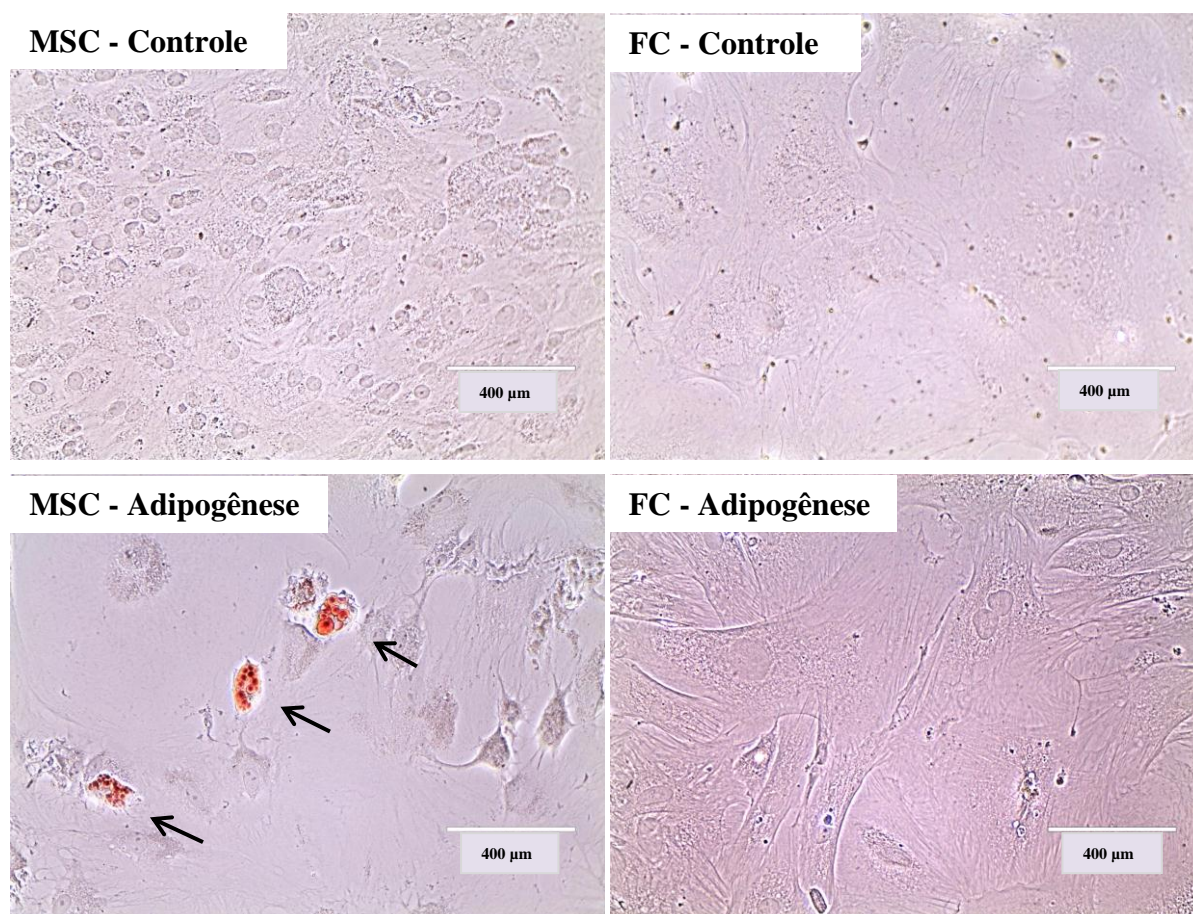


FIGURA 6: Fotos representativas da cultura de MSC (esquerda) e FC (direita) ao final do protocolo de diferenciação em adipócito (28 dias) e após coloração com Oil Red O. **MSC – Controle e FC – Controle (painéis superiores):** condições controle mantidas em meio não adipogênico. **MSC – Adipogênese e FC - Adipogênese:** referem-se às culturas submetidas aos fatores de diferenciação em adipócito. A coloração em vermelho marca células contendo vacúolos lipídicos citoplasmáticos (setas). Não foram observados vacúolos intracelulares na cultura de FC (Aumento de 400 vezes).

### 3.5.2 Osteogênese

Semelhantemente ao protocolo de adipogênese, durante o período de indução osteogênica foram obtidas imagens digitais da cultura nos tempos de 0, 14 e 28 dias após o início do protocolo. As culturas de células de MSC no tempo 0, apresentaram-se confluentes e com aspecto fibroblastóide. No 14º dia após o início da indução foi possível observar a deposição de cálcio, fato que conferiu à cultura aspecto macroscopicamente opaco e esbranquiçado. Quando observados em microscópio óptico era possível notar tal deposição de cálcio uma vez que a cultura tornava-se menos translúcida à observação. No 28º dia, término do protocolo de indução, a deposição de cálcio havia aumentado significativamente. Como



descrito anteriormente, na condição controle onde as células foram cultivadas na ausência de fatores indutores de diferenciação osteogênica, tal deposição de cálcio não foi observada. Ao final do protocolo osteogênico, foi realizada a revelação do processo de diferenciação. A deposição de cálcio, sugestiva de diferenciação em osteócito, foi confirmada pela coloração com Alizarin Red (2% p/v), ficando assim os osteócitos e matriz extracelular contendo depósito de cálcio corados em vermelho alaranjado (FIGURA 7, Painel inferior esquerdo). A condição experimental controle de MSC foi igualmente submetida à coloração com Alizarin Red. Entretanto, não foi observada a referida deposição de cálcio (FIGURA 7, Painel superior esquerdo).

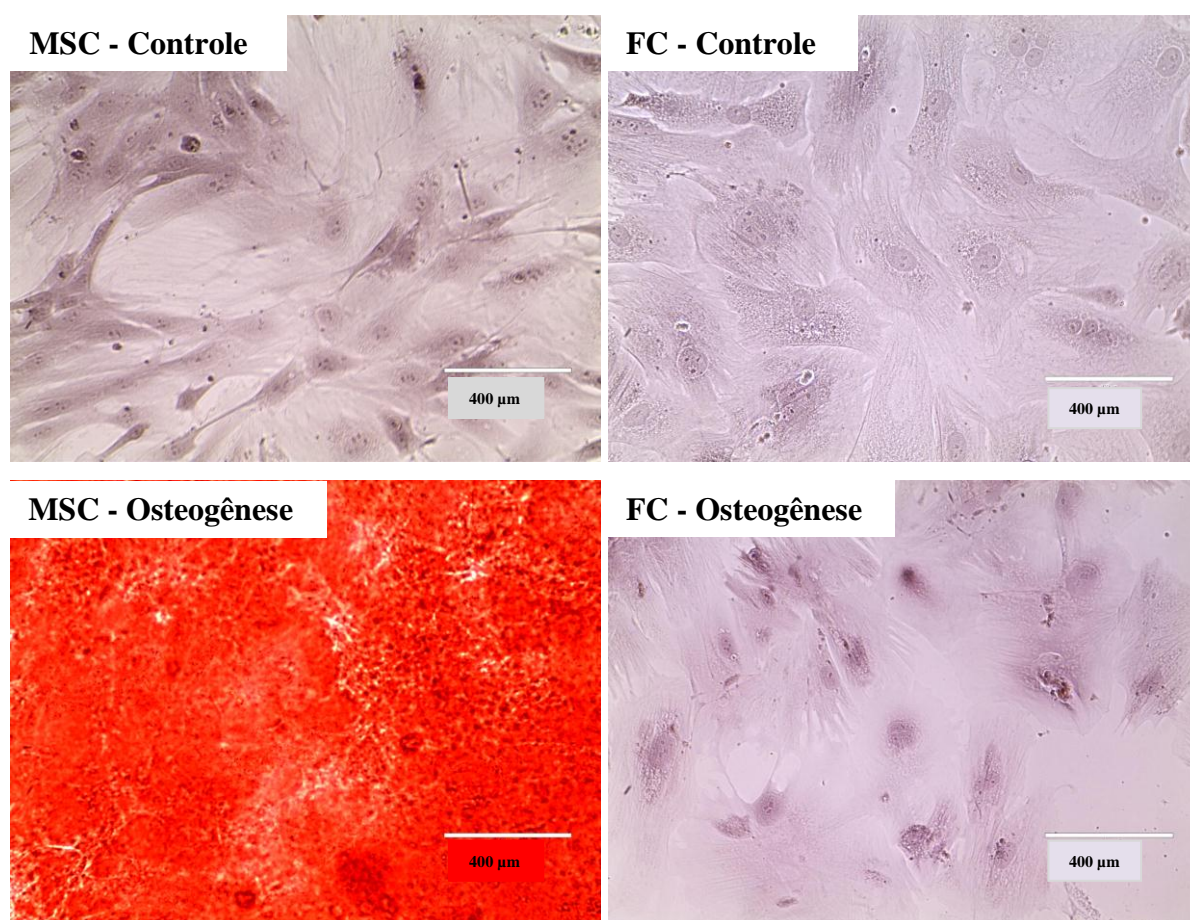


FIGURA 7: Fotos representativas da cultura de MSC (esquerda) e FC (direita) ao final do protocolo de diferenciação em osteócito (28 dias) e após coloração com Alizarin Red. **MSC – Controle e FC - Controle:** condições controle não induzidas à diferenciação. **MSC – Osteogênese e FC - Osteogênese:** referem-se às culturas submetidas aos fatores de diferenciação em osteócito. Observa-se que somente as MSC na condição com os fatores osteogênicos foram coradas em vermelho alaranjado, sugerindo diferenciação em osteócito (Aumento de 400 vezes).

A cultura de FC no início do protocolo apresentou-se confluyente e tanto no 14º quanto no 28º dia não foi observada a deposição de cálcio sugestiva de osteogênese na condição de indução e controle. Ao final dos 28 dias de indução e após revelação com Alizarin Red não

foi observada a assimilação do corante por parte da cultura de FC, indicando assim a ausência da deposição de cálcio e a não diferenciação em osteócito nas condições controle (FIGURA 7, Painel superior direito) e osteogênica (FIGURA 7, Painel inferior direito).

Reunindo-se todos os dados obtidos neste estudo, foi observado que as 5 culturas independentes de MSC foram capazes de se diferenciar em adipócito e osteócito por apresentarem vacúolos lipídicos e deposição de cálcio comprovada por coloração com Oil Red O e Alizarin Red, respectivamente. Em adição, nas 3 culturas independentes de FC não ocorreu diferenciação em adipócito e osteócito, visto a ausência de vacúolos lipídicos e deposição de cálcio comprovada por coloração com Oil Red O e Alizarin Red, respectivamente.

#### **4 DISCUSSÃO**

Com o posicionamento da *ISCT* houve uma primeira manifestação quanto à padronização da nomenclatura, obtenção e cultivo das MSC, permitindo assim a reunião dos conhecimentos existentes e possibilitando à comparação de dados entre diferentes estudos na literatura. O objetivo do presente estudo foi estabelecer a cultura de MSC no Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU seguindo algumas normas ditadas pela *ISCT* para desenvolvimento de futuros estudos com aplicação dessas células em doenças cardiovasculares. Primeiramente, investigamos a metodologia mais adequada para a obtenção do conteúdo medular total. Após avaliação, por meio de experimentos piloto, de duas técnicas de obtenção, lavado medular e centrifugação direta dos ossos, determinamos que a segunda fosse adotada preferencialmente, visto que a quantidade de células obtidas é igual àquela conseguida com a técnica de lavado medular, aspecto este importante devido à necessidade de expansão da cultura até a terceira passagem para atingir a condição experimental em quadruplicada. Outra vantagem apresentada por esta técnica é referente ao menor tempo de manuseio necessário para a obtenção celular, fato que otimiza a preservação das células assim como reduz a probabilidade de contaminação. Em adição, o método de extração de células de medula óssea por centrifugação direta dos ossos estabelece uma melhor padronização na obtenção do conteúdo medular total evitando assim discrepâncias entre diferentes experimentadores.

Outro delineamento realizado foi referente à densidade de plaqueamento celular. Segundo Neuhuber *et al* (2008), a densidade de plaqueamento ideal para expansão e diferenciação celular é uma densidade intermediária, correspondente à aproximadamente

$2 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup>. Sabe-se que a densidade de plaqueamento influencia na cinética de crescimento celular, onde as culturas em baixa densidade apresentam um crescimento mais lento em relação às culturas em alta densidade (ESLAMINEJAD; NADRI, 2009). Por outro lado, as culturas em alta densidade apresentam crescimento limitado devido à inibição dependente da densidade (inibição por contato) (NEUHUBER *et al*, 2008). A densidade adotada no presente estudo foi a de  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup>. Tal escolha se baseou na literatura (OLIVARES *et al*, 2004) e nos resultados do presente estudo, onde observamos que a alta densidade de plaqueamento possibilitou rápido crescimento da cultura e repiques até a terceira passagem com número suficiente de células para estabelecimento das condições experimentais em quadruplicatas ( $2 \times 10^5$  células por replicata) para cada condição experimental (controle, adipogênese e osteogênese). Vale ressaltar, que as culturas plaqueadas em muito baixa ( $2 \times 10^2$  células/cm<sup>2</sup>) e baixa densidade ( $2 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>) não alcançaram nível de confluência de 80-90% mesmo após 4 semanas do plaqueamento. Logo, nossos dados defendem a importância da alta densidade de plaqueamento e não estão de acordo com Neuhuber *et al*, (2008) que mostrou melhor rendimento da cultura em baixas densidades de plaqueamento.

Após o plaqueamento inicial houve a necessidade da realização de passagens com tripsina. As passagens tiveram como objetivo a purificação da cultura, pois, a cultura inicial foi realizada a partir da medula óssea total, constituída por uma população heterogênea de células-tronco hematopoiéticas e células estromais. As passagens foram realizadas a fim de se isolar as MSC que se encontram dentro desta população estromal, em pequena porcentagem variando de 0.0001 - 0.01% (ROBERTS, 2004; PITTENGER *et al*, 1999). As passagens com tripsina são também necessárias para a manutenção da cinética de crescimento celular, visto que a alta densidade celular inibe o crescimento celular por contato (NEUHUBER *et al*, 2008). Avaliando o crescimento populacional a cada passagem com tripsina constatamos que houve variação entre as culturas independentes de MSC no que se refere à quantidade celular obtida a cada passagem. Era esperado um crescimento exponencial da cultura, fato que poderia ser observado a cada passagem com tripsina (FA *et al*, 2005). Entretanto, no presente estudo, o número total médio de células entre cada passagem com tripsina não foi diferente. Cogita-se a possibilidade de perda celular por incompleta soltura das células durante o procedimento de tripsinização, visto que tivemos que trocar de fabricante objetivando uma tripsina que melhor se adequasse ao nosso tipo celular. Logo, qualitativamente, observamos que a cultura expandiu ao longo das passagens, apesar dos dados quantitativos não estarem de acordo com essa observação.

As passagens com tripsina também tiveram por objetivo purificar a população estromal de células com capacidade proliferativa menor que as MSC, tais como macrófagos. Estudos na literatura mostram que células de estroma de medula óssea em terceira passagem são negativas para marcadores hematopoiéticos e positivas para marcadores de MSC (TONDREAU *et al*, 2004) e ainda apresentam alta capacidade de diferenciação por ainda não estarem em fase de senescência (WAGNER *et al*, 2008).

Outro tipo celular utilizado neste estudo foram os fibroblastos cardíacos. Os fibroblastos são células responsáveis pela manutenção da integridade do tecido conjuntivo e estão presentes em grande número no coração. Fibroblastos são células mesenquimais maduras (PITTENGER *et al*, 1999), ou seja, células que perderam o potencial de diferenciação. Portanto, quando estas células são colocadas sob condições experimentais de diferenciação a mesma não ocorre, daí a escolha deste tipo celular como controle negativo dos experimentos de diferenciação. Em adição, a escolha de fibroblastos cardíacos objetivou um melhor aproveitamento dos animais utilizados em experimentações neste laboratório, visto que são desenvolvidos trabalhos com o uso dos cardiomiócitos onde os fibroblastos seriam desprezados.

Os FC foram mantidos nas mesmas condições experimentais propostas para as MSC a fim de se manter uma padronização dos resultados obtidos. Ambas as culturas quando atingiram confluência de 80-90% na terceira passagem foram induzidas à diferenciação.

A diferenciação consiste num processo onde as células são colocadas em cultura juntamente com fatores de indução. Seguindo os critérios ditados pela ISCT, as MSC são capazes de se diferenciar *in vitro* em adipócito, osteócito e condrócito, porém, no presente estudo, foram testados somente a diferenciação em adipócito e osteócito, visto que foram tomadas como suficientes para demonstrar a multipotência de tais tipos celulares (CARVALHO *et al*, 2008).

A adipogênese foi induzida com o uso de dexametasona e insulina (modificação de PHINNEY *et al*, 1999, CARVALHO *et al*, 2008). A dexametasona e a insulina aumentam a expressão de mRNA de PPAR- $\gamma$  (receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas), que são fatores de transcrição ligantes dependentes de uma superfamília de receptores nucleares envolvido na diferenciação em adipócito. Portanto, quando ativados desencadeiam uma série de reações bioquímicas que culminam no acúmulo intracelular de lipídeos neutros (FONSECA-ALANIZ *et al*, 2006; CURI *et al*, 2002; GREGOIRE; SMAS; SUL, 1998).

A osteogênese foi induzida por meio de dexametasona, ácido ascórbio 2-fosfato e  $\beta$ -glicerolfosfato (PHINNEY *et al*, 1999). As MSC quando colocadas em contato com a

dexametasona, glicocorticóide sintético, iniciam uma cascata de desenvolvimento de uma morfologia osteoblástica cubóide, com indução transitória de produção de fosfatase alcalina. Com fosfatos livres, há expressão de mRNAs de proteína de matriz óssea e deposição de cálcio (BRUDER *et al*, 1999). O  $\beta$ -glicerolfosfato é um fosfato inorgânico que dá suporte osteogênico por representar a fonte de fosfato necessária à mineralização da matriz. O ácido ascórbico 2-fosfato, por sua vez, é utilizado em cultura para aumentar da atividade da fosfatase alcalina.

As MSC quando colocadas em contato com o meio de indução osteogênico, apresentou deposição de cálcio que pôde ser visualizada com a coloração por Alizarin Red, sugerindo que a diferenciação ocorreu. Já os fibroblastos cardíacos não apresentaram deposição de cálcio sugestiva de diferenciação. Portanto, as células isoladas com este estudo são sugestivas de serem MSC por ser comprovada sua diferenciação *in vitro* em osteócito de acordo com os critérios ditados pela ISCT. Os FC não apresentaram características de diferenciação em osteócito, fato este, que é atribuído a sua perda de potencialidade por serem células mesenquimais maduras.

A multipotencialidade não pode ser atribuída a toda população aderente isolada no presente estudo, visto que, apesar de não termos feito um estudo quantitativo, a diferenciação, pelo menos para adipócitos, foi um evento observado em baixa frequência. Esta baixa frequência no processo de diferenciação pode estar relacionada com o reduzido percentual (0,001-0,01%) das MSC dentro da população estromal (ROBERTS *et al*, 2004). Existem estudos que buscam melhor purificar as MSC separando-as da população estromal (TONDREAU *et al*, 2004; JONES *et al*, 1996; SOLEIMAN; NADRI, 2009), fato demonstrado por um melhor rendimento no processo de diferenciação. Entretanto, até o momento, não existe um método único validado pela ISCT que otimize o isolamento de MSC. No presente estudo, o tempo destinado ao processo de diferenciação (28 dias) está de acordo com os protocolos descritos na literatura (PITTENGER *et al*, 1999; PHYNNEY *et al*, 1999; CARVALHO *et al*, 2008) e, portanto, acredita-se que não tenha sido fator limitante para o processo de diferenciação. Diante desta baixa frequência de diferenciação e em conjunto com a observação quantitativa da taxa de proliferação celular ao longo das passagens, cogita-se a possibilidade da diferenciação aqui observada ser oriunda de células progenitoras de osteoblastos e adipócitos. De fato, a população estromal além de MSC também é constituída de tais células progenitoras (JAROCHA; LUKASIEWICZ; MAJKA, 2008). Para nosso conhecimento, não há trabalhos na literatura que quantifiquem o percentual de tais células progenitoras dentro da população estromal. Este dado seria importante para melhor

discriminar a diferenciação a partir de células mesenquimais multipotentes da esperada diferenciação de células progenitoras nos fenótipos osteogênicos e adipogênicos.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que é possível obter a população de células de medula óssea total por centrifugação direta dos ossos. A partir do plaqueamento do conteúdo medular total é possível obter uma população aderente ao frasco de cultura abreviada como MSC, segundo a normatização ditada pela ISCT, quando somente o critério de aderência ao frasco de cultura é utilizado no isolamento (HORWITZ *et al*, 2005). Entretanto, no presente estudo, mostramos que a multipotencialidade, pelo menos para a adipogênese, parece ser característica de um número pequeno de células dentro da população estromal aderente. Logo, tornam-se necessários estudos que aprimorem a técnica de isolamento desta população.

Portanto, seguindo alguns dos critérios ditados pela *Sociedade Internacional de Terapia Celular*, de adesão ao frasco de cultura e de diferenciação em adipócito e osteócito podemos dizer que existem, dentro da população estromal de medula óssea, células com características de células multipotentes mesenquimais.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KHALDI, ABDULAZIZ *et al*. Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. **The Annals of thoracic surgery**, v. 75, n. 1, p. 204-209, Jan. 2003.

ALLEN, T. D.; T. M. DEXTER & P. J. SIMMONS. Marrow biology and stem cells. **Immunology series**, USA, v. 49, p. 1-38, 1990.

ALVAREZ-DOLADO, MANUEL *et al*. Fusion of bone marrow derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**, England, v. 425, n. 6961, p. 968-973, Oct. 2003.

AMADO, LUCIANO C. *et al*. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 102, n. 32, p. 11474-11479, Aug. 2005.

ANVERSA, PIERO; NADAL-GINARD, BERNARDO. Myocyte renewal and ventricular remodeling. **Nature**, England, v.415, n. 6868, p. 240-243, Jan. 2002.

BARRY, FRANK P; MURPHY, J. MARY. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Netherlands, v.36, n.4, p. 568–584, Apr. 2004.

BRUDER, SCOTT. P.; FOX, BARBARA. S. Tissue Engineering of Bone - Cell Based Strategies. **Clinical orthopaedics and related research**, USA, n. 367S, p. S68-S83, Oct. 1999.

CARVALHO, ADRIANA B. *et al.* Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. **Stem Cells**, USA, v.26, n. 5, p. 1307-1314, May 2008.

CURI, RUI *et al.* **Entendendo a gordura - os ácidos graxos**. 1. ed. São Paulo: Editora Manole, 2002. 580 p.

DEASY, BRIDGET M. *et al.* Mechanisms of muscle stem cell expansion with cytokines. **Stem Cells**, USA, v. 20, n. 1, p. 50-60, Jan. 2002.

DELORME, BRUNO *et al.* Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity **Stem cells**, USA, v. 27, n. 5, p. 1142–1151, May 2009.

DOBSON, K. R. *et al.* Centrifugal Isolation of Bone Marrow from Bone: An Improved Method for the Recovery and Quantitation of Bone Marrow Osteoprogenitor Cells from Rat Tibiae and Femuræ. **Calcified Tissue International**, USA, v. 65, n. 5, . 411-413, Nov. 1999.

DOMINICI, MASSIMO *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytherapy**, England, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

ESLAMINEJAD, MOHAMADREZA BAGHABAN NADRI, SAMAD. Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system: surface antigen expression and osteogenic culture mineralization. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, Germany, v. 45, n. 8, p. 451-459, Sept. 2009.

FA , XIAN'EN *et al.* Biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cell cultured *in vitro*. **Journal of Huazhong University of Science and Technology -- Medical Sciences**, v. 25, n. 3, p. 307-309, 2005.

FONSECA-ALANIZ, MIRIAM H. *et al.* O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Brasil, v. 50, n. 2, p. 216-229, abr. 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 4, n. 5, p. 267-274, Sept. 1976.

FUJIKAWA, TAKAHISA *et al.* Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. **The American Journal of Pathology**, USA, v. 166, n. 6, p. 1781-91, June 2005.

GNECCHI, MASSIMILIANO *et al.* Paracrine Action Accounts for marked Protection of Ischemic Heart by Akt-modified Mesenchymal Stem Cells. **Nature**, USA, v. 11, n. 4, p. 367-368, Apr. 2005.

GNECCHI, MASSIMILIANO *et al.* Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation research**, USA, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, Nov. 2008.

GREGOIRE, FRANCINE M.; SMAS, CYNTHIA M.; SUL, HEI SOOK. Understanding adipocyte differentiation. **Physiological reviews**, USA, v. 78, n. 3, p. 783-809, July 1998.

HORWITZ, EDWIN M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, England, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.



JAROCHA, DANUTA; LUKASIEWICZ, EWA; MAJKA, MARCIN. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells. **Folia histochemica et cytobiologica**, Poland, v. 46, n. 3, p. 307-314, 2008.

JIANG, ZHI-SHENG *et al.* Acute protection of ischemic heart by FGF-2: involvement of FGF-2 receptors and protein kinase C. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, USA, v. 282, n. 3, p. 1071-1080, Mar. 2002.

JONES, PHILIP H. Isolation and characterization of human epidermal stem cells. **Clinical Science**, England, v. 91, n. 2, p. 141-6, Aug. 1996.

KIM, J. W. *et al.* Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. **Annals of Hematology**, Germany, v. 83, n. 12, p. 733–738, Sept. 2004.

KINNAIRD, TIM *et al.* Local delivery of marrow derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation**, USA, v. 109, n. 12, p. 1543-1549, Mar. 2004b.

KINNAIRD, TIM *et al.* Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. **Circulation Research**, USA, v. 94, n. 5, p. 678-685, Mar. 2004a.

LEE, OSCAR K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, Washington, v. 103, n. 5, p. 1669-1675, Mar. 2004.

LERI, ANNAROSA *et al.* Identification of a coronary stem cell in the human heart. **Journal of Molecular Medicine**, Germany, v. 89, n. 10, p. 947-59, May 2011.

LICHTMAN, M. A. THE ultrastructure of the hematopoietic environment of the marrow: a review. **Experimental hematology**, Netherlands, v. 9, n. 4, p. 391-410, Apr. 1981.

MIROTSOU, MARIA *et al.* Review Article: Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, England, v. 50, n. 2, p. 280-9, Feb. 2011.

MURRY, CHARLES E. *et al.* Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature**, England, v. 428, n. 6983, p. 664-668, Apr. 2004.

NEUHUBER, BIRGIT *et al.* Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Experimental Hematology*, Netherlands, v.36, n. 9, p 1176-1185, Sept. 2008.

NYGREN, JENS M. *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. **Nature Medicine**, USA, v. 10, n. 5, p. 494-501, May 2004.

OLIVARES, EMERSON LOPES *et al.* Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, USA, v. 287, n. 2, p. H464-470, Aug. 2004.

OLIVEIRA, PATRÍCIA FIDELIS *et al.* Soluble factors from multipotent mesenchymal stromal cells have antinecrotic effect on cardiomyocytes in vitro and improve cardiac function in infarcted rat hearts. 2011, **No Prelo**.

ORLIC, DONALD. Adult bone marrow stem cells regenerate myocardium in ischemic heart disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, USA, v. 996, p. 152-157, May 2003.

ORLIC, DONALD *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, England, v. 41, n. 6829, p. 701-705; Apr. 2001a.

ORLIC, DONALD *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 98, n. 18, p. 10344–10349; Aug.2001b.

PARKER, ANNA M. Low serum and serum-free culture of multipotential human adipose stem cells. **Cytotherapy**, England, v. 9, n.7, p. 637-46, Jan. 2007.

PERIN, EMERSON C. *et al.* Transendocardial autologous bone marrow cell transplantaion for severe chronic ischemic heart failure. **Circulation**, USA, v. 107, n. 18, p. 2294-2302; May 2003.

PHINNEY, DONALD G. *et al.* Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, USA, v. 72, n.4, p. 570-585, Mar. 1999

PHINNEY, DONALD G.; PROCKOP, DARWIN J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. **Stem Cells**, USA, v. 25, n. 11, p. 2896–2902, Nov. 2007.

PITTENGER, MARK F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, New York, v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

ROBERTS, IRENE. Mesenchymal stem cells. **Vox Sanguinis**, USA, v. 87, n.s2, p. 38–41, July 2004.

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

SHAKE, JAY G. *et al.* Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional. **The Annals of Thoracic Surgery**, Netherlands, v. 73, n. 6, p. 1919–1926, June 2002.

SHOSTAK, STANLEY. (Re)defining stem cells. **Bioessays**, USA, v. 28, n. 3, p. 301-8, Mar. 2006.

SPEES, JEFFREY L. *et al.* Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 100, n. 5, p. 2397–2402, Mar. 2003.

TAVASSOLI, M.; A. FRIEDENSTEIN. Hematopoietic stromal microenvironment. **J. Hematol.**, v. 15, p. 195-203, 1985.

TERADA, NAOHIRO *et al.* Bone Marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. **Nature**, England, v. 416, n. 6880, p. 542-545, Apr. 2002.

TONDREAU, TATIANA *et al.* Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential., **Cytotherapy**, England, v. 6, n. 4, p. 372-379, 2004.

UEMURA, RYOTA *et al.* Bone Marrow Stem Cells Prevent Left Ventricular Remodeling of Ischemic Heart Through Paracrine Signaling. **Circulation Research**, USA, v. 98, n. 11, p. 1414-1421, June 2006.

VAN DER KOOY, DEREK; WEISS, SAMUEL. Why stem cells? **Science**, New York, v. 287, n. 5457, p.1439-1441, Feb. 2000.

WAGNER, WOLFGANG; HO, ANTHONY D. Mesenchymal Stem Cell Preparations- Comparing Apples and Oranges. **Stem cell reviews**, USA, v. 3, n. 4, p. 239-248, Dec. 2007.

WAGNER, WOLFGANG *et al.* Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, e2213, May 2008.

WEISS, SAMUEL *et al.* Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? **Trends in Neurosciences**, England, v. 19, n. 9, p. 387-393, Sept. 1996.

WRIGHT, NICHOLAS A.; PIKE, CHRISTINE; ELIA, GEORGE. Induction of a novel epidermal growth factor-secreting cell lineage by mucosal ulceration in human gastrointestinal stem cells. **Nature**, England, v. 343, p. 82-5, Jan. 1990.

WURMSER, ANDREW E.; GAGE, FRED H. *et al.* Cell fusion causes confusion. **Nature**, England, v. 416, n. 6880, p. 485-487, Apr. 2002.

YING, QI-LONG *et al.* Changing potency by spontaneous fusion. **Nature**, England, v. 416, n. 6880, p. 545-548, Apr. 2002.