



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

GIANE DANIELA CARNEIRO

**“ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIAIS DE MEDULA
ÓSSEA DE CAMUNDONGOS PARA UTILIZAÇÃO
EM TERAPIA CELULAR”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Giane Daniela Carneiro
Cristina Pontes Vicente
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

C215i

Carneiro, Giane Daniela

Isolamento e caracterização de células progenitoras endoteliais de medula óssea de camundongos para utilização em terapia celular / Giane Daniela Carneiro. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Cristina Pontes Vicente.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células endoteliais. 2. Cultura celular. 3. Proliferação celular. 4. Meio de cultura. I. Vicente, Cristina Pontes, 1965-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em inglês: Isolation and characterization of endothelial progenitor cells derived from bone marrow of mice for use in cell therapy.

Palavras-chave em inglês: Endothelial cells; Cell culture; Cellular proliferation; Culture medium.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Cristina Pontes Vicente, Sílvia Borges Pimentel de Oliveira, Maria Isabel Dori Rossi.

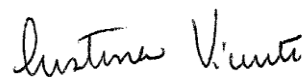
Data da defesa: 13/04/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 13 de abril de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente (Orientadora)



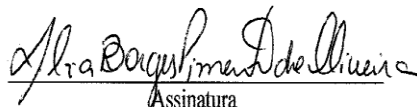
Assinatura

Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi



Assinatura

Profa. Dra. Silvia Borges Pimentel de Oliveira



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Assinatura

Profa. Dra. Joyce Maria Annichino-Bizzacchi

Assinatura

“Por favor, desenha-me um carneiro!

*... A jibóia é perigosa e o elefante ocupa muito espaço.
Preciso de um carneiro”*

“... eu corro o risco de ficar como as pessoas grandes, que só se interessam por números. Foi por isso que comprei um estojo de aquarelas e alguns lápis.”

(O Pequeno Príncipe de Antoine de Saint-Exupéry)

*Ando devagar porque já tive pressa e levo esse **sorriso** porque já chorei demais*

....

*Cada um de nós **compõe a sua historia***

*cada ser em si carrega **o dom de ser capaz, de ser feliz***

(Tocando em Frente – Renato Teixeira e Almir Sater)

À todos os sorrisos,

à cada olhar

e a cada carinho recebido...

À célula MÃE e à célula PAI:

progenitores de uma vida, tronco de um ser humano

AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus **pelos pais** que me concedestes, **pela força** que me providenciastes e **pelas pessoas** com as quais me presenteastes.*

*Agradeço à Maria Helena Fialho Carneiro e a Sebastião Carlos Carneiro, “**minha mãezinha**” e “**meu magrim**”! exemplos a seguir, de simplicidade e humildade, refletidos em cada carinho, em cada sorriso, em cada conselho, em cada palavra e em cada gesto. Meus pais, obrigada principalmente por terem me criado e me ensinado a ser um **ser humano** acima de qualquer outra coisa, acima de qualquer academicismo, titulação ou graduação*

Aos meus irmãos e meu cunhado pelo incentivo, carinho e paciência, às minhas sobrinhas por cada sorriso e brincadeiras inocentes .

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte da minha vida, em especial nestes dois últimos anos

pelos olhos (cheios de carinho e compreensão); pelas bocas (longas conversas e sorrisos constantes); pelos braços (abraços fortes e conforto); pelas mãos (por cada toque e pela segurança) e pelos pés (por todos os passeias e distrações). Sentimentos que a cada dia me fortaleceram e me incentivaram a seguir meu trabalho, a superar meus desafios, a vencer o cansaço

Ao presentinho especial que recebi, uma pessoa muito importante na minha vida: Daniel, obrigada por todas as conversas (elefante!), passeios (e passarinhos!), brincadeiras (pelas minhas bolinhas) e por todas as músicas (caboclinho!). Obrigada por cada olhar e cada sorriso, por todos os abraço e carinhos (únicos e inesquecíveis...)

Ao amigo que sempre me deu muita força, Guilherme, você é mesmo o Máximo

Aos que foram convidados a viajar comigo no meu balão: Daniel Block, Daniel Bruschi, Cristiano e Rony, de onde saíram muitas conversas sérias e “loucas”, muitos conselhos, muito choro e acima de tudo muita arte e muito sorriso

Às meninas de casa, Aline e Soraia, pelos cafezinhos e prosas, companhias de madrugada, despertador de manhã

*Aos que fizeram parte da integração (bandejão- cafezinho – corridas – IFCH):
Dani, Rô, Bia, Zé Bola*

À Karine e Juliana Nascimento e aos colegas de laboratório Flávio, Tiago e Patrícia. Às pessoas que me ajudaram de uma forma especial, principalmente no final do meu trabalho, Juliana Godoy e Danilo

E a todos que encontrei pelos corredores, em especial à Elaine.

À professora Dra. Cristina Pontes Vicente, pela orientação e ensinamento compartilhado, pelo profissionalismo na realização deste trabalho

Ao profs. Hernandes, Cláudio Werneck, Luciana e Shirley por disponibilizarem equipamentos

À Dra. Irene Iorand-Metze e Fernanda G. Pereira Cunha pela disponibilidade do Citômetro de Fluxo

A todos os professores da pós-graduação por todos os conhecimentos passados e exemplos de bom profissionalismo

À Liliam, Silvia Helena e a todos demais funcionários da secretaria da Pós-graduação;

À Universidade Estadual de Campinas, ao Instituto de Biologia, ao Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica e ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural por pela estrutura e recursos fornecidos para o desenvolvimento deste trabalho,

À CAPES/PROEX pela concessão da bolsa de mestrado,

À FAPESP pelo financiamento desta pesquisa.

Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que fez tua rosa tão importante...

(O Pequeno Príncipe de Antoine de Saint-Exupéry)

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs – Absorbância

acLDL – Lipoproteína de baixa densidade acetilada

BSA – Albumina de soro bovino

CA – Célula angiogênica

CAC – Célula angiogênica circulante

CE – Célula endotelial

CFCE – Células formadoras de colônias endoteliais

CPE – Célula progenitora endotelial

CMN – Célula mononuclear

CPEC – Células progenitoras endoteliais circulantes

CTH – Células tronco hematopoiéticas

CTM – Célula tronco mesenquimais

CAM – Molécula de adesão celular

CD34 – *Cluster of Differentiation 34*

CD133 – *Cluster of Differentiation 133* (ou AC133 em humanos e Prominin-1 em ratos)

CD31 – *Cluster of Differentiation 31*

CO₂ – Dióxido de Carbono

Ca⁺² - Íon Cálcio

C57bl/6 – Camundongos da linhagem black

DAB – Diaminobenzidina

DAPI – 4'6 diamino – 2 fenilindole

DMEM – meio de cultura modificado por Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

early EPCs – Células progenitoras endoteliais precoce

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF – Fator de crescimento epidermal

EGFR - receptor de EGF

EOC – Células endoteliais de crescimento

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

bFGF – Fator de crescimento fibroblástico básico

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*)

Flk1- Receptor de VEGF em ratos (o mesmo que VEGFR-2 de camundongos)

G1 – *Gap 1* (intervalo do ciclo de divisão celular)

G-CSF – Fator de estimulação de colônia de granulócitos

GM-CSF – Fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos

HGF – Fator de crescimento de hepatócito

HRP – Horseradish Peroxidase

HUVEC – Célula endotelial de veia umbilical humana

ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular 1 (ou CD54)

IL – Interleucina

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I

KDR – Receptor de VEGF em humanos (o mesmo que VEGFR-2 de camundongos)

KCl – cloreto de potássio

late OECs - células endoteliais de crescimento tardio

MC-CE – Meio condicionado de célula endotelial

MEM – Meio mínimo essencial Eagle

MMP – Metaloproteinase de matriz

MTT – 3-[4,5-Dimethylthiazol – 2 – yl] 2.5 – diphenyl tetrazolium bromide, thiazolyl blue

Meio 199 – Meio Eagle

NaCl – cloreto de sódio

PBS – Tampão fosfato-salino

PE – Ficoeritrina (*Phycoerithrin*)

PS – penicilina/estreptomicina

PECAM – Molécula de adesão das células endoteliais e plaquetárias (ou CD31)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

Tie-1 – Tirosina quinase com 1 domínio de homologia para imunoglobulina e EGF

UEA-I – *Ulex europaeus agglutinin I*

VCAM-1 – Molécula de adesão de célula vascular 1 (ou CD106)

VE-caderina – caderina do endotélio vascular (ou CD144)

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-2 – Receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular

vWF – Fator de von Willebrand

KDa - quilo-Dalton

mL - mililitro

ng – nanograma

µg – micrograma

µL – microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 3 dias de cultura	42
Figura 2 - Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 7 dias de cultura	44
Figura 3 - Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 14 dias de cultura	46
Figura 4 - Análise morfológica de células mononucleares após 14 dias de cultura em meio DMEM1-M1	61
Figura 5 - Análise morfológica de células mononucleares após 21 dias de cultura em meio DMEM1 - M1	62
Figura 6 - Análise morfológica de células mononucleares após 40 dias de cultura em meio DMEM1 - M1	63
Figura 7 - Imunocitoquímica de células mononucleares em cultura de 3 dias ...	64
Figura 8 - Imunocitoquímica de células mononucleares em cultura de 7 dias	65
Figura 9 - Imunocitoquímica de células mononucleares em cultura de 14 dias ..	66
Figura 10 - Imunofluorescência para células mononucleares após 3 dias de cultura em meio DMEM1 - M1.....	67
Figura 11 - Imunofluorescência para células mononucleares após 7 dias de cultura em meio DMEM1 - M1.....	68
Figura 12 - Imunofluorescência para células mononucleares após 14 dias de cultura em meio DMEM1 - M1	69
Figura 13 - Resultado de Western Blotting	70
Figura 14 - Ensaio de internalização de acLDL.....	74
Figura 15 - Células HUVECs e células mononucleares cultivadas em Matrigel ..	75
Figura 16 - Células mononucleares cultivadas em matrigel após 7, 9 e 15 dias ...	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Adesão celular por DAPI após 3 dias de cultura	48
Gráfico 2 -	Adesão celular por DAPI após 7 dias de cultura	49
Gráfico 3 -	Adesão celular por DAPI após 14 dias de cultura	49
Gráfico 4 -	Proliferação celular por Azul de Tripán após 3 dias de cultura	51
Gráfico 5 -	Proliferação celular por Azul de Tripán após 7 dias de cultura	52
Gráfico 6 -	Proliferação celular por Azul de Tripán após 14 dias de cultura	53
Gráfico 7 -	Viabilidade celular após 3 dias de cultura por Azul de Tripán	56
Gráfico 8 -	Viabilidade celular após 7 dias de cultura por Azul de Tripán	57
Gráfico 9 -	Viabilidade celular após 14 dias de cultura por Azul de Tripán	57
Gráfico 10 -	Viabilidade celular após 3 dias de cultura por MTT	58
Gráfico 11 -	Viabilidade celular após 7 dias de cultura por MTT.....	59
Gráfico 12 -	Viabilidade celular após 14 dias de cultura por MTT.....	59
Gráfico 13-	Expressão dos marcadores celular por Western Blotting	71
Gráfico 14-	Expressão dos marcadores por Citometria de Fluxo após extração ...	72
Gráfico 15-	Expressão dos marcadores por Citometria de Fluxo após 7 dias	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados de adesão celular pela marcação dos núcleos com DAPI	50
Tabela 2-	Número de células/ml, os valores em 10^4	54

SUMÁRIO

1. RESUMO	14
2. ABSTRACT	16
3. INTRODUÇÃO	18
3.1 Células Progenitoras Endoteliais e Células Endoteliais	18
3.2 Células Progenitoras Endoteliais e Terapia Celular	23
3.3 Cultura de Células Progenitoras Endoteliais	27
4. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivos Gerais	31
4.2. Objetivos Específicos	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	32
6. RESULTADOS	41
6.1 – Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios e períodos	41
6.2 – Análise da Adesão celular por DAPI e Proliferação por Azul de Tripán das células mononucleares em diferentes tempos de cultura	47
6.3 – Ensaio de Viabilidade Celular por Azul de Tripán e MTT	56
6.4 – Análises morfológicas de células mononucleares após seleção do meio DMEM1 – M1	60
6.5 – Imunocitoquímica	62
6.6 – Imunofluorescência	67
6.7 – Western Blotting	70
6.8 – Citometria de Fluxo	71
6.9 – Ensaio de internalização de acLDL	74
6.10 – Formação de estruturas semelhantes a capilares	75
7. DISCUSSÃO	77
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	83

1. RESUMO

As células progenitoras endoteliais (CPEs) foram descritas por Asahara *et al.* (1997), isoladas a partir do sangue periférico e são células originadas da medula óssea. Estas células podem ser reconhecidas pela expressão de marcadores como o CD34, CD133, VEGFR2 e o CD31, pela capacidade de internalização de acLDL e de formar estruturas semelhantes a vasos quando cultivadas em matrizes tridimensionais. Quando ocorrem lesões endoteliais, elas podem ser mobilizadas da medula migrando para o sangue periférico e atuar no local da lesão arterial, podendo se diferenciar em células endoteliais maduras e promover a re-endotelização do vaso lesionado. Contudo, estas células estão presentes na medula óssea e no sangue periférico em quantidade muito pequena, 0,1 e 0,01% do total de células respectivamente, o que leva diversos grupos de pesquisa buscarem selecionar e cultivar estas CPEs visando aumentar seu número para melhor caracterizá-las *in vitro* e *in vivo*. Em nosso trabalho, buscamos estabelecer um meio de cultura capaz de sustentar o crescimento, proliferação e diferenciação das células progenitoras endoteliais isoladas a partir de medula óssea de camundongos C57bl/6, e de caracterizar seus vários estágios de diferenciação destas células em diferentes tempos de cultura. Para tal, células mononucleares foram isoladas da medula de camundongos C57bl/6 por gradiente de Ficoll-Paque PLUS e cultivadas por 3, 7 e 14 dias em meios de cultura diferentes acrescidos de diferentes fatores de crescimento (VEGF, IGF, bFGF e EGF) com concentrações variadas. Dentre todos os meios testados, o DMEM1-M1 (DMEM com vermelho de fenol acrescido de VEGF, IGF e bFGF) foi o que apresentou melhores resultados para os ensaios de proliferação, de viabilidade celular por DAPI, Azul de Tripán e MTT. A partir deste meio foram realizados testes para verificar a expressão de marcadores celulares (CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31) por imunocitoquímica, imunofluorescência, Western Blotting e citometria de fluxo. Os resultados de imunocitoquímica e imunofluorescência foram positivos para todos os marcadores, em todos os períodos analisados. A análise por Western Blotting confirmou a expressão destes marcadores, com aumento na expressão de 3 para 7 dias de cultura. Por citometria de fluxo analisamos o perfil destas células em cultura de 7 dias comparando com as células *in vivo*, e conseguimos visualizar um aumento

principalmente na frequência de células que expressam VEGFR-2, um indicativo de que o meio utilizado está selecionando células progenitoras. A internalização de acLDL que também indica CPEs foi positiva após 7 e 14 dias. As células cultivadas em Matrigel® formaram estruturas semelhantes a vasos após 7 dias de cultura. Nossos resultados indicam que fomos capazes de estabelecer um meio de cultura eficiente na seleção e proliferação de CPEs, inibindo sua diferenciação inicial em células endoteliais, o que nos permitirá utilizar esta técnica de cultura para expandir o número de CPEs obtidas da medula óssea e poder utilizá-las no tratamento de lesões arteriais e em diferentes processos de terapia celular.

Palavras-chave: célula progenitora endotelial, cultura de células, proliferação, meio de cultura, terapia celular.

2. ABSTRACT

Endothelial progenitor cells (EPCs) were described by Asahara *et al.* (1997) isolated from peripheral blood, these cells are derived from bone marrow. EPCs can be characterized by the expression of cellular markers like CD34, CD133, VEGFR2 and CD31, internalization of acLDL and formation of structures similar to vessels when culture in tridimensional matrices. In the presence of endothelial lesion, they can be mobilized from bone marrow, migrating to peripheral blood and subsequently the endothelial lesion site. They can differentiate into mature endothelial cells and participate in the re-endothelization of the damaged vessel. However these cells are rare in bone marrow and peripheral blood 0,1 and 0,01%, respectively, several research groups are trying to develop strategies to isolate and cultivate these cells to better determine their characteristics *in vitro* and *in vivo*. In our study we tried to establish a culture medium able to sustain growth and proliferation of EPC obtained from C57bl/6 mice bone marrow and characterize the stages of differentiation that they could present in different times of culture. In order to do it, we isolated mononuclear cell from bone marrow using a Ficoll-Paque PLUS gradient and cultivated then for 3, 7 and 14 days using culture mediums with different compositions and concentrations of growth factors (VEGF, IGF, bFGF, EGF). Cellular growth determined by DAPI, trypan blue counting and MTT was more significant with the medium we named DMEM1-M1 (with VEGF, IGF and bFGF). Results obtained with immunocitochemistry and immunofluorescence with this medium was positive in all culture times. Western blotting demonstrated the expression of VEGFR2, CD34 and CD133 in 3 e 7 day, with a litte increase after 7 days. Flow citometry analysis of cells after 7 days in culture demonstrated an increase in cells expressing VEGFR2, indicating the selection of EPC with this medium. Internalization of acLDL and formation of structures similar to vessels were observed after 7 and 14 days in culture and confirms differentiation of mononuclear cells into EPC. So, in conclusion, our results indicate that we developed a culture medium able to sustain proliferation and differentiation of EPCs, inhibiting their terminal differentiation what will allow us to use this culture technique to increase the number of EPC from bone marrow

obtained and in the future use these cells in the treatment of arterial lesions in different process of cellular therapy.

Keywords: endothelial progenitor cell, cell culture, proliferation, culture medium, cell therapy.

3. INTRODUÇÃO

3.1 – Células Progenitoras Endoteliais e Células Endoteliais

Em 1997, Asahara *et al.* descreveram pela primeira vez, uma população de células CD34+, isoladas a partir de sangue periférico humano, com capacidade de se diferenciar *in vitro* em células com fenótipo endotelial. Estas células foram chamadas de “células progenitoras endoteliais” (CPEs), sendo descritas como uma população de células pluripotentes imaturas com capacidade de proliferar, migrar e diferenciar-se em uma linhagem de células endoteliais, mas ainda sem as características de células endoteliais maduras (Kawamoto e Asahara, 2007). As CPEs tem importante papel em processos fisiológicos e patológicos, estando envolvidas na formação e reparo do endotélio e podendo originar células endoteliais maduras que participam da neovasculogênese e da angiogênese (Eggermann *et al.*, 2003), o que fez das CPEs uma das descobertas mais fascinantes no campo da biologia vascular na última década.

As células progenitoras endoteliais são células que apresentam um potencial restrito de diferenciação quando comparadas às células tronco embrionárias e sua capacidade de proliferação possui um número limitado de divisões (Tongers, 2010). Apesar destas restrições, as CPEs podem ser expandidas em cultura a partir de células mononucleares (CMNs) obtidas da medula óssea (Lin *et al.*, 2000), sangue periférico (Asahara *et al.*, 1997), sangue de cordão umbilical (Ingram *et al.*, 2004, Smadja *et al.*, 2006 a,b) além do fígado fetal e gordura (Peichev *et al.*, 2000).

Duas populações de CPEs foram descritas por Hur *et al.* (2004) baseadas em ensaios *in vitro*. A primeira população constituem as chamadas “*early EPCs*” (Hur *et al.*, 2004) - células progenitoras endoteliais precoces – que também recebem o nome de células progenitoras endoteliais circulantes – CPECs ou células angiogênicas circulantes – CACs (Gulati *et al.*, 2003). Elas são derivadas de monócitos e são capazes de assumir características endoteliais, como ligar-se à lecitina e internalizar o LDL acetilado (lipoproteína de baixa densidade) (Hristov e Weber, 2004). Apresentam morfologia fusiforme e pico de crescimento entre a 2^o a 3^o semana de cultura, morrendo após

aproximadamente 4 semanas em cultura (Hur *et al.*, 2004). Autores como Yoder *et al.* (2007) preferem chamar as CPEs precoces de células angiogênicas (CAs) pelo fato de não apresentarem fenótipo endotelial *in vitro* e por aumentarem a neovascularização de forma parácrina, principalmente através da secreção de citocinas angiogênicas, que auxiliam no recrutamento das células endoteliais (CEs) maduras residentes, induzindo sua proliferação e sobrevivência.

A segunda população de CPEs identificada em cultura representa as células endoteliais de crescimento (*endothelial outgrowth cells* - EOCs) ou células progenitoras endoteliais tardias (Hur *et al.*, 2004), células endoteliais de crescimento tardio (*late outgrowth endothelial cells* – late OECs) (Yoon *et al.*, 2005) ou ainda células formadoras de colônias endoteliais – CFCE (Hirschi *et al.*, 2008). Estas células apresentam morfologia em forma de paralelepípedo (ou *cobblestone*) e aparecem após 2 a 3 semanas em cultura, com crescimento exponencial de 4 a 8 semanas e sobrevivem até no máximo 12 semanas em cultura (Hur *et al.*, 2004). Elas possuem características tipicamente endoteliais tanto *in vitro* quanto *in vivo* e contribuem de forma mais direta com a neovascularização fornecendo novas CEs e conseqüentemente novos vasos, graças ao seu alto potencial proliferativo, sendo consideradas, portanto, CPEs verdadeiras (Timmermans *et al.*, 2007).

As CPEs podem ser caracterizadas ainda pela capacidade de internalizar o LDL acetilado (Voyota *et al.*, 1984) e pela ligação a lecitina UEA (*Ulex europaeus agglutinin I*) além da formação de colônias e da formação de estruturas semelhantes a vasos ou capilares, resultados observados em ensaios *in vitro* ou *in vivo*.

Nos adultos, as CPEs encontram-se principalmente na medula óssea estando intimamente associadas às células tronco hematopoiéticas e ao estroma, formando assim um microambiente ideal para sua proliferação, migração e diferenciação em células de linhagem endotelial, embora ainda não sejam caracterizadas como CEs maduras (Ribatti, 2004).

As células mononucleares da medula óssea compreendem diferentes populações de células (células progenitoras, monócitos e leucócitos) (Yang *et al.*, 2010). Para se caracterizar estas células é necessário identificar e estabelecer seus marcadores, ou seja, os antígenos de superfície por elas expressos. O surgimento destas proteínas ao longo do

processo de diferenciação celular ocorre de forma regular, apresentando aumento ou perda gradual de expressão das mesmas.

As CPEs podem ser identificadas pela co-expressão de marcadores de células tronco hematopoiéticas (CD34 e CD133) e marcadores de células endoteliais (VEGFR-2, CD31, vWF e eNOS) (Urbich e Dimmeler, 2004). A heterogeneidade dos marcadores de superfície provavelmente reflete os diferentes estágios de desenvolvimento das CPEs que ocorre durante o processo de maturação das células residuais da medula óssea para células maduras da parede vascular, podendo contribuir ainda para as diferenças funcionais das mesmas (Zhang e She, 2007). Esta co-expressão pode ser usada para traçar um perfil de diferenciação das CPEs, por exemplo, CD133 e CD34 são expressos em células primitivas, indiferenciadas e a expressão de CD133 diminui ao longo da diferenciação, a expressão de CD34 mantém-se enquanto que a dos marcadores endoteliais (CD31, vWF e eNOS) aumenta (Tongers *et al.*, 2010).

O marcador CD133 (*Cluster of Differentiation* 133) (ou AC133 em humanos e Prominin-1 em ratos) é inicialmente expresso nos hemangioblastos e células progenitoras e tem sua expressão diminuída ao longo da diferenciação (Yin *et al.*, 1997). Trata-se de um polipeptídeo glicosilado de 120kDa com 5 domínios transmembrana com uma porção N-terminal extracelular e um resíduo C-citoplasmático (Miraglia *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). Sua função ainda não é conhecida, mas um subgrupo de células CD34⁺ circulante, expressando CD133, foi sugerido para representar uma população de CPEs funcionais que desempenha papel na angiogênese ou vasculogênese pós- parto, podendo se integrar em sítios de neovascularização e se diferenciarem em células endoteliais maduras (Peichev *et al.*, 2000).

A proteína transmembrana conhecida como CD34 é um marcador expresso na população de células hematopoiéticas, bem como nas células endoteliais. A cadeia intracelular do CD34 é um sítio de fosforilação ativado pela proteína C-quinase, o que sugere importante função na transdução de sinais. É uma proteína altamente glicosilada com cerca de 75 à 120 kDa e é possivelmente, uma molécula de adesão com importante função no início da hematopoiese mediando a ligação das células tronco à matriz

extracelular da medula óssea é comumente utilizada para o isolamento e manipulação das células tronco humanas (Healy *et al.*, 1995).

O VEGFR-2 (receptor do fator de crescimento do endotélio vascular 2, conhecido como Flk1 – quinase do fígado fetal tipo 1, em ratos e KDR – receptor do fator de crescimento endotelial vascular, em humanos) é um receptor tirosino-quinase específico tipo III para o fator de crescimento endotelial, caracterizado pela presença de um domínio tirosino-quinase citoplasmático, um domínio transmembrana e sete domínios de imunoglobulinas extracelulares. Seu gene é expresso nas células progenitoras endoteliais e em células endoteliais adultas e células tronco hematopoiéticas (Holmes *et al.*, 2007). O papel crítico do VEGFR-2 no desenvolvimento vascular é realçado pelo fato de que ratos VEGFR-2-/- morrem devido ao desenvolvimento defeituoso das células endoteliais e células hematopoiéticas (Shalaby *et al.*, 1995).

O CD31 ou PECAM-1 (molécula de adesão das células endoteliais e plaquetárias) é uma molécula sinalizadora, com diversos papéis na biologia vascular incluindo angiogênese, função plaquetária e trombótica, resposta mecano-sensitiva das células endoteliais e regulação de múltiplos estágios de migração dos leucócitos através da parede dos vasos sanguíneos. Ele é expresso em todas as células de comportamento vascular em diferentes graus, em subtipos de leucócitos, em plaquetas e células endoteliais, onde encontra-se amplamente concentrada nas junções de células adjacentes (Woodfin *et al.*, 2007).

Segundo Chun-Ling (2003), as células-tronco hematopoiéticas, as CPEs e as células endoteliais circulantes (CECs) expressam alguns marcadores em comum, tais como: o VEGFR-2, CD34, CD31 e Tie-1. Murasawa e Asahara (2005) observaram que, assim como as CPEs, as CTHs expressam inicialmente VEGFR-2 e CD34, porém marcadores de superfície específicos de células endoteliais (como o VE-caderina, VEGFR-2 e Tie-1) desaparecem nas células hematopoiéticas, permanecendo apenas nas CPEs em diferenciação.

As CPEs e células endoteliais, por sua vez, expressam marcadores similares específicos de células endoteliais circulantes, incluindo VEGFR-2, Tie-1, Tie-2, VE-

caderina (Ribatti D, 2007), cuja expressão depende do grau de comprometimento destas células com sua diferenciação endotelial.

Um número grande de CPEs co-expressam CD133 e VE-caderina, marcador de células mais precoce e diferenciadas, respectivamente. Com relação ao CD133, a maioria é CD133+/CD34+, indicando que a células CD133+ são um subgrupo de CD34+ ideal para gerar células endoteliais diferenciadas (Chachques *et al.*, 2003).

As CECs são células que se diferem das CPEs por serem células endoteliais maduras que se deslocam da parede das veias e entram na circulação em situações de lesão vascular, podendo servir como indicador de lesão arterial. As CPEs por sua vez, se localizam na medula óssea de onde são recrutadas para a participação de re-endotelização de vasos lesionados e redução na formação de neo-íntima após a lesão do endotélio vascular (Werner *et al.*, 2003). Assim como outras células-tronco ou células progenitoras, as CPEs localizadas em certos tecidos permanecem em estado inativo até receberem sinais específicos que permitam sua diferenciação (Zhang e She, 2007) e induzem sua mobilização para o sangue periférico. Este recrutamento pode estar associado à ativação de proteinases como a elastase, catepsina G e metaloproteinases (MMPs). Estas enzimas clivam as moléculas de ligação da matriz extracelular ou da membrana celular responsáveis pela adesão das CPEs às células do estroma da medula. A MMP-9 cliva o ligante *Kit* de membrana das células do estroma, transformando-o em *Kit* solúvel, este interage com o *c-Kit* das CPEs conduzindo assim um sinal para a diferenciação e migração da medula para o sangue periférico (Heissig *et al.*, 2002; Hristov e Weber, 2004).

Com relação à capacidade proliferativa e de expansão, as CPEs formam colônias endoteliais altamente proliferativas, enquanto que as CECs formam apenas monocamadas endoteliais com limitada capacidade de proliferação, por se tratar de células maduras e terminalmente diferenciadas (Lin *et al.*, 2000).

Contudo, estas CPEs representam menos de 1% do total de células da medula óssea e menos de 0,01% das mononucleares do sangue periférico (Smadja *et al.*, 2007) e considerando sua importância na recuperação de lesões arteriais e seu envolvimento em processos patológicos como a aterosclerose, trombose, hipertensão arterial e diabetes, as

pesquisas com as CPEs passam a ter grande importância para a terapia celular e muitos estudos são necessários, uma vez que, ainda conhecemos pouco suas características.

3.2- Células Progenitoras Endoteliais e Terapia Celular

O estudo das células tronco e das células progenitoras endoteliais e suas funções tem apresentado grande destaque, principalmente devido ao seu grande potencial na medicina regenerativa e na terapia celular para diversas patologias.

A descoberta das CPEs alterou radicalmente a concepção de angiogênese nos tecidos adultos, indicando a contribuição de células da medula óssea na formação de novos vasos sanguíneos ao invés de ocorrer apenas migração de proliferação de CEs maduras pré-existentes (Pearson, 2009). Foi demonstrado que estas células participam da vasculogênese e da angiogênese, que ocorre na vida pós-natal, o que as tornam importantes no reparo vascular e no processo de criação de novos vasos, sem a dependência da presença de outros vasos (Pearson, 2010).

O aparecimento do sistema vascular é um evento essencial durante o desenvolvimento embrionário, com o estabelecimento de ilhas sanguíneas no saco vitelínico. Durante este processo, precursores mesodermiais locais diferenciam-se em precursores vasculares (as células centrais do interior dessas ilhas) e células endoteliais (a população periférica das ilhas) que formam as primeiras estruturas vasculares que revestem o interior das células sanguíneas que origina um plexo vascular preliminar, processo denominado vasculogênese (Carmeliet, 2000).

A vasculogênese pode ser definida, então, como a diferenciação de células progenitoras endoteliais em células endoteliais no interior de capilar primário, sendo responsável pelo desenvolvimento do sistema vascular durante a embriogênese (Peichev *et al.*, 2000).

Em contrapartida, a angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos por brotamento de vasos preexistentes e ocorre durante o desenvolvimento

embrionário e durante a vida pos-natal. A angiogênese induzida pelas CPEs ocorre pelo aumento do fornecimento de células endoteliais, através da proliferação e diferenciação das CPEs, ou ainda pelo aumento no fornecimento de fatores de crescimento que por sua vez ativam as CEs maduras residentes, este processo envolve ainda o equilíbrio entre ativadores e inibidores da angiogênese. (Senegaglia *et al.*, 2008).

A angiogênese desregulada e persistente pode resultar em muitas doenças. Estes novos vasos sanguíneos podem invadir as articulações e acabam destruindo a cartilagem, no caso da artrite, no caso da diabetes, estes novos vasos podem invadir o vítreo da retina causando cegueira, além disso, o crescimento de tumores e a metástase são dependentes de angiogênese para o fornecimento de nutrientes necessários para o desenvolvimento das células tumorais (Folkman e Shing, 1992).

De acordo com Watt *et al.*, (2010) existem 3 possíveis estratégias terapêuticas para o uso de CPEs no reparo tecidual. Primeiro, elas podem ser utilizadas como biomarcadores para diagnóstico ou para prever o risco de patologias cardiovasculares (primeiro trabalho publicado por Vasa *et al.*, 2001). Em segundo, as CPEs podem ser mobilizadas para a circulação por fatores de crescimento ou ser obtidas a partir da medula óssea, do sangue de cordão ou tecidos proporcionando uma fonte de células progenitoras vasculares para auxiliar a neovascularização. E em terceiro lugar, podem ser manipuladas *in vivo* para aprimorar sua capacidade de reparo vascular.

Trabalhos com animais e humanos sugerem que a habilidade das CPEs em melhorar a função de órgãos isquêmicos, que ocorre possivelmente pela indução e modulação da angiogênese e vasculogênese em áreas com redução do suprimento de oxigênio ou por estímulo da re-endotelização de injúrias em vasos sanguíneos (Hristov *et al.*, 2003).

Para Sharpe *et al.* (2006) o ambiente neovascular pode facilitar a vasculogênese por promover a diferenciação de células endoteliais que atuam como uma barreira fisiológica para prevenir a agregação plaquetária e deposição de fibrina na superfície das válvulas. (Kasimir *et al.*, 2005).

Hill *et al.* (2003) reportaram uma forte correlação inversa entre o nível de CPEs do sangue periférico e o risco de doenças coronárias arteriais (determinados por ensaio de formação de colônia). Vasa *et al.* (2001) demonstraram que o número e a capacidade

migratória das CPEs são comprometidos em pacientes com doenças coronárias arteriais. Análises por citometria de fluxo revelaram uma redução de 48% das CPEs CD34+/VEGFR-2+ em pacientes com doença coronária arterial, além de redução de 40% das CPEs UEA-I+ (*Ulex europaeus agglutinin I*) e Dil-ac-LDL positivas em cultura, estas células apresentaram também um comprometimento nos ensaios migratórios em resposta ao VEGF.

Kalka *et al.* (2000) injetou CPEs isoladas de sangue periférico humano, cultivadas por 7 dias (em meio com VEGF, bFGF, IFG e FGF) em camundongos e descobriu que estas células melhoram a neovascularização dos vasos sanguíneos. Neste experimento camundongos nude com angiogênese prejudicada após excisão da artéria femoral receberam injeções de CPEs expandidas em cultura e marcadas com Dil-ac-LDL fluorescente. Foi possível observar que a neovascularização foi melhor quando foram injetadas células expandidas em cultura em comparação com a injeção de células CD34+ frescas, obtidas a partir do sangue periférico.

Shintani *et al.* (2001) observaram um aumento significativo de células CD34+ circulantes no sangue em pacientes com infarto agudo do miocárdio comparado com um grupo controle. O maior número de CD34+ foi observado 7 dias após o infarto, por citometria. Eles mostraram ainda que a cultura de mononucleares obtidas após 7 dias de infarto são bem mais numerosas que a cultura de células de mononucleares obtidas no 1º dia de infarto.

Ensaio pré-clínicos indicam que as CPEs contribuem com 1- 25% da formação de vasos após lesão isquêmica em diversas doenças (Young *et al.*, 2007). Além disso, as CPEs podem secretar fatores de crescimento e sinais parácrinos que impedem a morte de cardiomiócitos (Narmoneva *et al.*, 2004).

Este potencial terapêutico das CPEs pode ser melhor empregado, se estas forem bem caracterizadas, isoladas e administradas no local da lesão. De acordo com Zampetaki *et al.* (2008) a infusão de CPEs em membros isquêmicos de camundongos imuno-comprometidos melhorou a perfusão e recuperação de injúrias, mas somente um pequeno número das CPEs incorporadas pode ser identificada. Isto sugere que as CPEs podem

liberar fatores angiogênicos de modo parácrino e não apenas atuarem diretamente como fonte de células endoteliais.

Stamm *et al.* (2003), comprovaram tal capacidade infundindo $1,5 \times 10^6$ células CD133+ da medula óssea na zona limítrofe do miocárdio enfartado de 6 pacientes com isquemia crônica, submetidos à cirurgia de revascularização. Todos os 6 pacientes sobreviveram, e foi possível notar uma melhora na função ventricular esquerda de 4 deles e melhora na perfusão do tecido isquêmico em 5 pacientes. Concluiu-se que é mais vantajoso o emprego de uma pequena quantidade de CPEs selecionadas do que um grande número de células não selecionadas da medula óssea.

A relação das CPEs com outras patologias pode ser observada através dos ensaios biológicos. Existe grande interesse de se entender o papel das CPEs no tratamento de danos na medula espinhal e no cérebro, reparo dos tecidos cardíaco e hepático, tratamento da diabetes (reparo do pâncreas), reparo de músculos, vasos sanguíneos e pele (tratamento de queimados) (Roberts *et al.*, 2005). O número de CPEs assim como seu potencial proliferativo podem ser alterados em condições patológicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e artrite reumática (Miller- Kasprzak e Jagodzinski, 2007).

Paciente com diabetes mellitus tipo II indicam uma diminuição na capacidade proliferativa das CPEs e na formação de estruturas capilares características destas células. Isto pode se dever a uma diminuição da produção de óxido nítrico e atividade da MMP-9 (Krankel *et al.*, 2005), que transforma o ligante *c-kit* de membrana em um ligante *c-kit* solúvel (Heissig *et al.*, 2002). A artrite reumática é uma doença acompanhada pelo risco de doenças cardiovasculares e foi observado que pacientes com tal patologia também apresentam redução no número e capacidade migratória das CPEs (Herbrig *et al.* 2006).

O uso terapêutico das CPEs na substituição do endotélio lesionado é atualmente um dos principais focos das pesquisas vasculares em todo o mundo. As doenças vasculares são uma das principais causas de morte no mundo, dentre as quais tem destaque a aterosclerose, doença caracterizada pelo depósito de placas de ateroma na parede das artérias, tornando o endotélio disfuncional e reduzindo seu calibre, trazendo déficit sanguíneo aos tecidos irrigados por elas (Xu Yang *et al.*, 2007).

As CPEs podem atuar secretando uma variedade de fatores de crescimento, incluindo VEGF, HGF (fator de crescimento de hepatócito), G-CSF (fator de estimulação de colônia de granulócitos), GM-CSF (fator de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos) e IL-8 (interleucina-8, que atua na resposta inflamatória), que suportam a sobrevivência e função das células residentes de tecidos, acelerando o processo de formação de novos vasos e regeneração de órgãos (Marsboom e Janssens, 2008).

Estudos em animais revelaram que a neovascularização de tecidos com isquemia pode aumentar após transplante autólogo de medula óssea (Eggermann *et al.*, 2003). Raffi *et al.* (2003) sugeriram em seus estudos que as células progenitoras endoteliais contribuem potencialmente para revascularização e regeneração do tecido, abrindo caminho para sua utilização como fonte para a engenharia de enxertos vasculares que auxiliam na re-endotelização (Wijelath *et al.*, 2004).

3.3 – Cultura de Células Progenitoras Endoteliais

Uma limitação crítica para a aplicação terapêutica das CPEs é seu baixo número na circulação (proporção de células CD34+ é geralmente 0,1- 2% do total das células mononucleares da medula óssea, sangue periférico e sangue de cordão, segundo Asahara *et al.*, 1997) e devido a estas pequenas quantidades no sangue periférico, sua aplicação em ensaios clínicos acaba tornando-se inviável (Senegaglia *et al.*, 2008). Sendo assim, a cultura de CPE é extremamente importante para investigações biológicas, contudo, novas metodologias necessitam ser estabelecidas para o cultivo destas células a fim de utilizá-las na terapia celular (Iwaguro e Asahara, 2005), tudo isso faz com que muitos autores considerem seu estudo o “calcanhar de Aquiles” da biologia das CPEs (Timmermans *et al.*, 2009)

As células em cultura constituem uma mistura de células nas diferentes fases de desenvolvimento: contendo células multipotentes, precursoras indiferenciadas, maduras e diferenciadas, este equilíbrio pode ser alterado de acordo com as condições do ambiente e do meio de cultura. A técnica de cultura de células busca manter a viabilidade celular e

efetivar sua diferenciação, *in vitro*, em uma linhagem específica, tendo como princípio a manutenção do nicho celular, composto por matriz extracelular e citocinas, garantindo assim a homeostase das linhagens celulares, evitando a diferenciação e proliferação descontrolada (indução de tumores) e a apoptose (Zhang e She, 2007).

A combinação de uma série de fatores de crescimento e citocinas presentes no microambiente das células é um dos desafios da técnica de cultura. Os fatores de crescimento são substâncias protéicas que atuam no controle do ciclo celular estimulando a proliferação, migração, diferenciação celular e apoptose. Podem ser produzidos de forma autócrina ou serem liberados através da membrana plasmática de células adjacentes modulando a atividade celular (Takahashi *et al.*, 2007). Agem como sinalizadores entre as células, unindo-se a receptores de membrana e transmitindo o sinal externo para o interior celular, através do acoplamento a proteínas quinases que ativam uma cascata de sinais. Diversos fatores como o VEGF, FGF, IGF e EGF, tem sido descritos como necessários para o processo de proliferação e diferenciação das CPE em cultura.

O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), de acordo com Kalka *et al.* (2000) contribui para a neovascularização, mobilizando as CPEs derivadas da medula óssea. Ele é considerado o ligante preferencial de VEGFR-2 em condições fisiológicas e patológicas, é também o maior indutor de angiogênese e um potente estimulante da proliferação, migração, formação de vasos endoteliais e regulador da permeabilidade vascular (Lacaud *et al.*, 2004; Yancopoulos *et al.*, 2000). VEGF tem alta afinidade pelo VEGFR-2, indicando um sistema sinalizador parácrino crucial para as CEs no sistema vascular (Risau e Flame, 1995).

O FGF é o Fator de Crescimento Fibroblástico e atua como potente citocina angiogênica estimulando a proliferação endotelial e induzindo a angiogênese (Brown *et al.*, 1996). O fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF) regula a proliferação, migração e produção de proteases das CEs e possui importante papel em vários processos fisiológicos e patológicos (Miraglia *et al.*, 1997). Células endoteliais cultivadas na ausência de b-FGF são levadas à apoptose.

O Fator de Crescimento Semelhante à Insulina I (IGF-I) constitui uma cadeia polipeptídica única de 70 resíduos de aminoácidos ligados por 3 pontes dissulfídicas e com

peso molecular aproximado de 7,5kDa. Ele possui função mitógena para várias células como as células progenitoras eritróides, fibroblastos, osteoblastos, células musculares lisas, células fetais do cérebro e neurogliais (Senegaglia A, 2008). O IGF-I controla a proliferação e diferenciação celular específicos da fase G1 dentro do ciclo de divisão (Zumstein e Stiles,1987). Encontra-se amplamente distribuído nos tecidos de mamíferos, onde está relacionado a uma série de atividades biológicas como o crescimento e desenvolvimento tecidual (Li *et al.*, 2003).

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é uma proteína de 6,2KDa com três pontes dissulfeto intramolecular, possui importante papel no crescimento, proliferação e diferenciação celular através da ligação com seu receptor EGFR (Carpenter e Cohen, 1990), que irá desencadear uma série de respostas bioquímicas intracelular, como o aumento da glicólise e síntese de proteínas e que culminam na regulação do crescimento celular, proliferação e diferenciação.

A combinação destes fatores é sugerida em muitos trabalhos com CPEs, como por exemplo, Quirici *et al.*, (2001) para a expansão de CD133+ isolada de medula óssea humana, Eggermann *et al.* (2003), Zhang *et al.* (2007), Senegaglia *et al.* (2010) em seu trabalho para cardiomioplastia.

A manutenção da concentração e as associações destes fatores com seus receptores de membrana são muito importantes na diferenciação celular, uma vez que, muitos tipos celulares competem pelos mesmos fatores e citocinas, tornando-os assim um critério de seleção na técnica de cultura de células.

Outro desafio na técnica de cultura de CPEs é a chamada contaminação pelas células tronco mesenquimais (CTM) e por fibroblastos, o que, segundo Wang *et al.* (2008), pode ser controlado pelo cultivo das CPEs em meio condicionado de célula endotelial (MC-CE). Este meio é preparado a partir de uma cultura confluenta de 48 horas de uma linhagem estabelecida, sendo assim este meio contém citocinas suficientes para estimular o crescimento das CPEs e, além disso, fortes inibidores para suprimir o crescimento das CTM e dos fibroblastos (Wang *et al.*, 2008).

As CPEs podem ser isoladas por diferentes métodos, incluindo as microbeads magnéticas e a aderência na cultura. Asahara *et al.* utilizaram em 1997 da técnica das

microbeads, na qual por diferença de aderência em cultura células sanguíneas mononucleadas CD34+ foram isoladas de sangue periférico humano por beads magnéticas cobertas com anticorpo CD34, seguindo o princípio imunológico da ligação antígeno - anticorpo.

Com relação à aderência, a seleção é feita com base nos fatores de crescimento; hormônios específicos de crescimento e reguladores de crescimento também estão explicitamente envolvidos na regulação da função, diferenciação e mobilização das CPEs (Li *et al.*, 2009), como é o caso do IGF que de acordo com Devin e Young (2008) melhora a migração, formação de tubo e angiogênese das células endoteliais maduras.

Para que ocorra o crescimento e conseqüente proliferação, as CPEs necessitam de um tecido sólido para sua adesão. A adesão celular a estes substrato requer uma classe especial de proteínas de adesão, normalmente as caderinas, Ca^{+2} dependentes ou CAM, Ca^{+2} independente. Para a cultura de células normalmente faz uso das matrizes extracelular sintéticas. A superfície da matriz da cultura deve ser revestida por uma camada de colágeno ou gelatina, contudo, às vezes faz necessário uma monocamada celular - fibroblastos são utilizados para facilitar e aumentar o crescimento de células de baixa densidade, para providenciar a matriz correta (*feeder layer*) para a manutenção de células especializadas, portanto, para que seja estabelecida uma cultura de células progenitoras endoteliais é necessário se determinar o meio ideal, os fatores proliferativos necessários e a superfície de adesão celular ideal que permita a sobrevivência e diferenciação destas células *in vivo*.

Desta forma, cada laboratório tem buscado estabelecer suas condições de cultura mais adequadas a fim de isolar, caracterizar e expandir as CPEs, na tentativa de possibilitar o uso destas células na terapia celular, principalmente no tratamento de lesões vasculares, provocadas por doenças como a diabetes, hipertensão arterial e aterosclerose. Este é também o interesse da nossa pesquisa, uma vez que já foi demonstrado por nosso grupo de pesquisa, através do trabalho de Godoy *et al.* (2011) que células mononucleares isoladas por ficoll e injetadas em camundongos C57bl/6 submetidos à angioplastia, e provocam uma redução da neointima no local da lesão, reduzindo desta forma a oclusão da carótida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

O presente trabalho buscou selecionar e caracterizar células progenitoras endoteliais da medula óssea pela técnica da cultura aderente e o desenvolvimento de uma estratégia de cultura de células capaz de promover a proliferação das mesmas, viabilizando seu potencial terapêutico.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Isolar células mononucleares da medula óssea de camundongos C57bL/6 através da técnica de gradiente de Ficoll-Paque PLUS.

4.2.2. Verificar a capacidade proliferativa das células isoladas por Ficoll-Paque PLUS em diferentes meios de cultura acrescidos de fatores de crescimento com concentrações variadas.

4.2.3. Verificar a viabilidade e capacidade de diferenciação celular, além da capacidade de internalização do acLDL e formação de estruturas semelhantes a capilares quando cultivadas na presença de Matrigel[®].

4.2.4. Analisar a expressão dos marcadores celulares das células isoladas em cultura, como o CD133, CD34, VEGFR-2, CD31, durante o processo de diferenciação celular no meio selecionado.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Isolamento de células mononucleares por gradiente de Ficoll

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA (nº 1243-1).

As células mononucleares foram extraídas da medula óssea de camundongos machos C57bl/6 com aproximadamente 28g, eutanisados com superdosagem de anestesia (100 mg/kg quetamina e 20 mg/kg xilazina). Após a eutanásia os animais foram embebidos em uma solução de álcool iodado para assepsia, os ossos longos (fêmur, tíbia e úmero) foram isolados, as epífises abertas permitindo assim que a medula fosse perfundida com 15ml de meio de cultura específico (meio de cultura acrescido de 10% soro fetal bovino e 2% Penicilina/Estreptomicina - Nutricell–Campinas, SP/BR).

O aspirado de medula óssea foi coletado em um tubo falcon, centrifugado a 300xg por 15 minutos, foram realizadas 2 lavagens com meio de cultura. Após a última centrifugação as células passaram pelo processo de digestão celular, elas foram ressuspensas em 1ml de meio de cultura acrescido de 20µl de tampão de digestão (10 µl DNaseI (0,01% – Roche–USA) e 10 µl de Colagenase B (10mg/ml, Roche–USA) e mantidas em estufa a 37°C por 30 minutos.

Passados os 30 minutos da digestão as células foram centrifugadas 2 vezes para retirada do tampão de digestão e seguiu-se com o procedimento de isolamento das células por gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare–USA), através da centrifugação por 45 minutos a 300xg, permitindo assim o isolamento das células mononucleares totais (CMN) (Wang e cols, 2008) que após a centrifugação ficam na interfase entre o meio de cultura e o Ficoll. As CMN foram então recolhidas em um tubo falcon, lavadas para retirar o Ficoll e então contadas utilizando a câmara de Neubauer, para o plaqueamento de uma concentração exata de células.

5.2. Cultivo das células mononucleares

As células foram cultivadas em placas de cultura cobertas com gelatina 1% (Gelatin from bovine skin, Type B – Sigma–St Louis, MO/USA) em água MilliQ, a concentração de células utilizada foi de 10^5 células/ml. A morfologia, adesão, crescimento e proliferação destas células foram analisados em resposta aos diferentes meios de cultura testados, com base nas referências bibliografia. Testamos o meio 199, DMEM com vermelho de fenol DMEM sem vermelho de fenol, MEM e RPMI-1640 (todos os meios são da Nutricell–Campinas, SP/BR), a porcentagem de soro fetal bovino (Nutricell–Campinas, SP/BR) utilizada foi 10%. Além disso, diferentes concentrações dos fatores de crescimento VEGF (Human Recombinant Vascular Endothelial Cell Growth Factor – Invitrogen– Carlsbad, CA/USA), IGF (Insulin-like Growth Factor I – Sigma–St Louis, MO/USA), bFGF (Recombinant Human Fibroblast Growth Factor-basic (Amino Acid 10-155) – Invitrogen–Carlsbad, CA/USA), EGF (Human Recombinant Epidermal Growth Factor – Invitrogen–Carlsbad, CA/USA) e de hidrocortisona foram utilizados para suplementar os meios.

Meios de cultura testados:

	M Controle	M 1	M 2	M 3
Meio (RPMI, DMEM, MEM e M199)				
Penicilina/Estreptomicina (PS)	1%	1%	1%	1%
Soro Fetal Bovino (SFB)	10%	10%	10%	10%
VEGF		10ng/ml	10ng/ml	10ng/ml
bFGF		2ng/ml	2ng/ml	1ng/ml
IGF		2ng/ml		
EGF			1ng/ml	0,1ng/ml
Hidrocortisona				1ng/ml

Estes meios receberam a denominação RC, R1, R2 e R3 quando utilizamos o meio RPMI 1640; DC, D1, D2 e D3 para o DMEM; MC, M1, M2 e M3 para o meio MEM e M199MC, M199M1, M199M2 e M199M3 para o M199. O meio DME com vermelho de

fenol foi denominado como DMEM1 durante o experimento e o DME sem vermelho de fenol é DMEM2.

5.3. Teste de adesão celular por DAPI

Para o teste de adesão celular realizamos a contagem do número de células aderidas, através da marcação do núcleo das células com DAPI (4'6 diamino – 2 fenilindole, 0,1µl/ml). Foram plaqueadas 10^5 células/ml em placas de 24 poços com lamínulas, passado os períodos estabelecidos (3, 7 e 14 dias), as mesmas foram lavadas com PBS, fixadas com 200µl de acetona (30 minutos a 4°C), a acetona foi retirada e as células lavadas duas vezes com PBS. Seguiu-se a marcação dos núcleos através da incubação com 100µl de DAPI (0,1µg/ml em metanol) por 15 minutos a 37°C, o excesso de DAPI foi retirado por lavagens com PBS. As lâminas foram montadas e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5). Foram feitas triplicatas para cada meio testado e escolhidos 4 campos em cada lâmina para a contagem do total de células.

5.4. Teste de proliferação e viabilidade celular por Azul de Tripán

Para determinar a proliferação e viabilidade celular, as células mononucleares foram plaqueadas em placas de 24 poços (10^5 células/ml) e nos períodos de 3, 7 e 14 dias foram realizadas contagens do número de células com Azul de Tripán (Sigma–St Louis, MO/USA). A contagem foi feita em triplicata, cada poço foi tripsinizado (Tripsina EDTA, Nutricell–Campinas, SP/BR), a suspensão celular juntamente com as células tripsinizadas foram centrifugadas e ressuspensas em 500µl de PBS. A esta suspensão foi adicionado 500µl do corante Azul de Tripán (0.4% m/v em PBS) e após 5 minutos as células foram contadas em hemocitômetro.

Esta técnica permite identificar as células viáveis (refringentes) e as células não viáveis (coradas de azul pela penetração do corante através da membrana rompida). O que

garante resultados quantitativos (soma-se o total de células (viáveis e não viáveis) e multiplica pelo fator de diluição, no caso 2, os valores encontrados são expressos em 10^4). Já a viabilidade celular (em %) também pode ser determinada, neste caso, o total de células viáveis (não coradas) é dividido pela total de células (coradas e não coradas) e multiplicado por 100.

5.5. Ensaio de viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular foi detectada também pelo ensaio de MTT (3-[4,5 – Dimethylthiazol – 2 – yl] 2.5 – diphenyl tetrazolium bromide, thiazolyl blue) (Sigma nº M5655), este sal é reduzido por atividade enzimática mitocondrial das células a cristais de formazam, um subproduto insolúvel cuja intensidade da coloração azulada pode ser medida por espectrofotometricamente.

Uma concentração de 10^4 células/ml foi plaqueada em placas de 96 poços com 150µl de cada meio testado no presente trabalho. Após os períodos de cultura estabelecidos para os testes (3, 7 e 14 dias), foram adicionados 10µl de uma solução de 0,5mg/ml de MTT à placa contendo as células e seguiu-se com incubação à 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade atmosférica por 72 horas. Terminado este período o MTT foi retirado e adicionado 100µl de dimetilsulfóxido (DMSO). A placa ficou sob agitação branda por 15 minutos e a absorbância foi medida a 595nm em leitor de placa de Elisa (Synergy - BioTek).

Esta técnica avalia as células em cultura que se encontram metabolicamente ativas, uma vez que analisa a atividade mitocôndrial das mesmas.

5.6. Imunocitoquímica

As células foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas (cobertas com gelatina 1%) numa densidade de 10^5 células/ml e mantidas em cultura por 3, 7 e 14 dias. Decorrido os períodos estabelecidos, as células foram fixadas com 200µl de acetona por 30

minutos a 4°C, seguiu-se então a reação de imunocitoquímica, com marcadores para células progenitoras endoteliais (CD133, CD34 e VEGFR-2) e marcador de células endoteliais (CD31).

Primeiramente foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas pela incubação com PBS/BSA 2% por 2 horas, prosseguiu-se com a incubação dos anticorpos primários: CD133 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), CD34 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), VEGFR-2 anti-mouse biotinilado (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml) e CD31 anti-mouse (Invitrogen– Carlsbad, CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), todos diluídos 1:200 em PBS/BSA 2%.

Após a incubação overnight a 4°C o excesso de anticorpo primário foi retirado através de lavagens com PBS e seguiu-se com a incubação dos anticorpos secundários, fluorescente e não fluorescentes.

Para a técnica de revelação por DAB foram utilizados os anticorpos Biotinylated anti-rat IgG (H+L) (Vector Laboratories–Burlingame, CA/USA) para CD133, CD34 e CD31, e HRP (horseradish peroxidase) para o VEGFR-2 biotinilado, todos diluídos 1:200 e incubados 30 minutos a temperatura ambiente. No caso do anticorpo biotinilado, após sua incubação, foi necessário o uso do Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories–Burlingame, CA/USA), que se liga ao anticorpo por meio da interação avidina-biotina, fornecendo ao mesmo a peroxidase, substrato para o revelador DAB Substrate Kit for Peroxidase (SK-4100). O DAB (diaminobanzidina) na presença de H₂O₂ e peroxidase forma um polímero de coloração marrom. O HRP (horseradish peroxidase) não precisa ser incubado com o ABC Kit, uma vez que, já possui a peroxidase necessária.

Para a técnica de imunofluorescência foram utilizados os anticorpos secundários conjugados com fluoróforos e emitem luz quando excitado por fluorescência. Foram utilizados Ficoeritrina (PE Streptavidin - eBioscience–San Diego CA/USA; concentração inicial de 0,2mg/ml) para marcação de VEGFR-2 e CD34 biotinilados e Isotiocianato de Fluoresceína (FITC conjugated anti-mouse - eBioscience–San Diego CA/USA; concentração inicial de 0,5mg/ml) para marcação de CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 purificados, todos diluídos 1:250. Os mesmos foram incubados por 20 minutos a

temperatura ambiente, em seguida realizou-se a contra coloração com a marcação dos núcleos com DAPI (0,1µl/ml, incubação de 15 minutos a 37°C).

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5), sendo as imagens capturadas pelo programa QCapture. Em seguida estas imagens foram sobrepostas através do programa Adobe Photoshop 7.0.1 para identificação das células com dupla marcação.

5.7. Western Blotting

A expressão dos marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 foram verificadas pela técnica de Western Blotting. Após 3 e 7 dias de cultura as células foram tripsinizadas e contadas, pelo menos 10^6 células/ml foram necessárias para a extração das proteínas.

As células foram lisadas com 200ul do tampão RIPA (NaCl, ácido deoxicolato de sódio (1%), Tris- HCl (0,1M) NP-40 (1%) e água), acrescido de 5ul de coquetel anti-protease (Protease Inhibitor Cocktail – Sigma–St Louis, MO/USA), a partir deste ponto as amostras foram sempre mantidas em gelo, foi realizada a sonicação das mesmas (3 pulsos de 10 segundos cada a uma potência de 70%). Após 2 horas de intervalo, em gelo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante, contendo as proteínas extraídas, foi recolhido. As proteínas foram quantificadas pelo Método de Bradford (1976), e a quantidade de proteína estabelecida neste caso foi de 100ug de proteínas por ensaio.

Para a separação das proteínas foi utilizado um gel SDS-PAGE bis-acrilamida 10% de 75nm. As amostras para a eletroforese foram preparadas adicionando o tampão de amostra (SDS 2%, Glicerol 10%, β -mercapto 5%, Tris-base, Azul de bromofenol e água deionizada), na proporção de 1:1 (amostra: tampão) e aquecido a 100°C por 5 minutos, para romper as pontes dissulfeto e desagregar as proteínas.

As amostras foram aplicadas em duplicata para 3 e 7 dias, além do padrão de peso molecular de 10-200kDa (PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Fermentas LIFE SCIENCE SM0661). A separação procedeu-se à 90W.

Para a eletrotransferência foi utilizada membrana de PVDF (Immobilion-P Transfer Membrane, Millipore – Billerica, MA/USA) e a corrente foi de 400mA, o processo durou cerca de 1,5 hora. Terminada a eletrotransferência realizamos uma coloração rápida com Ponceu 0,5% em ácido acético 1%, por 5 minutos para verificar a transferência das proteínas, em seguida a membrana foi lavada para retirar o corante.

A marcação com os anticorpos iniciou-se com o bloqueio de ligações inespecíficas com solução bloqueadora (solução de leite em pó desnatado, 1%), por 1 hora, em seguida a membrana foi lavada 3 vezes de 5 minutos, com uma solução basal – TBS 1X, (Tris base 1M, NaCl 5M, Tween 20 e água destilada), sob agitação constante.

Os anticorpos utilizados foram CD133 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), CD34 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), VEGFR-2 anti-mouse biotilado (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml) e CD31 anti-mouse (Invitrogen– Carlsbad, CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), todos diluídos 1:400 em TBS e incubados overnight a 4°C.

Prosseguiu-se com a incubação do anticorpo secundário Biotinylated anti-rat IgG (H+L) (Vector Laboratories–Burlingame, CA/USA) diluído 1:500 por 2 horas, sob agitação constante e a temperatura ambiente. Após este período foram realizadas 3 lavagens com TBS, a aplicação do Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories–Burlingame, CA/USA) por 30 minutos e por último a revelação da membrana com DAB Substrate Kit for Peroxidase (SK-4100), incubação de 10 minutos sob agitação, a membrana foi então lavada com passagens rápidas em água destilada.

Os resultados da expressão dos marcadores foram analisados pelo programa ImageJ, obtido da internet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>)

5.8. Análise de células por Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo foi realizada para células não cultivadas (apenas isoladas por Ficoll-Paque PLUS) e para células após 7 dias de cultura, utilizando a concentração mínima

de 10^6 células/ml para os dois casos. Os anticorpos primários utilizados foram CD133 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), CD34 anti-mouse (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), VEGFR-2 anti-mouse biotilado (eBioscience–San Diego CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml) e CD31 anti-mouse (Invitrogen– Carlsbad, CA/USA, concentração inicial de 0,5mg/ml), incubados por 1 hora a temperatura ambiente.

Após sucessivas lavagens com PBS as amostras foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com o fluoróforo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC conjugated anti-mouse - eBioscience–San Diego CA/USA) para marcação de CD34 e CD133, Ficoeritrina (PE Streptavidin - eBioscience–San Diego CA/USA) para VEGFR-2 e Cy5™ Goat Anti-Rat IgG (H+L) Conjugate (Zymed-San Francisco CA/USA; concentração inicial de 1mg/ml) para CD31.

Estas células agora marcadas foram ressuspensas em PBS/BSA e paraformaldeído (4%) e analisadas pelo citômetro BD FACSCalibur™ System e para as análises foi utilizado o programa FlowJo (FlowJo, EUA).

A técnica de citometria de fluxo permite além de caracterizar os antígenos expressos pelas células, analisar o tamanho e a granulosidade celular. Através dos gráficos é possível fazer uma avaliação das áreas correspondentes a linfócitos, monócitos, granulócitos, células plasmáticas e regiões de blastos linfóides ou mielóides.

5.9. Ensaio para internalização de acLDL

Para o ensaio de internalização do acLDL (low-density lipoprotein from human plasma, acetylated, Alexa Fluor® 488 conjugate (Alexa Fluor® 488 AcLDL) 1mg/ml, Invitrogen– Carlsbad, CA/USA), 10µl deste foram incubados por 4 horas a 37°C em culturas de 7 e 14 dias em meio DMEM1–M1. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (0,1µl/ml).

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5), as imagens foram capturadas pelo programa QCapture. Em seguida estas

imagens foram sobrepostas através do programa Adobe Photoshop 7.0.1 para identificação das células com dupla marcação.

5.10. Formação de estruturas semelhantes a capilares

O ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel® (BD Biosciences, Beckton Dickison) foi realizado com células logo após o isolamento por Ficoll-Paque PLUS. O Matrigel® foi diluído (1:3) em meio de cultura DMEM1 e plaquado, todo esse procedimento foi realizado em gelo. A placa foi então colocada a 37°C (sem umidade) por 30 minutos para a polimerização do Matrigel®, passado este tempo as células suspensas em meio DMEM1-M1 (10^4 células/ml) foram plaqueadas sobre o matrigel e incubadas em estufa úmida a 37°C por 24 e 72 horas, 7, 9 e 15 dias. Testamos as concentrações de 10^3 e 10^4 células/cm² para verificar também se a concentração tinha alguma influência. As HUVECs foram utilizadas como controle positivo.

6 - RESULTADOS

Os resultados apresentados indicam as diferentes morfologias encontradas durante os períodos de cultura estabelecidos (3, 7 e 14 dias), onde encontramos células arredondadas, células aderidas e com emissão de prolongamentos, além de algumas colônias características de células endoteliais.

Em seguida realizamos as análises de adesão, proliferação e viabilidade celular, através das quais identificamos o meio DMEM1-M1 (acrescido de 10% de soro fetal bovino e fatores de crescimento – VEGF, bFGF e IGF) como sendo o mais adequado aos nossos objetivos. Para confirmar que o meio selecionado estava atuando na expansão de células progenitoras endoteliais, foram realizados testes para verificar a expressão dos marcadores característicos deste tipo de célula, CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31. As técnicas utilizadas foram a imunocitoquímica, imunofluorescência e western blotting, em todos os ensaios a expressão foi positiva para 3, 7 e 14 dias.

Por citometria de fluxo buscamos traçar um perfil de diferenciação das células mononucleares não cultivadas e destas mesmas após 7 dias de cultura, comparando o meio DMEM1-M1 e o DMEM1- MC (sem fatores de crescimento). Os dados indicaram que na presença dos fatores de crescimento utilizados houve principalmente aumento no número de células expressando o VEGFR-2. O ensaio de internalização de acLDL também foi positivo, reforçando a presença de células progenitoras endoteliais. Por fim, a cultura das células mononucleares em Matrigel[®] mostraram-se capazes de formar estruturas semelhantes a capilares somente a partir do 7º dia de cultura.

6.1 – Análises morfológicas de células mononucleares em diferentes meios e períodos

As células mononucleares foram cultivadas em placas cobertas com gelatina 1%, na concentração inicial de 10^5 células/ml. Diferentes meios de cultura acrescidos de diferentes fatores de crescimento com concentrações variadas foram testados. Estes meios receberam o nome de MC (meio controle, sem fatores de crescimento), M1 (meio acrescido de VEGF, IGF e bFGF), M2 (VEGF, bFGF e EGF) e M3 (VEGF, bFGF, EGF e hidrocortisona). As células foram fotografadas após 3, 7 e 14 dias de cultura, por uma câmara acoplada a um microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100.

6.1.1 – Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 3 dias de cultura

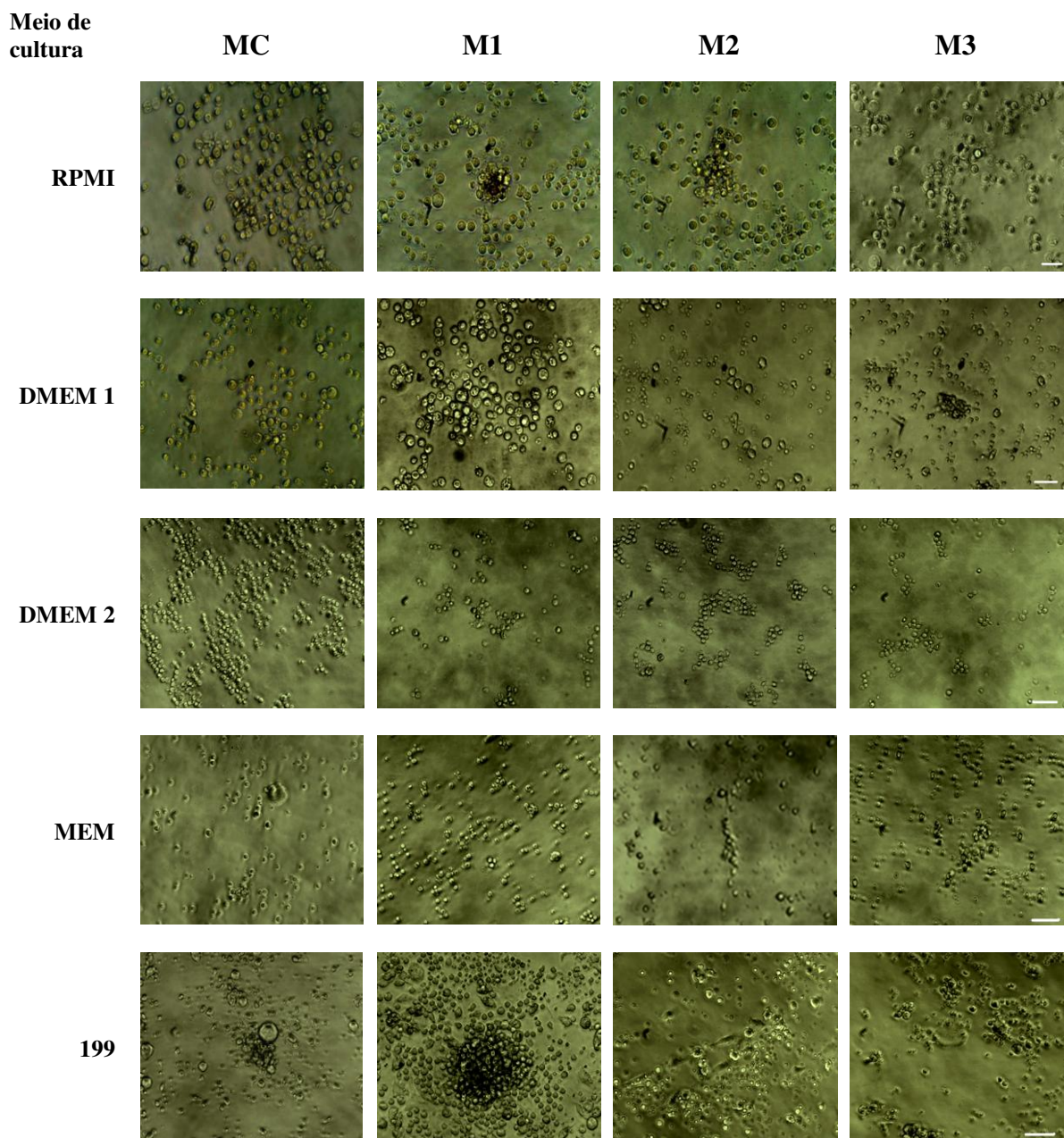


Figura 1: Células mononucleares após 3 dias de cultura em diferentes meios testados MC (meio e SFB), M1 (meio, SFB, VEGF, IGF e bFGF), M2 (meio, SFB, VEGF, bFGF e EGF) e M3 (meio, SFB, VEGF, bFGF, EGF e hidrocortisona). Aumento de 320X para RPMI e DMEM1 – MC e M1 e de 200X para os demais meios, em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1. Barra de escala de 100µm.

Com 3 dias de cultura podemos observar que as células são arredondadas, algumas já estão aderidas. Podemos notar também a presença colônias em RPMI-M1 e M2 e em 199-M1, estas colônias são características de células endoteliais como demonstrado por Iwaguro e Asahara (2005).

6.1.2 – Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 7 dias de cultura

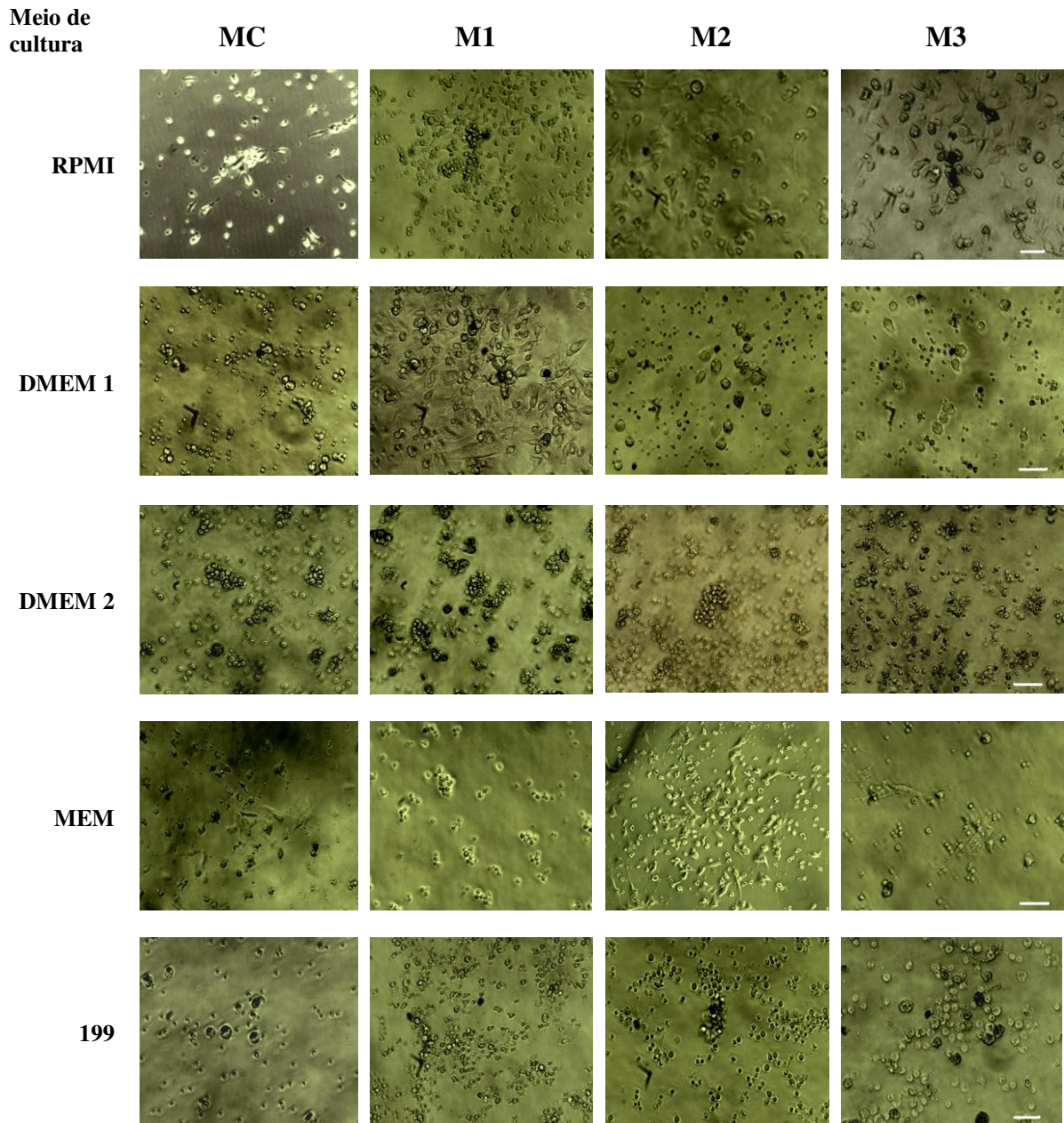


Figura 2: Células mononucleares após 7 dias de cultura em diferentes meios testados MC (meio e SFB), M1 (meio, SFB, VEGF, IGF e bFGF), M2 (meio, SFB, VEGF, bFGF e EGF) e M3 (meio, SFB, VEGF, bFGF, EGF e hidrocortisona). Aumento de 320X em RPMI – M2 e M3, DMEM1 – M1 e M199 – M3, nos demais

meios o aumento é de 200X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1. Barra de escala de 100µm.

Com 7 dias de cultura algumas células ainda apresentam o aspecto arredondado, ocorrendo uma seleção de células de tamanho maior. Muitas células apresentam morfologia fusiforme, indicando aderência como nos meios RPMI–M1, M2 e M3, e MEM–MC e M3. Por outro lado vemos também a presença de colônias bastante evidentes no meio DMEM2–M1 (sem vermelho de fenol) e todos os meios MEM, características de células endoteliais (Iwaguro e Asahara, 2005).

6.1.3 – Análises morfológicas de células mononucleares cultivadas em diferentes meios após 14 dias de cultura

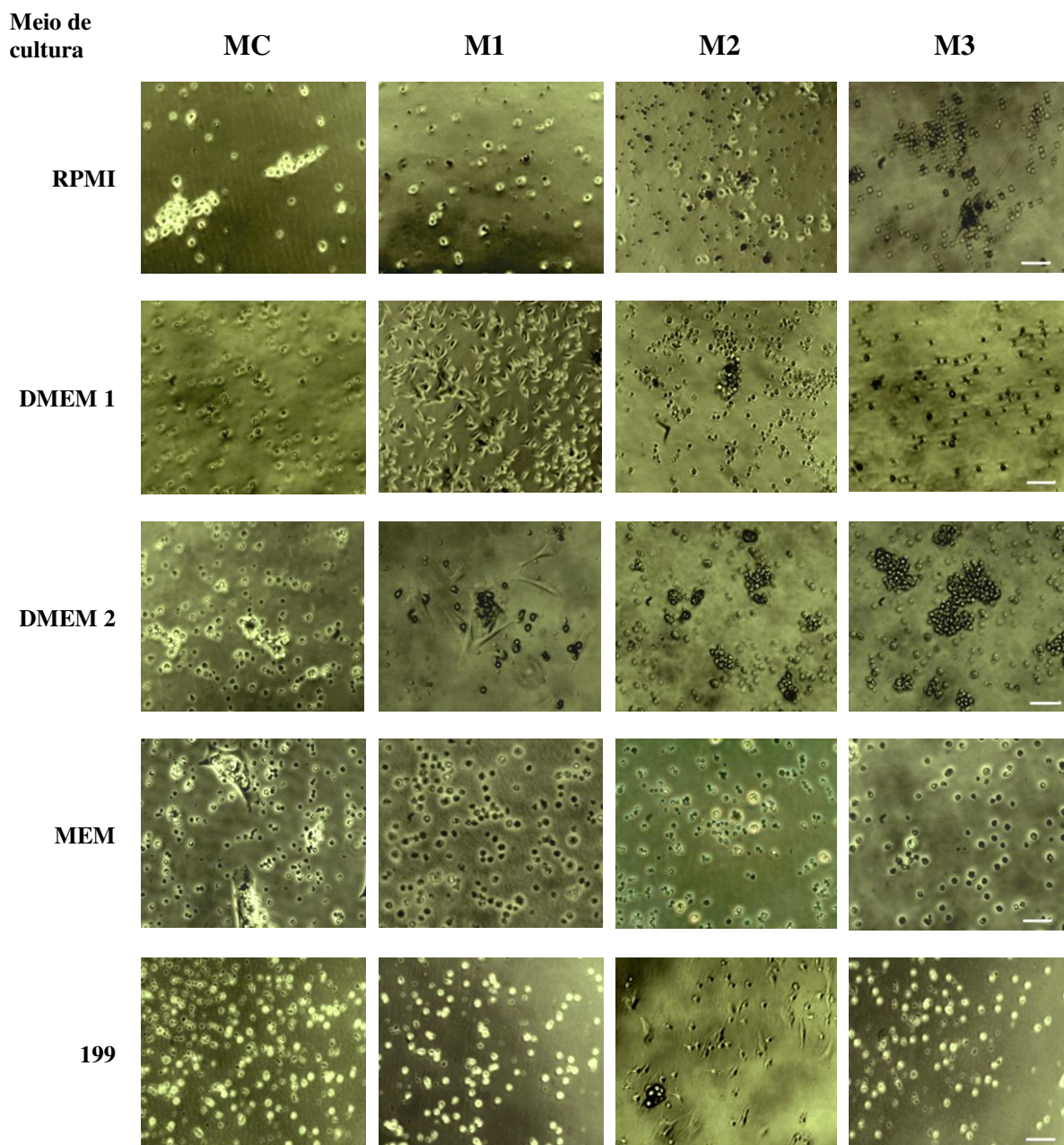


Figura 3: Células mononucleares após 14 dias de cultura em diferentes meios testados MC (meio e SFB), M1 (meio, SFB, VEGF, IGF e bFGF), M2 (meio, SFB, VEGF, bFGF e EGF) e M3 (meio, SFB, VEGF, bFGF, EGF e hidrocortisona). Aumento de 200X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1. Barra de escala de 100µm.

Com 14 dias de cultura ocorre uma redução do número de células em todos os meios (dados constatados pelos gráficos de proliferação, a seguir). As células são maiores que nos períodos de 3 e 7 dias. Em alguns meios ocorreram aderência e expansão celular, com emissão de prolongamentos, como no meio RPMI–MC, DMEM1–M1, DMEM2–M1 e M199–M2. Colônias ainda são vistas em RMPI–M3, DMEM2–M2 e DMEM2–M3. Nos meios MEM–M1 e MEM–M3 as células apresentam baixa refração, o que provavelmente indica células mortas, que acabam sendo eliminadas na troca do meio.

A diminuição no número de células se deve à seleção pelos meios e fatores utilizados ao longo dos períodos, muitas células não aptas a estas condições acabam morrendo e são eliminadas com as trocas realizadas a cada dois dias.

6. 2 – Análise de Adesão por DAPI e Proliferação por Azul de Tripán das células mononucleares em diferentes tempos de cultura

A escolha do meio mais adequado para o aumento no número de CPEs e consequente diferenciação em CEs maduras a partir das células mononucleares, se deu com bases nos ensaios de adesão celular (DAPI), proliferação (contagem com Azul de Tripán) e viabilidade (Azul Tripán e MTT). Os dados indicaram o meio DMEM1–M1 como sendo o melhor para estes objetivos.

As análises tanto para adesão quanto para proliferação foram feitas comparando os meios MC, M1, M2 e M3 para cada um dos meios, ou seja, dentro do RPMI1640, do DMEM1, do DMEM2, do MEM e do meio 199.

6.2.1 – Adesão celular por DAPI

As análises foram feitas dentro de cada meio testado RPMI, DMEM1, DMEM2, MEM e 199 comparando 3, 7 e 14 dias. Os valores são dados em total de células por campo, tendo sido analisados 4 campos para cada meio.

Adesão celular por DAPI após 3 dias de cultura

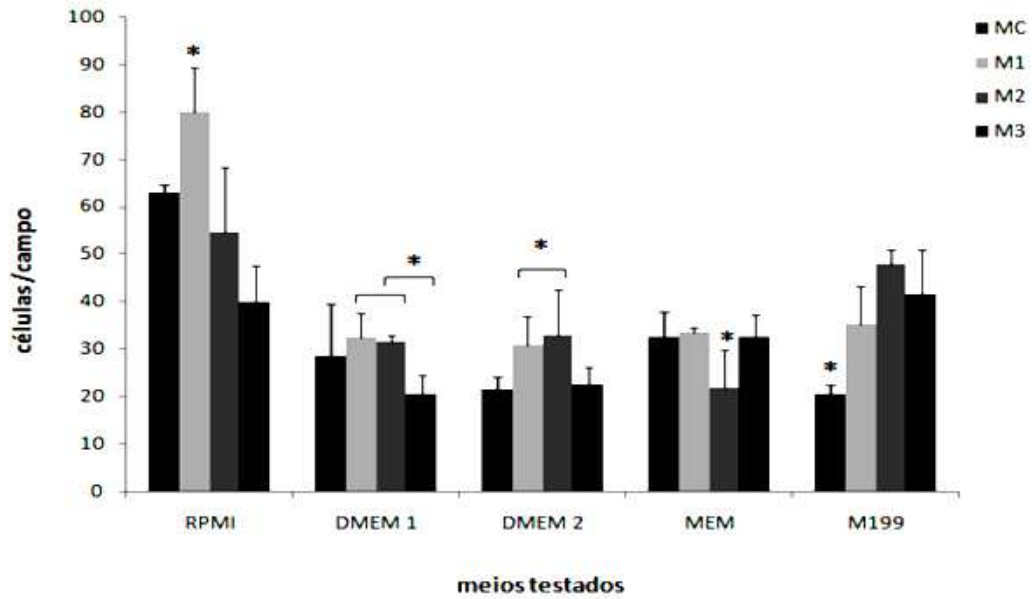


Gráfico 1: Análise da adesão celular por DAPI após 3 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa, para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 3 em triplicata.

Adesão celular por DAPI após 7 dias de cultura

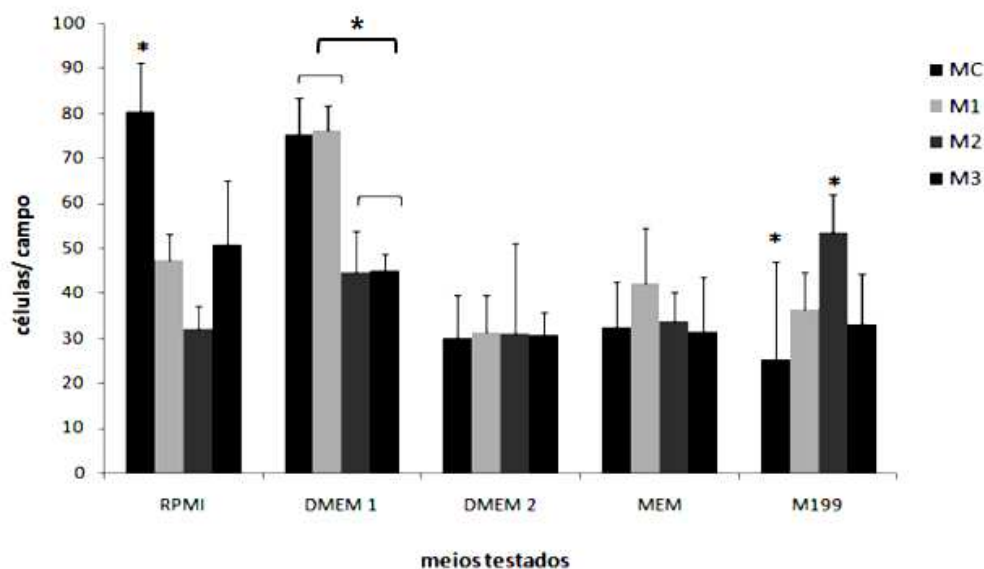


Gráfico 2: Análise da adesão celular por DAPI após 7 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa, para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 3 em triplicata.

Adesão celular por DAPI após 14 dias de cultura

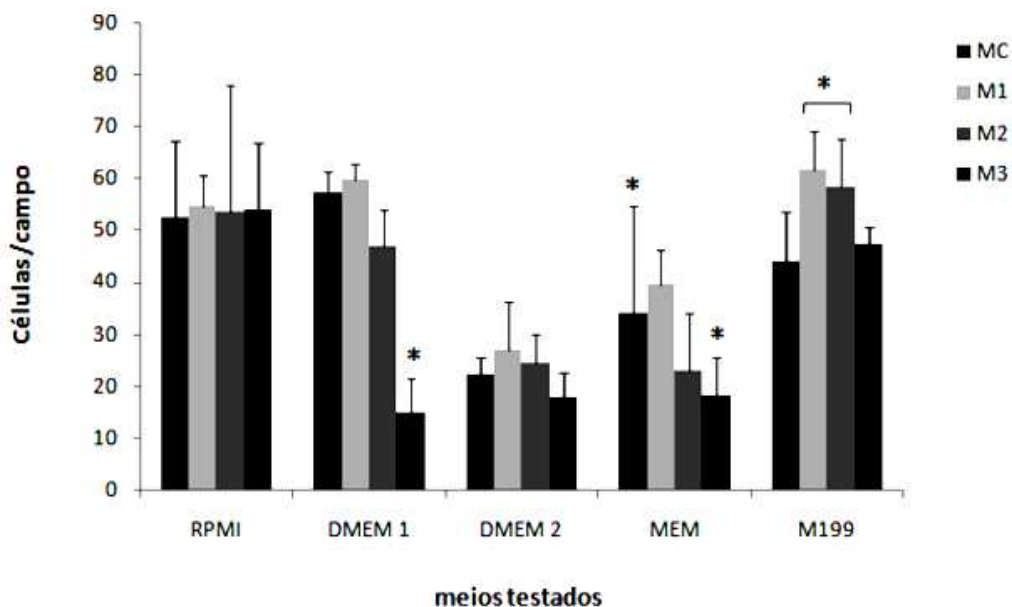


Gráfico 3: Análise da adesão celular por DAPI após 14 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa, para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 3 em triplicata.

Os dados de adesão celular por DAPI com 3 dias de cultura mostram o meio RPMI como apresentando maior número de células por campo analisado, porém apenas o meio M1 apresenta diferença significativa. Os demais meios mostram uma quantidade baixa de células neste período de cultura. Em 7 dias de cultura há uma redução significativa para o meio RPMI-M1 e um aumento significativo para DMEM1-MC e DMEM-M1. Os demais meios mantêm uma regularidade proliferativa, média de 35 células por campo.

Para culturas de 14 dias observamos aumento na adesão para o meio 199. Em todos os meios neste período o maior número de células por campo é visualizado no meio M1, valores com asterisco indicados na tabela abaixo.

Dados de adesão celular, através da contagem dos núcleos marcados por DAPI. Os valores são expressos em total de núcleos (células) por campo analisado.

	Meios	3 dias	7 dias	14 dias
RPMI	MC	63 ± 8,54	80,5 ± 10,66	52,5 ± 14,84
	M1	80 ± 7,34	47,5 ± 5,82	* 60 ± 12,82
	M2	65,5 ± 19,73	32,17 ± 4,95	53,67 ± 24,44
	M3	40 ± 5,09	51 ± 14,11	54,2 ± 12,65
DMEM 1	MC	28,5 ± 11,00	75,16 ± 8,42	57,17 ± 4,26
	M1	32,5 ± 5,08	76,5 ± 5,24	* 60 ± 2,75
	M2	31,67 ± 1,21	44,83 ± 7,34	47 ± 7,12
	M3	20,5 ± 4,08	45 ± 3,79	15 ± 6,60
DMEM 2	MC	21,5 ± 2,88	30 ± 9,52	22,17 ± 3,65
	M1	30,83 ± 6,01	31,33 ± 8,26	* 27,11 ± 9,13
	M2	33 ± 9,48	31 ± 20,24	24,66 ± 5,46
	M3	22,67 ± 3,55	30,67 ± 5,04	17,83 ± 4,79
MEM	MC	32,67 ± 5,27	32,5 ± 10,09	34 ± 20,80
	M1	33,5 ± 1,16	42,33 ± 12,37	* 39,67 ± 6,50
	M2	21,83 ± 8,15	33,83 ± 6,49	23 ± 10,97
	M3	32,5 ± 4,92	31,33 ± 12,30	18,33 ± 7,44
199	MC	20,6 ± 1,72	25,33 ± 21,63	44 ± 9,69
	M1	35,4 ± 7,00	36,67 ± 7,99	* 61,6 ± 7,70
	M2	48 ± 3,37	53,67 ± 8,26	58,4 ± 9,15
	M3	41,75 ± 6,74	33 ± 11,22	47,25 ± 3,30

Tabela1: Adesão celular pela marcação dos núcleos com DAPI, os valores indicam o número de células por campo. Os asteriscos chamam atenção para o meio M1 que apresenta maior quantidade de células por campo.

6.2.2 – Proliferação Celular por Azul de Tripán

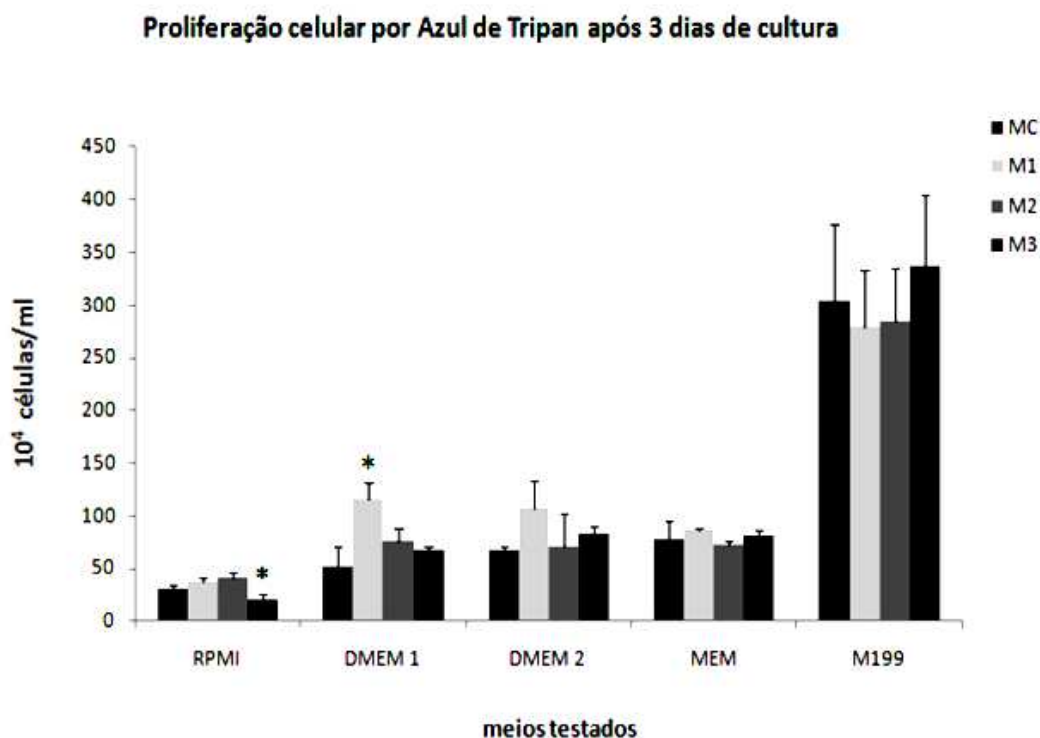


Gráfico 4: Análise da proliferação celular por Azul de Tripán após 3 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os valores são apresentados em 10^4 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Após 3 dias de cultura para o meio RPMI apenas o meio M3 é significativamente diferente. Para DMEM1 a diferença significativa é visualizada apenas no meio M1. Os demais meios DMEM2, MEM e 199 não apresentam diferença estatística significativa entre os meios testados. Notamos ainda que para este período de 3 dias o meio 199 apresenta uma média de $300 \cdot 10^4$ células/ml enquanto que os demais meios não passam de $106 \cdot 10^4$ células/ml (DMEM1-M1).

Proliferação celular por Azul de Tripán após 7 dias de cultura

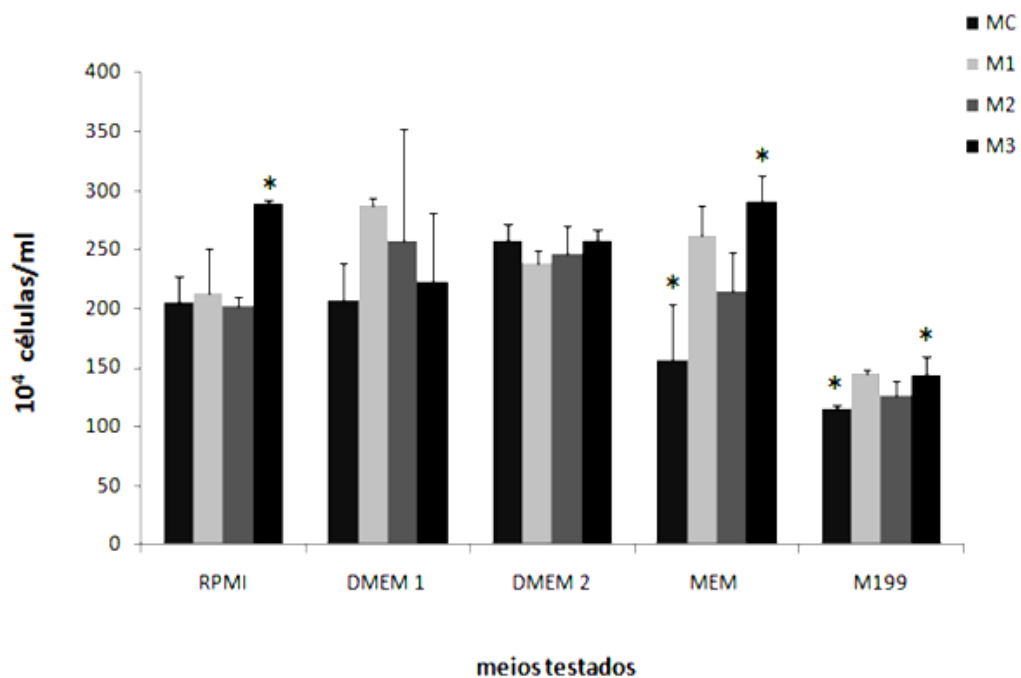


Gráfico 5: Análise da proliferação celular por Azul de Tripán após 7 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os valores são apresentados em 10^4 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Com 7 dias de cultura ocorre aumento proliferativo em todos os meios, comparando-se com 3 dias. Diferenças estatísticas significativas são observadas apenas para RPMI-M3, MEM-MC, MEM-M3, 199-MC e 199-M3. É interessante notarmos que o meio 199 que em 3 dias foi o que apresentou maiores números de células por ml, em 7 dias apresenta os menores valores, comparado com os demais meios.

Proliferação celular por Azul de Tripán após 14 dias

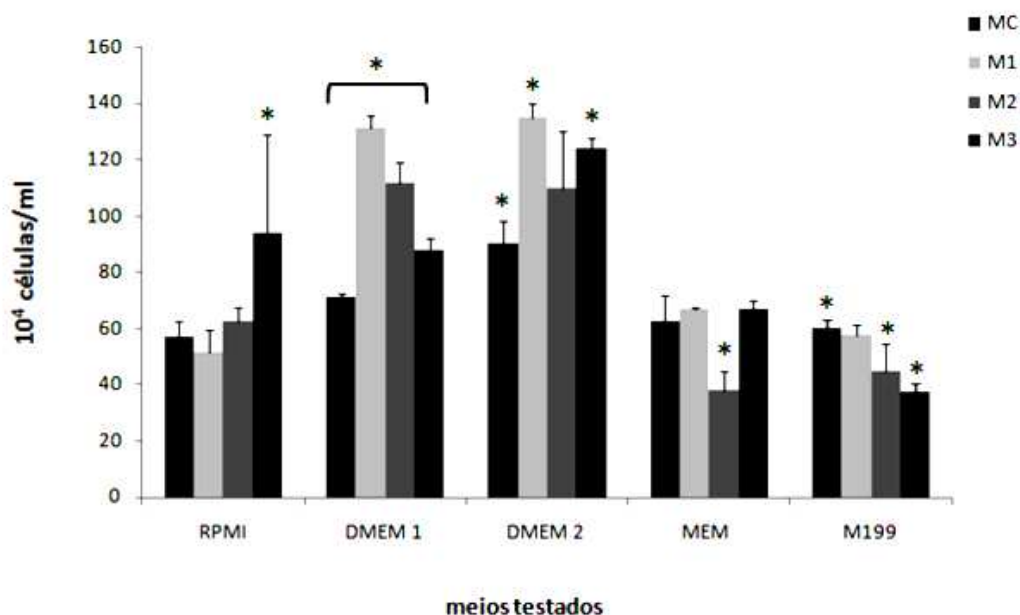


Gráfico 6: Análise da proliferação celular por Azul de Tripán após 14 dias de cultura. A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os valores são apresentados em 10^4 células/ml. O asterisco indica diferença estatística significativa para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Em 14 dias de cultura o meio RPMI-M3 continua sendo significativamente diferente dentre os RPMIs, para o DMEM1 todos os meios são significativamente diferentes, com valores de $p < 0,01$. DMEM2 também apresenta resultados significativos para MC, M1 e M3, o mesmo ocorrendo para o meio 199. No meio MEM apenas M2 é significativamente diferente.

Dados de proliferação celular por Azul de Tripán, sendo os valores expressos em 10^4 células/ml.

	Meios	3 dias	7 dias	14 dias
RPMI	MC	30,67 ± 4,16	205 ± 23,01	57,33 ± 5,03
	M1	38,67 ± 3,05	* 213 ± 38,27	51,33 ± 8,02
	M2	41,33 ± 5,03	203 ± 6,42	62,67 ± 5,03
	M3	21,33 ± 4,16	289 ± 3,05	94 ± 34,69
DMEM 1	MC	52 ± 19,07	207 ± 31,77	71,33 ± 1,15
	M1	116 ± 15,62	* 288 ± 5,50	** 131,33 ± 4,61
	M2	76,67 ± 11,54	257 ± 95,04	112 ± 7,21
	M3	67,33 ± 4,16	223 ± 58,73	88 ± 4
DMEM 2	MC	67,33 ± 3,05	241 ± 14	90 ± 8
	M1	106,67 ± 26,10	* 259 ± 11,01	** 135,33 ± 4,16
	M2	71 ± 30,28	246 ± 24,29	110 ± 20,29
	M3	84 ± 6,92	257 ± 9,86	124 ± 4
MEM	MC	78,67 ± 16,77	157 ± 46,91	62,67 ± 9,45
	M1	86,67 ± 2,30	* 263 ± 25,16	66,67 ± 1,15
	M2	73,33 ± 2,30	215 ± 32,51	38 ± 6,92
	M3	81,33 ± 5,77	255 ± 22,47	66,67 ± 3,05
199	MC	303,33 ± 72,72	115 ± 3,05	60 ± 3,46
	M1	279,33 ± 53,52	* 145 ± 4,16	58 ± 3,46
	M2	284,67 ± 50,80	127 ± 11,71	44,67 ± 10,06
	M3	272 ± 67,95	144 ± 15,09	37,33 ± 3,05

Tabela 2: Número de células/ml, os valores em 10^4 . Os asteriscos chamam atenção para o meio M1 que apresenta maior quantidade de células.

Com 3 dias de cultura, o meio 199 apresentou valores diferentes do demais meios, contudo, não houve a manutenção destes valores altos ao longo da cultura (7 e 14 dias). Estes dados podem ser justificados porque o isolamento por cultura aderente seleciona diferentes subpopulações de células (Zampetaki *et al.*, 2008) e ao longo da cultura os fatores utilizados acabam selecionando as células que respondem a esses suplementos e somente estas passam a se proliferar. Com este perfil, o meio 199 parece não corresponder aos nossos objetivos, principalmente o de expansão do número de CPEs.

Os demais meios apresentam um comportamento semelhante entre si, com aumento no número de células entre 3 e 7 dias e redução em 14 dias. Em todos estes casos os valores de p foram $< 0,05$.

Em 7 dias de cultura, em todos os meios testados o que apresentou maior número de células por ml foram os meios M1, ou seja, o meio suplementado com VEGF, FGF e IGF (dados indicados por um asterisco na tabela).

Com 14 dias, podemos notar uma quantidade muito alta de células nos meios DMEM1–M1 e DMEM2–M1 (dois asteriscos na tabela).

6.3 – Ensaio de Viabilidade Celular por Azul de Tripan e por MTT

A viabilidade celular foi verificada pelos ensaios de MTT e Azul de Tripan. Os dados de MTT indicam valores de absorvância que representam a presença de formazan, que é o resultado da degradação de MTT pelas mitocôndrias das células viáveis.

6.3.1 – Viabilidade Celular por Azul de Tripan

O ensaio por Azul de Tripan indica a frequência de células viáveis nos meios testados, estas são as células não coradas com o azul de tripan (que penetra as células não viáveis corando-as de azul).

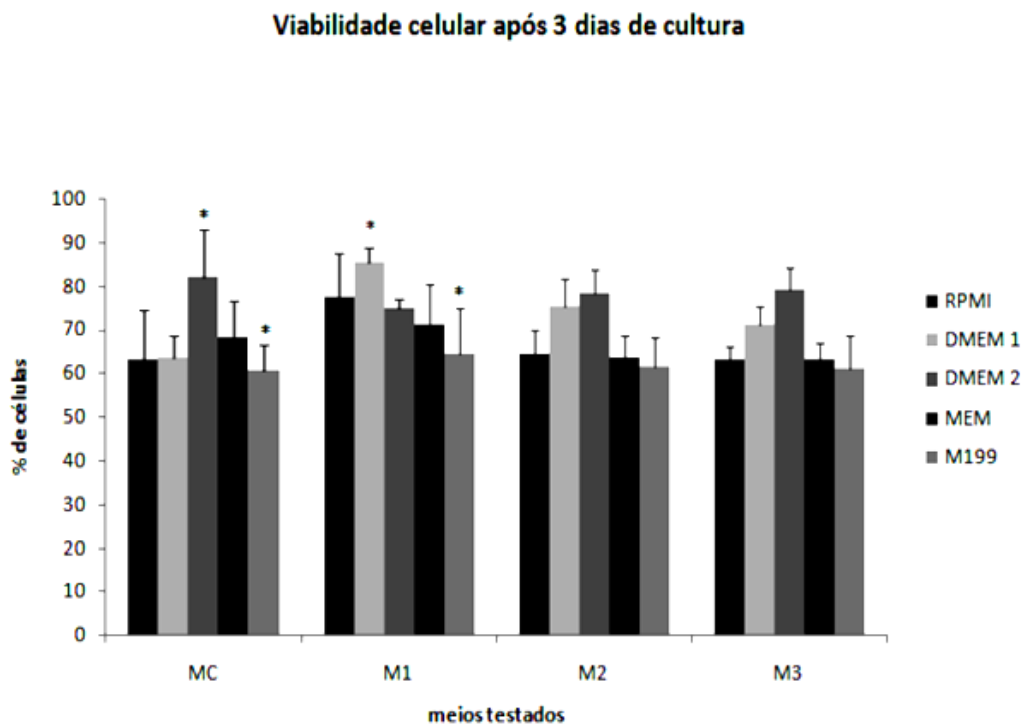


Gráfico 7: Análise da viabilidade celular por Azul de Tripan após 3 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Viabilidade celular após 7 dias de cultura

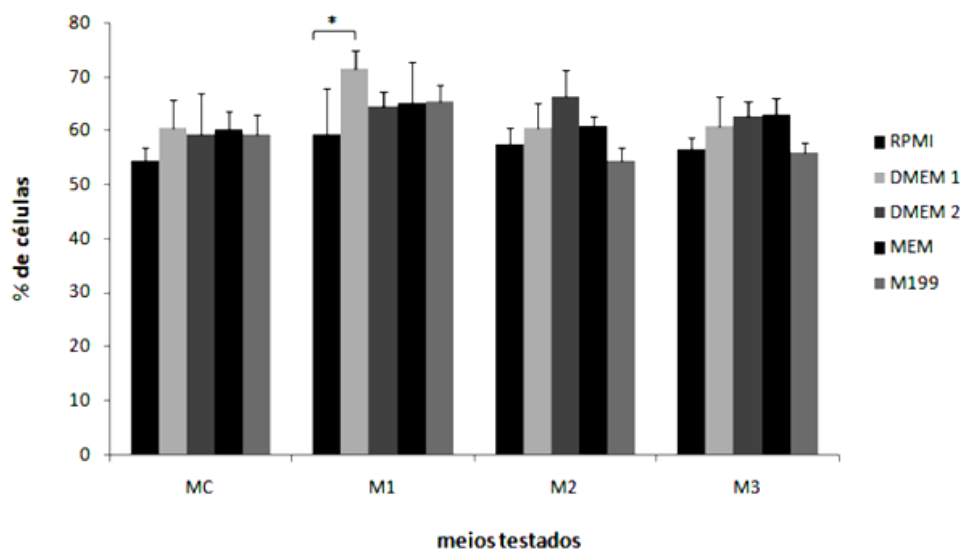


Gráfico 8: Análise da viabilidade celular por Azul de Tripán após 7 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Viabilidade celular após 14 dias de cultura

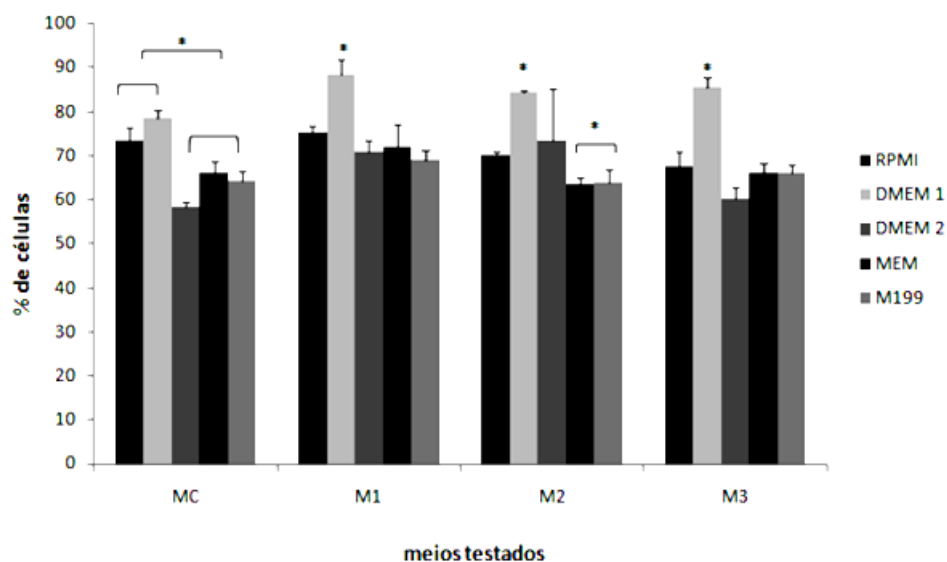


Gráfico 9: Análise da viabilidade celular por Azul de Tripán após 14 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^5 células/ml. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

6.3.2 – Viabilidade Celular por MTT

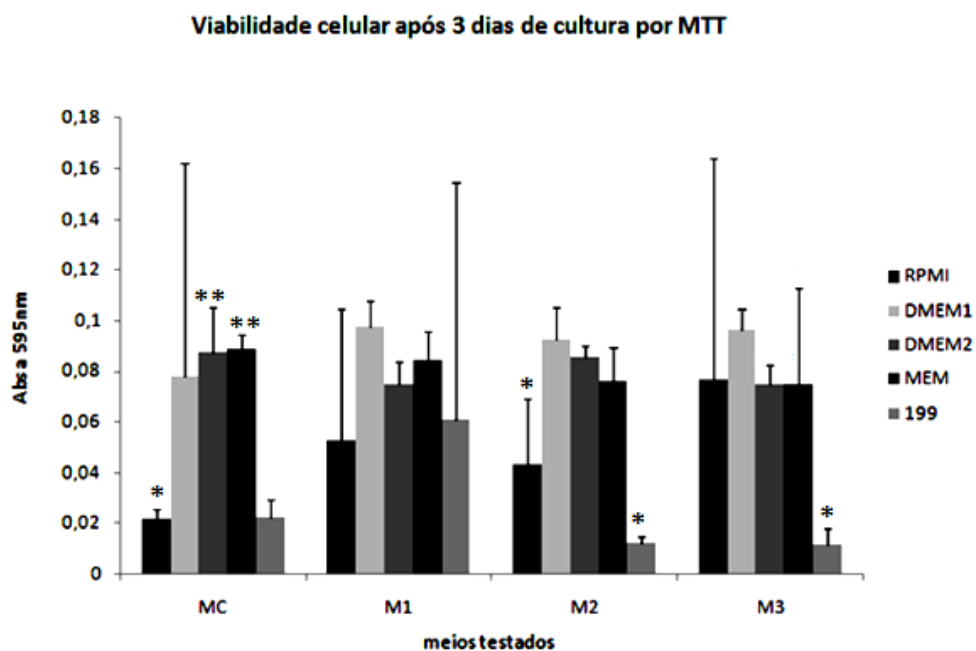


Gráfico 10: Viabilidade celular por MTT após 3 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^4 células/ml. MTT incubado por 72 horas e leitura da absorbância a 595nm em leitor de Elisa. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Viabilidade celular após 7 dias de cultura por MTT

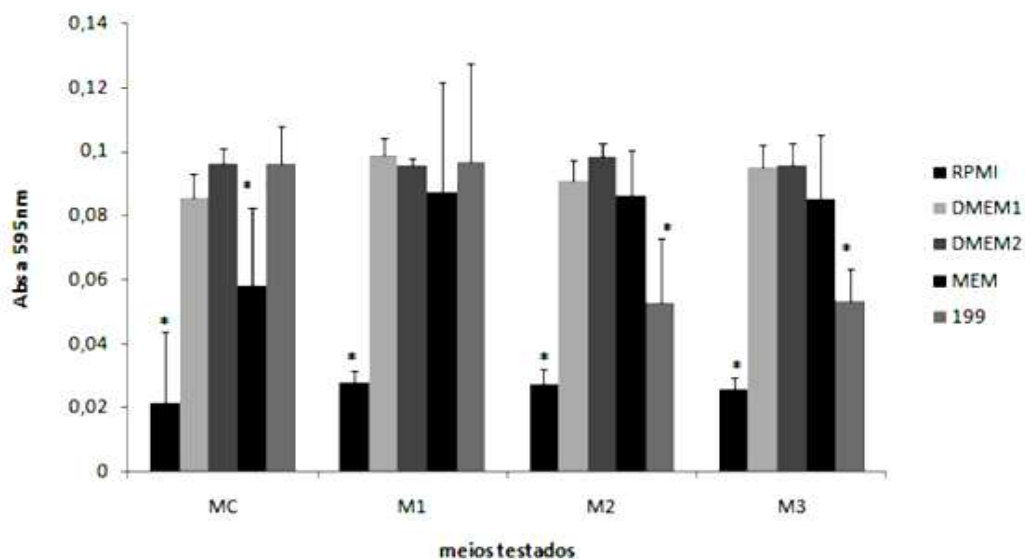


Gráfico 8: Viabilidade celular por MTT após 7 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^4 células/ml. MTT incubado por 72 horas e leitura da absorbância a 595nm em leitor de Elisa. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

Viabilidade celular após 14 dias de cultura

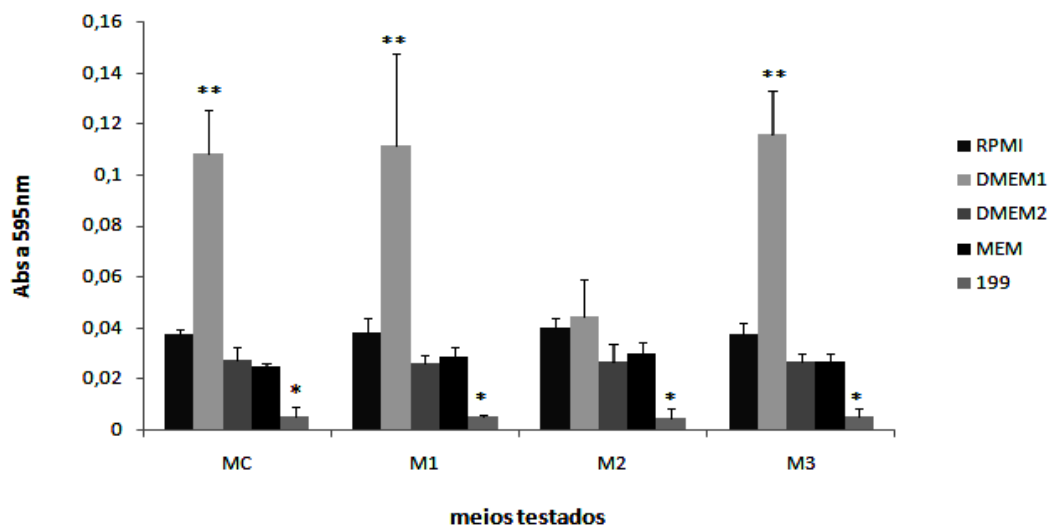


Gráfico 9: Análise da viabilidade celular por MTT após 14 dias de cultura nos diferentes meios testados (MC, M1, M2 e M3). A concentração inicial foi de 10^4 células/ml. MTT incubado por 72 horas e leitura da absorbância a 595nm em leitor de Elisa. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey). N= 5 em triplicata.

O teste de viabilidade celular tanto por Azul de Tripán como por MTT indica o DMEM1–M1 como de maior viabilidade. Este dado torna-se mais evidente na cultura de 14 dias, quando o DMEM1–M1 apresenta diferença significativa comparado aos demais meios testados. No teste de 3 dias de cultura notamos diferença apenas entre os MC e os meios M1 e para 7 dias a diferença é significativa apenas para o meio M1. Os demais meios são estatisticamente iguais em todos os períodos analisados.

6. 4 – Análise morfológica de células mononucleares após a seleção do meio DMEM1–M1

Após as análises estatísticas comparativas entre os meios testados, selecionamos o meio DMEM1-M1 como o que melhor atingia nossos objetivos de aumentar o número e a viabilidade das células em cultura. Seguimos então com a análise morfológica das células, a partir de 14 dias de cultura (último período analisado com todos os meios testes – figuras 1, 2 e 3) e acompanhamos a morfologia até 40º dia, quando a quantidade de células torna-se muito reduzida.

6. 4.1 – Análise morfológica de células mononucleares após 14 dias de cultura no meio selecionado DMEM1–M1

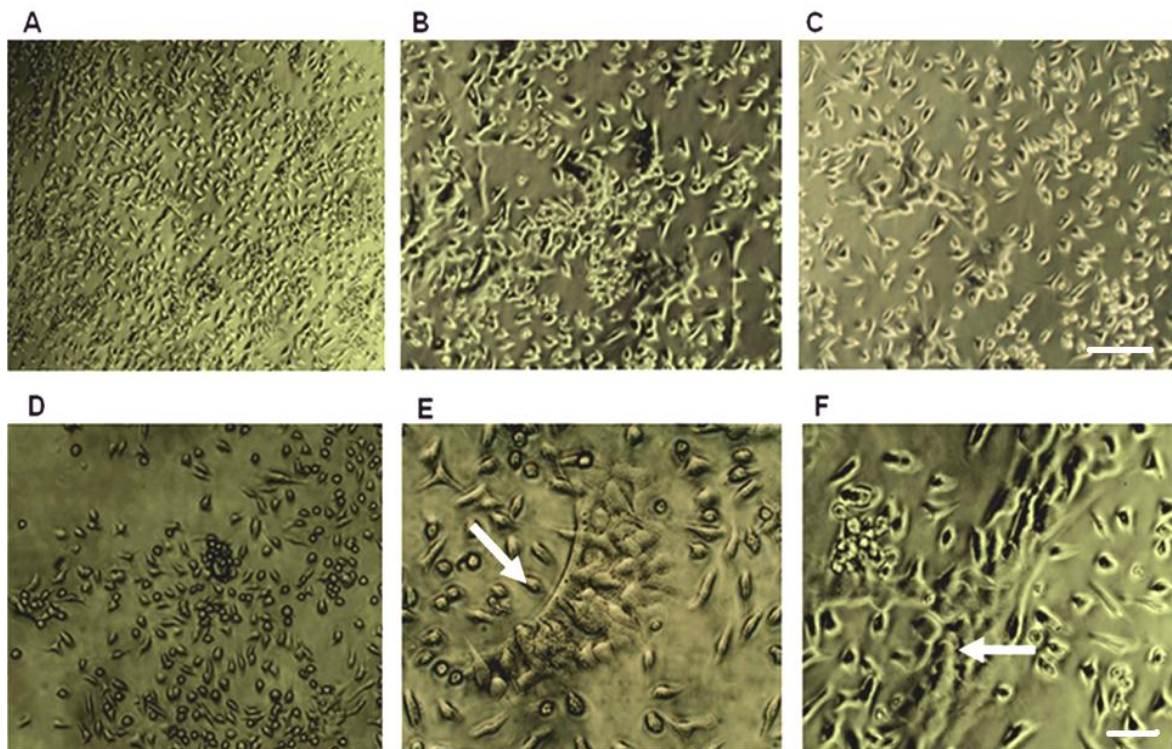


Figura 4: Imagens de células mononucleares aderidas após 14 dias de cultura no meio selecionado DMEM1 – M1. As setas indicam células expandidas emitindo prolongamentos. A e D aumento de 50X, B e C aumento de 100X e E e F aumento de 200X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1. Barra de escala de 100 μ m.

As células com 14 dias de cultura são em sua maioria fusiformes, ocorrem ainda agrupamentos celulares provavelmente resultantes da proliferação e do contato entre as mesmas o que pode favorecer a formação de uma malha celular e conseqüente confluência. Nas imagens E e F fica evidente a presença de células grandes e totalmente aderidas, expandidas e com prolongamentos (indicadas setas pretas), dando suporte para outras células menores. Notamos também a presença de algumas células ainda arredondadas.

6.4.2 – Análise morfológica de células mononucleares após 21 dias de cultura em meio DMEM1 –M1

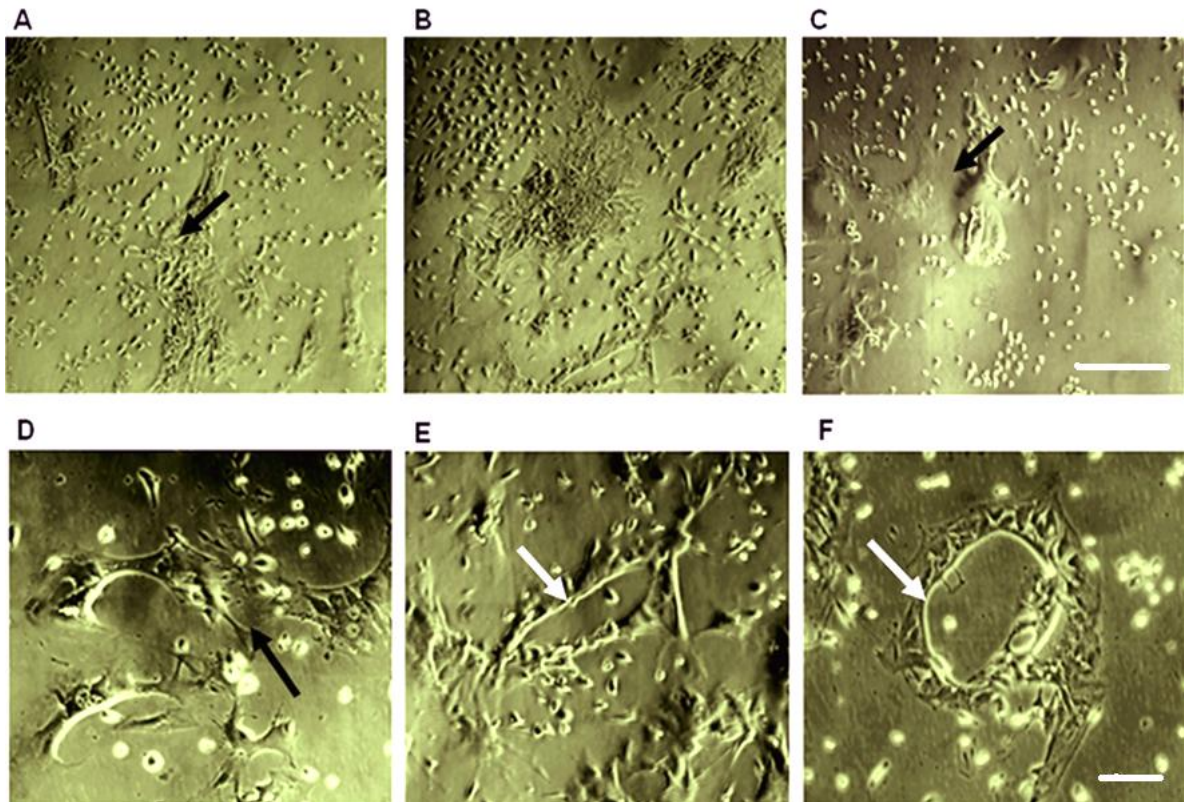


Figura 5: Imagens de células mononucleares aderidas após 21 dias de cultura em meio DMEM1-M1. As setas pretas indicam células expandidas emitindo prolongamentos e as setas brancas indicam estruturas que lembram a luz de capilares. A, B e C aumento de 50X e D, E e F aumento de 200X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1e H. Barra de escala de 100 μ m.

Após 21 dias de cultura o que se observa é uma clara redução do número de células, contudo, fica evidente a presença de células expandidas, totalmente aderidas com prolongamentos (setas pretas). Estas células começam a se organizar em estruturas semelhantes a vasos, nas imagens E e F visualizamos uma espécie de lumem se formando (setas brancas). É notória também a presença de células menores, algumas células ainda arredondadas.

6.4.3 – Análise morfológica de células mononucleares após 40 dias de cultura em meio DMEM-M1

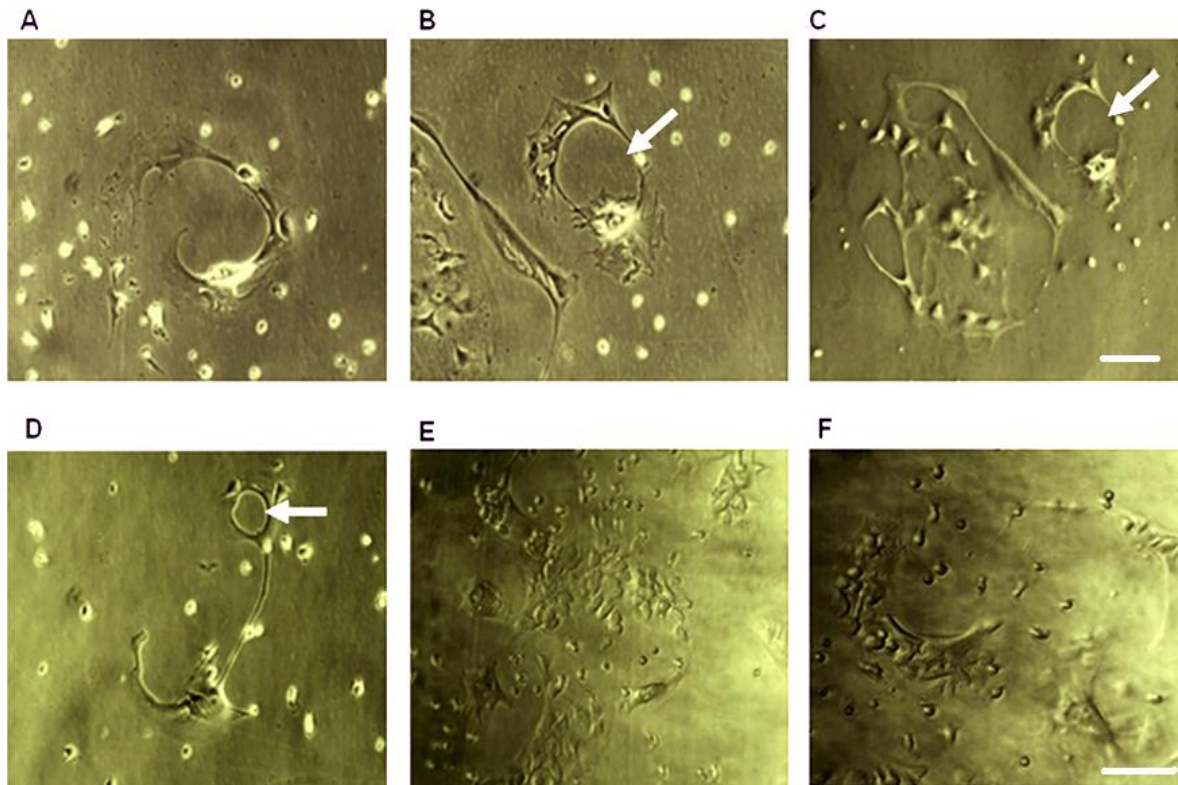


Figura 6: Imagens de células mononucleares aderidas após 40 dias de cultura em meio DMEM1-M1. Setas brancas indicam estruturas semelhantes à luz de capilares. A, B, C, D, aumento de 200X e E e F, aumento de 100X, em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1e H. Barra de escala de 100 μ m.

Com 40 dias de cultura todas as células estão aderidas, sua morfologia é praticamente igual a de 21 dias, a formação de luz do vaso fica mais evidente (setas brancas). Em E e F as células apresentam a morfologia de paralelepípedo, característica de células de crescimento tardio, que surgem após a 2^o ou 3^o semana de cultura. A quantidade de células comparando com a de 14 dias é muito reduzida. Demonstrando a seleção de células progenitoras endoteliais com o meio utilizado.

6.5 – Imunocitoquímica

As figuras abaixo mostram os resultados das marcações realizadas para verificar a expressão de CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31, após 3, 7 e 14 dias de cultura.

6.5.1 – Imunocitoquímica de células mononucleares após 3 dias de cultura em meio DMEM1–M1

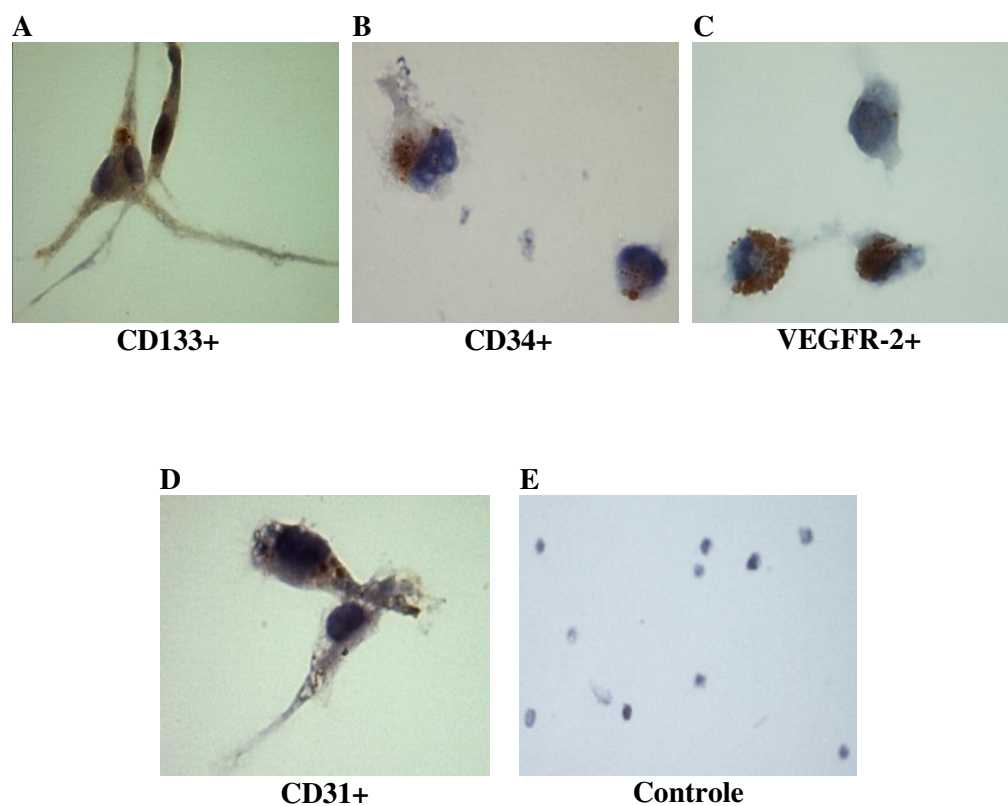


Figura 7: Imunocitoquímica de cultura de células mononucleares após 3 dias de cultura em meio DMEM-M1. A: marcação para CD133 (Biotin anti-mouse Prominin I); B: marcação para CD34 (Biotin anti-mouse CD34); C: marcação para VEGFR-2 (Biotin anti-mouse Flk-1 (CD309, VEGFR-2, VEGFR2, Ly-73)); D: marcação para CD31 (RAT anti-mouse CD31) e E: controle. Todos os anticorpos estão na diluição de 1: 200. Revelação com DAB e contra-coradas com Hematoxilina de Gills. Aumento de 40X para E e 100X para A, B, C e D, em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5).

6. 5. 2 – Imunocitoquímica de células mononucleares após 7 dias de cultura em meio DMEM1–M1

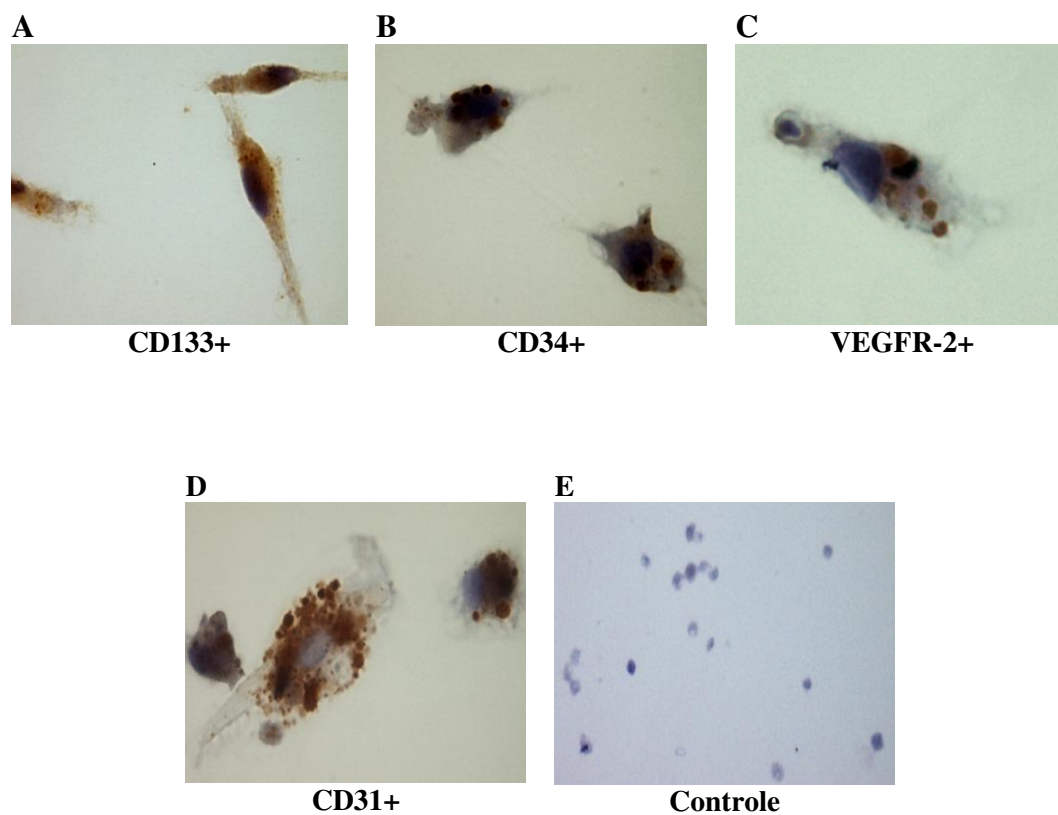


Figura 8: Imunocitoquímica de cultura de células mononucleares após 7 dias de cultura em meio DMEM-M1. A: marcação de CD133 (Biotin anti-mouse Prominin I); B: marcação para marcação para CD34 (Biotin anti-mouse CD34); C: marcação para VEGFR-2 (Biotin anti-mouse Flk-1 (CD309, VEGFR-2, VEGFR2, Ly-73), D: marcação para CD31 (RAT anti-mouse CD31) e E: controle. Todos os anticorpos estão na diluição de 1: 200. Revelação com DAB e contra-coradas com Hematoxilina de Gills. Aumento de 40X para E e 100X para A, B, C e D, em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5).

6. 5. 3 – Imunocitoquímica de células mononucleares após 14 dias de cultura em meio DMEM1–M1

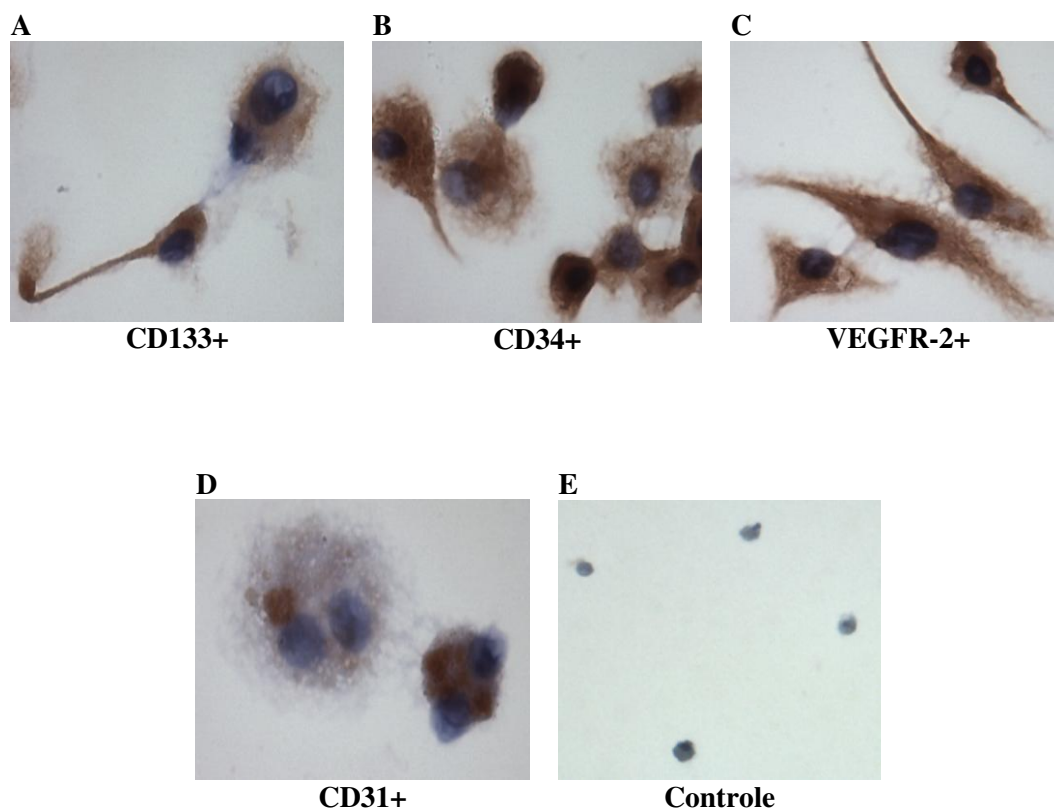


Figura 9: Imunocitoquímica de cultura de células mononucleares após 14 dias de cultura em meio DMEM-M1. A: marcação de CD133 (Biotin anti-mouse Prominin I); B: marcação para marcação para CD34 (Biotin anti-mouse CD34); C: marcação para VEGFR-2 (Biotin anti-mouse Flk-1 (CD309, VEGFR-2, VEGFR2, Ly-73); D: marcação para CD31 (RAT anti-mouse CD31) e E: controle. Todos os anticorpos estão na diluição de 1: 200. Revelação com DAB e contra-coradas com Hematoxilina de Gills. Aumento de 40X para E e 100X para A, B, C e D, em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5).

As figuras acima mostram marcação positiva para os marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 em 3, 7 e 14 dias de cultura. Em 3 dias as células tem um aspecto mais arredondados. Com 14 dias de cultura as células apresentam morfologia fusiforme, com prolongamentos o que pode indicar maior aderência. A marcação com CD31 é característica de célula endotelial diferenciada e já aparecem a partir de 3 dias de cultura, provavelmente são células mais diferenciadas selecionadas a partir do isolamento.

6. 6 – Imunofluorescência

6.6.1 – Imunofluorescência para células mononucleares após 3 dias de cultura em meio DMEM1–M1

A técnica de imunofluorescência foi realizada para confirmar a expressão dos marcadores e ao mesmo tempo a presença de células co-expressando estes marcadores (duplo-positivas), visualizados pelas imagens de sobreposição.

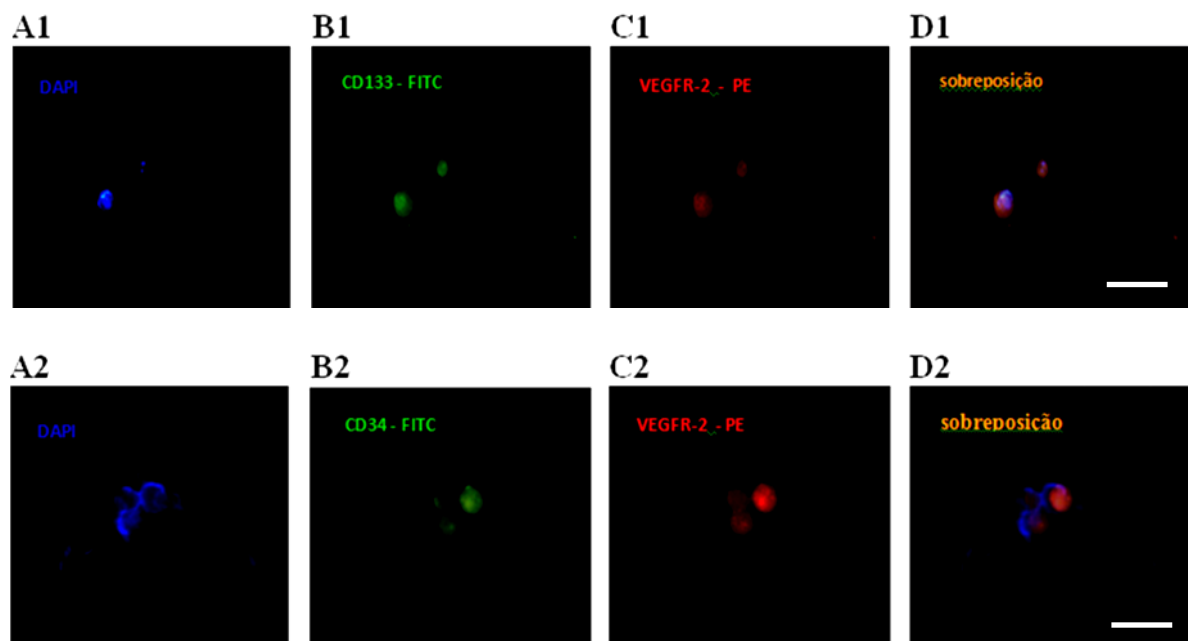


Figura 10: A1 e A2: marcação de núcleo com DAPI; B1: marcação para CD133 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); C1 e C2: marcação para VEGFR-2 com anticorpo fluorescente PE- estreptavidina; B2: marcação de CD34 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); D1 e D2: indicam a sobreposição das três marcações, sendo D1 duplo marcado CD133+/VEGFR-2+ e D2 duplo marcado CD34+/VEGFR-2+. Aumento de 400X em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5). Barra de escala 50µm.

As imagens mostram a expressão de marcadores típicos de células tronco hematopoiéticas e progenitoras endoteliais (CD34, CD133 VEGFR-2), contudo, em se tratando de cultura de 3 dias ainda não podemos confirmar a presença de células endoteliais diferenciadas.

6.6.2 – Imunofluorescência para células mononucleares após 7 dias de cultura em meio DMEM1–M1

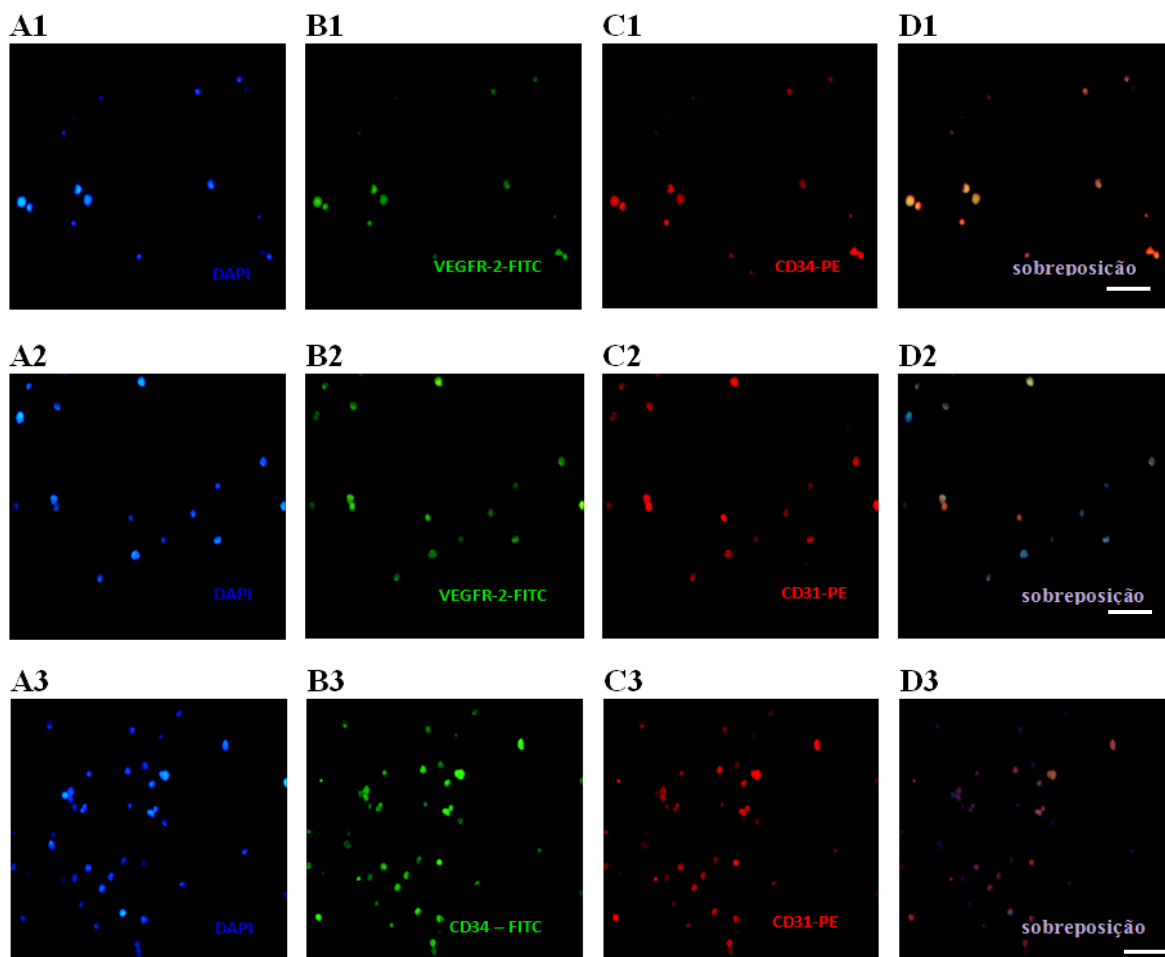


Figura 11: A1, A2 e A3: marcação de núcleo com DAPI; B1 e B2: marcação para VEGFR-2 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); C1: marcação para CD34 com anticorpo secundário PE- estreptavidina; D1 sobreposição de A1, B1 e C1; C2: marcação de CD31 com anticorpo fluorescente PE- estreptavidina; D2: sobreposição de A2, B2 e C2; B3: marcação para CD34 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); C3: marcação para CD31 com anticorpo secundário PE- estreptavidina; D3: sobreposição de A3, B3 e C3. Aumento de 200X em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5). Barra de escala 50µm.

As imagens mostram marcação positiva para todos os marcadores utilizados. A sobreposição D1 indica duplo marcado VEGFR-2+/CD34+; D2 é duplo marcado para VEGFR-2+/CD31+ e D3 é CD34+/CD31+, ou seja, a célula co-expressa estes dois marcadores.

6.6.3 – Imunofluorescência para células mononucleares após 14 dias de cultura em meio DMEM1–M1

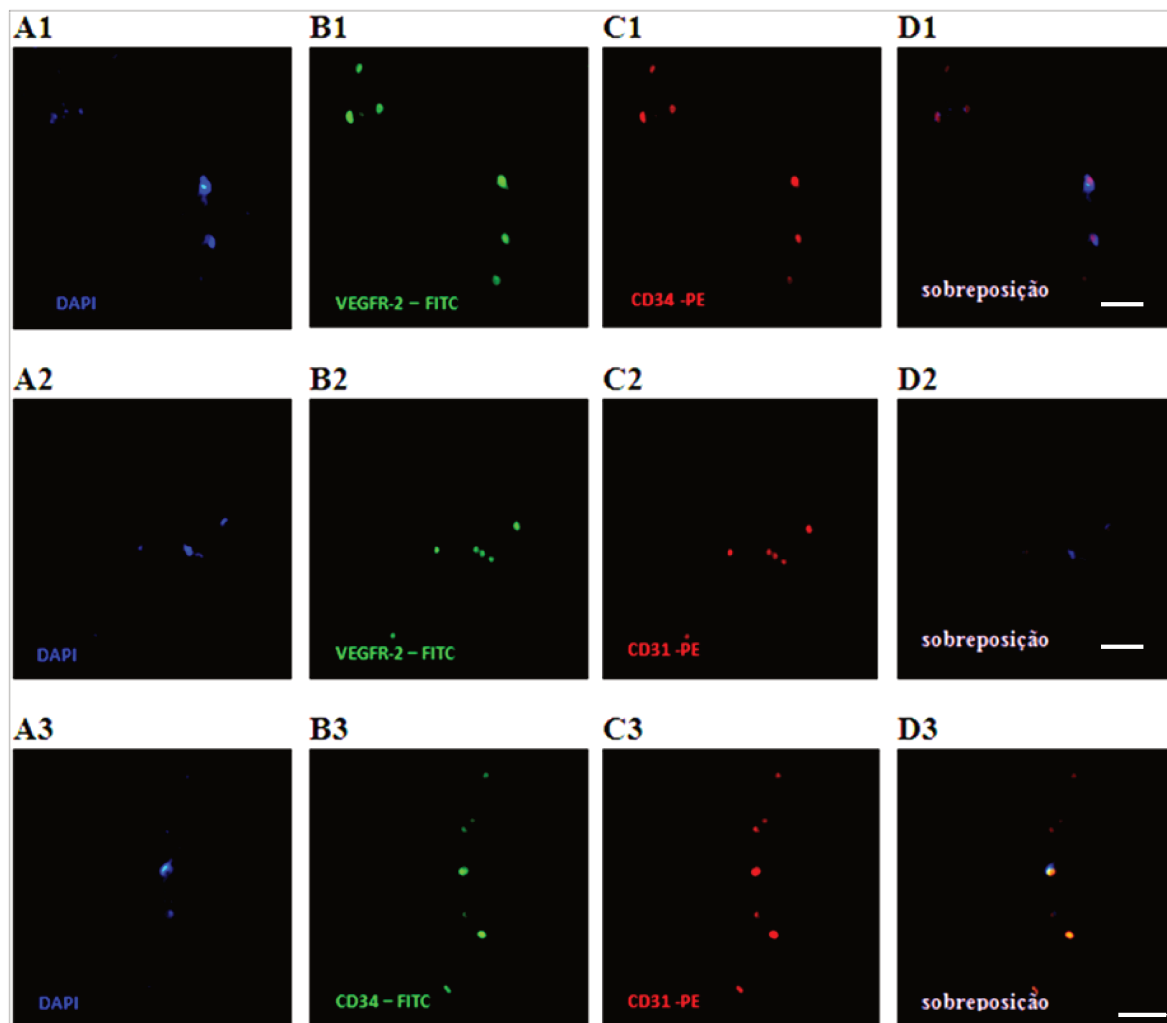


Figura 12: A1, A2 e A3: marcação de núcleo com DAPI; B1 e B2: marcação para VEGFR-2 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); C1: marcação para CD34 com anticorpo secundário PE- estreptavidina; D1 sobreposição de A1, B1 e C1; C2: marcação de CD31 com anticorpo fluorescente PE- estreptavidina; D2: sobreposição de A2, B2 e C2; B3: marcação para CD34 com anticorpo fluorescente FITC (rat anti-mouse); C3: marcação para CD31 com anticorpo secundário PE- estreptavidina; D3: sobreposição de A3, B3 e C3. Aumento de 200X em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5). Barra de escala 50µm.

As imagens mostram marcação positiva para todos os marcadores utilizados. A sobreposição D1 indica duplo marcado VEGFR-2+/CD34+, D2 é duplo marcado para VEGFR-2+/CD31+ e D3 é CD34+/CD31+.

As figuras 10, 11 e 12 (culturas de 3, 7 e 14 dias) indicam a presença de células co-expressando marcadores de células tronco hematopoiéticas CD133 e CD34 como marcadores de células vascular e células progenitoras endoteliais (VEGFR-2 e CD31) indicam a presença de células com características endoteliais.

6.7 – Western Blotting

A análise de Western Blotting foi realizada para verificar a expressão dos marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31, nos diferentes períodos de 3 e 7 dias de cultura. A expressão de α -actina foi utilizada como controle endógeno.

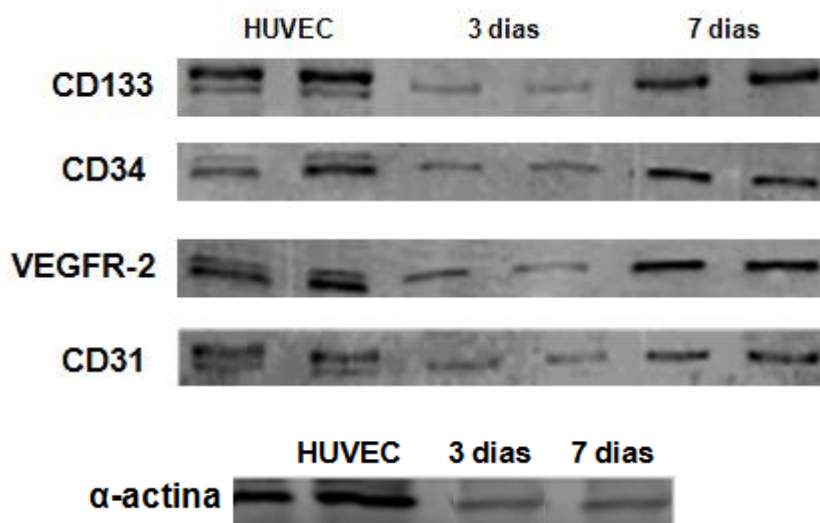


Figura 13: Resultado de Western Blotting. HUVEC foi utilizada como controle positivo em todas as análises e α -actina como controle endógeno.

Os resultados de Western Blotting indicam que as células mononucleares expressam os marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 tanto em 3 quanto em 7 dias de cultura, ocorrendo um aumento nesta expressão.

Expressão de marcadores por Western Blotting

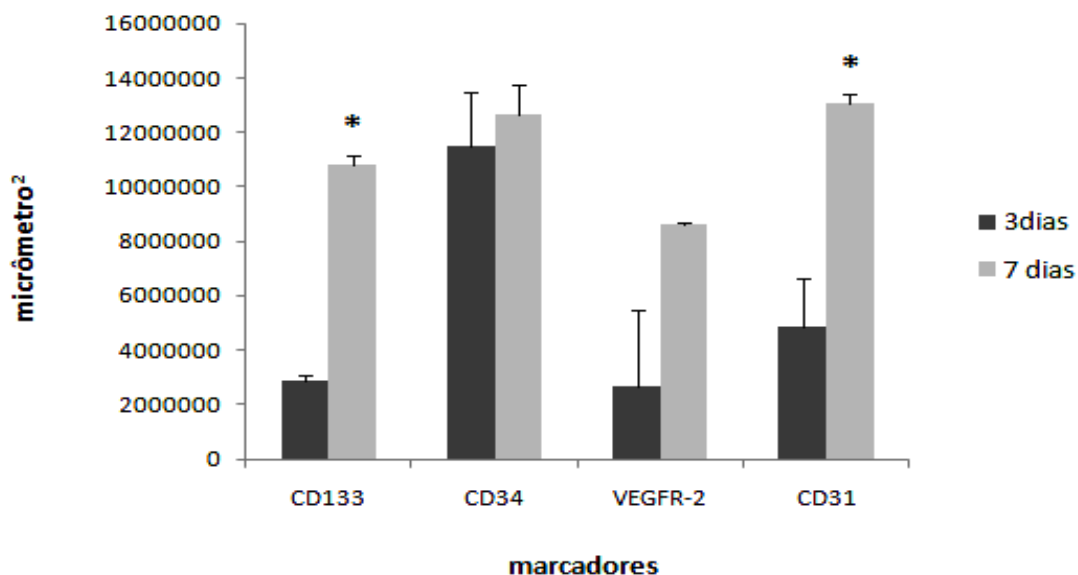


Gráfico 13: Expressão dos marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 após 3 e 7 dias de cultura. A intensidade das bandas foram transcritas em áreas pelo programa ImageJ. Os asteriscos indicam que as barras são estatisticamente diferentes para $p < 0,05$ (ANOVA seguida de Tukey).

Os dados foram analisados com base nas áreas dos gráficos gerados pelo programa ImageJ, estas áreas indicam a intensidade das bandas. Foi feita uma média para cada período e em seguida uma razão destes valores, fornecendo assim o valor do aumento da expressão entre 3 e 7 dias. Para CD133 este valor foi igual a 3,73; para CD34 igual a 1,09; para VEGFR-2 igual a 3,22 e para CD31 igual a 2,66. Podemos notar que o CD133 é o marcador com maior aumento de expressão entre 3 e 7 dias.

6.8 – Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo visa analisar a expressão de marcadores e ao menos tempo fornece um dado quantitativo das células que estão expressando os marcadores de interesse.

Primeiramente analisamos o perfil de expressão das células mononucleares logo após o isolamento por Ficoll- Paque PLUS, as células foram marcadas com CD133, CD34, VEGFR-2.

Expressão dos marcadores após a extração

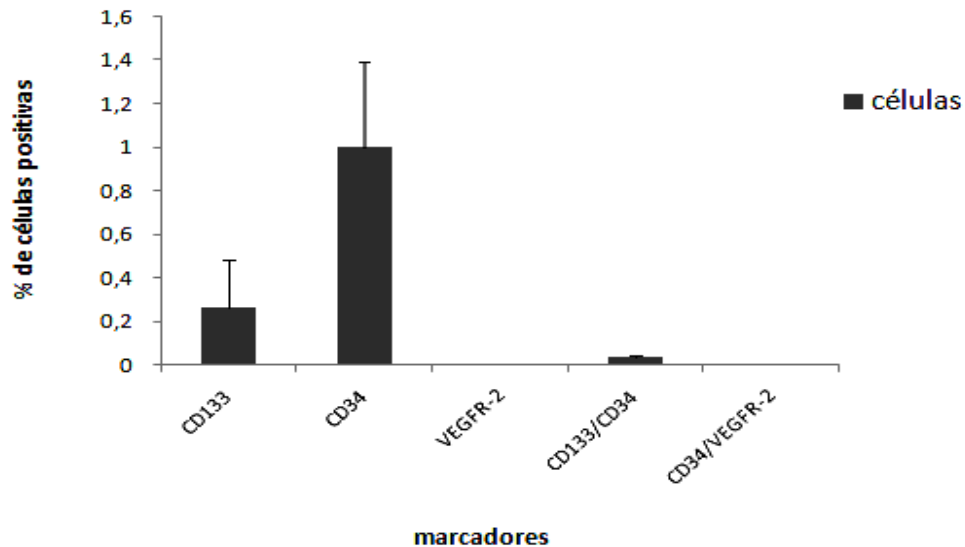


Gráfico 14: Frequência de células positivas para os marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e duplo- marcado. Neste caso as células mononucleares não foram cultivadas. N= 4 em duplicata, foram adquiridos 100.000 eventos.

Podemos notas que logo após o isolamento as células mononucleares são praticamente CD34+ (1%) e CD133+ (0,26%), a quantidade de células VEGFR-2+ é quase nula (apenas 0,001 %). Células duplo marcadas para CD133+/CD34+ representam 0,033%.

Após 7 dias de cultura realizamos a citometria de fluxo para traçar um perfil de diferenciação, comparando as células logo após o isolamento e após a cultura, comparamos ainda o perfil das as células cultivadas no meio DMEM1–M1 e DMEM1–MC (sem fatores de crescimento). Os marcadores selecionados para esta análise foram CD34, VEGFR-2 e CD31 para culturas de 7 dias.

Expressão de marcadores por Citometria de Fluxo

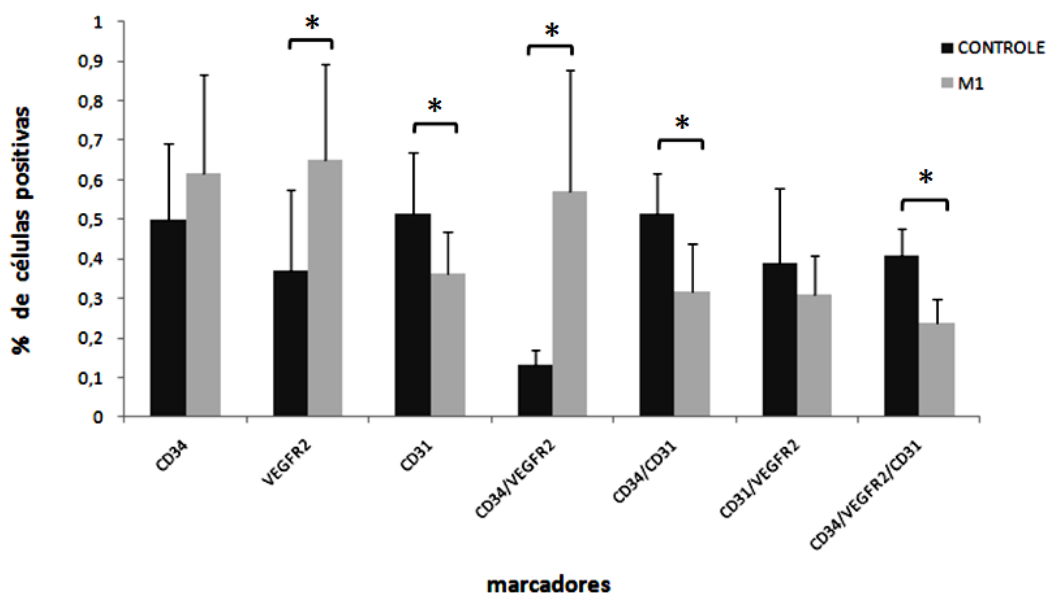


Gráfico 15: Porcentagem de células positivas expressando os marcadores CD34, VEGFR-2 e CD31 além de dupla e tripla marcação. O asterisco indica diferença significativa na cultura de 7 dias com o meio DMEM-MC (controle) e DMEM-M1 (VEGF, bFGF e IGF). N= 4 em duplicata, foram adquiridos 50.000 eventos.

A expressão de CD34 é maior no meio DMEM1-M1(0,616) do que no meio DMEM1-MC (0,498) mas esta diferença não é significativa; VEGFR-2 está presente em maior quantidade também no meio DMEM1-M1 ($p=0,03168$), já o CD31 é mais expresso pelas células de DMEM1-MC ($p=0,0191$). Consequentemente a dupla marcação para CD34+/VEGFR-2+ é maior em DMEM1-M1 ($p=0,0062$); CD34+/CD31+ ($p=0,010$) e CD31+/VEGFR-2+ ($p=0,2231$) são mais frequentes em DMEM1-MC, assim como o triplo marcado CD34+/VEGFR-2+/CD31+ ($p=0,0043$).

Comparando os valores referentes às células logo após o isolamento (gráfico 14) com os valores indicados no gráfico 15, podemos sugerir que no meio DMEM1-MC ocorre uma diferenciação das células CD34+ em CD31+ pela diminuição da frequência de CD34+, além disso, podemos sugerir que as células CD34+ são praticamente todas CD31+, como podemos visualizar na barra de duplo marcadas CD34+/CD31+. As células VEGFR-2+ que aparecem com maior frequência comparando com o 0,001% após o isolamento, podem ser caracterizadas como triplo marcadas CD34+/CD31+/VEGFR-2+.

O meio DMEM1-M1 também provoca uma redução na frequência de CD34+, de 1% para 0,6168% e um aumento muito significativo de células VEGFR-2+ (de 0,001% para 0,6512%), indicando que as células estão respondendo ao VEGF (10ng/ml) acrescido no meio. Muitas células são também CD34+/VEGFR-2+, marcadores de células progenitoras. Ocorre também o aparecimento de CD31+, CD34+/CD31+, VEGFR-2+/CD31+ e CD31+/VEGFR-2+/CD31+, mas todos em menor frequência que no meio DMEM1-MC. A presença de CD31+ pode indicar células diferenciadas, podendo comprometer a proliferação celular.

6.9 – Ensaio de internalização de acLDL

O ensaio de internalização do acLDL foi realizado para confirmar a presença de células progenitoras endoteliais no meio utilizado, uma vez que esta capacidade também é característica de células endoteliais diferenciadas.

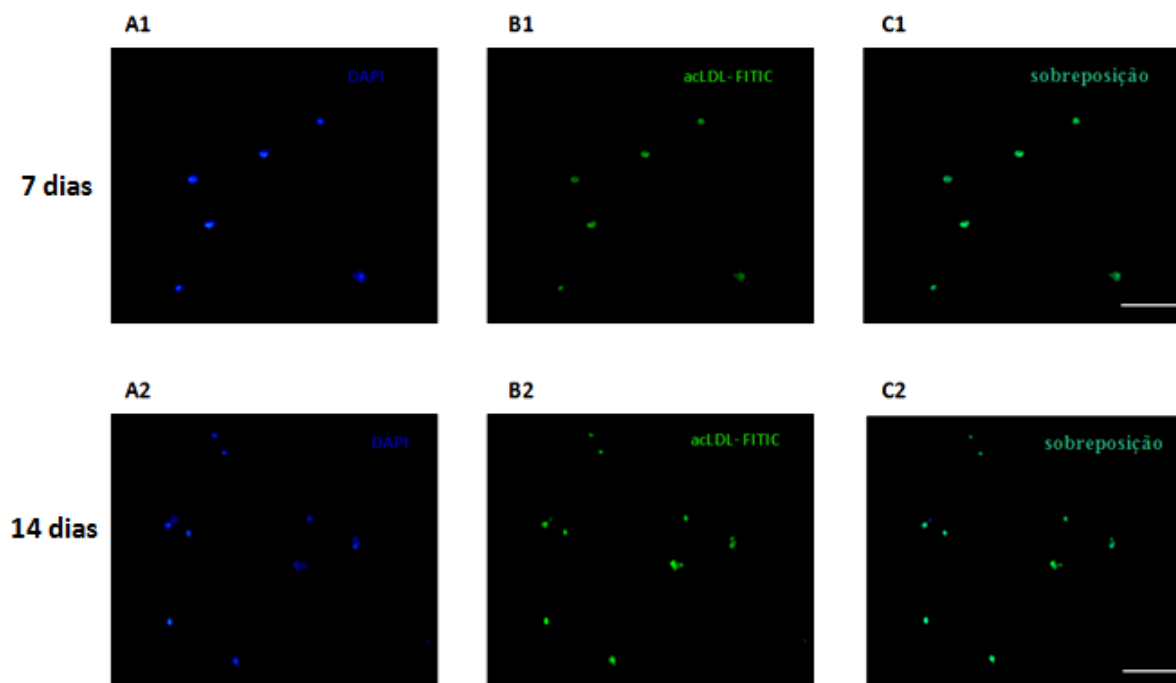


Figura 14: Imunofluorescência indicando células após 7 (A1, B1 e C1) e 14 dias (A2, B2 e C2) de cultura. Os núcleos foram marcados com DAPI e a marcação com acLDL foi evidenciada por FITC. Aumento de 200X em microscópio de fluorescência (Olympus model BX60F5). Barra de escala 50µm.

As imagens acima indicam positividade para acLDL em células após 7 e 14 dias de cultura, confirmando assim a internalização desta molécula e a capacidade do meio testado em selecionar e diferenciar células progenitoras endoteliais em células com características de células endoteliais maduras.

6.10 – Formação de estruturas semelhantes a capilares

O ensaio de formação de estruturas semelhantes a capilares, foi realizado em Matrigel® um substrato rico em proteínas de matriz extracelular, como laminina, colágeno tipo IV, que estimula a migração e diferenciação celular, mimetizando a situação *in vivo*.

Estes ensaios foram realizados com células mononucleares logo após o isolamento por Ficoll - Paque PLUS (sem expansão em cultura) e com HUVECs, utilizada como controle positivo.

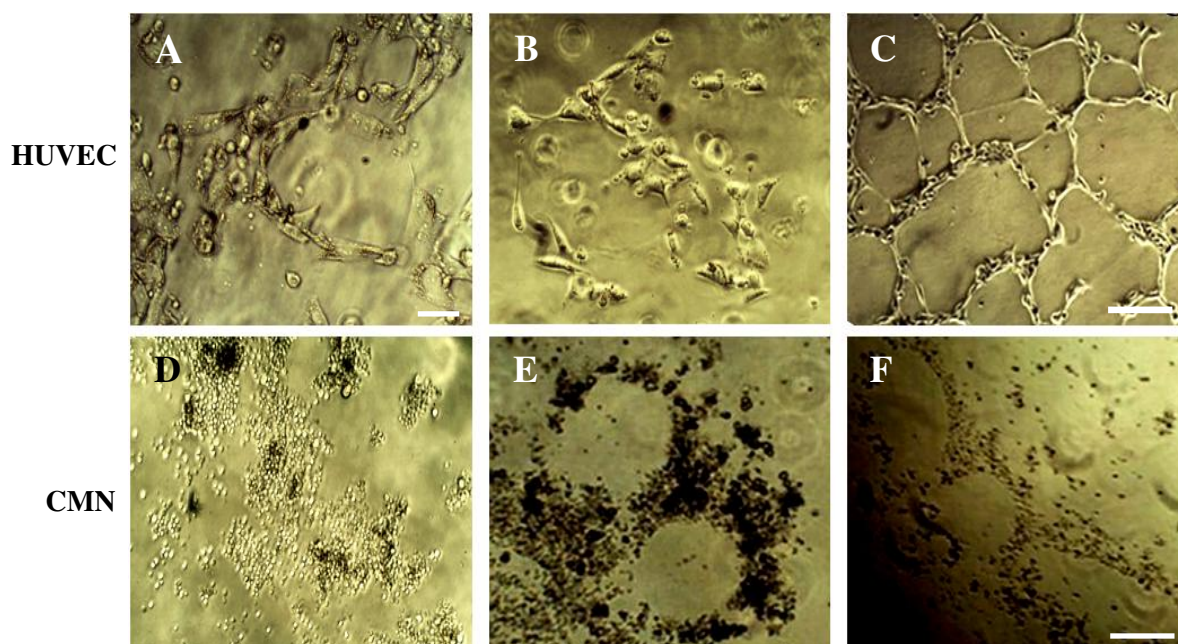


Figura 15: Células HUVECs (A, B e C) e células mononucleares (D, E e F) cultivadas em matrigel. A, B: HUVEC após 24 horas de cultura; C: HUVEC com 72 horas de cultura; D: mononucleares após 24 horas; E e F: células mononucleares após 3 dias. Aumento de 50X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro PH1. Barra de escala 50µm.

Células mononucleares

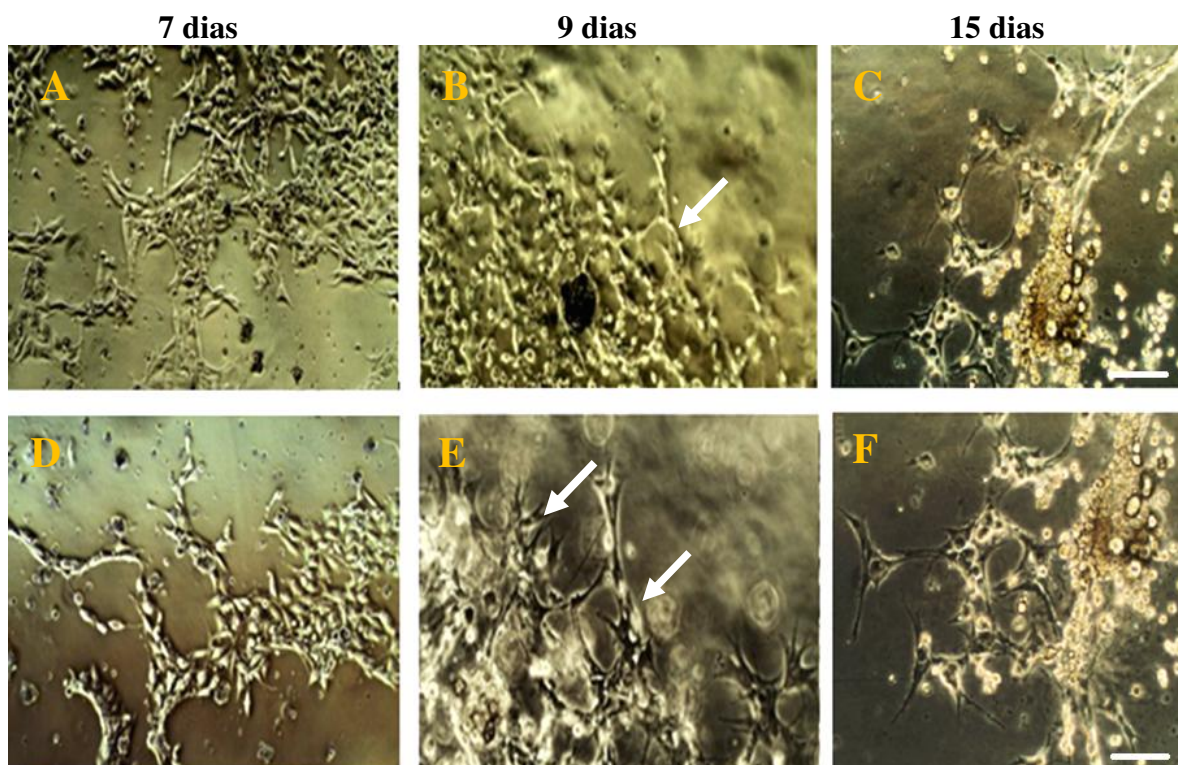


Figura 16: Células mononucleares cultivadas em matrigel após 7 dias (A e D), 9 dias (B e E) e 15 dias (C e F). As setas indicam estruturas semelhantes a capilares. Aumento de 50X em microscópio invertido de contraste de fase Zeiss Axiovert S100, filtro H (A) e PH1 (B, C, D, E e F).

As imagens A, B e C da figura 15 mostram a morfologia da HUVEC após 24 horas de cultura em Matrigel[®], as células começam a se organizar em estruturas semelhantes a vasos. Após 3 dias de cultura, estas redes se apresentam mais estruturadas (Figura 15C).

As células mononucleares por sua vez, não formam estruturas de vaso em 72 horas de cultura, o que ocorre é um alinhamento das mesmas. Foram plaqueadas 10^3 células/cm² e 10^4 células/cm² (imagens E e F, respectivamente), indicando que a concentração não influencia na formação de estruturas semelhantes a vasos.

Após 7, 9 e 15 dias de cultura (Figura 16) as células mononucleares estão aderidas e formando estruturas de rede e em alguns pontos estas se fecham, semelhante a capilares (setas da Figura 16).

7. DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, o isolamento das células progenitoras endoteliais foi realizado por cultura aderente, utilizando meio de cultura acrescido de fatores de crescimento favoráveis à proliferação e diferenciação das células progenitoras endoteliais (como o VEGF, IGF, bFGF e EGF). Este método é sugerido por Jin *et al.* (2004), através do qual as células são cultivadas em diferentes matrizes (colágeno, gelatina ou fibronectina) por diferentes tempos em cultura (Hirschi *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010). As CPEs separadas por cultura aderente compreendem várias pequenas subpopulações de células que embora não tenham um marcador celular consistente, tem mostrado alta capacidade proliferativa e características comuns às células endoteliais (Zampetaki *et al.*, 2008).

A escolha dos fatores de crescimento acrescidos aos meios testados visou um aumento na proliferação e na diferenciação das células mononucleares em células progenitoras endoteliais. Optamos pelo VEGF porque, além de ser agente mitógeno, para as CEs, é um estimulante da proliferação, migração, formação de vasos endoteliais e regulador da permeabilidade vascular (Lacaud *et al.*, 2004; Yancopoulos *et al.*, 2000). O FGF foi utilizado por influenciar no crescimento e na diferenciação celular *in vivo* e *in vitro* (Peters *et al.*, 1992) e regular a proliferação e migração das CEs (Seneglagia, 2008), adicionamos ainda o IGF por ser um mitógeno que controla a proliferação e diferenciação celular (Zumstein e Stiles, 1987). A eficiência da utilização de VEGF na diferenciação *in situ* de CPEs já foi apontada em muitos trabalhos como o de Shi *et al.* (1998) demonstrando que a presença de VEGF é muito importante para a diferenciação *in vitro* das CPEs; e o b-FGF e o IGF contribuíram com o aumento da formação de colônias endoteliais, o que também sustenta a utilização destes fatores de crescimento.

As análises morfológicas das células mononucleares em cultura indicaram diferentes morfologias ao longo dos períodos de cultura. Em 3 dias de cultura as células são arredondadas em todos os meios testados e em alguns elas formam colônias, características de células endoteliais, como mostrado por Iwaguro e Asahara (2005). A

partir de 7 dias notamos a presença de células fusiformes, como visto nas culturas de RPMI e DMEM1-M1, principalmente.

A seleção do meio de cultura que melhor atingisse nossos objetivos, assim como a concentração final dos fatores de crescimento utilizados nos mesmos, foi realizada com base na associação dos resultados obtidos através dos ensaios de adesão celular pela marcação do núcleo com DAPI, proliferação e viabilidade pela contagem do número de células por Azul de Tripán e medida de absorvância pela técnica do MTT.

Sabendo que a técnica de cultura por aderência seleciona diferentes subpopulações (Zampetaki *et al.*, 2008) durante o processo de isolamento, optamos por considerar apenas os dados de 7 e 14 dias de cultura, uma vez que período de 3 dias de cultura é muito curto e diferentes tipos celulares podem estar presentes e proliferando mais que as células de nosso interesse (dados visualizados principalmente no gráfico 1, de proliferação por Azul de Tripán). Em todos os ensaios realizados para adesão, proliferação e viabilidade, o meio M1(acrescido de VEGF, bFGF e IGF) foi o que apresentou maior número de células em 14 dias para todos os meios, RMPI 1640, DMEM1, DMEM2, MEM e 199 (dados das tabelas 1 e 2) e dentre estes, o meio DMEM1-M1 foi selecionado com base nos dados de proliferação (gráfico 2 e 3) e de viabilidade (gráficos 9 e 12).

Vale ressaltar que, em todos os casos, a proliferação celular diminui entre 7 e 14 dias, esta redução ocorre provavelmente porque ao longo do tempo tanto o meio quanto os fatores de crescimento utilizados tendem a selecionar apenas as células progenitoras endoteliais que representam um número muito pequeno, menos de 0,1% do total de células da medula óssea (Smadja *et al.*, 2007), podendo desta forma contribuir com esta redução do total de células.

Sendo assim, concluímos que o meio DMEM1-M1, acrescido dos fatores VEGF (10ng/ml), bFGF (2ng/ml) e IGF (2ng/ml) foi o que melhor atingiu nossos objetivos de aumentar o número e a viabilidade celular e a partir deste meio, realizamos ensaios para verificar a expressão de marcadores que pudessem identificar as células progenitoras endoteliais, além dos ensaios de internalização de acLDL e formação de estrutura semelhante a vasos, que também caracterizam as CPes.

Ingram *et al.*, (2004) sugere uma hierarquia das CPEs baseada no potencial proliferativo destas células. Hur *et al.*, (2004) divide as CPEs em 2 subpopulações, as chamadas CPEs precoce (*early EPCs*) e as CPEs de crescimento tardio (*late outgrowth EPCs*), cuja classificação está baseada na morfologia, proliferação, tempo de surgimento em cultura e expressão de marcadores.

Com base nestas características sugeridas e em nossas observações, podemos sugerir que nossas células como sendo as células progenitoras precoce (*early EPCs*), pela morfologia fusiforme predominante, pelo perfil proliferativo e pela viabilidade visualizados através da contagem com DAPI e dos ensaios com Azul de Tripán e MTT (resultados indicados nos gráficos) que indicaram um crescimento entre 3 e 7 dias de cultura e uma redução do mesmo entre 7 e 14 dias, dados que se confirmam com o trabalho de Smadja *et al.* (2007).

Ainda não existe na literatura um consenso sobre quais seriam os marcadores que melhor caracterizariam as CPEs. No caso do nosso trabalho escolhemos analisar a expressão dos marcadores CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31, que são os mais comumente descritos e mais aceitos na literatura (Yao *et al.*, 2009). Tongers *et al.* (2010) afirmam que o surgimento gradual de marcadores de células endoteliais e o desaparecimento de marcadores de células tronco (CD34 e CD133) são características da diferenciação celular, o que permite traçar um perfil de diferenciação ao longo da cultura. Eggermann *et al.* (2003) mostram que CPEs CD34+ podem se diferenciar em cultura mantendo os marcadores de células progenitoras.

Os resultados de imunocitoquímica, imunofluorescência, citometria de fluxo e western blotting, indicam a presença de todos estes marcadores nos três períodos analisados (3, 7 e 14 dias). Uma possível explicação para a presença do marcador CD31 de célula diferenciada já na cultura de 3 dias pode ser reflexo da técnica de isolamento que utilizamos (seleção por meio e não pela expressão de marcadores) na qual células em diferentes estágios de diferenciação podem estar contidas no “pool” de células mononucleares isoladas pela gradiente de centrifugação. Takahashi *et al.*, (1999) afirma que as CPEs mostram sinais morfológicos de células endoteliais e expressam marcadores endoteliais entre o 3º e 7º dia de cultura.

Os dados referentes à citometria de fluxo, comparando as células mononucleares recém isoladas e as células mononucleares cultivadas por 7 dias, indicaram que, quando na presença do meio DMEM1-MC (meio sem fatores de crescimento), as células CD34+ diminuem a frequência, uma possível causa pode ser a diferenciação das mesmas em CD31+, surgindo assim CD34+/CD31+, VEGFR-2+/CD31+ e CD31+/VEGFR-2+/CD31+, além de aumentar também CD34+/VEGFR-2+. Contudo, para nós essa diferenciação não tem muito interesse, uma vez que as células CD31+ diferenciadas têm baixo potencial proliferativo. Já o perfil celular da cultura em meio DMEM1-M1 mostrou um aumento nas células VEGFR-2+ e CD34+/VEGFR-2+ considerados juntamente com CD133 os principais marcadores de células progenitoras endoteliais. O interesse em manter estas células por mais tempo como células progenitoras e não induzir sua diferenciação em células endoteliais está relacionado à nossa intenção principal que é aumentar o número destas células progenitoras endoteliais em cultura, a fim de que elas possam ser utilizadas na angiogênese terapêutica e reparo de injúrias vasculares, como comprovados por diversos trabalhos citados por Pearson (2009 e 2010), e auxiliar ainda na redução da formação da neointima após lesão da carótida, como comprovado por Werner *et al.*, (2002) e por Godoy *et al.*, (2011).

A internalização de acLDL também foi positiva em nossos resultados, embora pesquisas recentes têm demonstrado que monócitos e macrófagos também internalizam acLDL (Ouchi *et al.*, 2001).

A formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel® foi visualizada somente no 7º dia de cultura e com 9 e 15 dias notamos que as células se fecham em estruturas que lembram a luz do vasos (setas da figura 16) . Nossos resultados em 24 horas de cultura são bastante parecidos com o apresentado por Smadja *et al.*, (2007) e o que vemos é apenas uma orientação, um arranjo celular e não estrutura semelhantes a vasos como sugerido por muitos trabalhos, uma possível explicação seria o fato de estarmos plaqueando as células no Matrigel® logo após o isolamento, enquanto que autores como Senegaglia *et al.* (2010) realizam a expansão prévia destas células em cultura de até 60 dias.

Desta forma, e com base em todos os resultados apresentados no presente trabalho, podemos considerar que o meio DMEM1-M1 foi capaz de induzir a proliferação das

células isoladas e provavelmente induziu a sobrevivência preferencial das CPEs ou ainda a diferenciação das células mononucleares em CPE, de acordo com o protocolo estabelecido no presente trabalho. Sendo assim, consideramos que foi estabelecido um protocolo para o isolamento e a proliferação das CPEs através da seleção das mesmas pelo meio de cultura DMEM1–M1, resultado que possui grande importância no campo das pesquisas com células progenitoras endoteliais, por favorecer o aumento do número destas células em cultura e ainda pelo potencial terapêutico das mesmas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados indicam que as células mononucleares isoladas a partir da medula óssea provavelmente sejam as células progenitoras precoces (*early EPCs*), uma vez que apresentaram maior proliferação após 7 dias de cultura e senescência após 14 dias, indicaram marcação positiva para a expressão de CD133, CD34, VEGFR-2 e CD31 e para a internalização de acLDL. Conseguimos ainda estabelecer os protocolos de Western Blotting e formação de estrutura de vaso em Matrigel[®] para estas células selecionadas.

O perfil destas células em cultura, identificado pela técnica de citometria de fluxo, corroboram com indicação de que se trata de células progenitoras endoteliais. Tudo isso nos leva a crer que o meio DMEM1-M1 estabelecido por nós é um meio bastante eficiente para a cultura de células mononucleares.

Sendo assim, podemos considerar que o presente trabalho foi de extrema importância para a pesquisa de cultura de células, principalmente para o nosso laboratório, que desta forma passa a utilizar estes meio DMEM1-M1 como o meio próprio para a cultura de células mononucleares. Esta importância torna-se ainda mais relevante quando nos referimos aos testes de terapia celular com células progenitoras para o reparo de lesão arterial desenvolvido no nosso laboratório. A significância do mesmo deve ser considerada ainda na pesquisa de cultura de célula, tornando-se autônomo do meio comercial específico para células endoteliais e ao mesmo tempo estabelecendo a técnica para a cultura da própria linhagem de células progenitoras endoteliais.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar os mesmos ensaios em períodos mais longos, de 21, 30 e até 60 dias.
- Verificar a expressão de marcadores de células diferenciadas, eNOS, vWF.
- Testar a capacidade de formação de estruturas semelhantes a capilares em Matrigel[®] após expansão do número de células em 30 dias de cultura (Senegaglia *et al.*, 2008)
- Fazer o isolamento das células por beads magnéticas marcados com CD133 e CD34.
- Testar a aderência das células em placa recoberta por fibronectina, que de acordo com Yang *et al.*(2010) aumentam a aderência inicial das CPEs.
- Verificar a integridade do cariótipo das células em cultura.
- Utilizar estas células expandidas em cultura para o reparo de lesão arterial (modelo de lesão estabelecido em nosso grupo).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZR, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**. v.275, p.964-967, 1997.

BRADFORD MM. **Anal. Biochem.** 72, 248, 1976.

BROWN KJ, MAYNES SF, BEZOS A, MAGUIRE DJ, FORD MD, PARISH CR. A novel *in vitro* assay for human angiogenesis. **Lab Invest.**75:539-555, 1996.

CARMELIET P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. **Nat Med.** 6: 389–95, 2000.

CARPENTER G, COHEN S. Epidermal growth factor. **The Journal of Biological Chemistry.** 265 (14): 7709–12, 1990.

CHACHQUES JC, DUARTE F, HERREROS J, PROSPER F, GIAMBRONI R, JULIA P, *et al.* Cellular myogenic and angiogenic therapy for patients with cardiac or limb ischemia. **Basic Appl Myol.**, v.1, n.13, p.29-37, 2003.

CHUN-LING F, YAN LI, PING-JIN GA O, LIU JJ, XUE-JUN Z, DING-LIANG ZHU. Differentiation of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood CD34+ cells in vitro. **Acta Pharmacol Sin.** v.3, n. 24, p.212-218, 2003.

DEVIN JK, YOUNG PP. The effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on the aging cardiovascular system and its progenitor cells. **Current Opinion in Investigational Drugs.** v.9, p.983–992, 2008.

EGGERMANN J, KLICHE S, JARMY G, HOFFMANN K, BEYRLE-MAYR U, MICHEL-KLAUS D, WALTENBERGER J, BELTINGER C. Endothelial progenitor cell culture and differentiation *in vitro*: a methodological comparison using human umbilical cord blood. **Cardiovascular Research**. v.58, p.478-486, 2003.

FOLKAMN J, SHING Y. Angiogenesis. **J Biol Chem**. 267 (160): 10931-4, 1992.

GODOY JAP, BLOCK DB, TOLLEFSEN DM, WERNECK CC E VICENTE CP. Dermatan sulfate and bone marrow mononuclear cells used as a new therapeutic strategy after arterial injury in mice. **Cytotherapy**. 2011.

GULATI R, JEVREMOVIC D, PETERSON TE, CHATTERJEE S, SHAH V, VILE RG, SIMARI RD. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. **Circ Res**. 93:1023–1025, 2003.

HEALY L, MAY G, GALE K, GOSVELD F, GREAVES M, ENVER T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.12240-12244, 1995.

HEISSIG B, HATTORI K, DIAS S, FRIEDRICH M, FERRIS B, HACKETT N R, CRYSTAL R G, BESMER P, LYDEN D, MOORE M A, WERB Z, RAFII S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**. v.109, p.625-637, 2002.

HERBRIG K, HAENSEL S, OELSCHLAEGEL U, PISTROSCH F, FOERSTER S E PASSAUER J. Endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis is associated with a reduced number and impaired function of endothelial progenitor cells. **Ann. Rheum. Dis**. 65, 157–163, 2006.

- HILL JM, ZALOS G, HALCOX JP, SCHENKE WH, WACLAWIW MA, QUYYUMI AA, FINKEL T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. **N. Engl. J. Med.** 348, 593–600, 2003.
- HOLMES K, ROBERTS O L L, THOMAS A M, CROSS M J. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. **Cellular Signalling.** 19, 2003–2012, 2007.
- HIRSCHI KK, INGRAM DA, YODER MC. Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitor Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 28;1584-1595, 2008.
- HRISTOV M, ERL W, WEBER PC. Endothelial Progenitor Cells Mobilization, Differentiation, and Homing. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 23, 1185-1189, 2003.
- HRISTOV M, WEBER C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. **J. Cell Mol. Med.** 8, 498–508. 2004.
- HUR J, YOON CH, KIM HS, CHOI JH, KANG HJ, HWANG KK, OH BH, LEE MM, PARK YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 24:288–293, 2004.
- INGRAM DA, MEAD LE, TANAKA H, MEADE V, FENOGLIO A, MORTELL K, POLLOK K, FERKOWICZ MJ, GILLEY D, YODER MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. **Blood.** 104:2752–2760, 2004.

IWAGURO H, ASAHARA T. Endothelial Progenitor Cell Culture and Gene Transfer. Methods in Molecular Medicine. **Molecular Cardiology: Methods e Protocols.Totowa.** v. 112, 2005.

JIN H, CHANG HY, HYO SK, JIN HC, HYUN JK, KYUNG KH, BYUNG HO, MYOUNG ML, YOUNG BP. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 24:288–293, 2004.

KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LI TT, ISNER JM, ASAHARA T. Transplantation of ex vivo expanded endothelialprogenitor cells for therapeutic neovascularization. **PNAS.** n. 7, v.97, p.3422-3427, 2000.

KASIMIR MT, WEIGEL G, SHARMA J, RIEDER E, SEEBACHER G, WOLNER E. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. **Thromb Haemost.** v.94, p.562-567, 2005.

KRANKEL N, ADAMS V, LINKE A, GIELEN S, ERBS S, LENK K, SCHULER G, HAMBRECHT R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.25, p.698-703, 2005.

LACAUD G, KOUSKOFF V, TRUMBLE A, SCHWANTZ S, KELLER G. Haploinsufficiency of Runx1 results in the acceleration of mesodermal development and hemangioblast specification upon in vitro differentiation of ES cells. **Blood.** v.103, p.886-889, 2004.

- LI TS, HAMANO K, HIRATA K, KOBAYASHI T, NISHIDA M. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. **J Cardio Surg.** 18 (s2): S69-S75, 2003.
- LI W, YANG SY, HU ZF, WINSLET MC, WANG W, SEIFALIAN AM. Growth factors enhance endothelial progenitor cell proliferation under high-glucose conditions. **Med Sci Monit.** v.15, n.12, BR357-363, 2009.
- LIN Y, WEISDORF DJ, SOLOVEY A, HEBBEL RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **J Clin Invest.** 105:71–77, 2000.
- MARSBOOM G, JANSSENS S. Endothelial progenitor cells: new perspectives and applications in cardiovascular therapies. **Expert Review of Cardiovascular Therapy.** v.6, p.687–701, 2008.
- MIRAGLIA S, GODFREY W, YIN A. H. *et al.* A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization and molecular cloning. **Blood.** v.90, p.5013-5021, 1997.
- MILLER-KASPRZAK E, JAGODZINSKI PP. Endothelial progenitor cells as a new agent contributing to vascular repair. **Arch. Arch Immunol Ther Exp.** 2007 55(4):247-59, 2007.
- MURASAWA S, ASAHARA T. Endothelial Progenitor Cells for Vasculogenesis. **Physiology.** v.20, 36-42, 2005.
- NARMONEVA DA, VUKMIROVIC R, DAVIS ME, KAMM RD, LEE RT. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: implications for cardiac regeneration. **Circulation.** 110 (8):962–968, 2004.

OUCHI N, KIHARA S, ARITA Y, NISHIDA M, MATSUYAMA A, OKAMOTO Y, ISHIGAMI M, KURIYAMA H, KISHIDA K, NISHIZAWA H, HOTTA K, MURAGUCHI M, OHMOTO Y, YAMASHITA S, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class a scavenger receptor expression in human monocytederived macrophages. **Circulation.** 103:1057–1063, 2001.

PEARSON JD. Endothelial progenitor cells – hype or hope ? **J Thromb Haemost.** 7: 255–62, 2009.

PEARSON JD. Endothelial progenitor cells—an evolving story. **Microvascular Research.** 79: 162–168, 2010.

PEICHEV M, NAIYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M, OZ MC, HICKLIN DJ, WITTE L, MOORE MAS, RAFII S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34+ cells identifies a population of functional endothelial precursors. **Hemostasis, Thromb Vasc Biol.** v.95, n.3, 952-958, 2000.

PETERS KG, WERNER S, CHEN G, WILLIAMS LT. Two FGF-receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. **Development.** 114 (1), 233-43, 1992.

QUIRICI N, SOLIGO D, CANEVA L, SERVIDA F, BOSSOLASCO P, DELILIERIS G L. Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. **British Journal of Haematology.** 115, 186-194, 2001.

RAFFI S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. **Nature Med.** 9:702–712, 2003.

- RIBATTI D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. **J Cell Mol Med.** 8(3):294-300, 2004.
- RIBATTI D. The discovery of endothelial progenitor cells an historical review. **Leukemia Research.** v.31, p.439-444, 2007.
- RISAU W, FLAMME I. Vasculogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol.** 11: 73–91, 1995.
- ROBERTS N, JAHANGIRI M, XU Q. Progenitor cells in vascular disease. **J Cell Mol Med.** v. 9, p.583-591, 2005.
- SENEGAGLIA AC, BROFMAN PRS, AITA CAM, DALLAGIOVANNA B, REBELATTO CLK, HANSEN P, BARCHIKI F, KRIEGER MA. Formação *in vitro* de túbulos capilares a partir de células de sangue de cordão umbilical humano com perspectivas para aplicação terapêutica. **Rev Bras Cir Cardiovasc.** n.4, v.23, p. 467-473, 2008.
- SENEGAGLIA AC, BARBOZA LA, DALLAGIOVANNA B *et al.* Are purified or expanded cord blood-derived CD133+ cells better at improving cardiac function?. **Experimental Biology and Medicine.** 235: 119–129, 2010.
- SHARPE EE, III, TELERON A A, LI B, PRICE J, SANDS MS, ALFORD K, YOUNG PP. The origin and *in vivo* significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells. **Am J Pathol.** v.168, p.1710-1721, 2006.
- SHALABY F, ROSSANT J, YAMAGUCHI TP, GERTSENSTEIN M, WU XF, BREITMAN ML, SCHUH AC. **Nature.** 376, 6535, 1995.

- SHI Q, RAFII S, WU MH, WIJELATH ES, YU C, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood**. 92: 362–367, 1998.
- SHINTANI S, MUROHARA T, IKEDA H, UENO T, HONMA T, KATOH A, SASAKI K, SHIMADA T, OIKE Y, IMAIZUMI T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. **Circulation**. 103: 2776–2779, 2001.
- SMADJA DM, BIECHE I, UZAN G, BOMPAIS H, MULLER L, BOISSON-VIDAL C, VIDAUD M, AIACH M, GAUSSEM P. PAR-1 activation on human late endothelial progenitor cells enhances angiogenesis in vitro with upregulation of the SDF-1/CXCR4 system. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 25:2321–7, 2005.
- SMADJA DM, BIECHE I, EMMERICH J, AIACH M, GAUSSEM P. PAR-1 activation has different effects on the angiogenic activity of endothelial progenitor cells derived from human adult and cord blood. **J Thromb Haemost**. 4:2729–31. 2006a.
- SMADJA DM, LAURENDEAU I, AVIGNON C, VIDAUD M, AIACH M, GAUSSEM P. The angiopoietin pathway is modulated by PAR-1 activation on human endothelial progenitor cells. **J Thromb Haemost**. 4:2051–8, 2006b.
- SMADJA DM, CORNET A, EMMERICH J, AIACH M, GAUSSEM P. Endothelial progenitor cells: Characterization, *in vitro* expansion, and prospects for autologous cell therapy. **Cell Biol Toxicol**. 23: 223–239, 2007.
- STAMM C, WESTPHAL B, KLEINE HD, PETZSCH M, KITTNER C, KLINGE H, SCUMICHEN C, NIENABER CA, FREUND M, STEINHOFF G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**. 361 (9351): 45–6, 2003.

TAKAHASHI T, KALKA C, MASUDA H, CHEN D, SIVER M, KEARNEY M, MAGNER M, ISNER JM, ASAHARA T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. **Nat Med.** v.5, p.434–438, 1999.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAK S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell.** 131, 861–872, 2007.

TIMMERMANS F, VAN HAUWERMEIREN F, DE SMEDT M, RAEDT R, PLASSCHAERT F, DE BUYZERE ML, GILLEBERT TC, PLUM J, VANDEKERCKHOVE B. Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133⁺ Cells or CD45⁺ Hematopoietic Precursors **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 27, p.1572-1579, 2007.

TIMMERMANS F, PLUM J, YÖDER MC, INGRAM DA, VANDEKERCKHOVE B, CASE J. Endothelial progenitor cells: identity defined? **J. Cell. Mol. Med.** Vol 13, 87-102, 2009.

TONGERS J, RONCALLI JG, LOSORDO DW. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. **Microvasc. Res.** May; 79(3):200-6, 2010.

URBICH C, DIMMELER S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. **Circ. Res.** 95, 343-353, 2004.

VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, ADLER K, URBICH C, MARTIN H, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Number and migratory activity of circulating

endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors of coronary artery disease. **Circ. Res.** 89, E1-7, 2001.

VOYTA JC, VIA DP, BUTTERFIELD CE, ZETTER BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. **J Cell Biol.** 99:2034–2040, 1984.

XU Y, ARAI H, MURAYAMA T, KITA T, YOKODE M. Hypercholesterolemia contributes to the development of atherosclerosis and vascular remodeling by recruiting bone marrow-derived cells in cuff-induced vascular injury. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 363 782-787, 2007.

WANG QR, WANG BH, HUANG HH, DAI G, LI WM, YAN Q. Purification and growth of endothelial cells from murine bone marrow mononuclear cells. **Journal of Cellular Biochemistry.** v.103, p. 21-29, 2008.

WATT SM, ATHANASSOPOULOS A, HARRIS AL, TSAKNAKIS G. Human endothelial stem/progenitor cells, angiogenic factors and vascular repair. **J. R. Soc. Interface.** 7, S731-S751, 2010.

WERNER N, PRILLER J, LAUFS U, ENDRES M, BÖHM M, DIRNAGL U, NICKENIG G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 22, 1567–1572, 2002.

WERNER N, JUNK S, LAUFS U, LINK A, WALENTA K, BOHM M, NICKENIG G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. **Circ Res.** 93:e17–e24, 2003.

- WIJELATH ES, RAHMAN S, MURRAYJ, PATEL Y, SAVIDGE G, SOBEL M.
Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells.
J Vasc Surg. v. 39, p.655-660, 2004.
- WOODFIN A, VOISIN MB, NOURSHARGH S. PECAM-1 a Multi-Functional Molecule
in inflammation and Vascular Biology. **Arterioscler Thromb and Vascular Biology.** v.
27, p.2514-2523, 2007.
- YANG N, LI D, JIAO P, CHEN B, YAO S, SANG H, YANG M, HAN J, ZHANG Y, QIN
S. The characteristics of endothelial progenitor cells derived from mononuclear cells of
rat bone marrow in different culture conditions. **Cytotechnology.** 2010.
- YANCOPOULOS GD, DAVIS S, GALE NW, RUDGE JS, WIEGAND SJ, HOLASH J.
Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **Nature.** v. 407, p.242-
248, 2000.
- YAO WJ, FIRTH AL, SACKS RS, OGAWA A, AUGER WR, FEDULLO PF, MADANI
MM, LIN GY, *et al.* Identification of putative endothelial progenitor cells
(CD34+CD133+Flk- 1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic
thromboembolic pulmonary hypertension. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.**
296:L870–L878, 2009.
- YIN AH, MIRAGLIA S, ZANJANI ED, *et al.* AC133, a novel marker for human
hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood.** v.90, p.5002-5012, 1997.
- YODER MC, MEAD LE, PRATER D, KRIER TR, MROUEH KN, LI F, KRASICH R,
TEMM CJ, PRCHAL JT, INGRAM DA. Redefining endothelial progenitor cells via
clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. **Blood.**v.109,
p.1801–1809, 2007.

YOON CH, HUR J, PARK KW, KIM JH, LEE CS, OH IY, KIM TY, CHO HJ, KANG HJ, CHAE IH, YANG HK, OH BH, PARK YB, KIM HS. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. **Circulation**.112:1618–27, 2005.

YOUNG PP, VAUGHAN DE, HATZOPOULOS AK. Biologic properties of endothelial progenitor cells and their potential for cell therapy. **Prog Cardiovasc Dis**. 49(6):421–429, 2007.

ZAMPETAKI A, KIRTON JP, XU Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells. **Cardiovasc. Res**. v.78, p.413-421, 2008.

ZHANG Q, SHE M. Biological behaviour and role of endothelial progenitor cells in vascular diseases. **Chin. Med. J**. v. 120, n.24, p.2297-2303, 2007.

ZHANG SJ, ZHANG H, HOU M, ZHENG Z, ZHOU J, SU W, WEI Y, HU S. Is It Possible to Obtain “True Endothelial Progenitor Cells” by In Vitro Culture of Bone Marrow Mononuclear Cells? **Stem Cells And Development**. 16:683–690. 2007.

ZUMSTEIN P, STILES CD. Molecular cloning of gene sequences that are regulated by insulin-like growth factor I. **J Biol Chem**. 262 (23): 11252-60, 1987.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Dissertação de Mestrado** intitulada "ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS DE MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS PARA UTILIZAÇÃO EM TERAPIA CELULAR":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

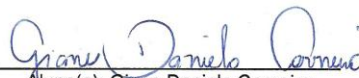
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança , projeto nº _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto nº 1243-1, Instituição: Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno(a): Glane Daniela Carneiro



Orientador(a): Cristina Pontes Vicente

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Carimbo e assinatura