

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

**EFEITO DOS FATORES FGF-2, EGF E β -CATENINA NO POTENCIAL
DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
PLACENTA HUMANA**

TALITA DA SILVA JEREMIAS

Florianópolis
2009

TALITA DA SILVA JEREMIAS

**EFEITO DOS FATORES FGF-2, EGF E β -CATENINA NO POTENCIAL DE
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
PLACENTA HUMANA**

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

Orientador: PROF.DR. MARCIO ALVAREZ SILVA

**Florianópolis
2009**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Dalmir e Antonia;
Aos meus irmãos,
Samira e Fernando;
Ao meu noivo,
Rafael.*

AGRADECIMENTOS

Ao Márcio, meu orientador, agradeço por todo apoio, todo ensinamento e paciência em todos estes anos de laboratório, os quais foram essenciais para meu crescimento científico e pessoal. Obrigada pela confiança e por ter acreditado no meu potencial.

Aos meus “co-orientadores”, Andréa, Cláudia e Ricardo, por agüentarem minhas inúmeras e incansáveis dúvidas. Pelo incentivo, conhecimento, paciência e idéias. Parte deste trabalho devo a vocês.

Ao povo do lab, que além de ótimos pesquisadores, são amigos maravilhosos. Obrigada a todos pelas risadas, ajudas, conhecimento e pelos momentos de descontração regados a muito café. Em ordem alfabética e sem esquecer de ninguém (espero): Aloísio, Beatriz, Bianca, Bi-K, Bruna, Bruno, Denise, Ezequiel, Fernanda, Gustavo, Larissa, Lucas, Maria Cecília, Mari, New, Ricardo, Rossana, Sarah, Suelen, Zucco. Trabalhar com vocês é muito bom.

À galerinha da placenta por dar continuidade a este trabalho. Vou sentir falta de esperar a lua cheia para ter parto! Podem contar comigo sempre.

À Cláudia, que apesar de ter nos abandonados, ainda é a minha mãezona. Tenho muito orgulho de ti, e sei que você vai longe. Sinto falta das conversas no corredor, dos conselhos, das reclamações, das cervejinhas, do churrasco do Lúcio. Volta!

Aos meus amigos espalhados pelo Brasil e pelo mundo. À Meline em Paris, à Pamela no Pantanal, à Luciana e à Talita, em Tuba city. Quero vocês perto de mim!

À toda minha família, todos os tios e primos, que sempre lembravam de mim quando passava alguma reportagem de célula tronco no Jornal Nacional.

À minha família Alemã, Rúbia, Nora e Rubens Kamke, por todo carinho e amizade. Um abraço da Schwarzer Kamke.

Aos meus cunhados, Renata e Daniel, pela ótima companhia, pelas risadas na praia, e claro, por fazerem meus brothers felizes.

Aos meus irmãos, Lhalha e Dede, simplesmente por serem meus irmãos. Vocês são maravilhosos. Claro que umas brigas sempre são bem vinda, afinal irmão muito amiguinho não tem graça. Sinto falta da alegria de vocês e principalmente, das confusões. Seus Confusentos!

Ao meu grande amor, Rafael, simplesmente por tudo. Continuo usando esta simples frase, pois não consigo expressar em palavras o quão importante você é na minha vida. Te amo muito.

Aos meus pais, que são tudo na minha vida, muito obrigada. Vocês me ensinaram a ter determinação, caráter e sabedoria. Agradeço do fundo do meu coração, todo amor, carinho e conselhos que vocês me deram. Vocês deixaram de construir os seus sonhos para construir o meu. Amo muito vocês.

“Menor que meu sonho não posso ser”

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância
ATRA: ácido trans-retinóico
BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina
cDNA: DNA complementar
CFU-F: Colony forming unit fibroblastic
CT: Célula tronco
CTDP: Célula tronco derivada de placenta
CTE: Célula tronco embrionária
CTH: Célula tronco hematopoiética
CTM: Célula tronco mesenquimal
CTS: Célula tronco somática
Dapi: 4'-6-diamino-2-fenilindol
DNA: ácido desoxiribonucleico
dNTP: deoxi-nucleotídeos
DVL: Disheveled
EDTA: ácido etileno-dinitrilo-tetracético
EGF: Fator de crescimento epidermal
EGFR: Receptor de EGF
FGF: Fator de crescimento fibroblástico
FITC: isotiocianato de fluoresceína
GAPDH: gliceraldeído fosfato desidrogenase
GFAP: Proteína fibrilar acídica glial
GFP: Proteína fluorescente verde
GSK-3 β : quinase glicogênio sintase
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's
LiCl₂: Cloreto de lítio
MAP-2: proteína associada a microtubulo
MgCl₂: Cloreto de magnésio
NF-M: Neurofilamento médio
PBS: salina tamponada por fosfato
RNA: ácido ribonucléico
RT: Transcriptase reversa

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

α SMA: alfa actina de músculo liso

SBF: Soro bovino fetal

TxRd: Vermelho do Texas

rpm: Rotações por minuto

KDa: Kilo daltons

Ig: Imunoglobulina

mg: miligramas

ng: nanogramas

mM: milimolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático mostrando os possíveis mecanismos para a plasticidade de células tronco adultas.....	06
Figura 2: Ilustração Esquemática da formação da placenta.....	08
Figura 3: Ilustração esquemática das regiões da placenta humana.....	09
Figura 4: Modelo proposto do nicho das CTMs e sua contribuição na manutenção do tecido.....	13
Figura 5: Padrão de sinalização do receptor de EGF, quando este é ativado por um ligante, no caso, o fator de crescimento epidermal	15
Figura 6: Cascata de sinalização ativada pela ligação do FGF ao seu receptor tirosina-kinase	18
Figura 7: Padrão de sinalização de Wnt	21
Tabela 1: Anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas.....	28
Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-PCR	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 CÉLULAS TRONCO	01
1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL	02
1.2.1 Características <i>in vitro</i> das CTMs	04
1.3 PLACENTA HUMANA E CTMs	07
1.4 NICHOS DAS CTMS	12
1.5 FATORES DE CRESCIMENTO E CTMS	14
1.5.1 Fator de crescimento Epidermal	15
1.5.2 Fator de Crescimento Fibroblástico	17
1.6 PROTEÍNA Wnt E A ATIVAÇÃO DA BETA-CATENINA	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 REAGENTES	23
3.2 EQUIPAMENTOS	24
3.3 MÉTODOS	24
3.3.1 Obtenção da Placenta Humana	24
3.3.2 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana	25
3.3.3 Tratamento com fatores de crescimento: EGF e FGF-2	26
3.3.4 Tratamento com ácido trans-retinoico (ATRA)	26
3.3.5 Tratamento com cloreto de lítio	26
3.3.6 Avaliação da proliferação celular por incorporação com BrdU	27
3.3.7 Análise imunocitoquímica	27
3.3.8 Reação em cadeia da polimerase por transcriptase Reversa (RT-PCR)	28

3.3.9 Transfecção do plasmídeo GFP	30
3.3.9.1 Transfecção e Amplificação do Plasmídeo	
pCX-EGFP em <i>Escherichia coli</i>	30
3.3.9.2 Extração do plasmídeo GFP	31
3.3.9.3 Transfecção do plasmídeo GFP em CTMs	31
3.3.10 Análise Estatística	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1. INTRODUÇÃO

1.2 CÉLULAS TRONCO

As células tronco (CTs) são geralmente definidas como células clonogênicas indiferenciadas, com capacidade de se auto-renovar e de originar um ou mais tipos de linhagens celulares diferenciadas (THOMSON *et al.*, 1998). A auto-renovação pode acontecer por divisão simétrica, onde há geração apenas de novas CTs, ou assimétrica, na qual são originadas além das CTs, células progenitoras que são parcialmente comprometidas fenotipicamente (SANDERS *et al.*, 2006). Em relação ao seu potencial de diferenciação, estas células têm sido classificadas como (1) totipotentes, sendo capazes de originar todos os tecidos embrionários e extra-embrionários; (2) pluripotentes, capazes de produzir todos os tipos celulares do embrião; (3) multipotentes, que contribuem para a produção de algumas linhagens celulares; e (4) unipotentes, que originam apenas um tipo celular maduro (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Molecularmente esta potencialidade das CTs tem sido associada com a expressão de inúmeros fatores de transcrição, destacando-se o OCT-4 e Nanog. A expressão destes fatores pode ativar ou inibir a expressão de vários genes, mantendo assim a célula em um estado indiferenciado e de auto-renovação (PAN *et al.*, 2002).

As CTs vêm sendo isoladas e caracterizadas a partir de tecidos embrionários, fetais e adultos (THOMSON *et al.*, 1998). As células tronco embrionárias (CTEs) pluripotentes, são derivadas da massa celular interna do blastocisto, e quando mantidas em culturas originam diferentes tipos de colônias de células, das quais várias possuem o fenótipo indiferenciado. Caso estas células indiferenciadas sejam cultivadas em uma camada celular alimentadora (fibroblastos, por exemplo), elas podem ser expandidas, formando assim uma linhagem de

CTEs imortais (DONOVAN; GEARHART, 2001). As células derivadas de tecidos adultos e fetais, chamadas de células tronco somáticas (CTS), foram descritas inicialmente como células tecido-específicas, sendo capazes de originar somente células progenitoras correspondentes a seu tecido de origem. Entretanto, nas últimas décadas inúmeros estudos têm demonstrado que as CTS possuem uma plasticidade maior do que aquela previamente descrita, tendo habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (multipotentes), porém com uma plasticidade menor do que as CTs embrionárias (WISLET-GENDEBIEN *et al.*, 2005).

Os estudos e aplicações clínicas com as células embrionárias têm se mostrado desafiadores em razão de várias controvérsias éticas e políticas em torno de sua utilização, além de seu alto potencial carcinogênico. Conseqüentemente, as CTs obtidas de tecidos adultos vêm sendo amplamente estudadas (RABIE *et al.*, 2007).

1.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

O conceito atual de células tronco mesenquimais, descrito pela primeira vez por Caplan (1991), surgiu a partir de experimentos clássicos realizados na década de 60, os quais demonstraram que transplantes de medula óssea para regiões anatomicamente heterotópicas resultavam em osso ectópico. O trabalho de Tavassoli e Crosby (1968) claramente estabeleceu provas de um potencial osteogênico inerente associado com a medula óssea, entretanto não puderam delinear a identidade dos progenitores destas células diferenciadas para osso (BIANCO, 2008).

Foram Friedenstein e colaboradores (1968), que demonstraram que o potencial osteogênico, revelado pelo transplante heterotópico de medula óssea, estava associado com uma subpopulação de células da medula. Estas células eram distinguidas da maioria das

células hematopoiéticas pela sua rápida aderência e pela aparência fibroblastóide de sua progênie em cultura, apontando para sua origem no compartimento estromal da medula óssea (DONALD, 2007; BIANCO, 2008). Além disso, eles demonstraram que estas células quando em suspensão em uma densidade clonal, resultavam na formação de colônias iniciadas por uma única célula, chamada de “colony-forming unit fibroblastic” (CFU-Fs). Transplantes *in vivo* mostraram que múltiplos tecidos esqueléticos, como osso, cartilagem, tecido adiposo e tecido fibroso, podem ser experimentalmente gerados pela progênie de uma única célula do estroma medular (BIANCO, 2008). Na década de 80, Friedenstein e Owen chamaram estas células de CT osteogênica ou CT estromal da medula óssea (FRIEDENSTEIN; OWEN, 1988).

Em resumo, estes trabalhos pioneiros de Travassoli, Friedenstein e Owen revelaram que um segundo tipo de células tronco, sendo a primeira a ser identificada a CT hematopoiética, pode estar presente na medula óssea, mais especificamente no estroma que suporta a hematopoiese.

Entretanto, o conceito de CTs não-hematopoiéticas na medula não foi bem aceito, apesar de a hipótese ser firmemente estabelecida e evidências experimentais serem publicadas e reproduzidas. Já o termo célula tronco mesenquimal (CTM), proposto previamente como uma alternativa para CTs estromais ou CTs osteogênicas, ganhou grande popularidade. O nome foi baseado na hipótese que vários tecidos de origem mesenquimal, além da linhagem esquelética, pode ser gerada através de CTMs pós-natais, incluindo músculo esquelético, miocárdio, músculo liso, tendão (CHAMBERLAIN, 2007; BIANCO, 2008). Atualmente, o conceito de CTMs, une a maioria dos conceitos previamente descritos ao longo dos anos, sendo então definida como uma população de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e capacidade de diferenciação em células osteogênicas, condrogênicas e adipogênicas (DOMINICI, 2006).

1.2.1 Características *in vitro* das CTMs

Em adição a medula óssea, as CTMs têm sido isoladas do músculo esquelético (WILLIAMS *et al.*, 1999), tecido adiposo (ZUK, 2001), cordão umbilical (ERICES, 2000), placenta, sistema circulatório (Kuznetsov, 2001), polpa dental (COURA *et al.*, 2008), fluido amniótico (ANKER, 2003), assim como, sangue fetal, fígado, medula óssea, e pulmão (NOORT, 2002). Na verdade, sugere-se que células com características de CTMs residem em todos órgãos e tecidos pós-natais (JAVAZON, 2004; MEIRELLES, 2006). Estas células são geralmente selecionadas em cultura pela sua característica de adesão ao plástico, sua morfologia fibroblastóide e por sua capacidade de proliferação, sendo que após uma fase inicial as células se dividem rapidamente atingindo confluência.

O aumento das CTMs, originando assim uma cultura homogênea pode ser obtida através da expansão e passagens (repiques) em meio pobre em nutrientes para evitar contaminações com outros tipos celulares (CAMPAGNOLI, 2001). Contudo, estudos clonais demonstraram que populações aderentes ao plástico isoladas da medula óssea são funcionalmente heterogêneas contendo, além de progenitores indiferenciados, precursores restritos à determinadas linhagens (MURAGLIA, 2000). Esta heterogeneidade, juntamente com os diferentes métodos de obtenção das CTMs e avaliação da sua capacidade de diferenciação torna difícil a caracterização das CTMs em relação a sua fenotipagem e potencialidade.

Fenotipicamente as CTMs expressam inúmeros marcadores, dos quais nenhum é específico. Geralmente é descrito que as CTMs adultas não expressam marcadores hematopoiéticos como CD45, CD34, CD14, ou CD11. Também não expressam moléculas coestimulatórias, CD80, CD40 ou moléculas de adesão como CD31 (PECAM - Molécula de adesão de célula endotelial plaquetária), CD18 (LFA1 - antígeno 1 associado com função

leucocitária) ou CD56 (molécula de adesão de célula neuronal). Mas, podem expressar CD105, CD44, CD90 (Thy-1), e Stro-1 assim como moléculas de adesão, CD106 (VCAM - molécula de adesão de célula vascular), CD29 e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) (CHAMBERLAIN, 2007).

Geralmente é aceito que todas as CTMs são desprovidas do marcador hematopoiético CD45 e do marcador de célula endotelial CD31. Porém, é importante ressaltar que diferenças na expressão de vários marcadores pode ser influenciada pelos fatores secretados por células presentes nas passagens iniciais. Além disso, a expressão de vários marcadores *in vitro*, pode nem sempre estar correlacionado com seu padrão de expressão *in vivo* (GRONTHOS, 2001). Enfim, as CTMs podem exibir variações no seu padrão de expressão gênica entre diferentes fontes de obtenção, método de isolamento e cultura (confluência, número de passagens) e espécies (GREGORY, 2005).

Em adição à identificação das CTMs baseadas nas suas características morfológicas e fenotípicas, outro método para identificá-las já mencionado anteriormente, é através de sua capacidade de diferenciação em osso, cartilagem, e gordura *in vitro*. Os métodos para obter tais diferenciações já são bem descritos, sendo que os meios indutivos possuem fatores como, dexametasona, indometacina, insulina, ácido ascórbico, glicerolfosfato (PITTENGER 1999; CONGET, 1999; HANADA K, 1997) e TGF- β (MACKAY, 1998).

Os mecanismos que regulam esta diferenciação ainda não são bem conhecidos (JIN *et al.*, 2003), mas existem possíveis explicações que descrevem como esta plasticidade é obtida (Figura 1). Estas explicações são baseadas em mecanismos como a transdiferenciação, desdiferenciação e fusão celular. Na transdiferenciação a conversão de linhagem ocorre diretamente pela ativação de uma outra forma de programa de diferenciação dormente, ou seja, a célula muda seu estado padrão de expressão gênica para outro tipo celular (Figura 1A) (FILIP *et al.*, 2005; WAGERS *et al.*, 2004). A conversão de linhagem pode ocorrer também

via desdiferenciação de uma célula tecido-específica para uma mais primitiva (pluripotente), e subsequentemente há a re-diferenciação em um novo padrão de linhagem (Figura 1B) (TANAKA, 2003).

Outro mecanismo é a fusão celular, no qual duas células fenotipicamente diferentes se fundem, mudando assim sua expressão gênica. Trabalhos demonstram que CTs quando co-cultivadas com outros tipos celulares, por exemplo astrócitos, podem se fundir a eles e adquirir uma característica neural. Em transplantes de CTs em camundongos também é relatado a fusão celular, sendo que as CTs tronco adquiriram um fenótipo diferenciado em razão da expressão gênica da outra célula já diferenciada (WAGERS *et al.*,2004).

Outras explicações para a plasticidade das CTs adultas estão relacionadas com a pureza ou homogeneidade da população, ou seja, vários tipos de CTs comprometidas com linhagens celulares distintas podem contribuir para o resultado observado (Figura 1C) (WAGERS *et al.*,2004). Ou, através da ação de uma única e rara célula tronco pluripotente, que origina progenitores de linhagens celulares distintas (Figura 1D) (WAGERS *et al.*,2004).

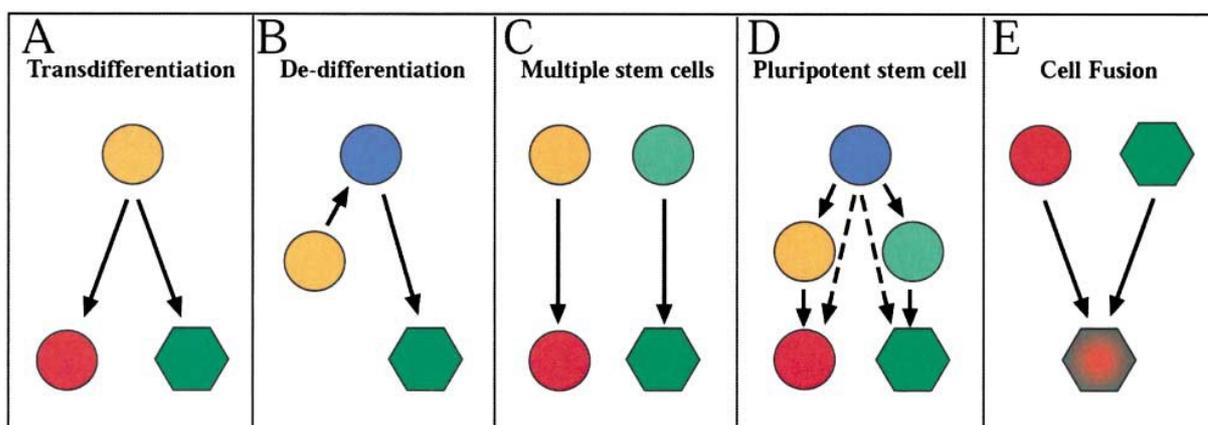


Figura 1. Diagrama esquemático mostrando os possíveis mecanismos para a plasticidade de células tronco adultas. Células tronco tecido-específicas estão representadas por círculos laranjas ou verdes, células tronco pluripotentes por círculos azuis e células diferenciadas por círculos vermelhos e hexágono verde.

Fonte: (WAGERS *et al.*,2004)

Nos últimos anos vários grupos têm se dedicado a investigar a diferenciação das CTMs em linhagens celulares diferentes das de origem mesodérmica. Sabe-se atualmente, que as CTMs possuem potencialidade também para a diferenciação em tecidos endodérmicos e ectodérmicos (KHUU, 2007; LEE, 2004; CROFT, 2000; DENG, 2006). Campard e colaboradores (2008), demonstraram a diferenciação de CTMs obtidas de cordão umbilical em células semelhantes a hepatócitos, sugerindo grande potencial na regeneração hepática. A diferenciação para o fenótipo neural das CTMs tem gerado grande interesse principalmente para o tratamento de doenças degenerativas e auto-imunes do sistema nervoso (BRAZELTON, 2000). Inúmeros trabalhos têm relatado a diferenciação neural destas células através de sua morfologia (neuronal e glial), expressão de marcadores neurais, como nestina (precursor neural), β -tubulina III (neurônio) e GFAP (glia), funcionalidade (excitabilidade) e transplante no sistema nervoso (JIN, 2003; JORI, 2005; KRAMPERA, 2007). Contudo, alguns métodos usados para promover tais diferenciações e principalmente a “qualidade” destas células diferenciadas são relatados como fragmentados e inconsistentes (DONALD, 2007).

1.3 PLACENTA HUMANA E CTMs

Em humanos, 6-7 dias após a fertilização ocorre a implantação do blastocisto e o desenvolvimento da placenta é iniciado. Neste estágio o blastocisto é formado pela massa celular interna e pelas células trofoblásticas que circundam a cavidade blastocística (Figura 2 A). O embrião, o cordão umbilical e o epitélio amniótico são originados a partir de células da massa celular interna, enquanto que a placenta é derivada do trofoblasto. No 8°-9° dia as células trofoblásticas proliferam consideravelmente, formando uma bicamada trofoblástica: a camada externa torna-se o sinciciotrofoblasto, e a interna o citotrofoblasto (Figura 2.A e B). A

partir da proliferação destas duas camadas celulares, juntamente com a proliferação do mesênquima extra-embriônico, são geradas as vilosidades da placenta e ao final do quarto mês de gestação a estrutura completa da placenta está formada (Figura 2.C) (JUNQUEIRA & CARNEIRO; ILANCHERAN, 2009).

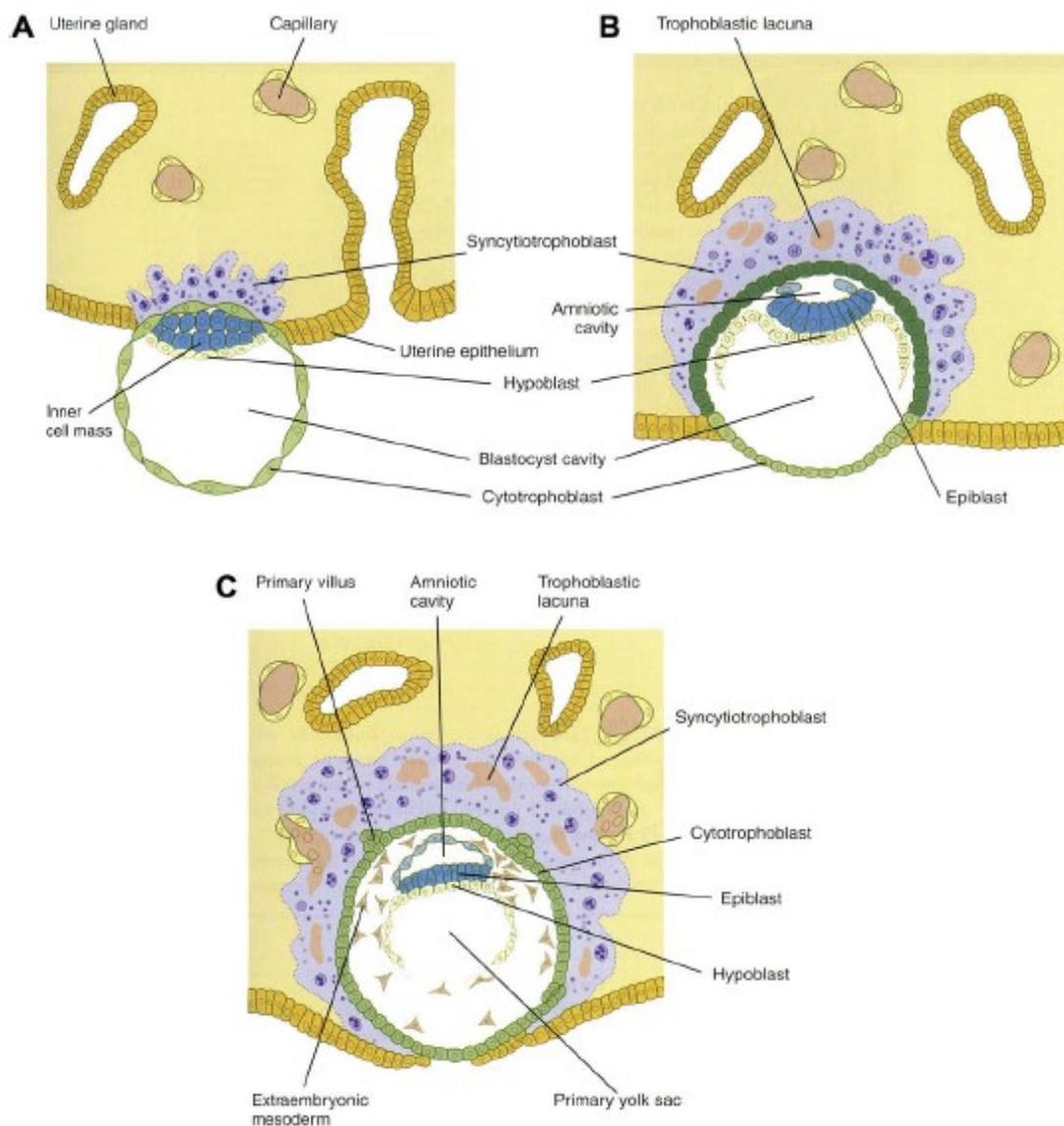


Figura 2. Ilustração Esquemática da formação da placenta.Fonte: (ILANCHERAN, 2009)

Em relação a sua estrutura, a placenta é constituída de uma parte fetal (placa coriônica) e uma parte materna (decídua/placa basal), sendo então o único órgão formado por células de dois indivíduos (Figura 3). A placa coriônica, uma estrutura de multicamadas que envolve a cavidade amniótica, é formada por duas estruturas: a membrana amniótica (composta de epitélio, camada compacta, mesoderme amniótica e camada esponjosa) e o córion (composto de mesênquima e uma região extravilosa formada por células trofoblásticas). As vilosidades originadas da placa coriônica ancoram a placenta fixando-se a placa basal e ao endométrio materno, mas também podem ser encontrados livres no espaço intervilosos. Na região materna, protusões da placa basal próximas aos vilos coriônicos produzem os septos placentários, que dividem o parênquima em cotilédones irregulares. As trocas fisiológicas entre o sangue da mãe e do feto ocorrem entre os vilos coriônicos e os espaços intervilosos (placa basal) (JUNQUEIRA & CARNEIRO,1999).

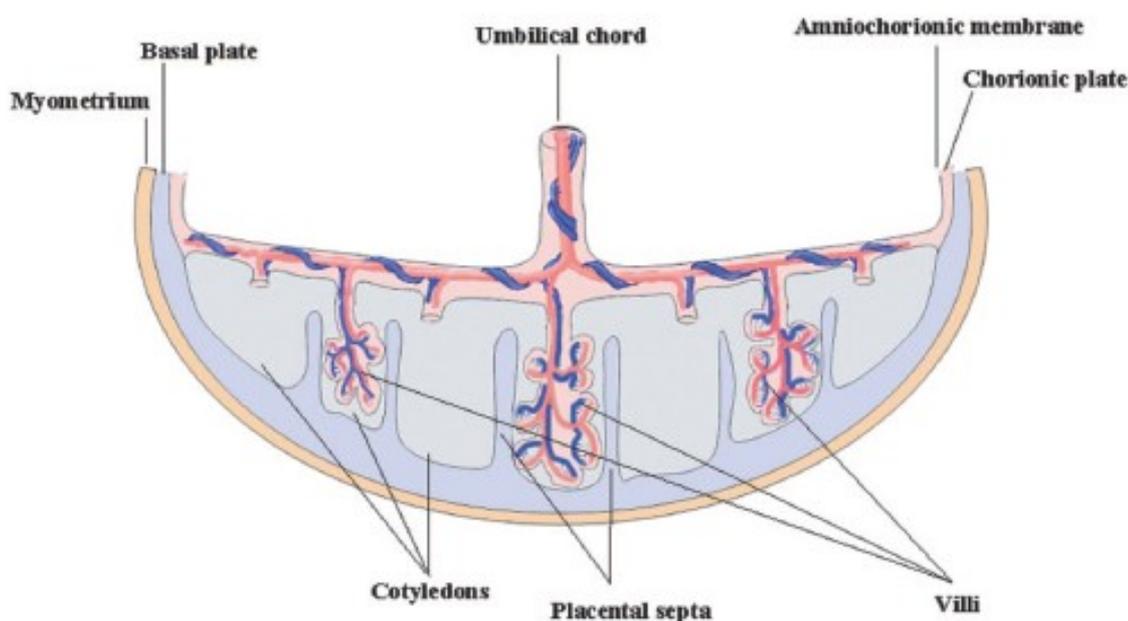


Figura 3. Ilustração esquemática das regiões da placenta humana. Fonte: (PAROLINI,2008).

A placenta humana, além de possuir um papel essencial e fundamental no desenvolvimento e nutrição do feto, pode também representar uma reserva de CTs. Nos últimos anos, tem havido grande interesse na sua utilização como fonte de CTs para a medicina regenerativa, em razão da alta plasticidade fenotípica das células isoladas deste tecido, da disponibilidade e facilidade em ser adquirida sem procedimentos evasivos, e a sua utilização não ocasiona debates éticos (PAROLINI *et al.*, 2008). Além disso, considerando que parte da placenta é originada do trofoblasto do blastocisto, a presença de células progenitoras embrionárias neste tecido tem sido por muito tempo proposto, embora seja improvável que possuam um potencial de diferenciação e proliferação como os das CTEs (GUPTA, 1997).

Considerando a complexidade de sua estrutura, inúmeros estudos descrevem a presença de CTs em diferentes partes da placenta, usando numerosos métodos de obtenção e caracterização. Destas diferentes regiões as seguintes populações de CTs já foram isoladas: mesenquimais, hematopoiéticas, assim como, progenitores endodermais, células trofoblásticas coriônicas e CTs epiteliais amnióticas (ALVAREZ-SILVA, 2003; CURTIS, 2006; PAROLINI, 2008). No primeiro Workshop Internacional de Células Tronco Derivadas da Placenta (CTDP), realizado em 2007, foram definidos os seguintes critérios para definir as CTs obtidas da placenta (excluindo as CTHs): aderência ao plástico, formação de colônias (CFU-Fs), padrão de expressão de determinados marcadores de superfície (como por exemplo, CD90 positivo e CD 45 negativo), origem fetal e potencial de diferenciação em ao menos uma destas linhagens celulares: adipogênica, condrogênica, osteogênica e endotelial (PAROLINI, 2008).

As CTDPs são altamente proliferativas, podendo ser mantidas até 20 passagens e expressam marcadores de pluripotência, comuns em CTEs, como OCT-4, nanog, SSEA e

nestina (MIAO, 2006;). Semelhante as CTMs da medula óssea, elas possuem simultaneamente um “estado multidiferenciado” expressando genes ectodermis, mesodermis e endodermis (AKIVA; DALE, 2008).

A utilidade clínica destas CTDPs envolve o transplante de células indiferenciadas ou pré-diferenciadas *in vitro*. Estudos pré-clínicos em modelos animais, e até mesmo em humanos, estão sendo desenvolvidos visando a possibilidade de cura de inúmeras doenças. Trabalhos sobre diferenciação hepática das CTMs obtidas da placenta tem se mostrado muito promissores para o tratamento de doenças no fígado (TAKASHIMA, 2004). Em doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio e isquemia, a terapia com CTDPs tem sido amplamente estudada. Experimentos de co-cultura com explantes de coração de rato confirmam que as CTDPs se integram ao tecido cardíaco e diferenciam em cardiomiócitos. Quando transplantadas no coração de ratos enfartados, estas células sobrevivem durante 2 meses se diferenciando em cardiomiócitos, além de liberarem fatores tróficos que podem afetar as células presentes no local da implantação (ZHAO, 2005).

A utilização das células da placenta para o tratamento de doenças neurológicas, principalmente as CTs epiteliais amnióticas, pode ser considerada tendo em vista seu potencial de expressar marcadores neuronais e glias específicos, além da sua capacidade de produzir e secretar neurotransmissores. Têm sido descrito transplantes com sucesso destas células dentro do núcleo caudato, hipocampo e medula espinhal. Quando transplantadas no hipocampo estas células se diferenciam em células semelhantes a neurônios. Em ratos com lesão medular, o transplante resulta em benefícios, como a neuroproteção em fase aguda e a facilidade de regeneração, sendo que estes efeitos podem ser mediados através da secreção de fatores neurotróficos (PAROLINI, 2008).

A medicina regenerativa baseada nas CTs representa um novo caminho para o tratamento de inúmeras doenças, revolucionando a medicina. Embora as CTs adultas e as

embrionárias exibirem grande plasticidade, parece improvável que uma única população de CTs seja ideal para o tratamento em todos os casos clínicos. Portanto, continuar o esforço para identificar e caracterizar novas fontes de CTs é importante para o sucesso clínico. Nos últimos anos, os tecidos extra-embrionários foram adicionados à lista de possíveis populações de células progenitoras, podendo oferecer algumas vantagens como: o isolamento a partir de tecidos normalmente descartados ao nascimento, a facilidade de crescimento em cultura, e ainda, a menor probabilidade de virem a ser rejeitadas após o transplante.

1.4 NICHOS DAS CTMS

As CTs de tecidos adultos são encontradas em nichos especializados nos seus correspondentes tecidos de origem (WATT *et al.*, 2000). Por exemplo, as CTs hematopoiéticas podem ser encontradas na medula óssea (VERFAILLIE *et al.*, 2000), as CTs epidermais no folículo piloso (BRAUN *et al.*, 2003) e as CTs neurais na zona subventricular (GOULD *et al.*, 1999). Entretanto, as CTs mesenquimais não possuem um nicho especializado.

Os tipos celulares originados das CTMs, como os adipócitos, condrócitos e osteócitos estão presentes no organismo inteiro, e sendo assim, a localização destas CTs no organismo deve permitir que sua progênie atinja a maioria ou todos os tecidos e órgãos. Considerando isto, três possibilidades podem ser consideradas de acordo com Meirelles *et al.* (2008). Na primeira, as CTMs estariam localizadas em somente um tecido específico ou órgão, do qual elas sairiam e circulariam para outros locais. Isto levaria a pensar que as CTMs residem no sangue periférico, mas a considerável dificuldade de estabelecer culturas de CTMs neste tecido (utilizando diferentes metodologias) argumenta contra esta hipótese. A segunda possibilidade é baseada no fato de que as CTMs adultas têm sido isoladas de inúmeros

tecidos, sugerindo que todos eles possuem um “pool” de CTs intrínsecas que podem estar se comportando como CTM quando caracterizada *in vivo* (MEIRELLES *et al.*, 2008).

A terceira possibilidade envolve a relação entre as CTMs e as células perivasculares. Esta sugestão pode adequadamente explicar porque as CTMs podem ser isoladas de todos os tecidos. A associação destas células mesenquimais com a vasculatura permite que as CTMs funcionem como uma fonte de novas células para reposição celular e estejam disponíveis para a reparação ou regeneração de lesões locais (Figura 4). Sendo assim, os danos a qualquer tecido iriam liberar a CTM perivascular, que iria se dividir, além de secretar fatores tróficos e imunoregulatórios. O estabelecimento de culturas de CTMs de vasos sanguíneos argumenta a favor desta hipótese (MEIRELLES *et al.*, 2008).

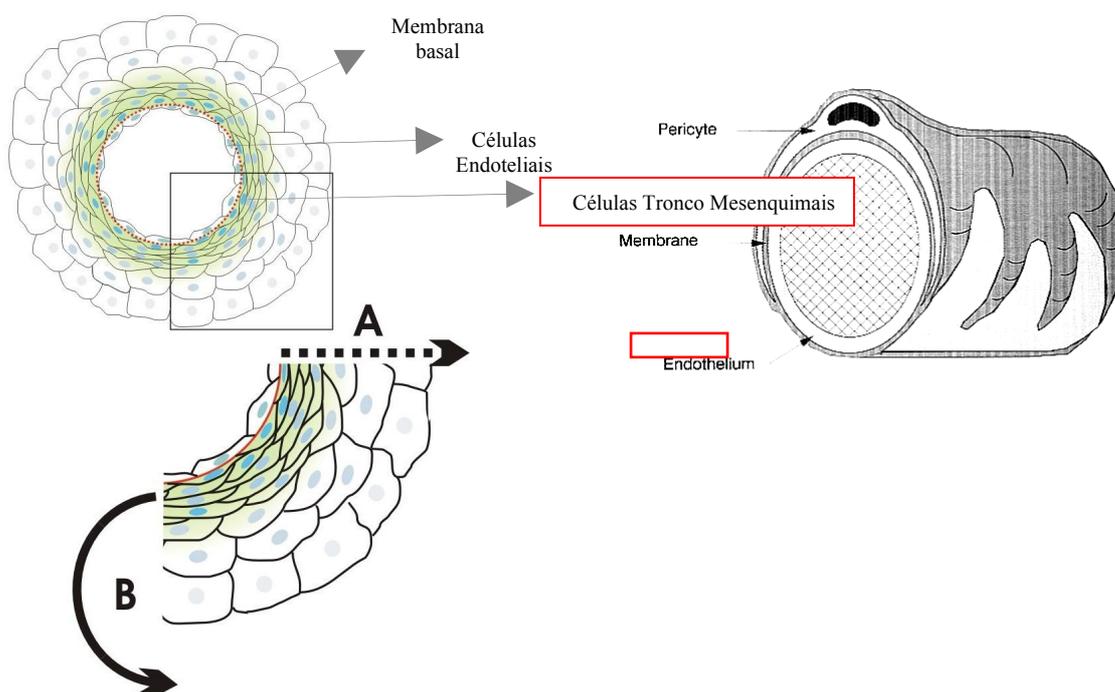


Figura 4. Modelo proposto do nicho das CTMs e sua contribuição na manutenção do tecido. No esquema estão representados um corte transversal de um vaso, no qual as CTMs estão ancoradas na membrana basal (linha vermelha), opostas as células endoteliais. Sinais fornecidos pelo microambiente do tecido coordena uma transição gradual (representada pelo gradiente em verde) a partir de células indiferenciadas à progenitores e células com fenótipo maduro. Este processo pode acontecer naturalmente, como representado pela seta pontilhada. No caso lesão tecidual CTMs indiferenciadas podem ser mobilizadas diretamente sem a transição à progenitores (seta B).

Adaptado de: (MEIRELLES *et al.*, 2006).

De fato, estudos vêm demonstrando que células perivasculares, como os pericitos (Figura 4), possuem a capacidade de se diferenciarem em tipos celulares mesenquimais *in vitro* e *in vivo*, dando origem a adipócitos, condrócitos e osteócitos, além de possuírem marcadores de células mesenquimais e morfologia semelhante a estas (MEIRELLES *et al.*, 2006). Os pericitos, também chamados de células periendothelias, são células que se encontram associadas à microvasos, opostas às células endoteliais. Para ser considerada pericito, uma determinada célula precisa demonstrar ter contato físico com as células endoteliais por meio de junções gap, expressar ao menos um marcador atribuído à pericitos (α SMA, nestina) e não expressar marcadores de células endoteliais (CD31). Da mesma forma, quando essa interação é interrompida e o pericito é liberado da membrana basal, sugere-se que ele seja considerado uma CTM (MEIRELLES *et al.*, 2008). Mais uma vez o termo células tronco mesenquimais parece inadequado e, possivelmente, o termo células-tronco perivascular poderia representar melhor esse tipo de célula.

1.5 FATORES DE CRESCIMENTO E CTMS

As CTMs, *in vivo*, residem em um complexo microambiente caracterizado pelos fatores de crescimento solúveis e componentes da matriz extracelular. Compreender como os fatores de crescimento regulam respostas comportamentais das CTMs é essencial tanto para as pesquisas básicas quanto para as aplicações tecnológicas (GENG *et al.*, 2008).

Os mecanismos moleculares que governam a diferenciação das CTMs não são completamente entendidos, mas inúmeros fatores de crescimento que medeiam padrões de sinalização vêm sendo relacionados à indução ou regulação da diferenciação das CTMs.

1.5.1 Fator de crescimento Epidermal

A família de fatores de crescimento epidermais compreende seis polipeptídios estruturalmente relacionados, os quais possuem uma estrutura compacta de três voltas conservada entre eles, chamada de domínio EGF. Todos os membros da família EGF se ligam e ativam um receptor tirosina quinase, conhecido como receptor de EGF ou ErbB, que é uma glicoproteína transmembranar com atividade tirosina quinase intrínseca (Figura 5). A ativação deste receptor por um ligante ocasiona sua fosforilação, resultando assim na iniciação de múltiplos padrões de sinalização, incluindo o padrão ERK, o padrão PI3-kinase-AKT e o padrão JAK/STAT (XIAN, 2007).

A ativação do receptor de EGF tem sido relacionada com o crescimento, diferenciação e migração celular, desempenhando assim um importante papel na manutenção da homeostase e na regulação da resposta à lesões em vários tecidos, incluindo sistema nervoso, glândulas mamárias e tecidos epiteliais (XIAN, 2007).

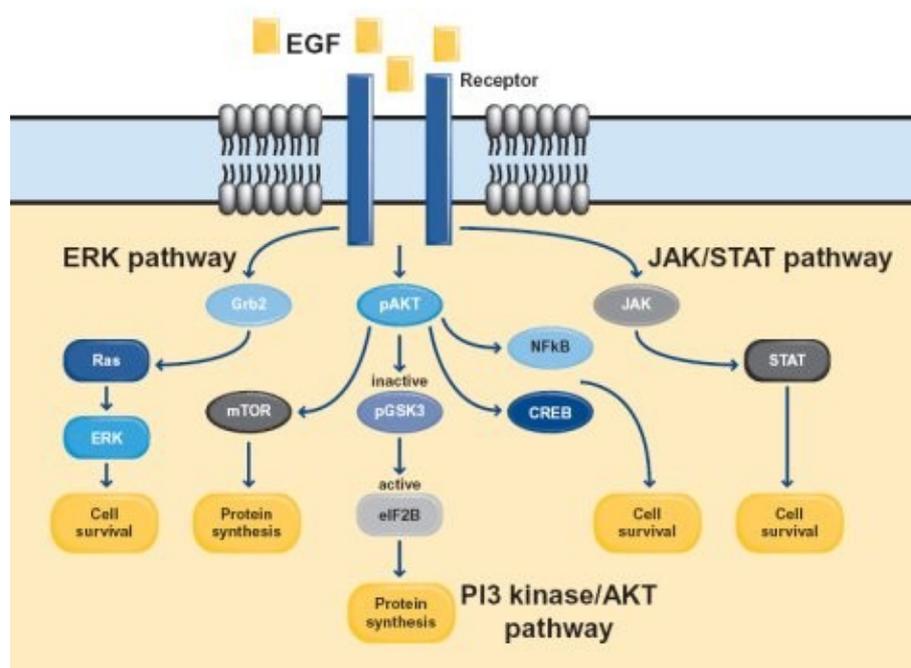


Figura 5. Padrão de sinalização do receptor de EGF, quando este é ativado por um ligante, no caso, o fator de crescimento epidermal.

As CTMs da medula óssea humana expressam receptores de EGF (EGFR), possuindo um nível elevado de ativação em resposta ao fator de crescimento EGF (NORMANNO *et al.*, 2005). Funcionalmente, estudos sugerem que os ligantes dos EGFR podem regular a proliferação e diferenciação das CTMs (GRONTHOS, 1995). Apesar do papel *in vivo* da expressão dos EGFR nas CTMs não estar claro, vários estudos têm demonstrado que estas células podem manter seu potencial de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* em resposta ao EGF (TAMAMA *et al.*, 2006). Existe ainda, uma grande produção de fatores de crescimento, incluindo o EGF, pelas CTMs da medula em resposta a lesões no microambiente, sugerindo que estas células poderiam regenerar a lesão através da secreção de fatores de crescimento (XIAN, 2007).

Os efeitos do EGF na diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica das CTMs têm sido controversos. Trabalhos relatam que a presença de EGF nas culturas, inibe esta diferenciação, enquanto outros demonstram que esta não é influenciada. A adição de EGF ao meio adipogênico não promove a diferenciação para adipócitos em CTMs da medula de ratos ou humanos (KRAMPERA *et al.*, 2005). Outros dados demonstram que o EGF inibe a síntese de colágeno e a atividade da fosfatase alcalina, e que a sinalização do seu receptor atua como um regulador negativo da diferenciação osteogênica (TAMAMA *et al.*, 2006). Já o pré-tratamento das CTMs com EGF parece não afetar a diferenciação, confirmando que a expansão *in vitro* destas células na presença deste fator não interfere com sua subsequente diferenciação, sendo então um ótimo candidato para a expansão destas células (TAMAMA *et al.*, 2006). A razão para este efeito controverso do EGF nas diferenciações para linhagens mesenquimais ainda não é clara e requer mais estudos sobre o efeito dos fatores de crescimento nas CTMs.

A aquisição de EGF e a ativação do seu receptor estão envolvidas também na regulação de muitos aspectos do desenvolvimento dos precursores neurais, como o potencial

de diferenciação e migração celular (CICCOLINIA *et al.*, 2005). Em razão disso, muitos estudos com CTs utilizam o EGF em meios indutivos para o fenótipo neural. Trabalhos descrevem sua atuação na diferenciação de CTs da medula óssea de camundongos, em células gliais e neurônios (BOSSOLASCO *et al.*, 2005). Em relação à diferenciação em miofibroblastos, quando há a inibição da cascata de sinalização (ERK/MAPK) promovida pela ativação do receptor de EGF, as CTMs da medula óssea se diferenciam neste fenótipo, ou seja, a presença de EGF inibe esta diferenciação (TAMAMA *et al.*, 2008).

Embora os estudos acima sugerirem que o EGF seja relevante para a biologia das CTMs, mais estudos são necessários para investigar as fontes de EGF *in vivo* e se a sinalização mediada pelo seu receptor realmente contribui para a diferenciação e/ou manutenção do estado indiferenciado das CTMs (TAMAMA *et al.*, 2006).

1.5.2 Fator de Crescimento Fibroblástico

Os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) compreendem uma grande família de moléculas sinalizadoras com inúmeras funções no desenvolvimento assim como na fisiologia e patologia do organismo adulto (DVORAK *et al.*, 2006). Já é bem descrito que os FGFs induzem atividade mitogênica, quimiotática e angiogênica em células de origem mesodermis e neuroectodermis. Até o momento, vinte FGFs foram descritos, contendo algumas distinções estruturais e funcionais entre eles (POWERS *et al.*, 2000).

O FGF-2, também chamado de FGF básico ou b-FGF, é formado por uma isoforma de massa molecular baixa (18kDa) e quatro altas, sendo que a região 18kDa possui alta afinidade ao receptor do FGF (DELRIEU, 2000). A transdução de sinal do FGF é iniciada após a ligação do FGF-2 em conjunto com moléculas de heparan-sulfato, ao seu receptor tirosina-quinase transmembranar (FGFR) (Figura 6). Esta ligação resulta na dimerização e

autofosforilação do receptor, ocasionando uma cascata de transdução de sinal, que leva ao estímulo da expressão de determinados genes através da ativação de fatores de transcrição (MOHAMMADI *et al.*, 2005).

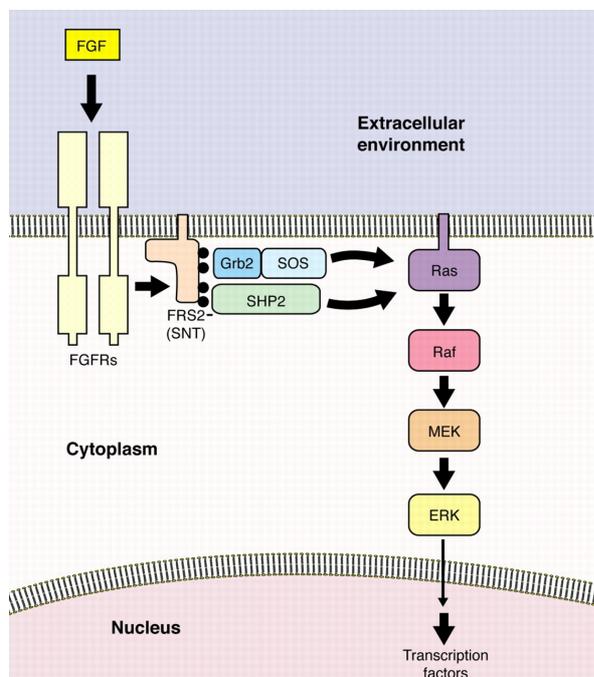


Figura 6. Cascata de sinalização ativada pela ligação do FGF ao seu receptor tirosina-quinase.

Fonte: www.stke.sciencemag.org

O FGF-2 tem sido descrito como um importante fator de crescimento, no reparo e regeneração de diferentes tecidos, tendo em vista seu grande efeito proliferativo em células fibroblásticas e endoteliais (POWERS *et al.*, 2000). Está relacionado também a patologias, como o câncer, sendo que os estudos com CTs cancerígenas descrevem seu envolvimento com a tumorigenicidade, sobrevivência e resistência a drogas destas células (SONG *et al.*, 2000; OKADA-BAN *et al.*, 1999). Além disso, tem um importante papel na manutenção da auto-renovação e do estado indiferenciado de CTs embrionárias (DVORAK *et al.*, 2006). De fato, estudos vêm demonstrando que o FGF é necessário para induzir a quiescência nas CTs (NISHIKAWA *et al.*, 2008)

Em relação às CTMs, inúmeros trabalhos demonstram a influência do FGF-2 na expressão de marcadores neurais, e na diferenciação mesodermal. O pré-tratamento com FGF-

2 aumenta o potencial de diferenciação osteogênica e condrogênica em CTMs humanas (ITO *et al.*, 2008). Além disso a proliferação celular das CTMs aumenta em resposta ao FGF (CHOI *et al.*, 2008). A combinação de FGF com outros fatores de crescimento, como EGF e PDGF (TAO *et al.*, 2005), e moléculas indutoras, como ácido retinóico e DMSO (BERTANI *et al.*, 2005), é amplamente utilizada para induzir a diferenciação neural. CTMs obtidas de placenta cultivadas em meio sem soro e com FGF-2 originam diferentes linhagens celulares, inclusive a neural (BATTULA *et al.*, 2007).

Assim como o EGF, estudos envolvendo o FGF-2 no potencial de diferenciação e proliferação das CTs são ainda muito controversos, e inúmeros trabalhos são difíceis de reconstituir. Isto pode ser resultado das diferentes condições experimentais, como fontes de obtenção, métodos de isolamento e espécies (GREGORY, 2005).

1.6 PROTEÍNA Wnt E A ATIVAÇÃO DA BETA-CATENINA

A proteína Wnt constitui uma das mais importantes famílias de moléculas sinalizadoras no desenvolvimento, exercendo também papel em tecidos adultos, como na regulação da proliferação e motilidade celular, geração de polaridade e especificação do destino celular. Recentemente, a sinalização de Wnt tem sido implicada no controle da diferenciação de células tronco hematopoiéticas e células tronco da pele, assim como na regulação miogênica, condrogênica e adipogênica. (ETHERIDGE *et al.*, 2004), além disso a molécula Wnt esta envolvida na manutenção e diferenciação das células progenitoras mesenquimais adultas (HEDGEPEETH *et al.*, 1997)

A sinalização de Wnt pode estimular quatro tipos diferentes de padrão de sinalização, sendo um deles, a que regula a estabilidade da β -catenina, levando a transcrição de vários genes alvos.

Na ausência da sinalização de Wnt, a β -catenina é fosforilada pela GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β), o que permite que seja ubiquitinizada e subsequentemente degradada por proteosomas. Entretanto, quando o Wnt se liga ao seu receptor, a molécula frizzled, a proteína citoplasmática DVL (disheveled) é ativada, inibindo assim a fosforilação da β -catenina pela GSK-3 β . Isto ocasiona a estabilização e acumulação da β -catenina e sua translocação para o núcleo, onde pode induzir a expressão de determinados genes (MERMELSTEIN *et al.*, 2007) (Figura 7).

A aplicação do íon lítio tem sido usada para mimetizar a sinalização de Wnt, pois inibe a GSK-3 β , estimulando assim componentes da via de sinalização de wnt. A utilização de cloreto de lítio em CTMs de medula óssea é eficiente na inibição da GSK-3, e subsequente translocação de β -catenina para o núcleo, proporcionando evidências que a sinalização de Wnt é funcional nas CTMs, sendo requerida para sua manutenção e funcionalidade (HEDGEPEETH *et al.*, 1997; STAMBOLIC *et al.*, 1996).

Mais estudos em torno do papel da sinalização de Wnt nas CTMs são necessários para aumentar o entendimento dos mecanismos sinalizadores envolvidos na manutenção e diferenciação das CTMs. A sinalização de Wnt em CTMs obtidas da placenta envolvendo diferenciação em linhagem neural ainda é pouco conhecida.

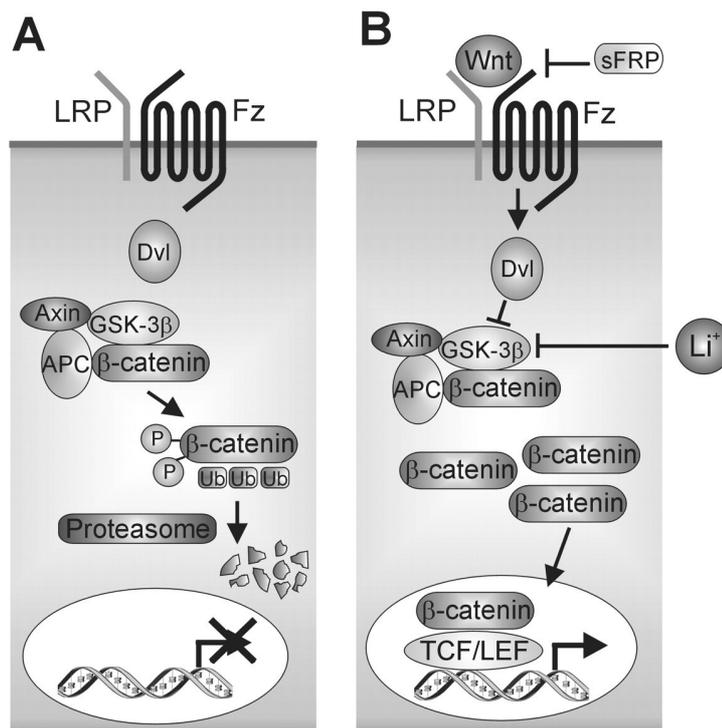


Figura 7. Padrão de sinalização de Wnt. A. Na ausência de Wnt, β -catenina é associada com GSK-3 β , axina e APC (adenomatous polyposis coli). A beta-catenina é fosforilada pela GSK-3 sendo marcada para ubiquitinação e subsequente degradação pelos proteossomas. B. Wnt se liga ao seu receptor Frizzled e co-receptor LRP, ativando Dvl, que inibe GSK-3. Beta-catenina é acumulada e deslocada para o núcleo, onde regula transcrição gênica. O Lítio inibe GSK-3 e pode ser usado para mimetizar a sinalização de Wnt. Fonte: ETHERIDGE *et al.*, 2004

A identificação de fatores de crescimento e vias de sinalização envolvidas na auto-renovação e diferenciação celular é importante para a concepção de estratégias, a fim de alcançar a senescência e a diferenciação direcionada para um determinado fenótipo das CTs (TAMAMA *et al.*, 2006). Tendo em vista, este argumento, nosso trabalho investigou a influência dos fatores de crescimento EGF e FGF-2, além da sinalização por lítio (mimetizando de Wnt), nos mecanismos de diferenciação e proliferação das CTMs de placenta humana *in vivo*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as influências dos fatores de crescimento FGF-2 e EGF, e a sinalização de Wnt no mecanismo de diferenciação das células tronco mesenquimais da placenta humana *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a influência do FGF-2 e EGF na potencialidade de diferenciação das CTMs
- 2) Avaliar a ação do cloreto de lítio na ativação de β -cateninas nas CTMs.
- 3) Determinar a influência da ativação da β catenina na diferenciação das CTMs.
- 4) Verificar a proliferação celular das CTMs tratadas com FGF-2, EGF *in vitro*.
- 5) Padronizar técnica de amplificação e transfecção do plasmídeo GFP em *Escherichia coli* e nas CTMs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Fosfato de sódio dibásico, IMDM, Trizol adquiridos da **GIBCO**.

4'-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), Ácido etileno-dinitrilo-tetracético (EDTA), Ácido trans-retinóico (ATRA), Ampicilina, Anticorpo primário anti- α SMA, Fator de crescimento Epidermal (EGF), Fator de crescimento fibroblástico (FGF), Penicilina, streptomicina, tripsina, Triton X-100, Tween 20, Cloreto de lítio (LiCl), Pancreatina, adquiridos da **Sigma**

Anticorpo primário anti-nestina, Anticorpo primário anti- β -catenina adquirido da **Santa Cruz Biotechnology**

Anticorpo primário anti-BrdU adquirido da **Calbiochen**

Soro bovino fetal (SBF) adquirido da **Cultilab**

5-bromo-2-deoxiuridinina (BrdU), SYBR Safe DNA, Lipofectamina, Kit-pure link quick plasmid miniprep, adquiridos da **Invitrogen**

Ácido clorídrico adquirido da **F.Maia**

Paraformaldeído adquirido da **MERK**.

Anticorpo primário anti- β -tubulina III, Kit máster mix, Transcriptase reversa, Oligo dT, Inibidor de RNase, dNTP, Cloreto de magnésio, Tampão 5X adquirido da **PROMEGA**

Agarose adquirida da **AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH**

Anticorpo secundário anti-IgG de coelho FITC, Anticorpo secundário anti-IgG1 de camundongo Txrd, Anticorpo secundário anti-IgG2a de camundongo FITC adquirido da

Sourthen Biothec

Iniciadores (primers) adquiridos da IDT - **Integrated DNA Technologies**

Meio LB, Agar adquiridos da **BD**

3.2 EQUIPAMENTOS

Banho Maria, dbm 120, BENFER

Centrífuga, Universal 32R, HETTICH

Centrífuga, Excelsa baby

Centrífuga, 5415 D, EPPENDORF

Câmara de Neubauer, HIRSCHMANN TECHCOLOR

Estufa úmida de CO², Elite II, REVCO

Fluxo laminar, Veeco

Microscópio de contraste de fase, CK40, OLYMPUS

Microscópio epifluorescente, IX71, OLYMPUS

pHmetro, Q-400^a, QUIMIS

Sistema de eletroforese, LABTRADE

Termociclador, Mastercycler gradient, EPPENDORF

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Obtenção da Placenta Humana

A placenta humana foi obtida através de uma colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), no qual pacientes com saúde qualificada doaram suas placentas após apresentação do termo de consentimento. Tal termo esclarece para as doadoras a linha de pesquisa, a segurança e seriedade com que esta será realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, através de número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG.

Uma pequena porção da placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril, contendo PBS (tampão fosfato salino) e encaminhada para o Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular, onde foi realizado o procedimento de cultura celular. Para realização das culturas, utilizamos apenas a região subjacente á placa coriônica localizada na parte fetal do anexo embrionário, próxima ao cordão umbilical.

3.3.2 Isolamento e cultura de células tronco mesenquimais de placenta humana

As amostras das placentas coletadas (aproximadamente 1cm²) foram dissociadas mecanicamente e digeridas enzimaticamente com pancreatina (6,25g/L) e solução de tripsina-EDTA (0,05%), por aproximadamente 20 minutos, em temperatura ambiente. O tecido dissociado homogeneamente foi submetido à centrifugação (500 g), durante 5 minutos e resuspenso em IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) acrescido de penicilina/streptomicina(1U/μg) e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF). Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² (corning) e mantidas em estufa úmida, à 37°C e ar atmosférico suplementado com 5% de CO². Após 4 dias o meio foi trocado e as células não aderentes descartadas. As CTMs foram selecionadas pela adesão no plástico, sendo que as células não aderentes foram removidas com a troca periódica do meio (3-4dias).

Após três semanas de cultura, quando a monocamada atinge confluência de aproximadamente 80 a 90 % , as células foram descoladas usando solução de tripsina (0,25%) e EDTA (0,02%) em PBS, pH 7,4, a temperatura ambiente. A reação foi neutralizada pela adição de meio de cultura contendo 10% de SBF. As células foram replaqueadas na concentração de 10³ células/ml em IMDM acrescido de penicilina/streptomicina e

suplementado com 10% de SBF (passagem 1). As células foram repicadas de 7 a 12 vezes, sendo estas as passagens utilizadas para os experimentos.

3.3.3 Tratamento com fatores de crescimento: EGF e FGF-2

Para os experimentos com os fatores de crescimento EGF e FGF-2, as CTMs em passagens 7-12 foram plaqueadas em placas de 96 poços (Corning), em uma densidade de 500 células por poço e incubadas durante cinco dias em IMDM suplementado com 10% de SBF e diferentes concentrações de EGF e FGF-2. Uma curva de concentrações foi realizada, utilizando-se 5, 10, 20 e 40 ng/ml de EGF ou FGF-2, separadamente. A análise da influência destes fatores juntos, foi realizada nas concentrações de 10 ng/ml e 20 ng/ml.

Após o tratamento as células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica para fenótipos específicos, conforme descrito no item 3.3.7.

3.3.4 Tratamento com ácido trans-retinoico (ATRA)

Para os experimentos com o ATRA, as células foram tratadas primeiramente com os fatores EGF e FGF-2 na concentração de 20 ng/ml, como descrito acima. Após o tempo de tratamento o meio contendo os fatores foi retirado, as células foram lavadas com PBS e mantidas em IMDM suplementado com 1 μ M de ATRA e 10% de SBF durante 24 horas. As células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica.

3.3.5 Tratamento com cloreto de lítio

As culturas de CTMs em passagens 7-12 foram plaqueadas em placas de 24 poços (Corning), em uma densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço e incubadas durante 24 horas em

IMDM suplementado com 10% de soro bovino fetal, contendo 20 mM de cloreto de lítio (LiCl_2).

Após o tratamento as células foram analisadas e quantificadas através de imunocitoquímica para β -catenina e fenótipos específicos, conforme descrito no item 3.3.7.

3.3.6 Avaliação da proliferação celular por incorporação com BrdU

A proliferação foi avaliada por ensaio de incorporação com brdU (5-bromo-2-deoxiurina) que corresponde a um análogo da timidina, incorporando-se ao DNA das células que estão proliferando. Após 4 dias de cultura, as CTMs tratadas com EGF e FGF-2 foram incubadas com 1 $\mu\text{g/mL}$ de brdU durante 24 horas. Em outro experimento para avaliação da proliferação as células tratadas foram incubadas com brdU após 0, 2 e 4 dias de cultura.

Após o período de incubação as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 20 minutos. Logo após, foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com ácido clorídrico (2N) durante 30 minutos, à 37°C. As culturas foram novamente lavadas com PBS e procedeu-se a reação imunocitoquímica, descrita no item 3.3.7.

3.3.7 Análise imunocitoquímica

Para a realização do ensaio de imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com PBS-Triton X-100 (0,25%) durante 30 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com 5% de SBF durante 40 minutos e em seguida, as células foram submetidas à reação imunocitoquímica, utilizando-se anticorpos primários específicos, descritos na tabela 1. A incubação com os anticorpos primários foi realizada por um período

de 1 hora a temperatura ambiente. A seguir procederam-se as lavagens (3 lavagens com PBS-Tween 20 [0,05%]) e a nova incubação (durante 1 hora) com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado a FITC, Anti-IgG1 de camundongo conjugado a TxRd e anti IgG2a de camundongo conjugado a FITC. Após 3 lavagens com PBS-Tween, as células foram incubadas com DAPI (50 ng/ml) durante 15 segundos, à temperatura ambiente, para análise do número total de células. As marcações fluorescentes da expressão fenotípica das CTMs foram observadas e fotografadas em microscópio de epifluorescência.

A análise imunofluorescente da localização de β -catenina, nuclear ou citoplasmática, foi realizada através de observação em microscópio de epifluorescência através da sobreposição da marcação de dapi (nuclear) e a de beta-catenina.

Tabela 1. Anticorpos primários utilizados nas reações imunocitoquímicas.

<i>Fenótipo</i>	<i>Anticorpo primário</i>
Músculo liso	Anti- α SMA (anti alfa actina de músculo liso) – IgG2a
Neurônio	Anti- β -tubulina III – IgG1
Precursor neural/ Célula indiferenciada	Anti-nestina – IgG1
Proliferação celular	Anti-Brdu – IgG1
β -catenina	Anti- β -catenina – IgG
Neurônio	Anti-NF-M (anti neurofilamento médio) - IgG

3.3.8 Reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR)

Para a realização da RT-PCR, as células foram lavadas com PBS e a extração do RNA total foi realizada com TRIZOL, de acordo com as orientações do fabricante. Para a reação da transcriptase reversa (RT), o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando-se 5 μ g de RNA total em um volume final de 20 μ l de uma mistura contendo enzima transcriptase reversa, iniciador oligo-dT (0,5mg/mL), inibidor de RNAase (40U/ μ l), nucleotídeos (dNTP 10 mM), Mg₂Cl (50mM) e Tampão 5X, em termociclador, por 1 hora a 40°C. A amplificação

do cDNA de interesse foi realizada com a utilização de iniciadores específicos (descritos na tabela 2) e do Kit máster mix. Os produtos das RT-PCRs foram visualizados em gel de agarose (2%) e coloração com Sybr in TAE.

Tabela 2 – Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção dos RNAs mensageiros por RT-PCR.

<i>Iniciador</i>	<i>Seqüência</i>	<i>Anelamento (T em °C)</i>
GAPDH	Sense: ATG AGG TCC ACC ACC CTG TT Anti-sense: ATC ACT GCC ACC CAG AAG AC	60
NF-M	Sense: GAG CGC AAA GAC TAC CTG AAG A Anti-sense: CAG CGA TTT CTA TAT CCA GAG CAC	56
MAP-2	Sense: CCA TTT GCA ACA GGA AGA CAC Anti-sense: CAG CTC AAA TGC TTT GCA ACT AT	54,5
β -TUBULINA III	Sense: AGA TGT ACG AAG ACG AGG AG Anti-sense: GTA TCC CCG AAA ATA TAA ACA CAA A	55
NESTINA	Sense: CAG CTG GCG CAC CTC AAG ATG Anti-sense: AGG GAA GTT GGG CTC AGG ACT GG	62
α SMA	Sense: CGA TAG AAC ACG GCA TCA TC Anti-sense: CAT CAG GCA GTT CGT AGC TC	51
NANOG	Sense: TGC AAA TGT CTT CTG CTG AGA T Anti-sense: GTT CAG GAT GTT GGA GAG TTC	54
OCT-4	Sense: CTC CTG AAG CAG AAG AGG ATC AC Anti-sense: CTT CTG GCG CCG GTT ACA GAA CCA	58
CD-90	Sense: GAG AAT ACC AGC AGT TCA CCC ATC Anti-sense: AGG ATC TCT GCA CTG GAA CTT GAG	58
VE-CADERINA	Sense: TTG CCC ACA TAT TCT CCT TG Anti-sense: GCA GCA GCA GGT GCT AAC C	61
CD 31	Sense: GAG TCC TGC TGA CCC TTC TG Anti-sense: ATT TTG CAC CGT CCA GTC C	61
CD 200	Sense: TCC AAT TTA ACA GCG AAA ACA A Anti-sense: CCC TGT ATA GCA GTC AGC CC	54
GFAP	Sense: GTG GGC AGG TGG GAG CTT GAT TCT Anti-sense: CTG GGG CGG CCT GGT ATG ACA	65

3.3.9 Transfecção do plasmídeo GFP

3.3.9.1 Transfecção e Amplificação do Plasmídeo pCX-EGFP em *Escherichia coli*

O Plasmídeo pCX-EGFP utilizado foi gentilmente doado pelo Dr. Masaru Okabe, Osaka University, Japão, e foi amplificado para posterior utilização nas CTMs. Quando inseridos nas CTMs, estas passam a expressar a proteína fluorescente verde (GFP), podendo assim serem diferenciadas em relação a outras linhagens celulares.

A transfecção do plasmídeo EGFP para amplificação, foi realizada na linhagem de bactérias competentes JM-1437-*Escherichia coli*. Para isso foi colocado 1µl do plasmídeo pCX-EGFP (0,1 µg/µl) em 100µl de bactérias competentes, e após 30 minutos de incubação no gelo, foi aplicado um choque térmico de exatamente 42°C durante 45 segundos, para a incorporação dos plasmídeos nas bactérias. As bactérias foram incubadas durante 2 minutos em gelo e após este período foi acrescentado 900 µl de meio LB e transferidas para estufa a 37°C sob agitação durante 1 hora. Logo após, as bactérias já contendo o plasmídeo foram plaqueadas em placa de cultura contendo ágar e antibiótico (ampicilina) e incubadas a 37°C sob agitação *overnight*.

No dia seguinte foi selecionada, com a utilização de uma ponteira, apenas uma colônia de bactéria, e estas foram incubadas em 4 mL de meio líquido (LB) contendo ampicilina, durante 24 horas, a 37°C sob agitação. Após este período as células foram centrifugadas durante 2 minutos a 12000 rpm, e submetidas à extração dos plasmídeos GFP.

3.3.9.2 Extração do plasmídeo GFP

A extração do plasmídeo GFP, foi realizada através do KIT PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen), e sua concentração foi observada em espectrofotômetro. O plasmídeo EGFP clonado, foi diluído em tampão eluente (do KIT) e armazenado em tubos RNAses free, a -4°C.

Todas as manipulações de transfecção do plasmídeo GFP nas bactérias competentes, foram realizadas no **Laboratório de Imunologia Aplicada à Aqüicultura (LIAA) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG)**, que possui os equipamentos apropriados para a realização das técnicas propostas, e além disso, possui autorização para a manipulação de organismos geneticamente modificados.

3.3.9.3 Transfecção do plasmídeo GFP em CTMs

Os plasmídeos GFP foram tranfectados nas CTMs através da utilização de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Para isso, foi preparado um complexo contendo o plasmídeo e Lipofectamine™ 2000 em uma razão de 1:3. O complexo foi adicionado nos poços contendo as CTMs em IMDM sem antibiótico e soro. As células foram incubadas durante 5 horas à 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Após este período, o meio foi trocado, adicionando-se assim IMDM contendo 10% de SBF e antibióticos. Dois dias após a transfecção foi observada em microscópio de fluorescência a expressão da proteína fluorescente verde (GFP).

3.3.10 Análise Estatística

A significância das diferenças foi avaliada através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida de teste de múltipla comparação de Bonferroni pelo programa Graphpad Prism. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIVA, J. M., DALE, W. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *J. Cell. Mol. Méd.*, 12(3) 730-742, 2008.

ALVAREZ-SILVA, M. *et al.* Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development.**, 130(22):5437-44, 2003.

ANKER, P.S. *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, 102:1548 –1549, 2003.

BAER,P.C.*et al.*, Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. **Eur.J.CellBiol.** (2009)

BATTULA V.L. *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. **Differentiation**, 75:279–291, 2007.

BERTANI N. *et al.* Neurogenic potential of human mesenchymal stem cells revisited: analysis by immunostaining, time-lapse video and microarray. **Journal of cell Science**, 118: 3925-3936, 2005.

BIANCO P.; ROBEY, P.G; SIMMONS P.J. Mesenchymal Stem Cells:Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, 2: 313-319, 2008.

BOSSOLASCO *et al.* Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in Vitro. **Exp. Neurology**, 193:312-325, 2005.

BRAUN K.M. *et al.* Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: Visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. **Development**, 130:5241–5255, 2003.

BRAZELTON, T.R.; ROSSI, F.M.V.; KESHET,G.L.; BLAU, H.M. From marrow to brain: expression of neural phenotypes in adult mice. **Science** , 290:1775-1779, 2000.

CAMPAGNOLI, C. *et al.* Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood** ,98:2396 –2402, 2001.

CAMPARD, D *et al.* Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. **Gastroenterology**. 134(3):833-48, 2008.

CÁRCAMO-ORIVE, I. *et al.* ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. **Experimental Cells Research**, 314:1777 – 1788, 2008.

CETRULO, C. L.; CETRULO, K. J. Placental and Pregnancy Stem Cells Everyone Is, or Should Be, Interested in the Placenta. **Stem Cell Reviews**, 2: 79-80, 2006.

CHAMBERLAIN, G. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, 25:2739–2749, 2007.

CHOI S.C *et al.*, Fibroblast growth factor-2 an-4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. **Stem Cells Dev**, 17(4):725-36, 2008.

CICCOLINIA *et al.* Prospective isolation of late development multipotent precursors whose migration is promoted by EGFR. **Developmental Biology**, 284:112-125, 2005.

COLTER, D.C.; SEKIYA, I.; PROCKOP, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proc Natl Acad Sci**, 98:7841–7845, 2001.

CONGET, P.A.; MINGUELL J.J. Phenotypical and functional properties of

human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **J Cell Physiol**, 181:67–73, 1999.

COURA, G. S et al. Human periodontal ligament as a potential niche of neural crest stem cells. **Journal of Periodontal Research**, 435:31-36, 2008.

CROFT, A.P.; PRZYBORSKI, S.A. Formation of Neurons by Non-Neural Adult Stem Cells: Potential Mechanism Implicates an Artifact of Growth in Culture. **Stem Cells** , 24: 1841 – 1851, 2000

DENG, J. *et al.* Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation. **Stem Cells**, 4:1054-64, 2006.

DELRIEU I. The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): An insight into an intracrine mechanism. **FEBS Letters**. , 468: 6–10, 2000.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, 8:315–317, 2006.

DONOVAN, P.J.; GEARHART J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, 414:92-97, 2001.

DVORAK, P.; DVORAKOVA D.; HAMPL A. Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. **FEBS Letters**, 580 (12):2869-2874, 2006.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**, 109:235–242, 2000.

ETHERIDGE, S.L *et al.* Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, 22:849-860, 2004.

FELICIA, N. *et al.* PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. **Blood**, 112(2):295-307, 2008.

FILIP, S.; MOKRÝ, J.; ENGLISH, D.; VOJÁČEK, J. Stem Cell Plasticity and Issues of Stem Cell Therapy. **Folia Biologica (Praha)**, 51:180-187, 2005.

FRIEDENSTEIN A.J. *et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, 6(2):230-47, 1968.

GENG T. *et al.* Quantitative analysis of the responses of murine bone marrow mesenchymal stem cells to EGF, PDGF-BB and fibronectin by factorial design methodology. **Cytotechnology**, 58:93–101, 2008.

GOODWIN, H.S. *et al.* Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. **Biol Blood Marrow Transplant.**, 7(11):581-8, 2001.

GOULD E. *et al.* Neurogenesis in the neocortex of adult primates. **Science**, 286:548–552, 1999.

GREGORY, C.A.; YLOSTAL, J.; PROCKOP, D.J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental “niches” in culture: A two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. **Sci STKE**, 2005:pe37, 2005.

GREGORY, C.A. *et al.* Dkk-1-derived Synthetic Peptides and Lithium Chloride for the Control and Recovery of Adult Stem Cells from Bone Marrow. **J. Biol. Chem.**, 280(3): 2309-2323, 2005.

GRONTHOS S.; SIMMONS P.J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. **Blood**, 85:929–940, 1995.

GRONTHOS S. *et al.* Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone**, 28:174 –181, 2001.

GUPTA, P. Placenta: an alternative source of hematopoietic stem cells. **Indian Pediatr** , 34:655-656,1997.

HANADA K.; DENNIS J.E.; CAPLAN A.I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Bone Miner Res** , 12:1606–1614, 1997.

HEDGEPEETH, C.M. et al. Activation of the Wnt signaling pathway: a molecular mechanism for lithium action. **Development Biology**, 185:82–91, 1997.

HEGNER, B. *et al.* Differential regulation of smooth muscle markers in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal Hypertens**, 23:1191-1202, 2005.

ILANCHERAN S.; MOODLEY Y.; MANUELPILLAI U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? **Placenta**, 30:2-10, 2009.

ITO T. *et al.* FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF-beta signaling. **Cytotechnology**. 56(1): 1–7, 2008.

JAVAZON , E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. **Exp Hematol**, 32:414–425, 2004.

JIN, K. *et al.* Induction of neuronal markers in bone marrow cells: differential effects of growth factors an patterns of intracellular expression. **Exp.Neurol.**, 184:78-89, 2003.

JORI, M.A. *et al.* Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. **J. Cell. Biochem**, 94: 645–655, 2005.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. Histologia básica. Nona edição, editora Guanabara Koogan, 1999.

KHUU, D.N.; NAJIMI, M.; SOKAL E.M.; Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? **World J Gastroenterol**, **13**:1554–1560, 2007.

KRAMPERA M. *et al.* Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. **Bone**, **40**:382-90, 2007.

KRAMPERA M. *et al.* HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: Inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. **Blood**, **106**:59–66, 2005.

KUZNETSOV, S.A. *et al.* Circulating skeletal stem cells. **J Cell Biol**, **153**:1133–1140. 2001.

LEE, K.D. *et al.* In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells, **Hepatology**, **40**:1275–1284, 2004.

LU, P.; BLESCH, A.; TUSZYNSKI, M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact. **J Neurosci. Res**, **77**:174 –191, 2004.

MACKAY, A.M. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. **Tissue Eng**, **4**:415– 428, 1998.

MARTINI, M.M *et al.* Human placenta-derived mesenchymal stem cells acquire neural phenotype under appropriate niche conditions. **Submitted: Intern. Journal of Biochemistry & Cell Biology.**

MEIRELLES L.S.; CAPLAN A.I.; NARDI N.B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, **26**(9): 2287 -2299, 2008.

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

MERMELSTEIN, C.S. *et al.* Wnt/ β -catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. **Differentiation**, **75**:184-192, 2007.

MIAO, Z. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. ***Cell Biology International***, 30:681-687, 2006.

MOHAMMADI M.; OLSEN S.K.; IBRAHIMI O.A. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. ***Cytokine Growth Factor Rev***, 16: 107–137, 2005.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA R.; QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. ***J Cell Sci***,113:1161–1166, 2000.

NEUHUBER, B. *et al.* Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: Disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. ***J Neurosci Res***, 77:192–204, 2004.

NISHIKAWA S.I. *et al.* Niche Required for Inducing Quiescent Stem Cells. ***Cold Spring Harb Symp Quant Biol***. 2008.

NARITA *et al.* Effects of transforming growth factor-beta 1 and ascorbic acid on differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage. ***Cell Tissue Res***, 333:449-459, 2008.

NOORT, W.A., *et al.* Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. ***Exp Hematol***, 30:870–878, 2002.

NORMANNO N. *et al.* Gefitinib inhibits the ability of human bone marrow stromal cells to induce osteoclast differentiation: implications for the pathogenesis and treatment of bone metastasis. ***Endocr Relat Cancer***, 12:471–482, 2005.

OWEN M; FRIEDENSTEIN AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. ***Ciba Found Symp.***, 136:42-60,1988.

PAN, G.J *et al.* Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. **Cell Research**, 12(5-6):321-329, 2002.

PAROLINI, O. *et al.* Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, 26:300–311, 2008.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair.- Current Views. **Stem Cells**, 25:2896–2902, 2007

PITTENGER, M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143–147, 1999.

PIETERNELLA, S. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cell**, 22:1338-1345, 2004

POWERS C.J.; MCLESKEY S.W.; WELLSTEIN A.. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. **Endocrine-Related Cancer**, 7:165–197,2000.

RABIE, M. *et al.* Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 65(8):1640-1647, 2007.

SANCHEZ-RAMOS, JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J Neurosci Res**, 69:880–893, 2002.

SANDERS, R.C. *et al.* Stem cell research. **Paediatr Respir Rev**, 7(2):135-140, 2006.

SONG S. *et al.* Fibroblast growth factors: an epigenetic mechanism of broad spectrum resistance to anticancer drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97:8658–8663, 2000.

STAMBOLIC, V.; RUEL, L.; WOODGETT JR. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. **Curr Biol**, 6:1664–1668, 1996.

STRAKOVA *et al.* Multipotential properties of myofibroblast cells derived from human placenta. **Cell Tissue Res.**, 332:479-488, 2008.

TAKASHIMA, S. *et al.* Human amniotic epithelial cells possess hepatocyte-like characteristics and functions. **Cell Struct Funct**, 29:73– 84, 2004.

TAMAMA K. *et al.* Epidermal growth factor as a candidate for *ex vivo* expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells** , 24:686–695, 2006.

TAMAMA K. *et al.* Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into the smooth muscle lineage by blocking ERK/MAPK signaling pathway. **Stem Cells Dev.**, 17(5):897-908, 2008.

TANAKA, E.M. Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. **Curr. Opin. Genet. Dev**, 13: 497-501, 2003.

TAO H. *et al.* Cytokine-induced stable neuronal differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in a serum/feeder cell-free condition. **Develop.Growth Differ.**, 47:423-433, 2005.

TAO, G. *et al.* Quantitative analysis of the responses of murine bone marrow mesenchymal stem cells to EGF, PDGF-BB and fibronectin by factorial design methodology. **Cytotechnology**, 58:93–101, 2008.

THOMSON, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, 282:1145, 1998.

TONDREAU, T. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. **Differentiation**, 72:319-326, 2004.

VERFAILLIE CM. *et al.* Hematology—Basic Principles and Practice. Anatomy and physiology of hematopoiesis.. **Philadelphia: Churchill-Livingstone**, 3:139-154, 2000.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN I.L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, 116:639–648, 2004.

WATT F.M; HOGAN B.L. Out of Eden: Stem cells and their niches. **Science**, 287:1427–1430, 2000.

WILLIAMS, J.T.*et al.* Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **Am Surg**, 65:22–26, 1999.

WISLET-GENDEBIEN, S *et al.* Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem cells**, 23(3):392-402, 2005.

WISLET-GENDEBIEN, S *et al.* Regulation of neural markers nestin and GFAP expression by cultivated bone marrow stromal cells. **Journal of Cell Science**, 116:3295-3302, 2003.

XIAN C.J. *et al.* Roles of epidermal growth factor family in the regulation of postnatal somatic growth. **Endocrine Reviews**, 28: 284-296, 2007.

ZHANG *et al.* Efficient adeno-associated virus-mediated gene expression in human placenta-derived mesenchymal cells. **Microbiol Immunol.**, 47(1):109-16, 2003.

ZHAO, P. *et al.* Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. **Transplantation**,79:528 –535, 2005.

ZUK, P.A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 7:211–228, 2001.