

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

Lucas Lourenço Marostica

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO MESILATO DE IMATINIBE EM  
CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
HUMANAS DERIVADAS DE PLACENTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmácia. Área de concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alvarez-Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M354a Marostica, Lucas Lourenço  
Análise dos efeitos do Mesilato de Imatinibe em cultura  
de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de placenta  
[dissertação] / Lucas Lourenço Marostica ; orientador, Marcio  
Alvarez da Silva. - Florianópolis, SC, 2011.  
121 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Mesilato  
de Imatinibe. 4. Sistema Hematopoiético. I. Silva, Marcio  
Alvarez da. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

CDU 615.12



*Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram presentes neste processo de aprendizado e evolução, especialmente aos meus pais Ademar e Vera, meu irmão Leonardo e minha namorada Francine Nicoli.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Alvarez-Silva, pela disponibilidade na orientação e condução deste trabalho, posso afirmar que o aprendizado jamais será esquecido. Agradecimentos especiais também para a minha Co-orientadora, Profa. Dra. Cidônia de Lourdes Vituri, por me receber atenciosamente em Florianópolis há cerca três anos, tendo me orientado na iniciação científica, especialização em Hematologia e contribuído também com este trabalho.*

*À minha família, especialmente aos meus pais, Ademar e Vera, e meu irmão Leonardo, agradeço pelo apoio contínuo, compreensão, carinho e, principalmente, pela VIDA. A evolução humana é uma condição que deve ser constantemente almejada e aperfeiçoada na era atual, e vocês proporcionaram e continuam estimulando isto na minha vida. Agradecimentos também para as inesquecíveis avós Lendi e Antonieta, as quais sempre fizeram orações para iluminar meu caminho.*

*À minha namorada, Francine Nicoli Hardt, que sempre esteve junto e apoiando em todos os momentos, além de tornar-me uma pessoa mais feliz e estimulada a alcançar as metas desejadas com a harmonia e equilíbrio necessários.*

*A todos os meus amigos, pelos momentos de apoio, descontração e troca de idéias, todos com sua parcela de contribuição neste trabalho. O meu muito obrigado também para as colegas Pâmela e Larissa, que me capacitaram inicialmente a trabalhar com cultivo celular, oferecendo toda sua experiência e sabedoria no esclarecimento de dúvidas.*

*Agradecimentos também aos colegas técnicos e docentes do Departamento de Análises Clínicas, em especial ao setor de Citologia e à Prof. Cidônia, onde durante quatro semestres pude também exercer atividade docente como Professor Substituto na disciplina de Citologia Clínica, atividade que contribuiu e muito na minha formação como Pesquisador, Docente e, também, SER HUMANO.*

*Agradecimentos à Universidade Federal de Santa Catarina pelo ambiente e estrutura proporcionados para a realização e êxito do trabalho.*

*Às agências de fomento para a Pesquisa, especialmente para a Capes, pelo auxílio e suporte neste trabalho.*

*Agradecimentos também a outros professores que fizeram parte deste trabalho, pela disponibilidade de realização de alguns procedimentos em seus laboratórios: Profa. Maria Cláudia S. Silva e Prof. Marcos A. Segatto. Aos professores que participaram da banca examinadora da defesa desta dissertação (Celso Spada, Giordano Wosgrau Calloni e Flávia Martinello). Agradecimentos pelas idéias, sugestões e críticas, as quais contribuíram significativamente para o trabalho.*

*Sinceros elogios e agradecimentos aos colegas e demais professores do Laboratório de Regeneração tecidual e células tronco (LACERT), pela ajuda, confiança e, principalmente, pela amizade gerada.*

*E, para finalizar, meu agradecimento à Deus, pois tenho certeza que sempre esteve junto e auxiliou neste trabalho, com sua luz e sabedoria.*

*Agradeço por tudo, pelos erros e acertos proporcionados até o momento nesta vida, contribuindo extensivamente na formação de um ser humano com princípios, ética e valores morais.*

*“Nascer, viver, morrer, renascer ainda e progredir continuamente, esta é a lei”*

*Allan Kardec*





## RESUMO

Apesar do recente avanço e evolução no desenvolvimento de medicamentos cada vez mais específicos para o tratamento de neoplasias, continuam sendo observados e relatados efeitos inespecíficos destes agentes, que além de atuar nas células neoplásicas exercem efeitos em células normais. O Mesilato de Imatinibe (MI) foi racionalmente desenvolvido para inibir a atividade de proteínas e receptores do tipo tirosinoquinase, especialmente a proteína BCR-ABL anômala característica da leucemia mielóide crônica (LMC). As células-tronco mesenquimais (CTM) compõem o microambiente hematopoiético (MH), com função de suporte e regulação da hematopoese, sendo células precursoras de outras células que também constituem o MH, como os fibroblastos, adipócitos e osteoblastos. Estudos relataram efeitos citotóxicos de diferentes agentes quimioterápicos nas CTM, porém, os efeitos que o MI exerce nesta população de células ainda são desconhecidos. O objetivo do trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos do MI em CTM normais isoladas da placenta humana. Aplicamos um protocolo de cultivo celular de CTM, expondo as mesmas a diferentes concentrações do MI e avaliamos parâmetros como viabilidade celular, proliferação, morfologia, diferenciação e morte celular. Também foi avaliada a expressão de marcadores de células indiferenciadas (Oct-4 e Nanog) e da molécula de matriz extracelular fibronectina. Inicialmente, caracterizamos as células isoladas da placenta humana como CTM, de acordo com características morfológicas, fenotípicas e um painel de expressão imunofenotípica preconizados para este tipo celular. O MI exerceu efeito citotóxico nas CTM a partir da concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , com valor de IC<sub>50</sub> de 8,7  $\mu\text{M}$ . A maioria das células expostas ao medicamento demonstrou morfologia alterada em comparação com as células normais e fibroblastóides do grupo controle. O MI reduziu a taxa de proliferação das CTM de modo concentração-dependente nos diferentes tempos de exposição testados. Nos ensaios de diferenciação celular, observamos que o medicamento estimulou a diferenciação das CTM para os fenótipos osteogênico e adipogênico. Com a análise da expressão de Nanog e Oct-4, observamos que, nas menores concentrações do MI (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ), as células indiferenciadas são mais resistentes aos efeitos do MI quando comparadas a células possivelmente já diferenciadas. A expressão

imunocitoquímica de fibronectina também foi reduzida pelo MI. Na avaliação do processo de morte celular observado nos primeiros experimentos, indicamos que este mecanismo foi provavelmente por apoptose, devido à maior quantidade de núcleos picnóticos nas CTM expostas ao MI e também pela captação do corante brometo de etídio. É importante ressaltar que todos os efeitos observados, principalmente nos ensaios quantificados, foram classificados como concentração-dependente. Estes resultados confirmam o efeito do MI em CTM normais, o que pode representar danos até mesmo irreversíveis no MH de pacientes que utilizam o medicamento por período prolongado. Estes dados indicam a necessidade do desenvolvimento de medicamentos mais específicos para o tratamento das diferentes neoplasias que acometem a população.

**Palavras-chave:** Células-tronco mesenquimais. Mesilato de Imatinibe. Microambiente hematopoiético.

## ABSTRACT

Despite the recent improvements and development of more drugs specific to the cancer treatment, often is observed and reported nonspecific effects of these agents, that act in neoplastic cells but also exert effects in normal cells. Imatinib mesylate (IM) was rationally designed to inhibit the activity of protein and receptor tyrosine kinase, especially against to the oncogene BCR-ABL that is a marker of chronic myelogenous leukemia (CML). The mesenchymal stem cells (MSCs) constitute the hematopoietic microenvironment (HM) with a supportive function and regulation of hematopoiesis, are precursor cells and other cells which are also part of HM, such as fibroblasts, adipocytes and osteoblasts. Studies have reported cytotoxic effects of different chemotherapeutic agents on MSC. However the effects that IM exerts this population of cells are still unknown. The aim of our study was to evaluate the *in vitro* effects of IM on MSC isolated from normal human placenta. We applied a protocol for cell culture of MSC by exposure to different concentrations of IM and evaluate parameters such as cell viability, proliferation, morphology, differentiation and cell death. We also analyzed the expression of undifferentiated cell markers (Oct-4 and Nanog) and the extracellular matrix molecule fibronectin. Initially, we characterize the cells isolated from human placenta as CTM in accordance with morphologic aspects, phenotypic expression and immunophenotypic panel standardized for this cell type. The MI had cytotoxic effect in MSC from the concentration of 1.0  $\mu\text{M}$ , with IC50 of 8.7  $\mu\text{M}$ . Most cells exposed to the medicament showed abnormal morphology compared with normal cells and fibroblastoid in the control group. IM reduced the rate of proliferation of MSCs in a concentration-dependent manner at different times of exposure tested. In assays of cell differentiation, we observed that the drug stimulated the differentiation of MSCs to osteogenic and adipogenic phenotypes. Through the analysis of expression of Oct-4 and Nanog, we found that lower concentrations of MI (2,5 and 5  $\mu\text{M}$ ) the stem cells pool seemed to be more resistant to the effects of MI when compared with cells possibly already differentiated. The immunocytochemical expression of fibronectin was also reduced by IM. In experiments evaluating cell death we observed possible mechanism of apoptosis, due to the greater

amount of pyknotic nuclei in MSC exposed to IM and the uptake of the ethidium bromide. Importantly, the observed effects, were always in a concentration-dependent manner. These results confirmed the effect of IM on MSC normal, which may represent irreversible damage even in HM of patients using the medicament for extended period of time. These data support the idea that the development of more specific drugs to treat many different cancers that affect the population is needed.

**KEYWORDS:** Mesenchymal stem cells. Imatinib mesylate. Hematopoietic microenvironment.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ilustração da translocação t(9;22) (q34;q11).....	26
<b>Figura 2.</b> Modelo da atuação a nível celular da proteína BCR-ABL na Leucemia Mielóide Crônica .....	27
<b>Figura 3.</b> Fórmula estrutural do Mesilato de Imatinibe como um derivado 2-fenilaminopirimidina .....	29
<b>Figura 4.</b> Ilustração do mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe	30
<b>Figura 5.</b> Características das células-tronco.....	38
<b>Figura 6.</b> Plasticidade de células-tronco mesenquimais adultas.....	43
<b>Figura 7.</b> Diagrama ilustrando os possíveis mecanismos da plasticidade nas células- tronco adultas.....	44
<b>Figura 8.</b> Componentes celulares do microambiente hematopoiético.	46
<b>Figura 9.</b> Ilustração da relação entre células-tronco mesenquimais, progenitores multipotentes e o estroma medular .....	48
<b>Figura 10.</b> Composição e atuação da matriz extracelular no controle funcional das células tronco na medula óssea.....	50
<b>Figura 11.</b> Estrutura anatômica da placenta humana .....	53
<b>Figura 12.</b> Caracterização morfológica e fenotípica de células-tronco mesenquimais humanas.....	70
<b>Figura 13.</b> Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais obtidas de placenta humana na quinta passagem.....	71
<b>Figura 14.</b> Influência do Mesilato de Imatinibe na viabilidade de células-tronco mesenquimais humanas após 4 dias de cultura celular .	72
<b>Figura 15.</b> Morfologia de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias.....	74

<b>Figura 16.</b> Morfologia de células-tronco mesenquimais humanas do grupo controle comparadas com células do grupo da IC50.....	75
<b>Figura 17.</b> Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU em células- tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe.....	77
<b>Figura 18.</b> Expressão imunocitoquímica de BrdU e DAPI em cultura de células tronco- mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 2 dias .....	78
<b>Figura 19.</b> Gráfico comparativo da proliferação celular por incorporação do BrdU em células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe .....	79
<b>Figura 20.</b> Quantificação de núcleos de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe e corados com DAPI.....	80
<b>Figura 21.</b> Diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteoblastos .....	81
<b>Figura 22.</b> Diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em adipócitos.....	82
<b>Figura 23.</b> Expressão imunocitoquímica de Nanog em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias .....	84
<b>Figura 24.</b> Expressão imunocitoquímica de OCT4 em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias .....	85
<b>Figura 25.</b> Expressão imunocitoquímica de fibronectina em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias .....	86
<b>Figura 26.</b> Quantificação de núcleos picnóticos em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe .....	88

**Figura 27.** Análise de morte celular com a aplicação do laranja de acridina e brometo de etídio em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias ..... 90

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1.</b> Taxa de sobrevivência de pacientes com LMC tratados com IM .....	33
<b>Tabela 2.</b> Respostas obtidas em 5 anos de terapia com o Mesilato de Imatinibe.....	34
<b>Tabela 3.</b> Eventos de toxicidade não hematológica em pacientes tratados com o IM nas três fases da Leucemia Mielóide Crônica.....	37
<b>Tabela 4.</b> Anticorpos primários aplicados na imunocitoquímica .....	66
<b>Tabela 5.</b> Anticorpos secundários aplicados na imunocitoquímica.....	67



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABL</b>	proto-oncogene Abelson do cromossomo 9
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>BCL-2</b>	do inglês “ <i>B-cell lymphoma</i> ”
<b>BCR</b> cromossomo 22	do inglês “ <i>Breackpoint cluster region</i> ” do
<b>BCR-ABL</b> <i>Cluster Region</i> (BCR)	Gene fusinado Abelson (ABL) – <i>Breackpoint Cluster Region</i> (BCR)
<b>BMP</b>	do inglês “ <i>bone morphogenetic protein</i> ”
<b>BrdU</b>	5-bromo-2-deoxiuridinina
<b>°C</b>	Graus centígrados
<b>C+</b>	Grupo controle positivo
<b>c-ABL</b>	Proteína com função tirosinoquinase
<b>CD</b>	do inglês “ <i>Cluster of differentiation</i> ”
<b>CEPSH</b> Humanos	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres
<b>CFU-F</b>	do inglês “ <i>Colony forming unit fibroblastic</i> ”
<b>CFU-GM</b>	do inglês “ <i>Colony forming unit – granulocyte-monocyte</i> ”

<b>c-Kit</b>	Receptor do fator de crescimento de células tronco (CD117)
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetros quadrados
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CP</b>	Células progenitoras
<b>CT</b>	Células-tronco
<b>CTE</b>	Células-tronco embrionárias
<b>CTH</b>	Células-tronco hematopoiéticas
<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>CTT</b>	Célula-tronco tumoral
<b>DAPI</b>	4'-6-diamino-2-fenilindol
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>FITC</b>	do inglês " <i>fluorescein isothiocyanate</i> "
<b>GIST</b>	do inglês " <i>gastrointestinal stromal tumors</i> "
<b>g/L</b>	Gramas/Litro
<b>HLA-DR</b>	do inglês " <i>Human leucocyte antigen</i> "

<b>HU-UFSC</b>	Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina
<b>IC50</b>	Concentração inibitória de 50%
<b>IC90</b>	Concentração inibitória de 90%
<b>ICAM-1</b>	do inglês “ <i>intercellular adhesion molecule</i> ”
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferon-alfa
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILD</b>	Infusão de leucócitos do doador
<b>IMDM</b> <i>Medium</i> ”	do inglês “ <i>Iscove’s Modified Dulbecco’s</i>
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>ISCT</b> <i>Therapy</i> ”	do inglês, “ <i>International Society for Cellular</i>
<b>LA/BE</b>	Laranja de acridina/Brometo de Etídio
<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crônica
<b>M</b>	Molar
<b>MEC</b>	Matriz extracelular

<b>mg/dia</b>	dosagem – miligramas/dia
<b>mg/mL</b>	Miligramas/Mililitro
<b>MH</b>	Microambiente hematopoiético
<b>MI</b>	Mesilato de Imatinibe
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>MTT</b> difeniltetrazólio	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-
<b>nm</b>	Nanometros
<b>ng/mL</b>	Nanogramas/Mililitro
<b>OCN</b>	do inglês “ <i>osteocalcin</i> ”
<b>OCT-4</b>	do inglês “ <i>Octamer-4</i> ”
<b>OPG</b>	do inglês “ <i>osteoprotegerin</i> ”
<b>PBS</b>	do inglês “ <i>Phosphate buffered saline</i> ”
<b>PDGF</b>	do inglês “ <i>platelet-derived growth factor</i> ”
<b>PDGF-R</b> plaquetas	Receptor do fator de crescimento derivado de
<b>PE</b>	do inglês “ <i>phycoeritrin</i> ”

<b>PerCP</b>	do inglês “ <i>peridinin chlorophyll</i> ”
<b>Ph</b>	Cromossomo <i>Philadelphia</i>
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SCF</b> <i>factor</i> ”	Fator de células tronco, do inglês “ <i>stem cell</i>
<b>STI571</b>	sigla para Mesilato de Imatinibe
<b>Stro-1</b> estromais	Proteína de superfície expressa em células
<b>t(9;22) (q34;q11)</b>	Translocação entre os cromossomos 9 e 22
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TGF-β</b>	do inglês “ <i>transforming growth factor – β</i> ”
<b>TMO</b>	Transplante de medula óssea
<b>μL</b>	Microlitros
<b>μg</b>	Microgramas
<b>μg/mL</b>	Microgramas/Mililitro
<b>μm</b>	Micrometros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>v/v</b>	Proporção volume-volume



# SUMÁRIO

Página

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>26</b>
1.1 Leucemia Mielóide Crônica e a ação do Mesilato de Imatinibe ....	26
1.1.1 Tratamentos para leucemia mielóide crônica .....	31
1.1.2 Resistência ao Mesilato de Imatinibe.....	34
1.1.3 Efeitos indesejados do Mesilato de Imatinibe .....	36
1.2 Células-tronco .....	38
1.2.1 Célula-tronco mesenquimal .....	39
1.2.2 Características <i>in vitro</i> das células-tronco mesenquimais .....	41
1.2.3 Célula-tronco mesenquimal e hematopoese.....	45
1.2.4 Matriz Extracelular.....	49
1.2.5 Danos celulares após quimioterapia.....	50
1.2.6 Placenta humana como fonte de células-tronco.....	52
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>55</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
3.1 Objetivo Geral .....	57
3.2 Objetivos Específicos.....	57
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>

4.1 Obtenção da placenta humana.....	58
4.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais humana .....	58
4.3 Preparo do meio de cultura .....	60
4.4 Obtenção e preparo do Mesilato de Imatinibe .....	60
4.5 Viabilidade celular .....	61
4.6 Análise da morfologia celular .....	62
4.7 Caracterização celular por imunofenotipagem .....	62
4.8 Proliferação celular .....	63
4.9 Diferenciação celular .....	64
4.9.1 Diferenciação osteogênica .....	64
4.9.2 Diferenciação adipogênica .....	65
4.10 Análise imunocitoquímica .....	65
4.11 Laranja de Acridina/Brometo de Etídio .....	67
4.12 Análise estatística .....	68
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>69</b>
5.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais.....	69
5.2 Influência do Mesilato de Imatinibe na viabilidade celular .....	71
5.3 Morfologia das células expostas ao Mesilato de Imatinibe .....	73
5.4 Interferência do Mesilato de Imatinibe na proliferação celular.....	75
5.5 Quantificação de núcleos corados pelo DAPI .....	79
5.6 Diferenciação celular para osteoblastos .....	80

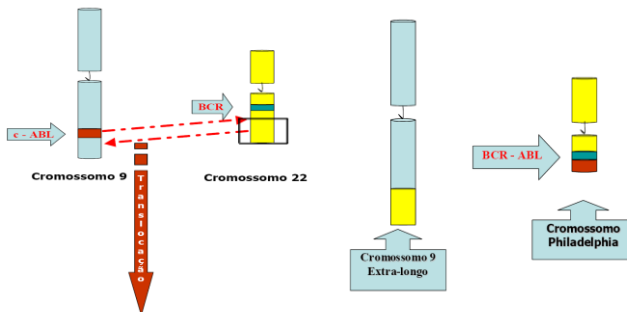


5.7 Diferenciação celular para adipócitos .....	82
5.8 Expressão imunocitoquímica de marcadores de pluripotência.....	83
5.9 Expressão imunocitoquímica de fibronectina .....	86
5.10 Contagem de núcleos picnóticos .....	87
5.11 Laranja de Acridina/Brometo de Etídio .....	89
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>107</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>119</b>
Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido das gestantes participantes do estudo .....	119

# 1 INTRODUÇÃO

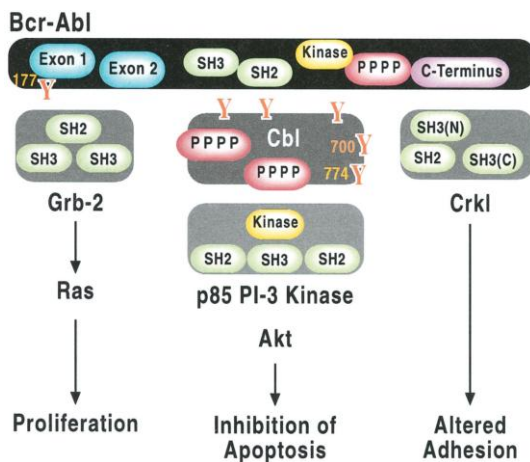
## 1.1 Leucemia mielóide crônica e a ação do Mesilato de Imatinibe

A LMC é uma doença mieloproliferativa crônica, trifásica, caracterizada pela expansão clonal de células hematopoiéticas neoplásicas. O diagnóstico é caracterizado por leucocitose acentuada com desvio à esquerda (precursores hematopoiéticos imaturos em sangue periférico), esplenomegalia e na maioria dos casos confirmado pela detecção de uma anormalidade citogenética característica, o cromossomo *Philadelphia* (*Ph*) (TEFFERI et al., 2005). O cromossomo *Ph* resulta da translocação entre os cromossomos 9 e 22, onde parte do protoncogene Abelson (ABL) do cromossomo 9 é transferida para o gene BCR (*Breackpoint cluster region*) no cromossomo 22 e parte do cromossomo 22 é translocada para o cromossomo 9 (DEININGER et al., 2000). Portanto, o cromossomo 22 alterado é o cromossomo *Ph*, conforme demonstrado na figura 2. O cromossomo *Ph* pode ser detectado em mais de 95% dos pacientes com LMC quando testes de biologia molecular são aplicados na confirmação diagnóstica (MAURO et al., 2002).



**Figura 1. Ilustração da translocação t(9;22) (q34;q11)** Fonte: Adaptado de: DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000.

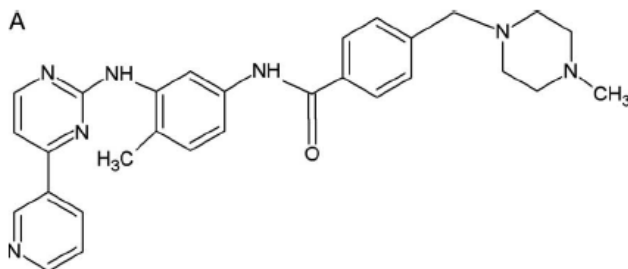
Em condições fisiológicas, o gene BCR codifica uma proteína com função regulatória em processos de sinalização e divisão celular, enquanto que o gene ABL codifica uma proteína com atividade tirosinoquinase e que exerce controle do ciclo celular e da resposta a estresse genotóxico. O gene quimérico BCR-ABL, resultante da translocação t(9;22) (q34;q11), promove a codificação de uma proteína com atividade tirosinoquinase exacerbada nas células leucêmicas da LMC (BERGANTINI et al., 2005). Deste modo, a célula leucêmica BCR-ABL positiva promove uma mieloproliferação contínua, resultante provavelmente devido a: manutenção de sinal mitogênico constante, alteração da adesão das células progenitoras hematopoiéticas com as células estromais e matriz extracelular (MEC) da medula óssea (MO), e também maior resistência a apoptose celular (MAURO et al., 2002) (figura 3).



**Figura 2. Modelo da atuação a nível celular da proteína BCR-ABL na Leucemia Mielóide Crônica.** Efeitos patológicos nas células-tronco e progenitores hematopoiéticos de pacientes com leucemia mielóide crônica incluem estímulo da proliferação, alteração da adesão no microambiente hematopoiético e inibição de apoptose, proporcionando aumento de células da linhagem mielóide na medula óssea e no sangue periférico. Abreviaturas e traduções: SH (domínio homólogo src), Y (resíduo de tirosina) e PPPP (região rica em prolina), Ras, Akt, PI-3 Kinase, Grb-2, Crkl (vias de sinalização celular), proliferation

(proliferação), inhibition of apoptosis (inibição da apoptose), altered adhesion (adesão alterada). Fonte: Adaptado de: MAURO et al., 2002.

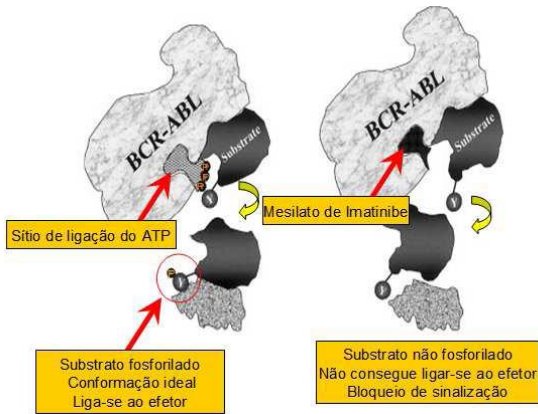
Recentemente, algumas estratégias têm sido aplicadas na busca de tratamentos que tenham ação mais específica sobre as células leucêmicas, tendo como alvo, por exemplo, a proteína oncogênica BCR-ABL e principalmente a sua alta atividade tirosinoquinase na leucemia mielóide crônica (LMC). Proteínas com atividade tirosinoquinase participam da regulação de vias de transdução de sinal que refletem efeitos em funções celulares importantes na oncogênese, tais como proliferação, diferenciação e apoptose (BENNASROUNE et al., 2004). Estas proteínas, na maioria dos processos tumorais, são funcionalmente desreguladas e/ou superexpressas (SAVAGE; ANTMAN, 2002). Com relação à LMC, a elucidação molecular da mesma proporcionou o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, tais como os inibidores da proteína tirosinoquinase BCR-ABL. O Mesilato de Imatinibe (MI) é um medicamento antineoplásico administrado por via oral e que permite a inibição de proteínas tirosinoquinase que influenciam e regulam o processo fisiopatológico na LMC (GUILHOT, 2004). Na LMC, a proteína oncogênica BCR-ABL foi identificada como a principal responsável pela patogênese da doença, e a partir disto foram racionalmente desenvolvidos medicamentos que a têm como alvo terapêutico, sendo que estes agentes recentemente foram aprovados para terapia em humanos. Um destes agentes administrados e com evidência de bons resultados no tratamento da LMC é o Glivec® (conhecido também pela sigla STI571 ou também Mesilato de Imatinibe, Novartis Pharma AG, Switzerland) (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007) (figura 1). O MI é um medicamento cuja estrutura química é derivada da 2-fenilaminopirimidina e exerce atividade inibitória contra proteínas tirosinoquinases, incluindo o oncogene BCR-ABL na LMC, além do receptor de c-Kit (receptor do fator de crescimento de células-tronco), c-ABL e PDGF-R (receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas), dentre outros. Seu mecanismo de ação é caracterizado pelo antagonismo competitivo em sítios de ligação do ATP nos domínios das quinases destes alvos, e esta resposta inibitória ocasiona antagonismo proliferativo via BCR-ABL que é superexpresso nas células leucêmicas (KANTARJIAN et al., 2002).



**Figura 3. Fórmula estrutural do Mesilato de Imatinibe como um derivado 2-fenilaminopirimidina.** Fonte: Adaptado de: SANTOS; RAVANDI, 2009.

O MI atua nas células leucêmicas bloqueando diferentes vias de sinalização celular. Parece modular diferentes proteínas anti e pró-apoptóticas pertencentes tanto à via extrínseca como intrínseca da apoptose. Apesar de já descrito, o exato mecanismo de ação do MI ainda não é uma unanimidade entre os pesquisadores. O que está definido é que corresponde a um medicamento seletivo para inibir o clone *Philadelphia* na LMC. Embora expresso também em outros tipos de leucemias, o cromossomo *Ph* é reconhecido como marcador citogenético da LMC e a sua detecção tem implicações no diagnóstico, prognóstico e na terapêutica da doença (BERGANTINI et al., 2005).

Como sua estrutura química é similar ao substrato de ATP, o MI liga-se de forma competitiva ao sítio ativo da proteína BCR-ABL dependente de ATP e inibe a fosforilação da proteína, inibindo a proliferação e induzindo para apoptose as linhagens BCR-ABL positivas (figura 4). Cabe ressaltar que o MI é um potente inibidor de BCR-ABL, mas também pode exercer efeitos em receptores de PDGF e c-Kit, dentre outras proteínas e receptores tirosinoquinases em células neoplásicas (HOLTZ et al., 2002).



**Figura 4. Ilustração do mecanismo de ação do Mesilato de Imatinibe.** No painel da esquerda, o ATP está ligado ao domínio tirosinoquinase da proteína BCR-ABL, resultando na fosforilação do substrato e capacitando a interação da oncoproteína BCR-ABL ativada com uma proteína efetora da sinalização celular. À direita, o medicamento compete pelo sítio de ligação do ATP no domínio tirosinoquinase, impedindo a ligação do ATP e bloqueando a fosforilação do substrato, inativando a proteína BCR-ABL e inibindo a sua interação com uma proteína efetora. Fonte: Adaptado de: DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000.

Após estudos farmacológicos de fase I e II, o MI foi aprovado para terapia em pacientes com diagnóstico de LMC em fase blástica, fase de transformação ou em fase crônica resistente ou intolerante ao interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) (DOBBIN; GADELHA., 2002). É importante salientar que o MI foi o primeiro medicamento aprovado para uso clínico e que inibe a sinalização de proteínas relacionadas diretamente com a patogênese de um processo neoplásico. Anteriormente ao surgimento do MI, medicamentos eram direcionados a múltiplos alvos moleculares e celulares, entretanto, os mesmos exerciam efeitos em proteínas associadas e de forma inespecífica, não atuando diretamente nos alvos causadores da LMC (GUILHOT, 2004).

### 1.1.1 Tratamentos para leucemia mielóide crônica

No histórico de tratamento da LMC, encontramos dados relatando que o arsênico foi a primeira terapia aplicada no tratamento da LMC, por volta de 1865. Posteriormente, em 1912, passou a ser utilizado o benzeno associado com radioterapia. Quatro décadas depois, foi introduzido no tratamento da LMC um agente alquilante, o bussulfan, iniciando uma nova era da quimioterapia. A associação do bussulfan com a 6-tioguanina proporcionou melhora da sobrevida nos pacientes, o que tornou este tratamento padrão durante aproximadamente 35 anos, quando ocorreu a introdução do interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ) na terapêutica (RANDOLPH, 2005). O IFN-  $\alpha$ , que é um estimulante não específico do sistema imune e que regula a função dos linfócitos T, promoveu aumento do tempo de sobrevida além de induzir ao desaparecimento do cromossomo *Ph*, demonstrando também capacidade em evitar e evolução da doença para a fase de crise blástica (FAUSEL, 2007). A partir de 1986, o transplante de medula óssea (TMO) tornou-se a forma de tratamento padrão para a LMC (RANDOLPH, 2005).

Alguns outros medicamentos já foram e ainda são utilizados no tratamento da LMC. Podemos citar como exemplos a hidroxiuréia, um agente inibidor da fase de síntese (S) do ciclo celular e o bussulfan, que até proporcionam controle da doença por tempo variável, no entanto, a doença torna-se refratária ao tratamento justamente porque estes agentes não eliminam na totalidade as células leucêmicas que expressam o cromossomo *Ph*. No ano de 1998, ocorreu uma verdadeira revolução na terapêutica da LMC com a introdução do MI, o qual demonstrou ser uma alternativa eficaz para os pacientes intolerantes e/ou que não respondiam às terapias anteriormente citadas (FADERL et al., 1999).

A introdução do MI na terapêutica da LMC representou o início de uma nova etapa e possibilidade de tratamento, justamente por ser um inibidor da oncoproteína BCR-ABL e assim manter a mesma na conformação inativa (MARIN et al., 2002), conforme ilustrado na figura anterior. Com esta evolução no tratamento da LMC, incluindo o MI, TMO e a infusão de leucócitos do doador (ILD), a perspectiva de vida dos pacientes com diagnóstico de LMC melhorou significativamente.

Atualmente, pacientes com diagnóstico de LMC podem ser tratados com hidroxiuréia, IFN- $\alpha$ , citarabina associada ao IFN- $\alpha$ , MI, TMO quando possível e ILD quando da recaída da doença após TMO. Somente em uma pequena proporção de pacientes com LMC o TMO é indicado, e poucos pacientes têm uma resposta citogenética completa apenas com a aplicação do IFN- $\alpha$  (BERGANTINI et al., 2005). No Brasil, o tratamento da LMC é aplicado de acordo com protocolo preconizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) e pela Portaria 347, de 23 de junho de 2008 do Ministério da Saúde, os quais determinam o MI como tratamento de primeira linha para a LMC.

Conforme estudo publicado por Martin e colaboradores (2002), o MI é administrado por via oral na forma de comprimidos cuja dosagem oscila de 400 mg/dia até 800 mg/dia e que depende, por exemplo: da resposta do paciente ao tratamento, da tolerância ao medicamento e do estágio em que se encontra a doença. Diante destes fatos, o MI é um medicamento recente e que melhor resposta proporcionou aos pacientes com LMC até o momento, pois conjuga duas características importantes na área da oncologia: baixa toxicidade e alto nível de resposta terapêutica (MAURO et al., 2002). O MI também demonstrou capacidade de promover remissão completa tanto no sangue periférico como na MO, com níveis molecularmente indetectáveis do cromossomo *Ph*, podendo também ser uma alternativa para as limitações do TMO (CHU et al., 2005).

Em um estudo clínico de fase II, a eficácia do MI em melhorar a taxa de sobrevida dos pacientes foi avaliada em todas as fases da LMC. Com o diagnóstico confirmado de LMC em crise blástica (n=229), a taxa de resposta citogenética foi de 6 e 18% em pacientes tratados com 400 ou 600 mg/dia, respectivamente. Na fase acelerada (n=235), os pacientes tratados com 400 e 600 mg/dia do MI apresentaram resposta hematológica de 65 e 71%, respectivamente. E na fase crônica tardia, após falha ou intolerância ao IFN- $\alpha$ , a taxa de resposta hematológica completa foi de 95%, com resposta citogenética completa em 5 anos de 57% (KANTARJIAN et al., 2007). A taxa de sobrevida dos pacientes avaliados neste estudo também está descrita na tabela 1.



**Tabela 1. Taxa de sobrevida de pacientes com LMC tratados com MI**

<b>FASE DA DOENÇA</b>	<b>DOSE DIÁRIA (mg)</b>	<b>TAXA DE SOBREVIDA (anos)</b>
Crônica, recém diagnosticada	400	89% (5)
Crônica, anteriormente tratada	400	86% (4) e 79% (5)
Fase acelerada	400-600	44% (3) e 66% (3)
Fase blástica	400-600	17% (2), 14-17% (2 – 3)

Fonte: Adaptado de Kantarjian et al., 2007.

A eficácia da terapia com o MI também foi avaliada em um estudo clínico de fase III-IRIS, com o medicamento sendo administrado na dose de 400 mg/dia e comparado com a combinação de IFN- $\alpha$  e citarabina em pacientes recentemente diagnosticados com LMC em fase crônica (n=1106). Após um acompanhamento de aproximadamente 19 meses, a terapia com MI foi significativamente mais eficaz de que o tratamento com o IFN- $\alpha$  associado com citarabina (JABBOUR et al., 2007), sendo estes resultados descritos na tabela 2.

**Tabela 2. Respostas obtidas em 5 anos de terapia com o Mesilato de Imatinibe**

<b>PARÂMETROS</b>	<b>% DE PACIENTES</b>
<b>Resposta hematológica completa</b> (leucometria < 10.000/mm <sup>3</sup> , ausência de blastos no sangue periférico, contagem normal de plaquetas, ausência de esplenomegalia)	97
<b>Resposta citogenética maior</b> (< 35% de células cromossomo <i>Ph</i> <sup>+</sup> em metáfase na medula óssea)	89
<b>Resposta citogenética completa</b> (0% de células cromossomo <i>Ph</i> <sup>+</sup> em metáfase na medula óssea)	82
<b>Sobrevida total</b>	89
<b>Sobrevida excluindo mortes não LMC</b>	95
<b>Sobrevida sem fase acelerada ou blástica</b>	93
<b>Sobrevida livre de eventos</b>	83

Fonte: Adaptado de Jabbour et al., 2007.

### 1.1.2 Resistência ao Mesilato de Imatinibe

Apesar dos avanços obtidos com a administração do MI no tratamento dos portadores de LMC, há relatos de resistência, principalmente após o tratamento prolongado. A resistência provavelmente acontece devido à múltiplas causas, permitindo que as

células BCR-ABL positivas permaneçam atuando tanto na MO como no sangue periférico dos pacientes (HOCHHAUS; ROSÉE, 2004). Alguns pacientes não respondem ao tratamento de uma forma precoce (resistência primária), enquanto que outros apresentam uma resistência adquirida (resistência secundária), provavelmente resultante de mutações no domínio quinase da oncoproteína BCR-ABL, dificultando a ligação do MI e a ação esperada (GOLEMOVIC et al., 2005).

É importante ressaltar que o MI é efetivo na grande maioria dos pacientes com LMC, no entanto, uma minoria dos pacientes desenvolve resistência ainda na fase crônica da doença e uma proporção maior de pacientes torna-se resistente nas fases mais avançadas da LMC (JABBOUR; CORTES; KANTARJIAN, 2008). Portanto, a resistência ao medicamento é rara em pacientes com LMC na fase inicial, enquanto que o índice de resistência após dois anos de terapia oscila entre 10 a 20% na LMC de fase crônica após falha de resposta ao IFN- $\alpha$ , índice de 40 a 50% de resistência na fase acelerada e aproximadamente 70 a 80% de pacientes resistentes na fase de crise blástica ou leucemia linfóide aguda com cromossomo *Ph* positivo (BRAVE et al., 2008).

O aparecimento de resistência ao MI é influenciado por fatores como: superexpressão de BCR-ABL e anomalias genéticas adicionais e/ou diferentes mutações que podem acometer o domínio quinase da oncoproteína BCR-ABL (BRANDFORD et al., 2003). Recentemente, também foi sugerida a hipótese da presença e envolvimento de células-tronco tumorais (CTT) na resistência aos medicamentos antineoplásicos, inclusive para a LMC. Neste modelo, os medicamentos atuariam somente nas células progenitoras e já diferenciadas da neoplasia, enquanto que as CTT seriam resistentes aos efeitos dos medicamentos, a que pode explicar a recorrência da neoplasia mesmo após o tratamento (HUNTLY; GILLILAND, 2005). Alguns fatores relacionados à resistência devem ser considerados, tais como eficácia e possibilidade de toxicidade a longo prazo. Devido a estas considerações e à resistência que já é observada com a administração do MI, novas opções terapêuticas precisam ser desenvolvidas na busca de novos alvos terapêuticos e com menor possibilidade de resistência (SOUZA, 2008).

### 1.1.3 Efeitos indesejados do Mesilato de Imatinibe

Os pacientes tratados com o MI apresentam uma tolerância satisfatória ao medicamento. No entanto, alguns pacientes que utilizam o MI relatam efeitos adversos. Na maioria dos casos, estes efeitos são amenos e não prejudicam a continuidade do tratamento da LMC. Dentre os eventos adversos não hematológicos, os mais frequentes são a retenção de líquidos, ganho de peso, dor muscular, náuseas, diarreia, erupções cutâneas e câimbras (JABBOUR et al., 2007) (tabela 3). O relato de reações adversas parece ser proporcional à dose do MI administrada nos pacientes e também conforme o estágio em que se encontra a doença. Na próxima tabela estão descritos os principais efeitos adversos não hematológicos observados durante o tratamento com o medicamento.

Conforme um estudo clínico de fase III-IRIS, a toxicidade hematológica é o principal efeito adverso detectado em pacientes tratados com o MI. Neste estudo, 16,7% dos pacientes apresentaram algum grau de mielossupressão (neutropenia, trombocitopenia e/ou anemia), 5,3% evidenciaram alterações hepáticas e 4,5% relataram edema periférico. Em alguns pacientes foi relatada hiperfosfatúria associada com baixo nível sérico de fosfato, com consequências no metabolismo ósseo destes pacientes. Quanto ao potencial teratogênico, ainda não se têm muitas informações quanto da possibilidade do MI causar este efeito (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007). Quando a mielossupressão é grave e prolongada, pode ser necessário reduzir a dose ou até mesmo interromper o tratamento até que a hematopoese fisiológica seja reestabelecida (GUILHOT, 2004).

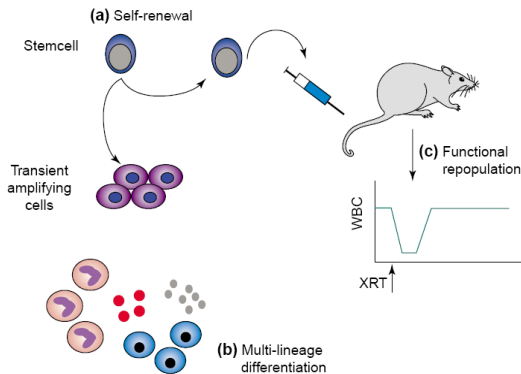
**Tabela 3. Eventos de toxicidade não hematológica em pacientes tratados com o MI nas três fases da Leucemia Mielóide Crônica**

<b>TOXICIDADE</b>	<b>FASE CRÔNICA (%)</b>	<b>FASE ACELERADA (%)</b>	<b>CRISE BLÁSTICA (%)</b>	<b>TOTAL (%)</b>
<b>Edema Periorbitário</b>	10	28	8	46
<b>Edema membros inferiores</b>	9	15	8	32
<b>Ganho de peso</b>	9	7	0	16
<b>Mialgia</b>	6	8	1	15
<b>Náusea</b>	3	8	3	14
<b>Rash cutâneo</b>	2	8	0	10
<b>Diarréia</b>	2	3	4	9
<b>Cãimbras</b>	6	3	0	9
<b>Cefaléia</b>	3	3	0	6
<b>Alterações hepáticas</b>	2	2	1	5
<b>Turvação visual</b>	1	3	0	4
<b>Artralgia</b>	3	0	0	3
<b>Trombose venosa</b>	0	1	0	1
<b>Úlceras orais</b>	0	1	0	1

Fonte: Adaptado de Funke et al., 2005.

## 1.2 Células-tronco

Apesar da evolução nas pesquisas com células-tronco (CT), o exato conceito das mesmas ainda não apresenta um consenso. De acordo com Verfaillie (2002), são três as principais características das CT: (a) capacidade de auto renovação ilimitada, possibilitando a geração de no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula-mãe; (b) potencial para diferenciar em outras linhagens celulares; (c) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado (figura 5). Estas características já foram descritas, por exemplo, para as células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco embrionárias (CTE) e também com as células-tronco mesenquimais (CTM). É importante ressaltar que a auto-renovação das CT pode ocorrer através de duas vias: (a) divisão simétrica, quando há apenas geração de novas CT mantendo um *pool* constante de CT; (b) divisão assimétrica, no qual podem ser geradas tanto novas CT como também células progenitoras (CP) já comprometidas fenotipicamente (MORRISON; KIMBLE, 2006). A figura a seguir ilustra estes critérios para a classificação das CT.



**Figura 5. Características das células-tronco.** As células-tronco são conceituadas como células com: (a) capacidade de divisão celular assimétrica; (b) capacidade de diferenciação em outras linhagens celulares; (c) possibilidade de reparar um tecido funcionalmente *in vivo*.

Traduções: stemcell (célula-tronco), self-renewal (auto-renovação), transient amplifying cells (amplificação transitória de células), multi-lineage differentiation (diferenciação celular em múltiplas linhagens), functional repopulation (reparação funcional). Fonte: Adaptado de: VERFAILLIE, 2002.

Outros autores preferem não utilizar todos estes três critérios para classificar uma célula como CT. Relatam que as CT são células que demonstram capacidade de auto- renovação por divisão simétrica ou assimétrica e que, simultaneamente, são capazes de diferenciar para outras linhagens celulares já especializadas, não sendo tão rigorosos quanto ao potencial destas células para reconstituir, *in vivo*, tecidos anteriormente lesados (CAI; WEISS; RAO, 2004).

As CP são populações de células que não compartilham as mesmas características já descritas para as CT. As CP são células comprometidas com uma dada linhagem celular, portanto, a sua capacidade de auto-renovação é limitada ou ausente, podendo gerar apenas células de uma linhagem celular específica (LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005).

Quanto ao potencial de diferenciação, as CT também podem ser classificadas. São totipotentes apenas as células que podem gerar todos os tecidos embrionários e extra-embrionários, ou seja, podem gerar um novo indivíduo. As células com característica pluripotente, CTE, por exemplo, possuem capacidade de gerar células dos três folhetos embrionários (mesoderma, ectoderma e endoderma), exceto os anexos embrionários. As células multipotentes originam tipos celulares de uma linhagem específica, como por exemplo, as CTM e CTH (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

### 1.2.1 Célula-tronco mesenquimal

O primeiro relato da presença de células precursoras não hematopoiéticas na MO foi descrito pelo patologista alemão Julius Cohnheim, em 1867 (revisado por PROCKOP, 1997). No entanto, a

confirmação da existência destas células ocorreu somente na década de 1960 (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966). Próximo ao ano de 1970, estas células passaram a ser descritas como células fibroblastóides, e que além da MO poderiam também ser isoladas do baço (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Os autores relataram que estas células se comportavam de forma diferente quando comparadas com as CTH da MO, porque demonstravam aderência e morfologia fibroblastóide em cultura, evidenciando para sua origem no compartimento estromal da MO. Além disso, foi descrito que estas células, quando suspensas, formavam colônias constituídas inicialmente por uma única célula e denominada de unidade formadora de colônias fibroblásticas (CFU-F - do inglês, *Colony Forming Unit Fibroblast*). Após serem testadas e aplicadas em transplantes *in vivo*, estas células demonstraram capacidade em gerar tecidos como osso, cartilagem, tecido adiposo e fibroso, experimentalmente gerados a partir de uma única célula da MO (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

A partir destes fatos ficou demonstrado que havia um segundo tipo de CT presente na MO, a qual foi denominada inicialmente de CT estromal da MO (OWEN; FRIEDENSTEIN, 1988). Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*) indicou uma nova nomenclatura para esta população de células fibroblastóides, aderentes ao plástico e isoladas de diferentes tecidos, com capacidade de diferenciação multipotencial: células mesenquimais estromais multipotentes. Esta sociedade ainda propõe que as CT compõem uma subpopulação destas células aderentes, e a sigla CTM (MSC – do inglês, *Mesenchymal Stem Cell*) pode ser utilizada para designar estas células (HORWITZ et al., 2005). Atualmente, portanto, o conceito das CTM agrega a maioria destas nomenclaturas citadas ao longo do tempo, sendo então a CTM uma população de células aderentes e fibroblastóides, com capacidade para diferenciar em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (DOMINICI et al., 2006).

São numerosos os protocolos disponíveis atualmente para o isolamento e cultivo das CTM, que também utilizam diferentes fontes para tal fim. Pelas características destas células, o método tradicional de isolamento foi descrito inicialmente por Friedenstein (FRIEDENSTEIN; GORSKAJA; KULAGINA, 1976), o qual se baseia na capacidade de aderência das células ao plástico dos frascos de cultivo celular. Este



método tem como desvantagem a obtenção de populações heterogêneas de células, principalmente devido a contaminação por CTH, entretanto, a cultura das CTM torna-se homogênea após as primeiras passagens, devido ao descarte das células não-aderentes (COLTER et al., 2000).

A MO continua sendo a principal fonte para o isolamento e estudo de CTM, porém, estas células têm sido isoladas também a partir de outros órgãos e tecidos, tais como o tecido muscular esquelético (YOUNG et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), cordão umbilical (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000), veia umbilical (COVAS et al., 2003), pulmão (SABATINI et al., 2005), dentre outras possibilidades. O que tem sido proposto para explicar a presença das CTM em múltiplos locais se refere ao fato de que células com características de CTM estão presentes em diversos órgãos e tecidos pós-natais (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004; MEIRELLES; CHAGASTELLES, NARDI, 2006). Outra hipótese sugere uma origem perivascular para as CTM, o que também pode auxiliar a compreender a presença desta população celular em diferentes tecidos (CRISAN et al., 2008). Nas primeiras passagens *in vitro*, as CTM apresentam uma alta taxa de proliferação, permitindo de forma satisfatória a expansão *ex vivo* destas células. Através da microscopia de luz ou contraste de fase, as CTM são visualizadas como células fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e centralizado, e com citoplasma abundante (TAGAMI et al., 2003).

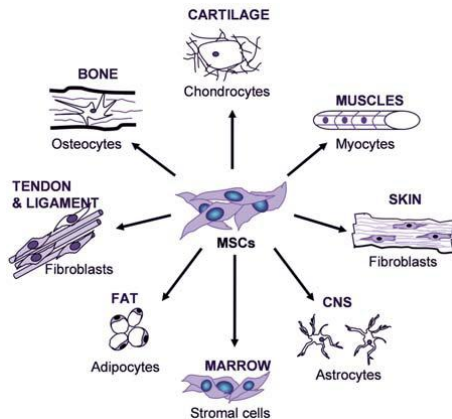
As CTM têm sido estudadas com grande interesse devido à possibilidade da aplicação das mesmas na medicina regenerativa. A facilidade de isolamento, cultivo celular e a sua alta capacidade de expansão *in vitro* tornam as CTM atrativas para serem aplicadas em protocolos experimentais em estudos de diferenciação celular, terapia celular e terapia gênica (CAPLAN, 2007).

### **1.2.2 Características *in vitro* das células-tronco mesenquimais**

O painel de expressão imunofenotípica das CTM já está caracterizado, porém não é específico desta população de células. Neste painel, está descrito que as CTM não expressam marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD34. Também não expressam

marcadores endoteliais como o CD 31. Expressam positivamente, com intensidade variável, marcadores como CD73, CD90, CD105, Stro-1, e algumas moléculas de adesão, como CD 29 e ICAM-1 (molécula de adesão célula-célula) (CHAMBERLAIN et al., 2007). Este painel de caracterização pode sofrer alterações de acordo com as diferentes fontes de obtenção, métodos de isolamento e cultivo destas células, isto porque as CTM podem apresentar variações no seu padrão de expressão gênica de acordo com estas variáveis (GREGORY et al., 2005). Além disso, a expressão destes marcadores *in vitro* nem sempre pode ser a mesma observada *in vivo* (GRONTHOS et al., 2001).

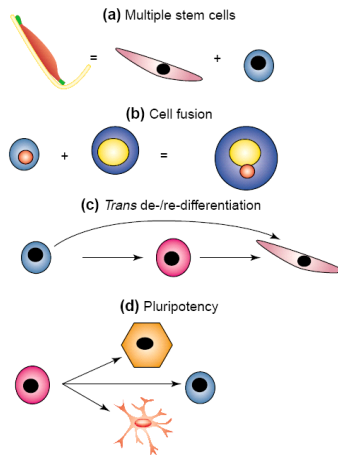
Além das características morfológicas e imunofenóticas, os protocolos de diferenciação celular também são utilizados para complementar a caracterização destas células. As CTM são CT multipotentes com capacidade para diferenciar em linhagens de origem mesodérmica, tais como osso, cartilagem e tecido adiposo (figura 6). Os protocolos de diferenciação de CTM também já estão descritos e padronizados, e constam da utilização de meios de cultura indutivos da diferenciação celular. Os meios de cultura indutivos são constituídos por fatores como indometacina, ácido ascórbico, dexametasona, insulina, dentre outros. Após o período de indução da diferenciação celular, as células são coradas com o objetivo de evidenciar a ocorrência ou não da diferenciação celular para o fenótipo desejado (PITTENGER et al., 1999).



**Figura 6. Plasticidade de células-tronco mesenquimais adultas.** Em condições adequadas, as células-tronco mesenquimais podem diferenciar em linhagens como osteócitos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos, células estromais da medula óssea, astrócitos e células musculares. Traduções: MSCs (célula-tronco mesenquimal), CNS (sistema nervoso central), skin (pele), fat (gordura), cartilage (cartilagem), chondrocytes (condrócitos), muscles (músculo), myocytes (miócitos), fibroblasts (fibroblastos), astrocytes (astrócitos), marrow (medula óssea), stromal cells (células estromais), adipocytes (adipócitos), tendon e ligament (tendão e ligamento), bone (osso), osteocytes (osteócitos). Fonte: Adaptado de: GRASSEL; AHMED, 2007.

Atualmente, os mecanismos que regulam a diferenciação das CTM para linhagens específicas ainda não está completamente esclarecido, no entanto, algumas possibilidades são descritas para explicar esta plasticidade (figura 7). Transdiferenciação, desdiferenciação, fusão celular e pluripotencialidade seriam alguns destes mecanismos. Na fusão celular duas células diferentes seriam fundidas gerando uma célula comprometida com uma dada linhagem celular. No processo de transdiferenciação, a célula poderia modificar a expressão de seus genes resultando na conversão em outro tipo celular comprometido funcionalmente. Na desdiferenciação, a célula já diferenciada retornaria para um estado mais primitivo e posteriormente poderia rediferenciar para outro tipo de célula. Quanto à pluripotência,

sabe-se que as CTM são células multipotentes e que poderiam somente gerar células pertencentes ao folheto do mesoderma, no entanto, algumas destas células poderiam também manter um estado pluripotente, demonstrando uma maior plasticidade. Todas estas possibilidades que envolvem o processo de diferenciação estão fortemente relacionadas com as características de expressão gênica das CT (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Na figura 7 estão ilustrados estes possíveis mecanismos de plasticidade das CTM.

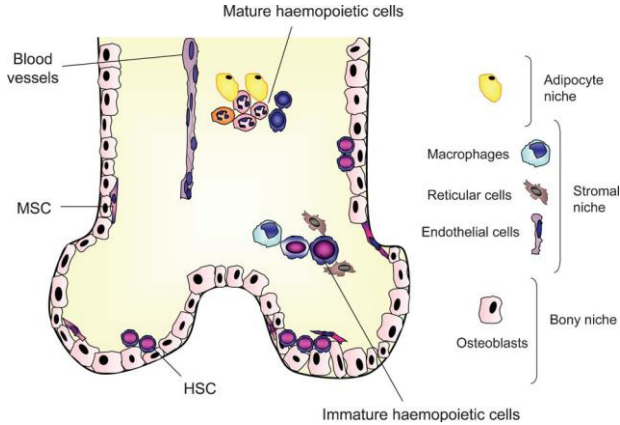


**Figura 7. Diagrama ilustrando os possíveis mecanismos da plasticidade nas células-tronco adultas.** (a) células-tronco de um tecido podem estar presentes em outros tecidos e órgãos; (b) fenômeno da fusão celular; (c) plasticidade devido ao mecanismo de trans des/rediferenciação; (d) células com características pluripotentes presentes no organismo adulto. Traduções: multiple stem cells (células-tronco em diferentes tecidos e órgãos), cell fusion (fusão celular), trans de-/re-differentiation (trans de-/re-diferenciação), pluripotency (pluripotência). Fonte: Adaptado de: VERFAILLIE, 2002.

### 1.2.3 Célula-tronco mesenquimal e hematopoese

A hematopoese, na MO, requer um microambiente estromal intacto, altamente organizado e funcionante. O estroma que suporta a hematopoese é constituído por células de origem hematopoiética, endotelial e as células de origem mesenquimal, como os adipócitos, osteoblastos e fibroblastos. Além destas células, este estroma medular também é constituído pela MEC secretada pelas próprias células que compõem o microambiente (DAZZY et al., 2006). O termo microambiente tem sido amplamente utilizado para se referir à região anatômica próxima das células, a qual pode exercer influência essencial em diversos processos da vida celular como a migração, proliferação, diferenciação e metabolismo celular. O microambiente é normalmente constituído pelos fatores de crescimento, MEC e pelas próprias células que se relacionam diretamente com este ambiente (ABBOTT; RONNBACK; HANSSON, 2006)

Simultaneamente, as células associadas com a MEC no estroma medular exercem controle em funções celulares como auto-renovação, adesão, migração, proliferação, sobrevivência e diferenciação das CTH que participam da hematopoese. Este controle efetuado pelo microambiente hematopoiético (MH) na regulação das CTH ocorre por interações célula-célula, célula-MEC e também pela secreção de fatores de crescimento e citocinas regulatórias da hematopoese (DAZZY et al., 2006) (figura 8). Alguns estudos descrevem a hipótese de que as CTM são as principais responsáveis em proporcionar este microambiente estromal propício para a hematopoese fisiológica na MO (KADEREIT et al., 2002; MAJUMDAR et al., 2000; DEVINE; HOFFMAN, 2000). Caracteriza-se, desta forma, uma teoria na qual o microambiente e as CT se regulam e coordenam de forma dinâmica, com os fatores produzidos por estas células (proteínas solúveis, MEC ou mesmo proteínas de membrana celular) influenciando as células próximas e gerando uma resposta interligada (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).



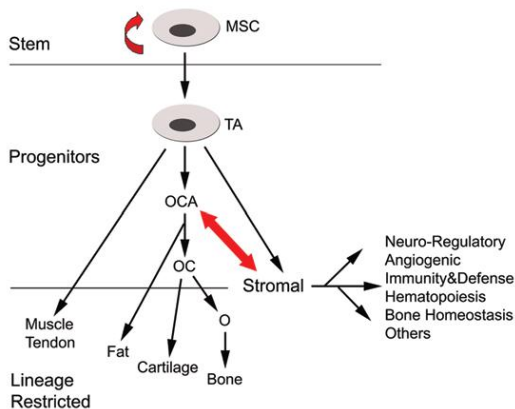
### Figura 8. Componentes celulares do microambiente hematopoiético.

Além dos tipos celulares ilustrados na figura, é importante salientar que o microambiente no qual ocorre a hematopoese na medula óssea também é composto pela matriz extracelular secretada pelas células estromais. Osteoblastos e células hematopoiéticas imaturas se localizam principalmente nas extremidades do tecido ósseo, enquanto que adipócitos, células endoteliais, células-tronco mesenquimais e células hematopoiéticas já diferenciadas ocupam a região central da medula óssea. Traduções: MSC (célula-tronco mesenquimal), HSC (célula-tronco hematopoiética), blood vessels (vasos sanguíneos), osteoblasts (osteoblastos), bone niche (nicho ósseo), immature haemopoietic cells (células hematopoiéticas indiferenciadas), stromal niche (nicho estromal), endothelial cells (células endoteliais), reticular cells (células reticulares), macrophages (macrófagos), adipocyte niche (nicho de adipócitos), mature haemopoietic cells (células hematopoiéticas diferenciadas). Fonte: Adaptado de: DAZZY et al., 2006.

A hipótese inicial da influência do microambiente estromal na hematopoese foi descrita primeiramente por Dexter e seus colaboradores, em 1977. Neste estudo, uma monocamada de células aderentes oriundas da MO foi capaz de manter as CTH viáveis e com capacidade de gerar colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM – do inglês, *Colony Forming Unit Granulocyte - Monocyte*), além de colônias de eritrócitos por períodos que variavam de semanas até meses. Esta teoria foi comprovada posteriormente através de novos estudos que utilizaram CTM isoladas da MO, sangue do cordão umbilical e da

placenta humana. Estas novas evidências comprovaram a capacidade das CTM em manter as CTH viáveis, além de permitir a expansão destas células até mesmo na ausência de citocinas estimulatórias da hematopoese, já que na presença destas o processo é sinérgico (BACIGALUPO, 2004; ZHANG et al., 2004; JANG et al., 2006).

As células estromais multipotentes (CEM), que constituem o microambiente hematopoético, possuem origem mesenquimal e, conforme já descrito, compartilham comportamento e características demonstradas também para as CTM. Dentre estas características, as CEM se caracterizam pela: (a) capacidade em aderir ao plástico; (b) imunofenotipagem negativa para marcadores hematopoéticos (CD14, CD11, CD19, CD34, CD45, HLA-DR) e positiva para marcadores de origem mesenquimal (CD73, CD90, CD105); (c) possibilidade de diferenciação para condrócitos, osteoblastos e adipócitos (figura 9). Portanto, está comprovado que as células do estroma medular têm características de CTM ou até mesmo são populações de CTM (DOMINICI et al., 2006). As CEM também expressam moléculas que controlam a adesão e migração das CT na MO, além de sintetizar as moléculas que constituem a MEC neste microambiente, tais como fibronectina, laminina, trombospondina, colágeno e proteoglicanos. Todas estas moléculas de adesão e da MEC constituem uma camada de aderência para as CTH envolvidas com a formação das células sanguíneas (LAZENNEC; JORGENSEN, 2008).



**Figura 9. Ilustração da relação entre células-tronco mesenquimais, progenitores multipotentes e o estroma medular.** A partir das células-tronco mesenquimais são geradas células diferenciadas que constituem o estroma da medula óssea, tais como adipócitos, osteoblastos e as células estromais com suas respectivas funções de suporte para a hematopoese. Traduções: MSC (células-tronco mesenquimais), OCA (progenitor osteogênico, condrogênico e adipogênico), TA (amplificação transitória), progenitors (progenitores), stem (célula-tronco), OC (progenitor condrogênico e osteogênico), stromal (estromal), muscle tendon (tendão e músculo), lineage restricted (linhagem limitada), neuro-regulatory (regulação neural), angiogenic (angiogênico), immunity & defense (imunidade), bone homeostasis (homeostase óssea), others (outros). Fonte: Adaptado de: PHINNEY, 2007.

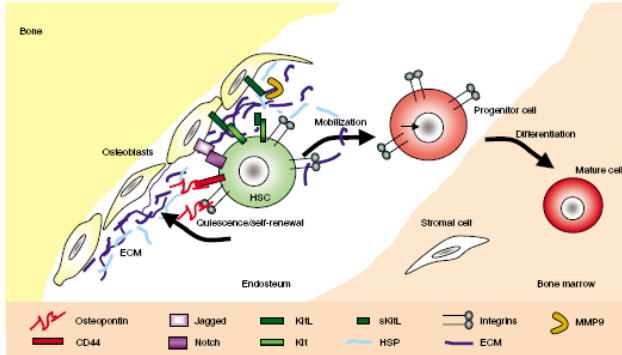
De acordo com estudo publicado por Kadereit e colaboradores (2002), as CTH cultivadas na presença de uma monocamada de CTM demonstraram uma maior expressão de proteínas inibitórias do ciclo celular, como a p21, e proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma 2*). Estes dados sugerem que quando as CTH são expandidas associadas com CTM ocorre uma provável manutenção do estado indiferenciado das CTH, reforçando a importância das células de origem mesenquimal para as CTH e a hematopoese.



#### 1.2.4 Matriz extracelular

A MEC é constituída por diferentes proteínas e polissacarídeos. A composição desta matriz é feita pelas proteínas estruturais (laminina, fibronectina, colágenos, elastina, dentre outras), proteínas especializadas funcionalmente como os fatores de crescimento e citocinas, além dos proteoglicanos (DALEY; PETERS; LARSEN, 2008) (figura 10). Deste modo, a MEC exerce funções de resistência e suporte estrutural para tecidos e órgãos. Além disso, participa da organização e coordenação das funções celulares nos tecidos, sendo através da MEC que ocorrem processos celulares como adesão, migração e processos de transdução de sinal que regulam, por exemplo, proliferação celular e expressão gênica nas células de um dado tecido. Todos estes mecanismos regulatórios da MEC envolvem também as moléculas de adesão celular, as quais ligam as células com os componentes da MEC (CHEN et al., 2007).

Na MO, as macromoléculas que constituem a MEC são secretadas pelas células estromais. Estas células estromais possuem uma origem mesenquimal, sendo provavelmente um nicho de CTM. No MH da MO, a MEC possui duas funções importantes: (a) permitir a fixação das CT que chegam na MO através de seus receptores de membrana para moléculas de adesão; (b) proporcionar contato dinâmico entre as CT e os fatores de crescimento secretados pelas células estromais, contribuindo na manutenção de um MH fisiológico. O contato entre as CTH e a fibronectina, uma importante proteína componente da MEC, é essencial para que as CTH possam proliferar e diferenciar em condições adequadas (CHEN et al., 2007).



**Figura 10. Composição e atuação da matriz extracelular no controle funcional das células-tronco na medula óssea.** Participação da matriz extracelular na adesão, migração, quiescência e diferenciação das células-tronco hematopoéticas. Traduções: HSP (proteoglicano heparan sulfato), HSC (célula-tronco hematopoética), MMP9 (metaloproteinase do tipo 9), progenitor cell (célula progenitora), bone marrow (medula óssea), mature cell (célula diferenciada), differentiation (diferenciação), stromal cell (célula estromal), endosteum (endóstio), quiescence/self-renewal (quiescência/auto-renovação) mobilization (migração), bone (osso), osteoblasts (osteoblastos), ECM (matriz extracelular), osteopontin (osteopontina), CD44 (glicoproteína de adesão celular), integrins (integrinas), Kit (receptor do fator de células-tronco), KitL (ligante de kit, mais conhecido como fator de células-tronco), sKitL (ligante solúvel de Kit). Fonte: Adaptado de: DALEY et al., 2008.

### 1.2.5 Danos celulares após quimioterapia

Apesar de todos os avanços recentes nas possibilidades terapêuticas aplicadas em pacientes com neoplasias hematológicas, os efeitos adversos dos quimioterápicos sobre o MH e as CT continuam sendo relatados (MELZER et al., 2004). Em virtude deste fato, a preocupação com a integridade das CT e do MH após a exposição a quimioterápicos deve ser mantida e continuamente avaliada.

Tendo em vista o papel essencial das CTM com função de suporte para a hematopoese, estudos têm investigado a possibilidade de efeitos inespecíficos dos quimioterápicos sobre as CTM de pacientes que recebem esta terapia. Nestes estudos, as CTM foram isoladas dos pacientes após a quimioterapia, com diferentes parâmetros celulares sendo posteriormente analisados. Os resultados descritos são preocupantes, porque evidenciam uma lesão qualitativa e quantitativa sobre as CTM, prejudicando, por exemplo, a capacidade das CTM em fornecer suporte para a hematopoese, redução da capacidade de proliferação e diferenciação, menor capacidade de secreção de citocinas importantes para a hematopoese, tais como fator de células tronco (SCF – do inglês, *Stem Cell Factor*), interleucinas 3 e 6 (IL-3 e IL-6), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF – do inglês, *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*), além do prejuízo na formação de colônias CFU-F (CARLO-STELLA et al., 1997; CAO et al., 2008).

Dentre estas evidências, há trabalhos contraditórios. Em um destes estudos, foram isoladas CTM da MO de pacientes com neoplasias hematológicas e previamente submetidos a protocolos de quimioterapia. Conforme relatado, as CTM isoladas destes pacientes não evidenciaram dano qualitativo ou quantitativo dos quimioterápicos, inclusive com os autores citando que estas células persistem na MO e se tornam mais resistentes a apoptose após a quimioterapia (MUELLER et al., 2006).

Aplicando um protocolo de cultura *in vitro*, pesquisadores avaliaram os efeitos agudo e direto de alguns quimioterápicos sobre as CTM. Neste estudo, os autores demonstraram que as CTM isoladas são relativamente resistentes aos danos de alguns quimioterápicos, como ciclofosfamida, bussulfan e metotrexate, entretanto, as células foram sensíveis e lesadas de modo irreversível por agentes como vincristina, paclitaxel, etoposide e citarabina. Apesar disso, as CTM mantiveram a capacidade de diferenciação mesmo na presença destes medicamentos (LI et al., 2004). Analisando estes dados, fica evidente que os efeitos dos agentes citotóxicos no comportamento das CTM variam de acordo com cada tipo de medicamento aplicado na terapia, permitindo afirmar que sempre há grau variável de dano nestas células e, obviamente, no MH. Todos estes dados convergem no sentido da comprovação de danos significativos sobre a funcionalidade das CTM e, conseqüentemente, ao microambiente no qual ocorre a hematopoese na MO. No entanto, a extensão dos danos causados pelos medicamentos quimioterápicos

permanece desconhecida. Estes efeitos provavelmente prejudicam o restabelecimento da hematopoese fisiológica após um esquema de tratamento quimioterápico, fato que pode tornar a recuperação do paciente ainda mais complicada.

### **1.2.6 Placenta humana como fonte de células-tronco**

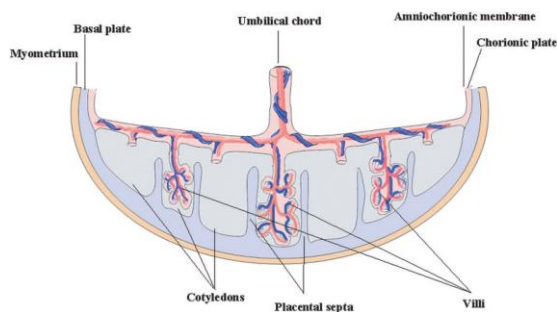
Em humanos, além da placenta ser fundamental no desenvolvimento e na nutrição do feto ela também é uma fonte importante de CT. Recentemente tem sido direcionado um grande interesse na utilização da placenta humana como fonte alternativa de CT. Na medicina regenerativa, esta opção tem boas perspectivas, principalmente em razão da plasticidade fenotípica demonstrada pelas CTM isoladas deste tecido, da disponibilidade e facilidade de obtenção da placenta descartada após o trabalho de parto e também pelo fato de que a utilização da placenta humana não tem problemas de ordem ética e religiosa (PAROLINI et al., 2008).

A estrutura da placenta é complexa, e alguns estudos têm descrito a presença de CT em diferentes regiões da placenta, além de disponibilizar diferentes métodos de isolamento, cultivo e caracterização das CT inseridas neste tecido. Diferentes tipos de CT já foram isoladas a partir de diferentes porções da placenta: células mesenquimais, hematopoiéticas, progenitores endodermis e também células epiteliais amnióticas (ALVAREZ-SILVA et al., 2003). Em 2007, durante o Workshop Internacional de Células- Tronco Derivadas da Placenta, foram descritos critérios para identificar as CT isoladas da placenta como CTM: capacidade em aderir ao plástico e formar colônias de CFU-F, expressão de alguns marcadores de superfície celular (CD73, CD90 e CD105, por exemplo) e potencial de diferenciar para no mínimo uma linhagem celular do mesoderma embrionário (PAROLINI et al., 2008).

No organismo humano, ao sétimo dia após a fertilização ocorre a implantação do blastocisto no útero e, simultaneamente, o início do desenvolvimento da placenta como um órgão de suporte para o desenvolvimento embrionário. Nesta etapa, o blastocisto é constituído

por uma massa celular interna que mais tarde irá gerar o embrião, cordão umbilical e o epitélio amniótico, sendo este blastocisto também constituído por células do trofoblasto que circundam externamente a sua estrutura. Após a implantação do blastocisto na cavidade uterina, as células trofoblásticas proliferam de modo intenso, proporcionando a formação de uma bicamada trofoblástica: a camada interna denominada de citotrofoblasto e a camada externa chamada de sincitiotrofoblasto. Com a proliferação destas duas camadas celulares, são formados os vilos primordiais da placenta e, por volta do quarto mês de gestação, a placenta está completamente formada (ILANCHERAN; MOODLEY; MANUELPILLAI, 2009).

Com relação a sua estrutura, a placenta é dividida em duas regiões: uma porção fetal denominada de placa coriônica, e outra porção materna, a placa basal, sendo o único órgão humano constituído por células de dois indivíduos. O processo de trocas fisiológicas entre o sangue da mãe e do feto ocorre entre os vilos coriônicos e os septos placentários (PAROLINI et al., 2008) (figura 11). Em nosso estudo, isolamos as CTM da porção fetal da placenta, na região da placa coriônica, próximo da inserção do cordão umbilical.



**Figura 11. Estrutura anatômica da placenta humana.** Esquema demonstrando as duas porções componentes da placenta humana: a parte fetal representada pela placa coriônica próxima ao cordão umbilical e a parte materna representada pela placa basal. Traduções: myometrium (miométrio), basal plate (placa basal), umbilical chord (cordão umbilical), amniochorionic membrane (membrana amniocoriônica), chorionic plate (placa coriônica), villi (vilosidades), placental septa

(septo placentário), cotyledons (cotilédones). Fonte: Adaptado de: PAROLINI et al., 2008.

As CT derivadas da placenta humana apresentam alta taxa de proliferação, podem ser mantidas por até 20 passagens e, ao mesmo tempo em que são células multipotentes também expressam alguns marcadores de pluripotência que seriam exclusivos das CTE, tais como Oct-4 (do inglês, *Octamer-4*), Nanog e nestina. Portanto, tanto a MO como a placenta humana podem ser fontes de CTM, sendo que estas células compartilham das mesmas características morfológicas, funcionais e imunofenotípicas, podendo ser isoladas com o método de aderência ao plástico, o qual já é descrito também para a obtenção das CTM oriundas da MO (MIAO et al., 2006). Similarmente às células da MO, as CT derivadas da placenta também apresentam um estado multidiferenciado, expressando diversos genes de ectoderma, endoderma e mesoderma (AKIVA; DALE, 2008). Todos estes trabalhos sugerem a placenta humana como fonte alternativa de CTM humanas, permitindo que as CTM oriundas da placenta humana possam ser aplicadas em modelos clínicos de estudo (BARLOW et al., 2008), inclusive em nosso trabalho, facilitando a execução e compreensão dos efeitos do MI especificamente na população de CTM.

## 2 JUSTIFICATIVA

Inicialmente, considerava-se que o MI pouco influenciava a hematopoese fisiológica em pacientes com LMC, porém, estudos têm relatado que o MI pode afetar progenitores hematopoiéticos normais (DEWAR et al., 2003). Nestes progenitores, foi demonstrado que o MI compromete a mobilização, proliferação e diferenciação, representando risco de mielossupressão para os pacientes que utilizam o medicamento. Além disso, nas células hematopoiéticas normais, os efeitos do MI foram caracterizados como concentração-dependente e reversíveis, podendo afetar todas as linhagens hematopoiéticas em grau variado (APPEL et al., 2005).

Outros medicamentos aplicados no tratamento de neoplasias hematológicas também têm sido descritos como danosos para as CTM normais, prejudicando, por exemplo, a capacidade de expansão, clonogenicidade e diferenciação destas células *in vitro* (DE LIMA PRATA et al., 2010). Sendo importante constituinte celular do microambiente da MO, as CTM são sensíveis a estes agentes farmacológicos e o dano a estas células pode refletir danos também para a hematopoese normal. Paclitaxel, vincristina, etoposide, dentre outros medicamentos, já foram descritos como citotóxicos para as CTM normais, comprovando os efeitos inespecíficos destes agentes nas CTM normais (LI et al., 2004). Já foi demonstrado também que as CTM isoladas da MO de pacientes com LMC não expressam o cromossomo *Ph* (CARRARA, et al., 2007), apesar disso, o MI, além de afetar as células hematopoiéticas normais, pode também exercer efeitos graves nas células que compõem o estroma medular *in vitro* (MELZER et al., 2004). Agrupando estes dados, justificamos nosso trabalho na necessidade e importância de se avaliar os efeitos do MI de forma específica sobre as CTM normais provenientes de placenta humana, visando compreender melhor estes possíveis efeitos inespecíficos em nível celular, o que pode auxiliar a compreender as possíveis alterações celulares que ocorrem *in vivo* em pacientes que utilizam o medicamento. Além disso, o trabalho também permitirá avaliar os riscos que este medicamento pode exercer na placenta de pacientes gestantes e com diagnóstico de LMC.

Este trabalho também é uma continuidade dos estudos do nosso grupo de pesquisa. Já foram avaliados, até o momento, os efeitos do MI em nível de MO em pacientes com LMC (JESUS; VITURI, 2008), além dos seus efeitos em progenitores hematopoiéticos e células estromais normais de camundongos. No presente trabalho, buscamos avaliar os possíveis efeitos do medicamento na população de células que é precursora dos componentes celulares estromais normais da MO: as CTM humanas.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar parâmetros relacionados ao comportamento de células-tronco mesenquimais normais, derivadas de placenta humana e expostas ao Mesilato de Imatinibe *in vitro*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar e caracterizar as CTM isoladas da placenta humana com metodologias preconizadas para tal fim;
- Avaliar a viabilidade, proliferação celular e morfologia das CTM expostas ao MI;
- Analisar o efeito do MI na diferenciação osteogênica e adipogênica das CTM humanas;
- Analisar a expressão imunocitoquímica de fibronectina e alguns marcadores de pluripotência em cultura de CTM humanas na presença do medicamento;
- Avaliar o possível mecanismo de morte celular induzida pelo MI;

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção da Placenta Humana**

As amostras de placenta humana foram obtidas por meio de colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), na qual gestantes com saúde qualificada e após trabalho de parto à termo doaram a placenta mediante assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido. Tal termo procurou esclarecer as doadoras e também os familiares quanto ao propósito do estudo, linha de pesquisa e seriedade com que a mesma seria conduzida. É importante ressaltar que estes procedimentos foram anteriormente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – UFSC, sob o número de protocolo 198/03-CEPSH/PRPG.

Imediatamente após o trabalho de parto à termo, uma pequena porção da placenta foi coletada e armazenada em recipiente estéril contendo salina tamponada por fosfato pH 7,4 (PBS, Sigma), sendo encaminhada ao laboratório para a realização do isolamento e cultura celular. Este fragmento de placenta foi coletado da região subjacente à placa coriônica localizada na porção fetal deste anexo embrionário, próximo ao local de inserção do cordão umbilical. Neste trabalho, foram utilizadas três amostras distintas de placenta humana, o que permitiu a realização dos diferentes protocolos experimentais em triplicata.

### **4.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais humanas**

Os fragmentos de placenta humana coletados possuíam aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, sendo posteriormente dissociados mecânica e enzimaticamente com pancreatina 6,25 g/L (Sigma) durante 20 minutos em temperatura ambiente. O fragmento do tecido foi dissociado de forma homogênea e centrifugado à 300 x G por 5 minutos. Após a dissociação do tecido, este foi ressuscitado em meio de cultura de Iscove's modificado por Dulbecco's (IMDM, Gibco) suplementado com

10.000 U/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina (PS, Gibco) e 10% de Soro Bovino Fetal (SBF, Cultilab), conforme orientações do fabricante. Na etapa seguinte, as células foram transferidas para garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) contendo 5,0 mL de meio de cultura IMDM, e mantidas em estufa úmida (Revco) com temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 4 dias metade do meio de cultura foi trocado e as células não aderentes descartadas. Deste modo, as células-tronco mesenquimais humanas (CTMs) foram selecionadas pela sua capacidade de adesão ao plástico, já que as células não aderentes foram sendo removidas com as trocas periódicas do meio de cultura.

Após duas semanas, quando a monocamada de CTMs aderentes alcançava confluência de aproximadamente 80 a 90%, as mesmas eram lavadas com PBS pH 7,4, tripsinizadas e realizada a expansão das células para as passagens utilizadas no estudo. Para a tripsinização, as CTMs foram dissociadas do plástico com a aplicação de solução de tripsina 0,05% (Sigma) suplementada com ácido etilenodiaminotetracético 0,02% (EDTA, Sigma) em temperatura ambiente (TA) durante 3 minutos. Após a dissociação da monocamada celular, a enzima foi inativada com a adição de SBF. A suspensão celular foi centrifugada à 300 x G por 5 minutos para obtenção do *pellet* celular, e o mesmo foi ressuspenso em meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SBF, com as células sendo transferidas para uma nova garrafa de cultura (passagem 1). As células foram repicadas de 5 a 10 vezes, sendo estas também as passagens utilizadas nos experimentos. A cultura celular foi constantemente monitorada com a utilização de microscópio invertido Olympus CK40. As garrafas de cultura foram utilizadas basicamente para a expansão e repique das CTMs, enquanto que para os ensaios analíticos foram utilizadas principalmente placas de 24 cavidades (Corning). Na placa de 24 cavidades o volume de meio utilizado foi 1,0 mL com cultivo inicial de  $1 \times 10^4$  células/mL/cavidade e, nas garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, volume final de 5,0 mL de meio de cultura com cultivo inicial de  $2 \times 10^5$  células/garrafa. A contagem das células para os protocolos experimentais sempre foi ajustada após quantificação das mesmas em hemocitômetro. Na placa de 24 cavidades e no tempo de cultura celular de 4 dias foi o período em que as células do grupo controle atingiram a confluência da monocamada celular.

### 4.3 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado no protocolo de cultivo celular foi o meio IMDM suplementado com 10% de SBF (v/v), 10.000 U/mL de penicilina e 10.000  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomina. O meio base IMDM em pó foi diluído em água de Mili-Q estéril e filtrado à vácuo com membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (Sigma), conforme orientações do fabricante. O antibiótico foi adicionado ao meio no momento do seu preparo, enquanto que a suplementação com 10% de SBF foi realizada somente no momento da utilização do meio de cultura durante os experimentos. As alíquotas de meios preparados foram armazenadas sob refrigeração com temperatura de aproximadamente 4°C.

### 4.4 Obtenção e preparo do Mesilato de Imatinibe

Os comprimidos com 400 miligramas (mg) de Mesilato de Imatinibe (MI, Glivec<sup>®</sup> - Novartis) foram obtidos através de doação do Centro de Pesquisas Oncológicas de Santa Catarina (CEPON-SC). Também esclarecemos que os comprimidos cedidos ao estudo foram medicamentos devolvidos anteriormente pelos pacientes, os quais por algum motivo interromperam o uso, não comprometendo, portanto, a distribuição e o estoque do medicamento disponível aos demais pacientes em tratamento.

Foram preparadas soluções estoque do MI na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , através da trituração do comprimido sendo que o pó obtido foi dissolvido em 68 mL de uma solução contendo dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e água de Mili-Q estéril 1:1 (v/v). Esta solução estoque do medicamento (10  $\mu\text{M}$ ) foi filtrada à vácuo em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  e em seguida acondicionada na forma de alíquotas em tubos eppendorfs. Estas alíquotas foram mantidas congeladas em freezer (-20°C) e somente descongeladas no momento da aplicação nos experimentos. Em trabalho realizado por BARTOLOVIC (2004), a concentração final de DMSO quando o MI foi adicionado na cultura celular oscilou entre 0,1 e 0,37% e não exerceu efeito inibitório e interferente sobre o crescimento das células neste estudo. Em nosso trabalho, a preparação da solução

estoque do medicamento foi realizada de acordo com este trabalho citado e, portanto, não foi realizada a quantificação da concentração final de DMSO em nosso protocolo de cultivo celular. Para a utilização nos experimentos, a solução estoque do medicamento foi descongelada em banho-maria à 37°C e diluída em meio de cultura IMDM conforme cada concentração a ser avaliada. O medicamento foi adicionado no primeiro dia de cultivo celular e novamente acrescentado durante as trocas de meio em concentração proporcional ao volume de meio trocado. O grupo controle positivo dos experimentos foi constituído somente pelas células na ausência do MI.

#### **4.5 Viabilidade celular**

Nesta técnica, a viabilidade celular foi determinada com a aplicação do método do brometo de dimetilazol difeniltetrazólio (MTT, Sigma). O MTT é um sal de tetrazólio de coloração amarela que, na presença de atividade mitocondrial, é reduzido e precipitado para um derivado de formazana com coloração azul, indicando, portanto, presença ou não de atividade mitocondrial nas células. Apenas as células viáveis metabolizam este sal, sendo um método que permite quantificar a viabilidade celular. Inicialmente,  $1 \times 10^4$  células/mL foram adicionadas em placas de 24 cavidades e expostas ao MI durante 4 dias, nas seguintes concentrações: 0  $\mu\text{M}$  (controle positivo), 1,0  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  do MI, sendo estas as concentrações do medicamento testadas na maioria dos experimentos. Chegamos ao consenso do estudo destas concentrações do MI após experimentos iniciais que indicaram estas concentrações como as de maior interesse para avaliação. Após 4 dias de cultura e exposição das células ao MI, o sobrenadante foi removido e substituído por meio de cultura IMDM contendo 10% (v/v) de solução de MTT (5,0 mg/mL em PBS pH 7,4) durante 3 horas à 37°C. Na etapa posterior, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os cristais de formazana dissolvidos com solução de Isopropanol (Merck), sendo o sobrenadante transferido para placas de 96 cavidades (Corning). A leitura das absorbâncias das amostras foi realizada em espectrofotômetro Microwell Systems (Organon Teknika), no comprimento de onda de 540 nm, sendo a densidade óptica do grupo controle considerada como parâmetro de

100% de viabilidade celular na comparação com os grupos expostos ao MI. A IC<sub>50</sub> para o medicamento nestas células (concentração inibitória de 50%) foi calculada através da equação da reta.

#### **4.6 Análise da morfologia celular**

Para analisar a morfologia celular, foi adicionado  $1 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 cavidades durante 4 dias, e as mesmas expostas ao MI nas concentrações já descritas no item anterior. Após a cultura celular, as células foram observadas e fotografadas em microscópio de contraste de fase Olympus CK40, e a avaliação morfológica realizada com as imagens captadas. Em todos os protocolos experimentais que resultaram em fotografias foram captadas 20 imagens para cada cavidade da placa de cultivo celular, permitindo a análise de área significativa da monocamada celular.

#### **4.7 Caracterização celular por imunofenotipagem**

A caracterização das CTMs utilizadas nos experimentos foi realizada com técnica de imunofenotipagem, utilizando para esta finalidade um painel de anticorpos monoclonais, os quais reconhecem antígenos de superfície na membrana celular. Neste painel, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: CD45 FITC, CD73 PE, CD90 FITC e CD105 PerCP (Becton Dickinson). Para tal caracterização, as células foram cultivadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> até atingir a confluência da monocamada celular, entre o quinto e o décimo repique, ou seja, nas mesmas passagens que foram utilizadas nos experimentos. Após lavagem e tripsinização da monocamada de células, alíquotas de 100 µL de suspensão celular diluída em PBS pH 7,4 e contendo aproximadamente  $10^5$  células foram colocadas em tubos de citometria, previamente identificados com os diferentes anticorpos do painel descrito anteriormente. A seguir, foram adicionados 5,0 µL dos anticorpos monoclonais conjugados aos fluorocromos e as amostras incubadas no escuro, por 30 minutos e sob

temperatura de 4°C. Após a incubação com os anticorpos, foram adicionados 2,0 mL de PBS pH 7,4 em cada tubo, e as amostras centrifugadas à 300 x G por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e novamente adicionado 2,0 mL de PBS pH 7,4 em cada tubo para nova centrifugação. Cada *pellet* celular foi ressuspensão em 200 µL de PBS pH 7,4. Também foram preparados tubos com controles positivo e negativo dos anticorpos conjugados aos fluorocromos, justamente para uma adequada calibração do citômetro de fluxo, análise dos resultados e definição de positividade das amostras. As células marcadas foram adquiridas e a intensidade de fluorescência captada através de citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson), e os dados obtidos analisados com o software FACSDiva (Becton Dickinson).

#### 4.8 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de incorporação com 5-bromo-2-deoxiuridina (BrdU, Invitrogen), que corresponde a um análogo da timidina e incorpora no DNA das células que estão proliferando. Nesta metodologia, foram adicionadas  $1 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 cavidades, sendo expostas ao MI durante 24, 48, 72 e 96 horas nas mesmas concentrações utilizadas no ensaio descrito no item 4.5. Após os períodos de tempo acima descritos, as células foram incubadas com BrdU 1,0 µg/mL durante 24 horas em estufa de cultivo celular. Após esta incubação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Merck) durante 30 minutos em TA. Em seguida, foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com ácido clorídrico 2N (Sigma), durante 30 minutos e à 37°C. Em seguida, as células foram lavadas novamente com PBS pH 7,4 e iniciada a reação imunocitoquímica, conforme descrita no item 4.10. As fotos com os núcleos marcados nos ensaios de proliferação também foram utilizadas para determinar a contagem de núcleos picnóticos nas CTMs expostas ao MI. Também através destas imagens foi calculada a taxa percentual de proliferação, com a relação entre os núcleos que incorporaram o BrdU e os núcleos totais que captaram DAPI.

## 4.9 Diferenciação celular

### 4.9.1 Diferenciação osteogênica

Para a indução de diferenciação osteogênica, foram adicionadas  $1 \times 10^4$  células/mL em placas de 24 cavidades, contendo meio IMDM acrescido de 10% de SBF até a obtenção da confluência celular. Após a confluência, as células foram expostas ao MI e o meio de cultura IMDM inicialmente utilizado foi substituído pelo meio específico de indução osteogênica, composto de: meio de Dulbecco's modificado por Eagle's (DMEM, Invitrogen) acrescido de 10% de SBF, 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina, 3,15 mg/mL de β-glicerolfosfato (Sigma), 5,0 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) e  $10^{-8}$  M de dexametasona (Sigma), sendo estas as concentrações finais dos componentes do meio indutor osteogênico. Foi realizado tanto um controle negativo, que consistiu apenas de células e o meio IMDM, e também o controle positivo das células com o meio indutivo osteogênico. As células foram mantidas por aproximadamente 30 dias em estufa de cultivo celular, sendo o meio indutivo parcialmente trocado a cada 3 dias. Após a diferenciação, as células e a matriz óssea depositada na placa de cultura foram lavadas com PBS pH 7,4 e fixadas com paraformaldeído 4%, sendo posteriormente coradas. Protocolo de coloração: 2 g de Alizarin Red S (Sigma) em pó foram dissolvidos em 90 mL de água deionizada. O pH desta solução foi conferido e ajustado para 4,1 com a adição cuidadosa de solução de hidróxido de amônia (Sigma). Em seguida, o volume da solução foi completado para 100 mL com água deionizada, e a solução filtrada com papel de filtro para remover precipitados. Para a coloração, foram adicionados 300 µL da solução estoque de Alizarin Red S na monocamada celular durante 5 minutos. Após esta etapa, o corante foi descartado e a monocamada celular lavada 3 vezes com água deionizada. A matriz extracelular contendo cálcio e secretada pelos osteoblastos foi observada e fotografada em microscópio de contraste de fase Olympus CK40.



## 4.9.2 Diferenciação adipogênica

O procedimento da indução de diferenciação das células em adipócitos foi similar ao anterior, com exceção do meio indutivo que foi composto de: meio de cultura DMEM acrescido de 10% de SBF, 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina, 10 µg/mL de insulina (Sigma), 100 µM de indometacina (Sigma) e  $10^{-8}$  M de dexametasona (Sigma), sendo estas as concentrações finais do meio indutor adipogênico. Tal como na indução osteogênica, foi realizado o controle negativo e positivo. O meio de cultura foi parcialmente trocado a cada 3 dias, durante aproximadamente 30 dias de indução da diferenciação. Após o período de indução da diferenciação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e os vacúolos lipídicos dos adipócitos corados. Protocolo de coloração: 3,75 g de Oil Red O (Sigma) em pó foram dissolvidos em 100 mL de isopropanol (Sigma). Esta solução foi misturada com dois volumes de água deionizada e filtrada com papel de filtro. Para a coloração, foram adicionados 300 µL de solução estoque de Oil Red O na monocamada celular, durante 5 minutos. Em seguida, o corante foi descartado e a monocamada celular lavada 3 vezes com água deionizada. Os vacúolos lipídicos característicos dos adipócitos corados com Oil Red O foram observados e fotografados em microscópio de contraste de fase Olympus CK40.

## 4.10 Análise Imunocitoquímica

Para a realização dos ensaios de imunocitoquímica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% durante 30 minutos em TA, lavadas 3 vezes com PBS e, quando necessário, permeabilizadas com PBS Triton 0,25% (Sigma) por 30 minutos em TA, para abertura de poros na membrana celular, quando do antígeno pesquisado ser intracelular. Em seguida, foram bloqueados os sítios inespecíficos com solução de PBS pH 7,4 contendo 5% de SBF, durante 40 minutos. Logo após, as células foram submetidas à reação imunocitoquímica com anticorpos primários específicos para os antígenos a serem detectados, conforme descrito na tabela 4. A incubação das células com os anticorpos primários teve duração de 1 hora em TA. Após a incubação

com os anticorpos primários, foram realizadas três lavagens com PBS Tween 0,05% (Sigma). Na sequência, foram incubados os anticorpos secundários por 1 hora em TA, e descritos na tabela 5. Após a incubação com os anticorpos secundários, as células foram novamente lavadas com PBS Tween 0,05%. O núcleo das células foi evidenciado através da utilização do corante 4-6-diamino-2-fenilindol 50 ng/mL (DAPI, Sigma) diluído 1:1000 em PBS pH 7,4 por 30 segundos na monocamada celular, para a quantificação do número total de células. Especialmente para a marcação da expressão de Nanog e OCT4, foi realizada a amplificação da reação imunocitoquímica com a utilização de anticorpos secundários biotinizados, seguido da incubação com Streptavidina (Perkin-elmer) e a revelação da reação com a Tyramida (Dako). As marcações fluorescentes da expressão fenotípica nas células foram observadas e fotografadas com microscópio de epifluorescência Olympus IX71. Na análise imunocitoquímica foram fotografados e quantificados, quando necessário, 20 campos microscópicos de cada cavidade de cultura celular para cada amostra de placenta humana, após três experimentos independentes.

**Tabela 4. Anticorpos primários aplicados na imunocitoquímica.**

<b>Fenótipo</b>	<b>Anticorpo primário</b>
<b>Proliferação celular</b>	Anti-BrdU IgG1 de camundongo (Calbiochem)
<b>Fibronectina</b>	Anti-fibronectina IgG de coelho (Dako)
<b>Nanog</b>	Anti-Nanog IgG de coelho (Chemicon)
<b>OCT4</b>	Anti-OCT4 IgG de coelho (Chemicon)

**Tabela 5. Anticorpos secundários aplicados na imunocitoquímica.**

<b>Anticorpos Secundários</b>
Anti-IgG de coelho conjugado ao Texas Red (Txrd, Southern Biotech)
Anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Southern Biotech)
Anti-IgG de coelho conjugado a biotina (Sigma)

#### **4.11 Laranja de Acridina/Brometo de Etídio**

Para avaliar o possível mecanismo de morte celular que o medicamento poderia exercer nas CTMs, foram utilizados dois corantes fluorescentes para visualização de células apoptóticas: laranja de acridina e o brometo de etídio. Nesta metodologia, as células viáveis exibem coloração verde oriunda do laranja de acridina, enquanto que as células inviáveis demonstram coloração alaranjada, proveniente da incorporação do brometo de etídio. Para esta análise, foram adicionadas  $1 \times 10^4$  células/mL sobre lamínulas circulares e em placas de 24 cavidades durante 4 dias, sendo expostas ao MI nas mesmas concentrações descritas no item 4.5. Após o cultivo celular, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas da placa e colocadas sobre lâminas de microscopia. Foi preparada uma solução contendo volumes iguais de laranja de acridina  $10 \mu\text{g/mL}$  e brometo de etídio  $10 \mu\text{g/mL}$ . As lamínulas contendo as células e os corantes fluorescentes foram recobertas com outras lamínulas por 10 minutos em TA. Após a incubação, as lâminas foram observadas e fotografadas com microscópio de fluorescência Olympus BX41.

#### 4.12 Análise estatística

Todos os procedimentos descritos foram realizados em triplicata, ou seja, três experimentos independentes. Os resultados serão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, os quais foram calculados, plotados em gráficos e analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prisma 5 (GraphPad Software). O teste estatístico aplicado foi a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pela análise *post hoc* que foi o teste t de Tukey. Também foi aplicada a análise de variância de duas vias (ANOVA) quando da comparação entre duas variáveis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

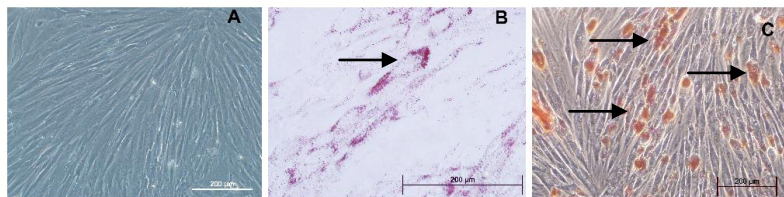
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das células-tronco mesenquimais

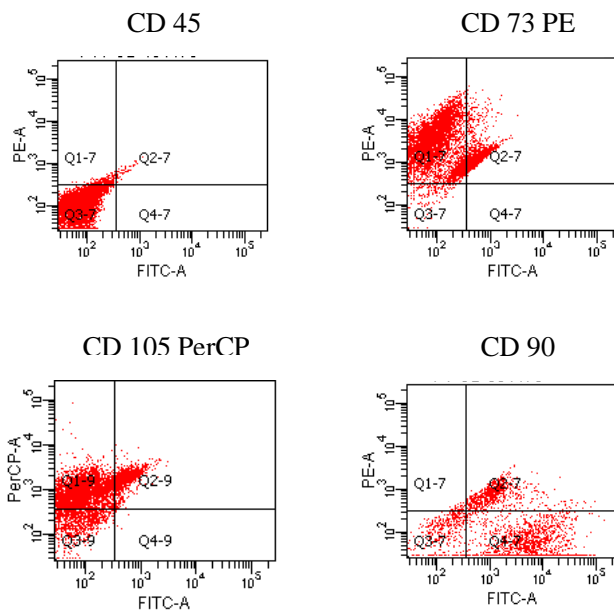
O método de isolamento das células por aderência ao plástico e com meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SFB mostrou ser eficiente em nosso estudo. As CTM humanas são caracterizadas pela morfologia fibroblastóide, capacidade para diferenciar para no mínimo duas linhagens mesodermiais específicas, e também por um painel padrão de expressão imunofenotípica.

Conforme demonstrado na figura 12-A, as células utilizadas em nosso estudo apresentaram morfologia fibroblastóide e também demonstraram, com a utilização de meios indutores da diferenciação, capacidade para diferenciar em células da linhagem mesodermal, tais como adipócitos e osteoblastos (figura 12 B e C, respectivamente)

A detecção da expressão de antígenos de superfície nas células foi realizada através de citometria de fluxo pela técnica de imunofenotipagem. Os resultados demonstrados nos histogramas da figura 13 indicam um painel de anticorpos o qual foi aplicado para a caracterização celular. Conforme já descrito na introdução deste trabalho, as células mesenquimais não expressam marcadores de células hematopoiéticas, tais como CD45 e CD34, enquanto que expressam, em diferentes níveis de intensidade, antígenos como CD73, CD90 e CD105. Nossos resultados demonstram que as células utilizadas em nosso estudo apresentam baixa expressão de CD45 (0,6%) e expressão de CD73 (75%), CD90 (66,5%) e CD105 (62%) em maior intensidade. Portanto, nossas células foram caracterizadas por serem realmente CTM porque demonstraram morfologia do tipo fibroblastóide, foram capazes de diferenciar em linhagens mesodermiais específicas e também se caracterizaram por apresentar um painel de expressão imunofenotípica consistente com a literatura científica (figuras 12 e 13).



**Figura 12. Caracterização morfológica e fenotípica de células-tronco mesenquimais humanas.** (A) morfologia celular fibroblastóide; (B) diferenciação celular para adipócitos e (C) diferenciação celular em osteoblastos. Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase. Em (B), seta indicando vacúolos lipídicos de adipócito corado em vermelho com solução de Oil red O e na figura (C) setas indicando a deposição de matriz óssea também em coloração vermelha oriunda do corante Alizarin Red S.

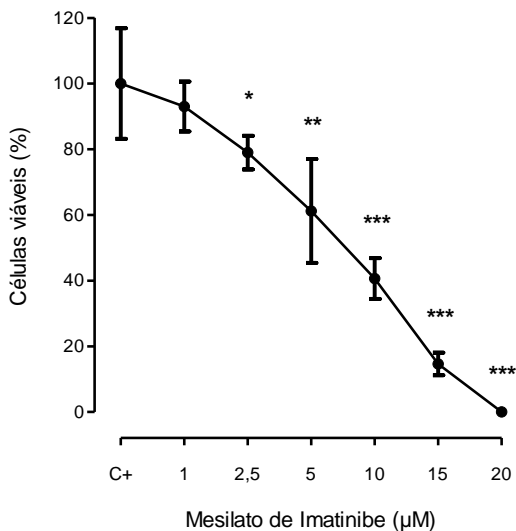


**Figura 13. Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais obtidas de placenta humana na quinta passagem.** A expressão antigênica das glicoproteínas de superfície que caracterizam um painel de anticorpos foi avaliada por citometria de fluxo pela técnica de imunofenotipagem e encontra-se expressa na forma de histogramas. As células avaliadas demonstraram baixa expressão do marcador hematopoiético CD45 e expressão positiva de CD73, CD90 e CD105.

## 5.2 Influência do Mesilato de Imatinibe na viabilidade celular

Inicialmente avaliamos o efeito do medicamento sobre a viabilidade das células e, também, determinamos a concentração inibitória de 50% (IC50) do MI neste estudo. Após 4 dias de exposição ao medicamento, observamos uma redução gradual e estatisticamente significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ .

A concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  do MI não demonstrou efeito significativo e, portanto, não foi avaliada nas demais metodologias aplicadas, assim como a concentração de 20  $\mu\text{M}$ , a qual demonstrou reduzir em 100% a viabilidade celular. A IC50 do medicamento nas CTM foi calculada através de equação matemática da reta com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2007, sendo o valor da IC50 de 8,7  $\mu\text{M}$  (figura 14).

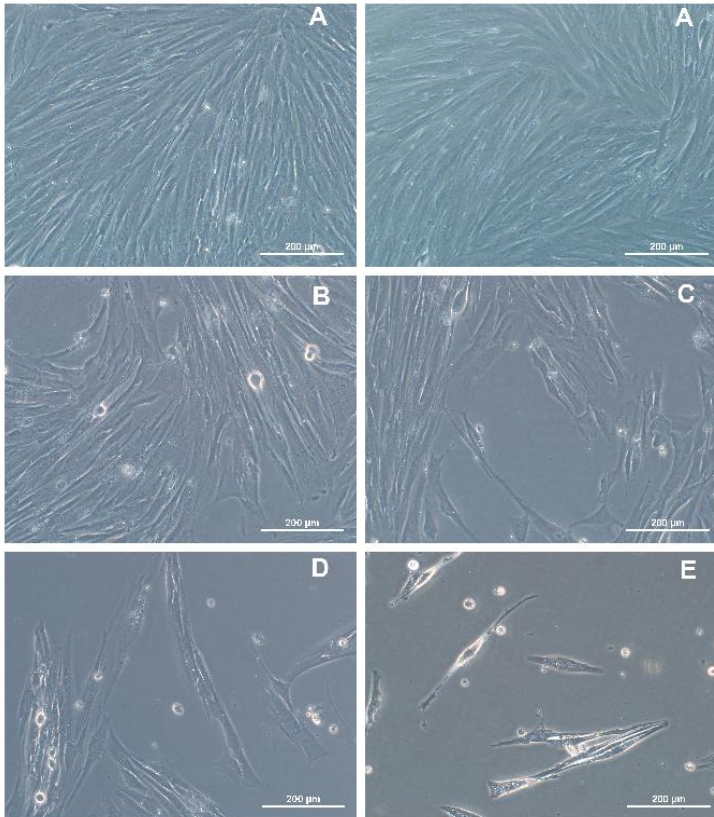


**Figura 14. Influência do Mesilato de Imatinibe na viabilidade de células-tronco mesenquimais humanas após 4 dias de cultura celular.** A viabilidade celular foi avaliada através do método do MTT, conforme descrito no item 4.5. O grupo controle positivo (C+, células cultivadas na ausência do MI) corresponde a 100% de viabilidade celular. Cada ponto no gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  demonstram diferença estatística significativa na comparação com o grupo controle através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste t de Tukey.

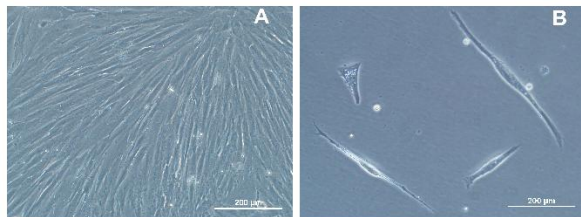


### **5.3 Morfologia das células expostas ao Mesilato de Imatinibe**

Avaliamos também a interferência do MI na morfologia celular (figura 15). Para esta análise, as células foram cultivadas e expostas ao medicamento durante 4 dias. Conforme demonstrado na figura 15, as células do grupo controle positivo apresentam morfologia com aspecto normal, isto é, do tipo fibroblastóide. Nos grupos expostos ao medicamento, foram evidenciadas alterações morfológicas, principalmente nas maiores concentrações do MI. Dentre as alterações morfológicas observadas, há certo grau de deformação nas células expostas ao medicamento. Quando expostas ao medicamento, algumas células são muito alongadas e delgadas, enquanto outras são curtas e alargadas, comprovando a interferência do MI na morfologia celular (figuras 15 e 16). Também fica evidente o decréscimo da confluência celular conforme o progressivo aumento na concentração do MI, dado este que fica correlacionado ao observado também no ensaio de viabilidade celular.



**Figura 15. Morfologia de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias.** (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do MI). Grupos expostos ao medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase e com ampliação de 200x.



**Figura 16. Morfologia de células-tronco mesenquimais humanas do grupo controle comparadas com células do grupo da IC50.** (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do MI); (B) células do grupo IC50 (8,7  $\mu\text{M}$ ). Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase e com ampliação de 200x.

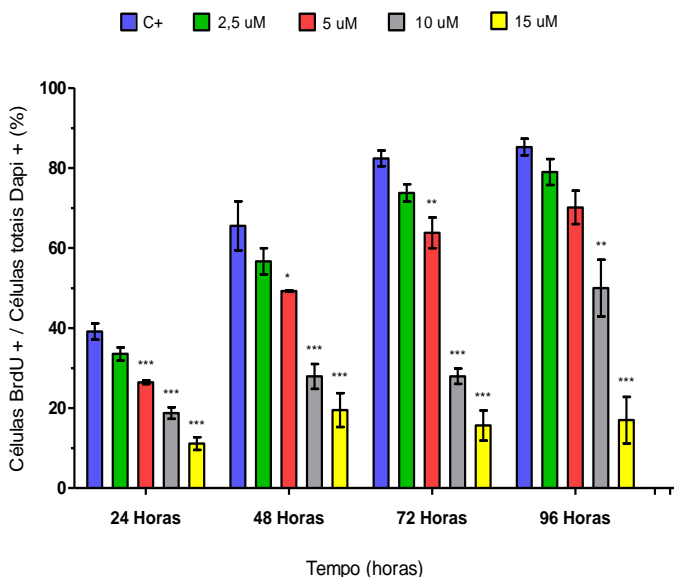
Na figura 16 (comparação do grupo controle positivo e grupo da IC50 do MI) fica evidente o efeito do medicamento na alteração da morfologia normal das CTM. Na imagem B da figura 16, podemos observar que enquanto algumas células são curtas e alargadas, outras células são compridas e delgadas, comprovando a deformação celular observada nas células expostas ao medicamento.

#### **5.4 Interferência do Mesilato de Imatinibe na proliferação celular**

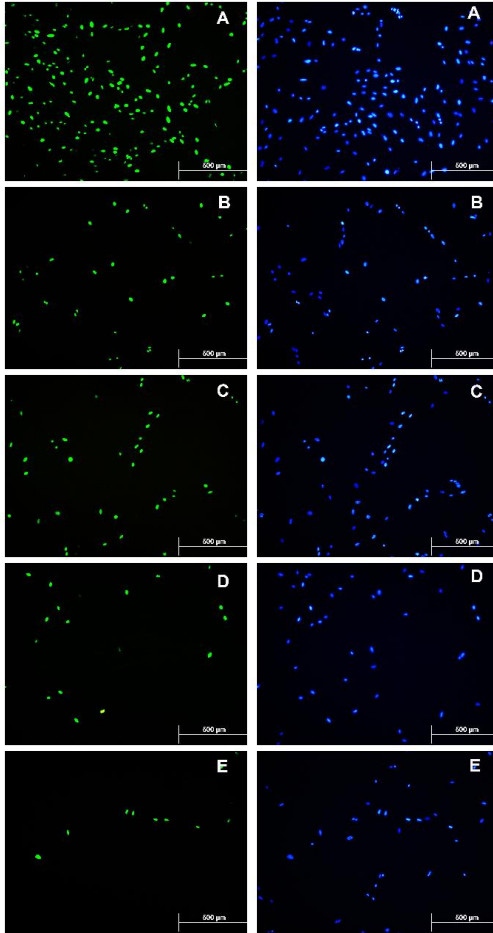
Para avaliar a proliferação celular utilizamos o método de incorporação do BrdU, que é um análogo da timidina e que é incorporado no núcleo das células que estão proliferando, sendo posteriormente detectado com técnica imunocitoquímica. Também foi quantificado o número total de núcleos, através da incorporação de DAPI. Deste modo, foi estabelecida uma relação percentual da taxa de proliferação celular após a quantificação dos núcleos celulares com as fotografias obtidas.

Os resultados estão ilustrados nas figuras 17 e 19 e demonstram inibição da proliferação celular de acordo com as diferentes

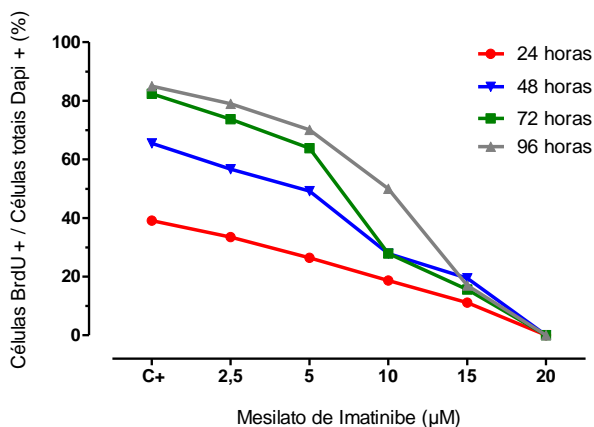
concentrações do medicamento testadas, ou seja, um efeito concentração-dependente. Estes dados indicam um efeito inibitório do MI na proliferação celular, sendo a taxa de proliferação inversamente proporcional à concentração do medicamento. O efeito inibitório do MI na proliferação celular foi estatisticamente significativo principalmente a partir da concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  nos diferentes tempos de exposição avaliados. Para a comparação da influência das variáveis tempo e concentração na proliferação celular, aplicamos a análise estatística de variância (ANOVA) de duas vias. O tempo de exposição ao MI foi responsável por 27,7% da variância total, enquanto que a concentração do medicamento contribuiu com 62,9% desta variância. A variância influenciada pelo tempo e pela concentração foi extremamente significativa na análise da proliferação celular ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que as duas variáveis analisadas e comparadas contribuíram significativamente para o efeito do MI em reduzir a proliferação celular de modo concentração-dependente nas CTM.



**Figura 17. Avaliação da proliferação celular por incorporação do BrdU em células- tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe.** As células foram expostas ao medicamento nos respectivos períodos de tempo e concentrações indicados na figura acima. Após reação imunocitoquímica, os núcleos foram quantificados conforme a incorporação do BrdU, a partir de fotografias representativas obtidas em microscópio de epifluorescência. Cada ponto no gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  demonstram diferença estatística significativa na comparação com o grupo controle através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste t de Tukey.



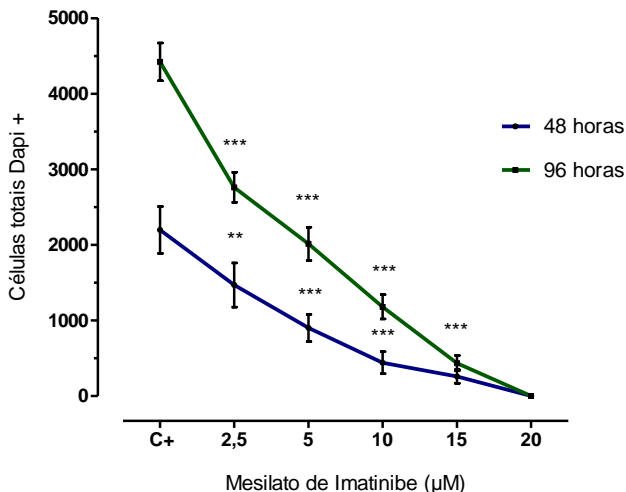
**Figura 18.** Expressão imunocitoquímica de BrdU e DAPI em cultura de células tronco- mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 2 dias. (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do MI). Grupos expostos ao medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência após reação imunocitoquímica. Evidenciados em azul os núcleos DAPI positivos e em verde os núcleos de células proliferando e que captaram o BrdU.



**Figura 19.** Gráfico comparativo da proliferação celular por incorporação do BrdU em células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe. Gráfico de linhas permitindo observar a influência do medicamento na taxa de proliferação de células tronco mesenquimais humanas, ilustrando os mesmos dados da figura anterior, porém, com outro modo de ilustração.

### 5.5 Quantificação de núcleos corados pelo DAPI

Os núcleos corados com o DAPI através de reação imunocitoquímica foram quantificados a partir de fotografias obtidas em microscópio de epifluorescência. Este valor reflete o número total de células nos grupos avaliados. Através da quantificação dos núcleos, observamos um efeito similar do MI tal como o que foi observado no ensaio de viabilidade celular, com uma redução gradual na quantidade de núcleos conforme o progressivo aumento na concentração do medicamento (figura 20). Assim como também observado e descrito no ensaio de viabilidade celular, o MI exibiu um efeito inibitório similar nos dois períodos de tempo estudados.



**Figura 20. Quantificação de núcleos de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe e corados com DAPI.**

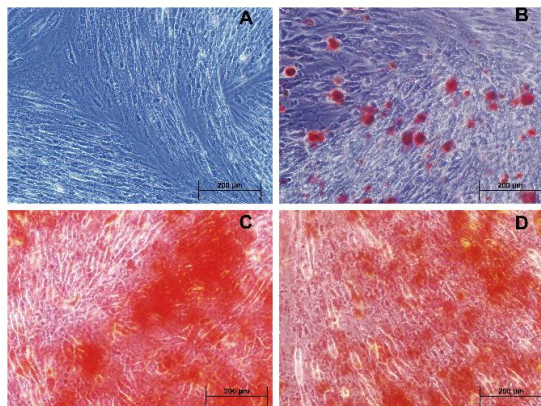
As células foram expostas ao medicamento durante 48 e 96 horas e os núcleos corados pelo DAPI quantificados. Cada ponto no gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão obtido de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferença estatística significativa na comparação com o grupo controle através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste t de Tukey.

## 5.6 Diferenciação celular para osteoblastos

Avaliamos a possibilidade de o medicamento exercer efeito sobre a diferenciação osteogênica das CTM (figura 21). Neste experimento observamos que o MI parece estimular as células no sentido da diferenciação osteogênica, promovendo uma maior deposição de matriz óssea nos grupos expostos ao medicamento, principalmente na concentração de 2,5 µM, e em menor grau na concentração de 5,0 µM. Como o protocolo de diferenciação teve duração mais prolongada que as demais culturas, obviamente as células expostas a concentrações de 10



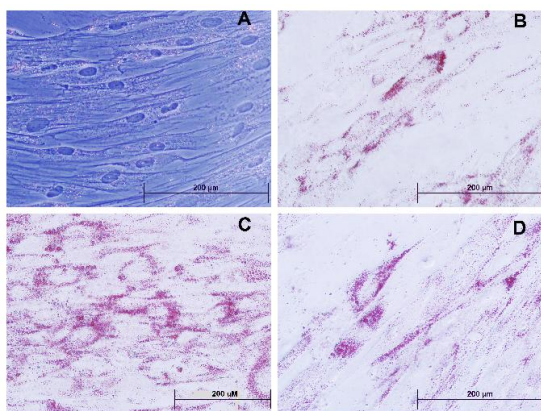
$\mu\text{M}$  e  $15 \mu\text{M}$  do MI resultaram em processo de morte celular antes do término do experimento e, portanto, não estão incluídas na figura abaixo. Foram realizadas culturas controle com e sem meio indutor da diferenciação, justamente para se analisar os resultados com maior confiabilidade.



**Figura 21. Diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteoblastos.** (A) células do grupo controle na ausência do meio indutor da diferenciação e ausência do medicamento; (B) células do grupo controle positivo cultivadas na presença do meio indutor e ausência do medicamento. Grupos expostos ao medicamento: (C)  $2,5 \mu\text{M}$  e (D)  $5,0 \mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais, após aproximadamente 30 dias de cultivo celular para diferenciação. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase e com ampliação de  $200\times$ , após coloração com vermelho de Alizarina evidenciando a deposição de matriz óssea na cultura celular.

## 5.7 Diferenciação celular para adipócitos

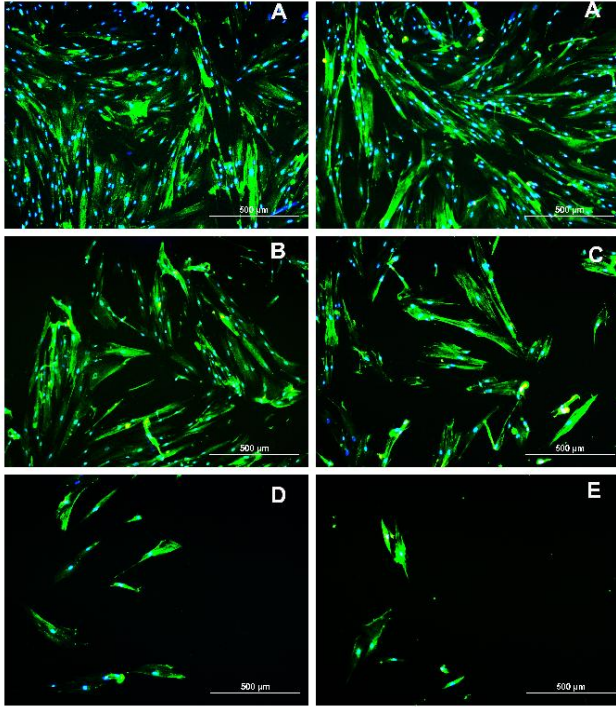
Também avaliamos se o MI poderia interferir na diferenciação das CTM para adipócitos. O efeito observado neste caso foi similar ao observado e comentado no item anterior. O medicamento também parece estimular a diferenciação das CTM em adipócitos, principalmente na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  e em menor proporção na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  (figura 22). Os grupos de células expostos a concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  não possuem fotografias pelas mesmas razões já citadas no item 5.6. Também foram realizadas culturas controle com e sem meio indutor.



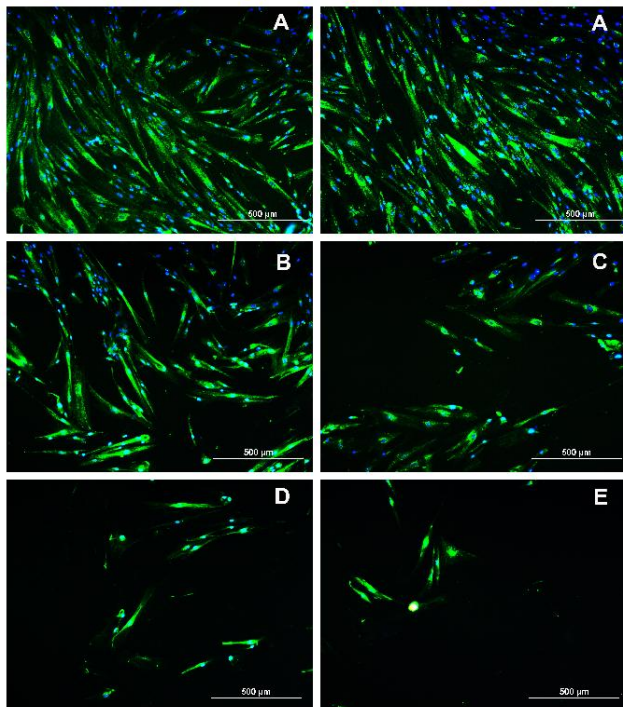
**Figura 22. Diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em adipócitos.** (A) células do grupo controle positivo na ausência do meio indutor da diferenciação e ausência do medicamento; (B) células do grupo controle positivo cultivadas na presença do meio indutor e ausência do medicamento. Grupos expostos ao medicamento: (C) 2,5  $\mu\text{M}$  e (D) 5,0  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais, após cerca de 30 dias de cultivo celular para diferenciação. Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase e com ampliação de 400x, após coloração com solução de Oil Red O evidenciando os vacúolos lipídicos característicos de adipócitos.

## 5.8 Expressão imunocitoquímica de marcadores de pluripotência

Tanto o Nanog como o OCT4 são aplicados como marcadores de pluripotência, ou seja, marcadores expressos em células indiferenciadas e que possuem potencial para gerar outras linhagens de células, uma importante característica das CT. O comportamento da expressão destes marcadores nas células expostas ao medicamento foi praticamente o mesmo. Observamos que com a exposição das células ao MI ocorre uma redução no número de células que expressam estes marcadores, efeito este observado basicamente a partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ , sendo mais evidente na concentração de 15  $\mu\text{M}$  (figuras 23 e 24). Conforme observado nos experimentos de diferenciação em que o MI possivelmente exerce estímulo para que as células modifiquem seu estado indiferenciado para originar uma linhagem celular específica, nesta análise também fica evidente que o MI atua nesta população de células indiferenciadas promovendo redução da quantidade destas células com potencial para diferenciação celular. Entretanto, nas menores concentrações (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ), o MI parece não alterar a proporção de células com características mais indiferenciadas (Nanog e Oct-4 positivas). Comparando os grupos controle e os grupos expostos a 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  do medicamento, observamos somente a redução da quantidade de núcleos (em azul), com a permanência da mesma proporção de células indiferenciadas marcadas nestas faixas de concentração do MI (Nanog e Oct-4 positivas em verde). A partir deste dado, sugerimos que células mais indiferenciadas e imaturas são mais resistentes aos efeitos do medicamento quando comparadas com células possivelmente já diferenciadas e de fenótipo adquirido. Adicionalmente, quando da redução significativa da viabilidade celular das CTM nas concentrações de 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ , podemos justificar que estas células afetadas podem ser principalmente células com provável estágio diferenciado. Estes dados indicam que CTM parcialmente ou totalmente diferenciadas são mais sensíveis aos efeitos do MI, e que nas maiores concentrações pode também haver estímulo do medicamento para a diferenciação das CTM, já que nas maiores concentrações do mesmo houve uma redução na proporção de células Oct-4 e Nanog positivas.



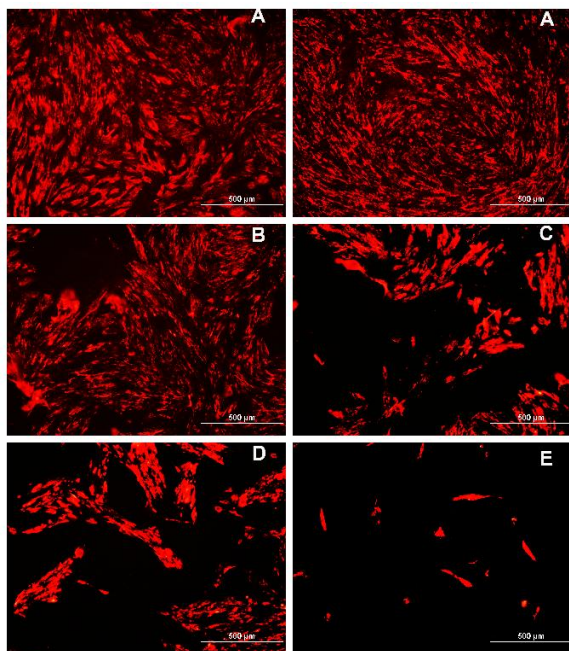
**Figura 23. Expressão imunocitoquímica de Nanog em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias.** (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do medicamento). Grupos expostos ao medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência após reação imunocitoquímica. Evidenciados em azul os núcleos DAPI positivos e em verde a marcação de Nanog.



**Figura 24. Expressão imunocitoquímica de OCT4 em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias.** (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do medicamento). Grupos expostos ao medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência após reação imunocitoquímica. Evidenciados em azul os núcleos DAPI positivos e em verde a marcação de OCT4.

## 5.9 Expressão imunocitoquímica de fibronectina

Na análise da expressão de fibronectina por imunocitoquímica, observamos nas fotografias da figura 25 que o MI pareceu reduzir a expressão imunocitoquímica de fibronectina quando as células foram expostas ao medicamento. Este efeito iniciou a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  e foi mais evidente com 5,0  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  do medicamento, como pode ser observado na comparação com as fotografias do grupo controle. A fibronectina é uma das principais proteínas componentes da matriz extracelular e o MI, neste caso, parece alterar a expressão desta importante proteína de MEC.

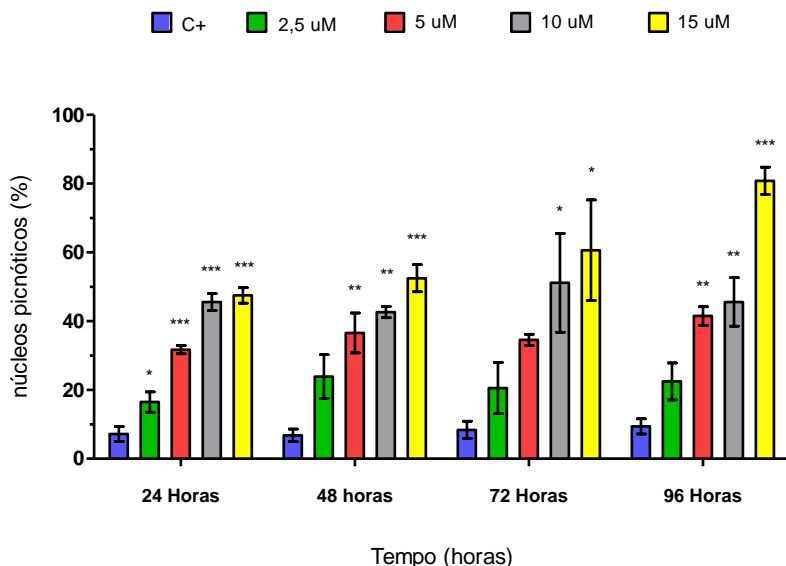


**Figura 25. Expressão imunocitoquímica de fibronectina em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias. (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do medicamento). Grupos expostos ao**

medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência após reação imunocitoquímica. A fibronectina demonstra a marcação na cor vermelha.

### **5.10 Contagem de núcleos picnóticos**

Para avaliar o mecanismo de morte celular evidenciado desde o método do MTT, inicialmente realizamos uma triagem com a quantificação de núcleos picnóticos utilizando os mesmos dados e fotografias dos experimentos da proliferação celular. Uma das alterações que ocorrem e caracterizam o processo de apoptose é a picnose do núcleo das células sendo, portanto, um indício de morte celular por apoptose. Através do gráfico da figura 26, podemos observar que, independente do tempo de exposição das células ao MI, ocorre um aumento progressivo no percentual de núcleos picnóticos a partir de 2,5  $\mu\text{M}$  do MI e que é estatisticamente significativo principalmente a partir da concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  nos diferentes tempos de exposição avaliados. Conforme ocorre aumento na concentração do medicamento há também maior quantidade de núcleos picnóticos associado possivelmente com maior grau de morte celular por apoptose. Portanto, conforme já observado nos resultados da viabilidade celular, é possível que o mecanismo de morte celular que ocorre quando as CTM são expostas ao medicamento seja pelo estímulo de apoptose. Além disso, na comparação das variáveis tempo e concentração com a análise de variância (ANOVA) de duas vias, a concentração do medicamento foi responsável por 85,8% da variância total, enquanto que a variável tempo foi relacionada com apenas 3,6% desta variância. Apenas a variável concentração foi extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na influência da contagem de núcleos picnóticos, demonstrando, portanto, ser a principal variável responsável pelo efeito observado neste resultado.

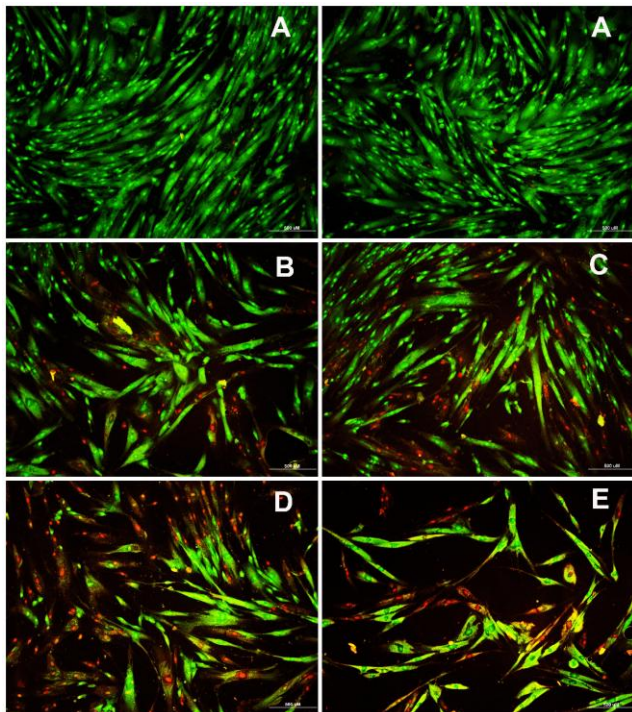


**Figura 26. Quantificação de núcleos picnóticos em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe.** As células foram expostas ao medicamento nos respectivos períodos de tempo e concentrações indicados no gráfico acima. Após reação imunocitoquímica, os núcleos picnóticos foram quantificados a partir de fotografias representativas obtidas em microscópio de epifluorescência. Cada ponto no gráfico representa a média±desvio padrão obtido de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  indicam diferença estatística significativa na comparação com o grupo controle através do teste ANOVA de uma via seguido pelo teste t de Tukey.



### **5.11 Laranja de Acridina/Brometo de Etídio**

Na técnica do LA/BE, podemos observar com maior clareza, na comparação entre o grupo controle e os grupos expostos ao medicamento, que ocorre morte celular em todas as faixas de concentrações do MI. Observando as fotos, parece haver uma maior captação do BE nas células tratadas com 10  $\mu$ M do MI e, portanto, uma maior intensidade de morte celular nesta faixa de concentração (figura 28 - D). Estes dados estão correlacionados com o observado no item anterior, demonstrando que a causa de morte celular nos grupos expostos ao MI seja possivelmente pelo mecanismo de apoptose. Tanto as células como os núcleos alaranjados que captaram o BE caracterizam células em processo de morte celular, provavelmente por apoptose.



**Figura 27. Análise de morte celular com a aplicação do laranja de acridina e brometo de etídio em cultura de células-tronco mesenquimais humanas expostas ao Mesilato de Imatinibe durante 4 dias.** (A) células do grupo controle positivo (cultivadas na ausência do medicamento). Grupos expostos ao medicamento: (B) 2,5  $\mu\text{M}$ ; (C) 5,0  $\mu\text{M}$ ; (D) 10  $\mu\text{M}$ ; (E) 15  $\mu\text{M}$ . Fotografias representativas de três experimentos independentes realizados nas mesmas condições experimentais. Imagens obtidas em microscópio de fluorescência. Em coloração verde células viáveis que captaram o LA e na coloração laranja células e/ou núcleos em processo de apoptose que captaram o BE.

## 6 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm ressaltado e confirmado a hipótese de que diferentes tecidos e órgãos podem ser utilizados como fonte de CTM. A placenta humana, conforme publicado por Zhang e colaboradores (2003), é uma fonte promissora de CTM, que podem ser isoladas e expandidas com sucesso *in vitro*. Em nosso trabalho, os resultados foram consistentes com esta observação e as células foram isoladas de forma satisfatória pelo método de adesão ao plástico, sendo que as mesmas também demonstraram capacidade de expansão *in vitro*, possibilitando a manutenção do cultivo celular por várias passagens e permitindo a obtenção de quantidade suficiente de células para a aplicação em nosso trabalho.

As células isoladas e aplicadas neste trabalho demonstraram características de CTM. Estas características foram consistentes com o que já foi padronizado para a caracterização destas células como CTM, conforme as informações descritas durante o Workshop Internacional de Células Tronco Derivadas da Placenta em 2007 (PAROLINI et al., 2008). As células isoladas neste estudo apresentaram exatamente estas características: morfologia do tipo fibroblastóide (figura 13-A), capacidade de adesão ao plástico; potencial para diferenciar em no mínimo uma linhagem celular de mesoderma, sendo que nossas células foram capazes de diferenciar em osteoblastos e adipócitos (figura 13 - B e C); e também um painel de expressão imunofenotípica consistente com as características das CTM, demonstrando expressão praticamente nula de marcadores hematopoiéticos como o CD45, e expressão positiva dos marcadores CD73, CD90 e CD105 (figura 12). Portanto, as células isoladas e expandidas neste trabalho compartilham destas características sendo caracterizadas como CTM. Conforme Barlow e colaboradores (2008), as CTM isoladas da placenta humana compartilham das mesmas características das CTM isoladas de MO e também podem auxiliar a compreender como o MI atua e interfere nesta população de células essenciais para a hematopoese.

As CTM utilizadas neste trabalho foram isoladas a partir da porção fetal da placenta, na região próxima da inserção do cordão umbilical. Células de origem materna também podem ter sido isoladas, apesar disso alguns trabalhos têm demonstrado que as CTM podem ser

isoladas também a partir da porção materna da placenta, e tanto as células isoladas da parte fetal como da parte materna compartilham das mesmas características, sem demonstrar risco de interferência na população de CTM isoladas (PIETERNELLA et al., 2004).

O MI foi desenvolvido e sintetizado após alguns compostos terem sido identificados e testados *in vitro*, e os mesmos tendo demonstrado baixa eficácia e mínima especificidade, inibindo serina/treonina e tirosinoquinases. Após aperfeiçoar a estrutura química e introduzir novos radicais, o MI foi finalmente sintetizado, apresentando melhor grau de especificidade na inibição de proteínas tirosinoquinases (O'DWYER et al., 2004).

A MO é formada por um estroma composto de diferentes populações celulares e também por uma MEC, os quais juntos constituem o microambiente adequado e que favorece, por exemplo, o controle da quiescência, auto-renovação e diferenciação das CTM, bem como, proliferação, maturação e apoptose das células hematopoiéticas (DAZZY et al., 2006). Apesar disso, não é possível correlacionar essas funções regulatórias com tipos particulares de células no MH, o qual consiste principalmente de macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e adipócitos (HUBIN et al., 2005). A mielotoxicidade pode resultar tanto do efeito direto do medicamento sobre os progenitores hematopoiéticos quanto do efeito sobre as células do estroma medular ou até mesmo interferindo na expressão de citocinas e/ou receptores. Portanto, a especificidade do medicamento aplicado na terapia oncológica é de essencial importância (PESSINA et al., 2003).

Na MO, as CTMs são importantes componentes do nicho das CTH e da hematopoese normal. Apesar de as CTH serem as células-tronco adultas mais estudadas e compreendidas na área da biologia celular, o seu nicho é pouco esclarecido. Estudos recentes demonstraram a existência de dois tipos de nichos de CTH na MO: um nicho endosteal e um nicho perivascular. Células estromais derivadas de CTMs, como os osteoblastos e fibroblastos, estão principalmente envolvidas com o nicho endosteal, localizado no endósteo da trabécula óssea. Junto com as células especializadas que interagem com as CTH, as CTMs estão diretamente envolvidas com a regulação e controle do processo hematopoiético (MEIRELLES et al., 2008).

Informações sobre os efeitos do MI em células da MO normal são escassas. A melhor compreensão dos possíveis efeitos inespecíficos do MI em células normais pode ser de grande relevância, visto que inibidores de tirosinoquinases estão sendo utilizados como terapia de

primeira linha em pacientes com LMC e tumor de estroma gastrointestinal (GIST – do inglês, *gastrointestinal stromal tumors*), e a maioria dos pacientes fica exposta por tempo prolongado a estes agentes (SANCHEZ-GUIJO et al., 2009). Recentemente, foi demonstrado que MI pode afetar severamente as células normais do estroma medular *in vitro*. Esse efeito parece ser parcialmente independente da sinalização via PDGF-R e c-Kit, e parece estar relacionado com o estado proliferativo das células (MELZER et al., 2004). Estes dados são importantes e até limitantes para a administração do MI em situações na qual há aumento da renovação celular no estroma medular, devido à recuperação após intensa quimioterapia e/ou radioterapia (APPEL et al., 2006). Em estudo recente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que há correlação entre a fibrose e vascularização da MO na obtenção da resposta citogenética em pacientes com LMC e tratados com o MI (JESUS; VITURI, 2008). Neste trabalho, o o medicamento promoveu diminuição da produção de fibras reticulares pelas células estromais, sugerindo atuação principal nos fibroblastos. Assim, no presente trabalho, avaliamos os efeitos do MI sobre CTMs normais *in vitro*, de modo a esclarecer e compreender os possíveis efeitos que o medicamento exerce nesta população de células importantes para a hematopoese.

Nos pacientes que utilizam o medicamento, a absorção e biodisponibilidade do mesmo no plasma é influenciada por fatores como: dose, adesão ao tratamento, absorção pelo trato gastrointestinal, variabilidade da atividade de enzimas que metabolizam o medicamento e a interação com a  $\alpha$ -1 glicoproteína ácida (CORTES et al., 2009). A concentração clinicamente significativa do MI corresponde exatamente à concentração plasmática que o mesmo atinge nos pacientes. Para estabelecer as concentrações a serem testadas em nosso estudo, nos baseamos principalmente em trabalhos similares e anteriores, como o trabalho de Bartolovic e colaboradores (2004), que avaliaram concentrações de 0 a 10  $\mu$ M do MI, enquanto que no trabalho de Vittal e colaboradores (2007) as concentrações oscilaram entre 0 e 20  $\mu$ M do MI. Em nosso trabalho as concentrações do medicamento oscilaram de 0 a 15  $\mu$ M.

Conforme estudo de farmacocinética publicado por Cortes e colaboradores (2009), pacientes que utilizam 400 mg/dia do MI atingem concentrações plasmáticas médias de aproximadamente 1000 ng/mL, o que corresponde a 1,7  $\mu$ M do MI para 400 mg/dia, 2,55  $\mu$ M para 600 mg/dia e aproximadamente 3,5  $\mu$ M em pacientes que utilizam 800

mg/dia do medicamento. Larson e colaboradores (2008) também publicaram dados similares e, além disso, relataram que alguns pacientes que utilizaram entre 400 e 600 mg/dia do MI atingiram a concentração plasmática máxima de 2947 ng/mL, que corresponderia a 5,0  $\mu\text{M}$  do MI nestes pacientes. As concentrações alcançadas no plasma dos pacientes podem ser ainda maiores quando da exposição prolongada e/ou devido a problemas de metabolização do medicamento. Além disso, o principal metabólito resultante da biotransformação do MI é um derivado N-desmetilado (CGP74588), o qual apresenta potencial similar ao medicamento *in vitro*, o que poderia prolongar, *in vivo*, os efeitos observados neste trabalho (MARTIN et al., 2002). Portanto, as concentrações clinicamente significativas do MI analisadas neste trabalho foram 2,5 e 5  $\mu\text{M}$ .

Com a finalidade de avaliar o efeito do MI na viabilidade das CTM, realizamos o ensaio do MTT com as células sendo expostas ao medicamento durante 4 dias (figura 14). Observamos em nossos resultados um efeito concentração-dependente do MI na viabilidade das CTM, com redução significativa da viabilidade celular a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  e inibição total com 20  $\mu\text{M}$ . O percentual de células viáveis reduziu 7% com 1,0  $\mu\text{M}$ , 21% com 2,5  $\mu\text{M}$ , 38,8% com 5,0  $\mu\text{M}$ , 59,3% com 10  $\mu\text{M}$ , 85,3% com 15  $\mu\text{M}$  e nenhuma célula viável na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Nos demais experimentos do trabalho, testamos todas estas concentrações do medicamento, exceto a concentração de 1,0  $\mu\text{M}$ , já que esta não apresentou efeito significativo na curva de viabilidade celular. A concentração de 20  $\mu\text{M}$  demonstrou inibição total da viabilidade celular e também não foi aplicada nos demais ensaios. A IC50 calculada após o ensaio do MTT foi de 8,7  $\mu\text{M}$ . Em trabalho publicado por Mueller e colaboradores (2006), pesquisadores isolaram CTM da MO de pacientes normais e avaliaram a viabilidade destas células após 3 dias de exposição a cisplatina, vincristina e etoposide, que são agentes aplicados na terapia de neoplasias hematológicas. A IC50 obtida em nosso trabalho para o MI (8,7  $\mu\text{M}$ ) foi maior que a IC50 da cisplatina (2,0  $\mu\text{M}$ ), vincristina (0,001  $\mu\text{M}$ ) e etoposide (0,2  $\mu\text{M}$ ) relatados neste trabalho. Isso demonstra que o MI representa um menor risco para as CTM quando comparado com estes três agentes quimioterápicos, apesar de que a concentração inibitória de 90% (IC90) da cisplatina (17,4  $\mu\text{M}$ ) e etoposide (41,3  $\mu\text{M}$ ) foram maiores de que a IC90 do MI obtida em nosso estudo (15,6  $\mu\text{M}$ ).

Li e colaboradores (2004) aplicaram a mesma metodologia do MTT para testar a viabilidade de CTM normais expostas a diferentes medicamentos aplicados em regimes quimioterápicos. Após 3 dias de

cultivo celular na presença destes agentes, os resultados apresentaram diferenças quanto à sensibilidade das CTM com os diferentes medicamentos avaliados. Neste trabalho, paclitaxel, vincristina, etoposide, citarabina e altas doses de dexametasona reduziram a viabilidade celular das CTM em mais de 20% em concentrações (1,0  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , respectivamente) que são clinicamente relevantes (58,5%, 57,7%, 31,1%, 25,4% e 30,2%, respectivamente). Estes agentes, assim como o MI, são amplamente aplicados em terapias oncológicas e, de acordo com estes resultados, podem comprometer o MH da MO. Em nosso trabalho, o MI demonstrou um valor de IC50 maior se comparado ao destes medicamentos citados no estudo de Li e colaboradores (2004). Apesar disso, comparando nossos dados com estes citados, ressaltamos que o MI reduz a viabilidade celular em mais de 20% nas CTM a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , a qual é uma concentração clinicamente significativa. Este efeito também demonstra que, apesar de o MI atuar inibindo uma oncoproteína da LMC, ele também exerce efeitos inespecíficos em células normais e que não expressam o cromossomo *Ph*, como as CTM aplicadas neste trabalho e que foram isoladas de pacientes sem diagnóstico de LMC.

Este efeito inespecífico do MI na MO também foi evidenciado em trabalho publicado por Thiele e colaboradores (2005), na qual alterações histopatológicas foram observadas na MO de pacientes com LMC após longo tempo de tratamento com o MI (21 meses). Neste trabalho, foram detectados danos aos constituintes do estroma medular após o tratamento com o MI, demonstrando que o medicamento atua sobre as células leucêmicas, mas também exerce efeitos em outras populações de células normais e que compõem o estroma medular. Estes dados são consistentes com nossos resultados, e demonstram que o MI pode atuar tanto nas células leucêmicas como nas CTM, independente do tempo de exposição ao medicamento, já que em nosso trabalho observamos efeito de inibição da viabilidade celular com 4 dias de exposição das CTM ao MI, e neste último trabalho citado foram demonstrados efeitos histopatológicos na MO após quase dois anos de tratamento e exposição dos pacientes ao MI.

Através da contagem de núcleos corados pelo DAPI (figura 20), observamos efeitos similares aos resultados da viabilidade celular. O medicamento causou redução significativa na contagem de núcleos a partir da concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , com comportamento semelhante nas CTM em 2 e 4 dias de cultivo celular na presença do MI, indicando que

a concentração do medicamento foi uma variável importante na redução da quantidade de núcleos DAPI positivos.

Os resultados da viabilidade celular e da contagem de núcleos DAPI positivos foram consistentes com os achados na análise da morfologia das CTM expostas ao MI durante 4 dias (figuras 15 e 16). Através das fotografias obtidas em microscopia ótica de contraste de fase, podemos observar a expansão e crescimento normal das CTM do grupo controle, as quais atingiram a confluência no cultivo celular. Nos grupos expostos ao MI, evidenciamos uma progressiva redução de CTM a partir do aumento da concentração do medicamento. Ao mesmo tempo em que há redução do número de CTM há também um aumento progressivo na quantidade de restos celulares, um indicativo de morte celular nos grupos expostos ao MI. Estes dados são consistentes com os demais já citados, demonstrando novamente um efeito concentração-dependente do MI na alteração morfológica das CTM. A morfologia normal das CTM é do tipo fibroblastóide, no entanto, com a exposição ao medicamento, as CTM apresentaram alterações na sua morfologia em todas as concentrações do MI, indicando haver algum grau de anormalidade na formação destas células. Expostas ao medicamento, algumas destas células são alongadas e delgadas, enquanto outras são curtas e largas, demonstrando haver perda do equilíbrio da morfologia normal destas células, com uma minoria das células apresentando morfologia normal e fibroblastóide (figura 16). Estes dados podem ser correlacionados com o trabalho de Kemp e colaboradores (2010), que avaliaram os danos de diferentes esquemas de quimioterapia em CTM isoladas da MO de pacientes com diferentes neoplasias hematológicas. Neste estudo, os autores demonstraram que as CTM oriundas de pacientes que receberam quimioterapia apresentaram-se com morfologia arredondada, ao contrário da morfologia normal destas células, a qual é fibroblastóide e alongada.

Na análise de proliferação celular, procuramos avaliar este parâmetro em diferentes tempos de exposição das células ao MI (figura 17). Quando comparados aos grupos controle, os grupos expostos ao medicamento demonstraram que o mesmo reduziu a taxa de proliferação das CTM de modo concentração-dependente. Na maioria dos períodos de tempo avaliados, a redução da proliferação celular foi estatisticamente significativa somente a partir da concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ . Este efeito do MI, reduzindo a capacidade de proliferação das CTM, ficou mais evidente nas maiores concentrações. Nas menores concentrações (2,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ ), a inibição da proliferação das CTM não é estatisticamente significativa. Conforme já citado e comentado no



item 5.4, a variável concentração foi a principal responsável pela redução da proliferação (62,9%), no entanto, a influência da variável tempo também foi extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) para o resultado, demonstrando que as duas variáveis influenciaram o resultado de modo significativo. Apesar de não ser um potente inibidor da proliferação de CTM, fica demonstrado, portanto, que o MI também interfere na proliferação destas células e que, com períodos de exposição mais prolongados, a auto-renovação e o *pool* de CTM na MO poderia ser prejudicado em maior intensidade.

Em trabalho publicado por Vittal e colaboradores (2007), foram obtidos resultados semelhantes com os nossos resultados da proliferação celular. Neste trabalho, o MI inibiu a proliferação de fibroblastos de pulmão fetal humano, com efeito do tipo concentração-dependente (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{M}$  do MI). Neste estudo, a inibição completa da proliferação ocorreu com 20  $\mu\text{M}$  e estatisticamente significativa a partir de 5,0  $\mu\text{M}$  do MI após 48 horas de cultivo celular na presença do medicamento. A partir destas informações e da correlação deste trabalho com o nosso, fica comprovado que o MI não exerce efeitos somente nas células leucêmicas, mas também em outras populações de células, tais como fibroblastos e CTM. Bartolovic e colaboradores (2004) também demonstraram que o MI prejudica a viabilidade e proliferação de progenitores hematopoiéticos CD34+ normais (cromossomo *Ph* negativos) em concentrações similares às testadas em nosso trabalho. No entanto, os progenitores CD34+ parecem ser mais sensíveis aos efeitos do medicamento quando comparados com as CTM e fibroblastos de pulmão fetal humano, sendo estes resultados preocupantes principalmente pelo fato de que atualmente o MI é o agente de primeira linha para o tratamento da LMC e GIST.

Através dos ensaios de diferenciação celular, nossos resultados demonstram que o MI, em baixas concentrações, é capaz de estimular a diferenciação das CTM em osteoblastos. Este dado foi comprovado com a observação da maior deposição de matriz óssea nas culturas expostas a 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$  do medicamento, quando comparadas com os grupos controle (figura 21). Neste protocolo de diferenciação, temos resultados somente destas duas concentrações testadas porque como o protocolo de diferenciação celular é prolongado (aproximadamente 30 dias), as CTM entraram em processo de morte celular nas concentrações mais elevadas do medicamento. Este resultado é consistente com diversos estudos já publicados (TIBULLO et al., 2009; FITTER et al., 2008), inclusive com protocolos de diferenciação semelhantes ao que utilizamos em nosso estudo, porém a interpretação destes resultados e os possíveis

mecanismos deste efeito osteogênico do MI ainda não estão completamente elucidados. Tibullo e colaboradores (2009) demonstraram que, a partir da concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  o MI promove estímulo para diferenciação osteogênica das CTM, além de expressar em maiores níveis marcadores osteogênicos como osteocalcina (OCN – do inglês, *osteocalcin*), proteína morfogenética óssea do tipo 2 (BMP – do inglês, *bone morpho-genetic protein*) e a osteoprotegerina (OPG – do inglês, *osteoprotegerin*). Estes dados confirmam a hipótese de o medicamento estimular a diferenciação das CTM para o fenótipo osteogênico.

A partir destes dados referentes à diferenciação osteogênica, fica demonstrado que o MI pode alterar a homeostase óssea. Promovendo a osteoblastogênese, o medicamento proporciona uma maior mineralização óssea e aumento do volume trabecular nos ossos de pacientes tratados, além de promover um maior *turnover* de minerais, o que poderia estar associado a um quadro de hipofosfatemia sérica em função da maior deposição de matriz óssea. De acordo com evidências experimentais *in vivo*, estas observações podem ser explicadas pelo efeito inibitório do MI na sinalização dos receptores de PDGF, já que o PDGF promove proliferação de osteoblastos e bloqueio da sua diferenciação, e o MI teria um efeito oposto estimulando a diferenciação osteogênica das CTM e sinalizando para uma maior expressão de genes relacionados com esta rota de diferenciação, justamente por inibir a atividade tirosinoquinase e sinalização mediada pelo receptor de PDGF (FITTER et al., 2008).

Ao nível celular, os osteoblastos participam da composição do MH normal na MO e exercem influência importante na regulação das células que participam da hematopoese, já que o conceito atual de nicho das CTH afirma que estas células, na MO, estão em contato direto célula-célula com a região endosteal dos ossos, e os osteoblastos controlando processos celulares como proliferação, diferenciação e migração das CTH na MO (NILSSON et al., 2005). Este estímulo da diferenciação das CTM em osteoblastos proporcionado pelo MI deve ser mais bem estudado e compreendido ao nível celular da MO, para verificar os possíveis efeitos interferentes no processo da hematopoese. Ao mesmo tempo em que o medicamento pode estar promovendo aumento da densidade óssea pode também estar limitando o espaço disponível para o estroma medular e a hematopoese. Este estímulo na diferenciação osteogênica de CTM pode também ser um efeito protetor visando a recuperação deste microambiente da MO lesado após a quimioterapia com o MI, com o objetivo de recuperar a hematopoese

fisiológica após quimioterapia. De acordo com Kollet e colaboradores (2006), os osteoclastos degradam os componentes ósseos e promovem a mobilização de progenitores hematopoiéticos, enquanto que os osteoblastos proporcionam uma maior mineralização óssea e menor poder de migração destes progenitores da hematopoese, já que os progenitores hematopoiéticos ficam em contato com os osteoblastos neste processo. Portanto, com nossos resultados e os dados citados, parece evidente que o MI tem pode influenciar o metabolismo ósseo, estimulando a aquisição do fenótipo osteogênico pelas CTM. Apesar disso, estes efeitos devem ser mais bem avaliados, principalmente para observar as possíveis alterações ósseas que possam ocorrer *in vivo*.

Também analisamos a influência do MI na diferenciação das CTM para o fenótipo adipogênico (figura 22). Os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados já citados para a diferenciação osteogênica. O medicamento estimulou a diferenciação das CTM também para o fenótipo adipogênico, efeito este observado principalmente na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  (figura 22-C). Este estímulo para a diferenciação adipogênica foi evidenciado pela maior quantidade de células contendo vacúolos lipídicos na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$  do MI, quando comparado ao grupo controle. Neste protocolo também não dispomos de resultados das concentrações mais elevadas, já que nestas concentrações as células resultaram em morte celular devido ao experimento ser mais prolongado. De acordo com Gimble (1996), os adipócitos são as células estromais mais frequentes no microambiente da MO, estando relacionados com o funcionamento normal do MH. Algumas hipóteses das funções dos adipócitos na MO já foram descritas, tais como: preenchimento de espaços vazios na MO, tornando esta mais compacta para o contato entre as células; participação no metabolismo lipídico fornecendo uma espécie de reserva energética como suporte da hematopoese; e uma atuação conjunta com outras células componentes da MO na regulação da hematopoese (GIMBLE, 1996).

Os adipócitos, portanto, são componentes normais do MH. Porém, quando sua presença na MO é exacerbada, pode causar um certo prejuízo e comprometimento na hematopoese, já que os adipócitos são relatados também como reguladores negativos da hematopoese porque quando presentes de forma excessiva estes reduzem a atividade hematopoiética devido a substituição de uma MO vermelha e funcional para uma MO amarela, que é gordurosa e pouco funcional no sentido da reposição de células sanguíneas adultas e funcionais (GUREVITCH; SLAVIN; FELDMAN, 2007). Naveiras e colaboradores (2009)

demonstraram evidências de um efeito supressivo dos adipócitos na hematopoese, isto quando presentes em excesso neste microambiente. Os autores demonstraram que uma MO contendo excesso de adipócitos tem menor quantidade de progenitores hematopoiéticos, além da maior quantidade de células quiescentes. Neste mesmo trabalho, camundongos com genes de adipogênese suprimidos demonstraram recuperação hematopoiética mais rápida após irradiação, consolidando evidências de que os adipócitos, quando presentes em grande quantidade na MO, exercem um efeito supressivo e prejudicial para a hematopoese.

A partir destas observações e dos resultados obtidos em nosso estudo, podemos sugerir a hipótese de que as CTM respondem ao MI de forma a adquirir o fenótipo adipogênico. Este efeito foi observado *in vitro*, entretanto, no organismo *in vivo* este efeito poderia estar relacionado com uma tentativa das CTM em responder ao tratamento e reconstituir a MO de forma a facilitar a recuperação da hematopoese fisiológica, ou exercendo um efeito danoso e acelerando a substituição da MO vermelha por MO amarela e comprometendo ainda mais a hematopoese nos pacientes com LMC e que já possuem algum grau de déficit hematológico. Apesar destas hipóteses sugeridas, maiores investigações devem ser direcionadas para a compreensão, *in vivo*, que estes efeitos do MI na diferenciação adipogênica e osteogênica podem gerar nas CTM e na hematopoese.

Trabalhos recentes têm procurado esclarecer os mecanismos pelo qual a característica pluripotente das CT é mantida constante. Fatores de transcrição como o Oct-4 e Nanog, além de outros, têm sido descritos como reguladores deste processo de manutenção do estado pluripotente das CT. Estes fatores também têm sido indicados como promotores de reprogramação das células diferenciadas para um estado indiferenciado (PEI, 2008). Através da análise imunocitoquímica da expressão de Oct-4 (figura 24) e Nanog (figura 23), observamos que com o aumento gradual da concentração do MI há também uma progressiva redução de células que expressam estes marcadores de células indiferenciadas, comprovando que o medicamento atua nesta população de células com potencial para diferenciação em outros tipos celulares. Apesar disso, a redução da quantidade de células indiferenciadas foi observada somente nas maiores concentrações do MI (10 e 15  $\mu\text{M}$ ). Nas menores concentrações (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ), a proporção de células indiferenciadas foi similar na comparação aos grupos controle, sugerindo que as CT indiferenciadas sejam mais resistentes aos efeitos do MI do que células diferenciadas. As figuras 23 (B e C) e 24 (B e C) comprovam estas observações, já que a maioria dos núcleos que são visualizados nos

grupos controle (figuras 23 A e 24 A) não é observada nos grupos expostos ao medicamento, sendo que estes núcleos que não exibiram marcação para Oct-4 e Nanog provavelmente indiquem células já diferenciadas e de fenótipo definido. Outra hipótese para explicar a menor quantidade de células Nanog e Oct-4 positivas nas maiores concentrações do MI (10 e 15  $\mu\text{M}$ ) seria o provável estímulo do medicamento para a diferenciação das CTM, efeito este já observado em nosso protocolo de diferenciação, na qual o MI estimulou a diferenciação das CTM para os fenótipos ósseo e adipogênico.

Também buscamos avaliar a interferência do MI na expressão imunocitoquímica de fibronectina (figuras 25 e 26), a qual é uma das principais proteínas componentes da MEC. Na presença do medicamento, a expressão imunocitoquímica de fibronectina foi reduzida. O que também observamos, através das fotografias de imunocitoquímica, é que o MI também parece afetar a organização estrutural da fibronectina (figura 25). Estes dados são preocupantes, já que na MO o contato entre a fibronectina e as CTH é essencial para a hematopoese normal, pois as proteínas de MEC auxiliam na regulação da hematopoese e este efeito do MI poderia prejudicar a adesão e migração de progenitores hematopoiéticos. Este efeito observado pode ser também justificado como resultado da morte celular que o MI exerce nas CTM. Os resultados obtidos com a análise da fibronectina são consistentes com trabalhos já publicados. Distler e colaboradores (2007) demonstraram que o MI reduz de modo concentração-dependente a síntese de proteínas da MEC, tais como os colágenos tipos 1 e 2 e fibronectina, principalmente a partir da concentração de 1,0  $\mu\text{M}$  do MI em cultura de fibroblastos dermais. Neste trabalho, o efeito inibitório do MI na síntese de componentes de MEC ocorreu devido à inibição da sinalização celular pelo PDGF e fator de crescimento e transformação do tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$  – do inglês, *transforming growth factor  $\beta$* ). Este mecanismo de ação pode auxiliar a explicar o efeito também observado em nosso trabalho. Portanto, o medicamento pode alterar a síntese de componentes de MEC e comprometer o MH na MO, dificultando ainda mais a recuperação da hematopoese fisiológica dos pacientes ou até mesmo facilitando a liberação de células leucêmicas do compartimento da MO para a circulação sanguínea, já que a redução da síntese de fibronectina provavelmente prejudica a adesão dos progenitores hematopoiéticos na MEC da MO.

Em trabalho publicado por Chen e colaboradores (2007), ficou demonstrado que a MEC da MO previne a diferenciação das CTM em osteoblastos. Este dado pode auxiliar a compreender e correlacionar a

redução da expressão de fibronectina com o estímulo para diferenciação osteogênica das CTM expostas ao MI. Em nosso trabalho, observamos que o medicamento interferiu na expressão imunocitoquímica de fibronectina e possivelmente pode comprometer a constituição normal da MEC *in vivo*.

Para compreender o possível mecanismo de morte celular observado nos experimentos anteriores, aplicamos algumas técnicas disponíveis. Pelo fato de o MI ser um agente antineoplásico, levantamos a hipótese de que o principal mecanismo de morte celular seria pelo estímulo de apoptose. Através da contagem de núcleos picnóticos e coloração com laranja de acridina e brometo de etídio, buscamos avaliar a morte celular observada quando da exposição das CTM ao medicamento.

Na contagem de núcleos picnóticos, analisamos o percentual de núcleos com picnose em relação aos núcleos celulares de tamanho normal (figura 27). O MI, em todos os tempos de exposição avaliados, promoveu aumento de núcleos picnóticos de modo concentração-dependente.. Este aumento na contagem de núcleos picnóticos foi estatisticamente significativo principalmente a partir da concentração de 5,0  $\mu\text{M}$  do MI. Na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , o índice de núcleos picnóticos foi de aproximadamente 20%, enquanto que em 5,0  $\mu\text{M}$  este índice ficou próximo de 40%, sugerindo que a redução da viabilidade celular observada em nossos experimentos possivelmente ocorre pelo fato de o medicamento estimular a morte celular apoptose nas CTM, já que o núcleo picnótico é uma das características de células em processo de morte celular por apoptose. Neste resultado, a variável concentração do MI foi a principal responsável pelo efeito observado (85,8%), enquanto que o tempo respondeu por apenas 3,6% da variação total. Além disso, somente a variável concentração teve influência extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) na contagem de núcleos picnóticos. Portanto, a variável concentração foi a principal responsável pelo aumento concentração-dependente de núcleos picnóticos nas CTM expostas ao MI.

Aplicamos também os corantes brometo de etídio e laranja de acridina nas culturas com CTM expostas ao MI. O brometo de etídio tem coloração alaranjada e o laranja de acridina coloração verde. As células viáveis captam somente o laranja de acridina, permanecendo com coloração verde. Nas células inviáveis, pelo defeito na membrana celular das mesmas, o brometo de etídio é captado corando o núcleo e/ou citoplasma das células com coloração alaranjada. Observando a figura 28, concluímos que as células de todos os grupos expostos ao

medicamento captaram o brometo de etídio (células com citoplasma e/ou núcleo alaranjados), enquanto que somente as células do grupo controle captaram somente o laranja de acridina (células esverdeadas). A partir destes resultados, fica evidente que há morte celular, possivelmente por apoptose, em todas as concentrações do MI, o que fica consistente com nossos dados de viabilidade celular, quando houve redução concentração-dependente da viabilidade de CTM expostas ao medicamento, além de comprovar que o mesmo atua em células normais, como as CTM utilizadas em nosso estudo. Os quimioterápicos em geral agredem o organismo em diferentes níveis. Li e colaboradores (2004) demonstraram que citarabina, vincristina, etoposide e placitel apresentam citotoxicidade quando adicionados em culturas de CTM, principalmente após 72 horas de exposição. O medicamento avaliado em nosso trabalho, embora atue no defeito molecular BCR-ABL da LMC, também promoveu morte celular provavelmente pelo estímulo de apoptose em culturas de CTM normais, demonstrando que sua atuação não é essencialmente específica.

Diante dos resultados obtidos em nosso trabalho, relatamos que o MI influencia o comportamento de outras populações de células que constituem o MH, como as CTM avaliadas neste estudo. Todos os efeitos observados e quantificados foram caracterizados como concentração-dependente.

As concentrações clinicamente significativas do medicamento avaliadas neste estudo foram 2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ , no entanto, há a possibilidade de que os efeitos observados sejam mais acentuados em pacientes que utilizam o medicamento por tempo prolongado – anos, por exemplo - já que em nosso trabalho avaliamos um tempo de exposição curto e agudo do MI nas CTM. Estes efeitos demonstrados *in vitro* possivelmente refletem as alterações das CTM da MO observadas também nos pacientes *in vivo*, no entanto, trabalhos mais detalhados *in vivo* devem ser realizados a fim de esclarecer melhor estes efeitos e seus possíveis mecanismos. Apesar da constante evolução no desenvolvimento de agentes cada vez mais específicos no tratamento do câncer, efeitos inespecíficos em células normais continuam sendo observados e são preocupantes. Além disso, os resultados deste trabalho sinalizam para os riscos que, por exemplo, gestantes com diagnóstico de LMC poderiam ser expostas ao utilizar o MI, o qual poderia comprometer o desenvolvimento normal da placenta humana e também o desenvolvimento embrionário. Por demonstrar capacidade em estimular a diferenciação das CTM para o fenótipo ósseo, o MI também

é uma opção a ser estudada para aplicação no tratamento de neoplasias de tecido ósseo, e também em doenças caracterizadas por perda de massa óssea.

Acreditamos que nosso trabalho tenha contribuído de forma positiva e relevante para uma melhor compreensão dos efeitos celulares do MI, em específico no comportamento das CTM, já que são escassos os trabalhos realizados com o propósito de verificar a atuação do mesmo nesta linhagem celular.



## 7 CONCLUSÕES

1. As células-tronco isoladas da placenta humana foram caracterizadas como CTM, por demonstrar morfologia, potencial de diferenciação e marcadores imunofenotípicos condizentes com os já padronizados para a correta identificação destas células.
2. O MI reduziu a viabilidade celular das CTM de modo concentração-dependente com valor de IC50 de 8,7  $\mu\text{M}$ .
3. As CTM apresentaram morfologia alterada em todas as concentrações em que foram expostas ao medicamento.
4. A taxa de proliferação celular foi reduzida de modo concentração-dependente pelo MI.
5. O medicamento estimulou a diferenciação das CTM para os fenótipos adipogênico e osteogênico, principalmente na concentração de 2,5  $\mu\text{M}$ , favorecendo o aparecimento de células adiposas e osteoblastos.
6. O medicamento reduziu a população de células indiferenciadas (Oct-4 e Nanog positivas) somente nas maiores concentrações (10 e 15  $\mu\text{M}$ ). Assim, sugerimos que as células indiferenciadas pareceram ser mais resistentes aos efeitos do MI quando comparadas a células possivelmente já diferenciadas, isso nas menores concentrações (2,5 e 5,0  $\mu\text{M}$ ).
7. A expressão imunocitoquímica de fibronectina foi reduzida nas CTM expostas ao MI, indicando que o medicamento pode também comprometer os constituintes normais da MEC.
8. As CTM expostas ao MI demonstraram aumento concentração-dependente no percentual de núcleos picnóticos e captaram o corante Brometo de Etídio, comprovando que houve morte celular em todas as faixas de concentração a que as CTM foram expostas ao medicamento, possivelmente pelo mecanismo de apoptose.
9. O MI demonstrou não ser específico para inibição da sinalização BCR-ABL, afinal as CTM utilizadas em nosso estudo foram

células saudáveis e que provavelmente não expressaram esta oncoproteína. O efeito inespecífico do medicamento nas CTM provavelmente resultou da modulação de diferentes proteínas e receptores do tipo tirosinoquinase presentes nesta população de células.

## 8 REFERENCIAS

ABBOTT, N. J; RÖNNBÄCK, L; HANSSON, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, p. 41-53. 2006.AKIVA, J.M;

ALVAREZ-SILVA, M., et al. Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5437-5444, 2003.

APPEL, S., et al . Effects of imatinib on normal hematopoiesis and immune activation. **Stem Cells**, v. 23, n. 8, p. 1082-1088, 2005.

BACIGALUPO, A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 17, n. 3, p. 387-399, 2004.

BARLOW, S., et al. Comparison of human placenta – and bone marrow – derived multipotent mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v.17, p. 1095-1108, 2008.

BARTOLOVIC, K., et al. Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro. **Blood**, v.103, n. 2, p. 523-529, 2004.

BENNASROUNE, A., et al. Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 50, p. 23-38, 2004.

BERGANTINI, A.P., et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 2, p. 120 -125, 2005.

BIANCO, P; ROBEY, P.G; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313–319, 2008.

BRANDFORD, S., et al. Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate binding loop (P-

loop) are associated with a poor prognosis. **Blood**, v. 102, n. 1, p. 276-283, 2003.

BRAVE, M., et al. Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 2, p. 352-359, 2008.

CAI, J; WEISS, M. L; RAO, M.S. In search of "stemness". **Experimental Hematology**, v. 32, n. 7, p. 585-598, 2004.

CAO, J., et al. Effects of adjuvant chemotherapy on bone marrow mesenchymal stem cells of colorectal cancer patients. **Cancer Letters**, v. 263, n. 2, p. 197-203, 2008.

CAPLAN, A. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 341-347, 2007.

CARLO-STELLA, C., et al. Effect of chemotherapy for acute myelogenous leukemia on hematopoietic and fibroblast marrow progenitors. **Bone Marrow Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 465-471, 1997.

CARRARA, R.C.V., et al. Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not Express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 57-67, 2007.

CHAMBERLAIN, G., et al. Concise Review: Mesenchymal stem cells: Their Phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v. 25, p. 2739-2749, 2007.

CHEN, X.D., et al. Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cells Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells and Prevents Their Differentiation Into Osteoblasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 12, p. 1943-1956, 2007.

CHU, S., et al. Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic

remission on imatinib mesylate treatment. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2093-2098, 2005.

COLTER, D. C., et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **PNAS**, v. 97, n. 7, p. 3213-3218, 2000.

CORTES, J.E., et al. Pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation and blood-level testing in imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. **Leukemia**, v. 23, p. 1537 – 1544, 2009.

COVAS, D. T., et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

CRISAN, M., et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, p. 301-313, 2008.

DALE, W. Fetal Stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

DALE, W. Fetal Stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

DALEY, W.P; PETERS, S.B; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 3, p. 255-264, 2008.

DAZZI, F., et al. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. **Blood Reviews**, v. 20, n. 3, p. 161-171, 2006.

DEININGER, M.W.N; GOLDMAN, J.M; MELO, J.V.. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DE LIMA PRATA, K., et al. Effects of high-dose chemotherapy on bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells isolated from lymphoma patients. **Experimental Hematology**, v. 38, p. 292-300, 2010.

DEVINE, S. M; HOFFMAN, R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 6, p. 358-363, 2000.

DEXTER, T. M; ALLEN, T. D; LAJTHA, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **Journal of Cell Physiology**, v. 91, n. 3, p. 335-344, 1977.

DEWAR, A.L., et al. Imatinib inhibits the in vitro development of the monocyte/macrophage lineage from normal human bone marrow progenitors. **Leukemia**, v.17, p. 1713-1721, 2003.

DISTLER, J., et al. Imatinib Mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 1, p. 311-322, 2007.

DOBBIN, J.A; GADELHA, M. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 429-438, 2002.

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

ERICES, A; CONGET, P; MINGUELL , J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical Cord blood. **British Journal of Haematology**, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000.

FADERL, S., et al. Chronic Myelogenous Leucemia: Biology and Therapy. **Annals of Internal Medicine**, v. 131, n. 3, p. 207-219, 1999.

FAUSEL, C. Target chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 13, n. 8, p. 8-12, 2007.

FITTER, S., et al. Long-term imatinib therapy promotes bone formation in CML patients. **Blood**, v. 111, n. 5, p. 2538-2547, 2008.

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

FRIEDENSTEIN, A. J; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A. J; CHAILAKHJAN, R. K; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FUCHS, E; TUMBAR, T; GUASCH, G. Socializing with the neighbors stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004.

FUNKE, V.A.M., et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: A study of 98 cases. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, p. 159- 165, 2005.

GIMBLE, J.M; ROBINSON, C.E; KELLY, K.A. The function of adipocytes in the bone marrow stroma: An update. **Bone**, v. 19, n. 5, p. 421-428, 1996.

GOLEMOVIC, M., et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 11, p. 4941-4947, 2005.

GRASSEL, S; AHMED, N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 4946-4956, 2007.

GREGORY, C., et al. Dkk-1-derived synthetic peptides and lithium chloride for the control and recovery of adult stem cells from bone marrow. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 3, p. 2309-2323, 2005.

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

GUILHOT, F. Indications for imatinib mesylate therapy and clinical management. **The Oncologist**, v. 9, n. 3, p. 271-281, 2004.

GUREVITCH, O; SLAVIN, S; FELDMAN, A.G. Conversion of red marrow into yellow – cause and mechanisms. **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 531-536, 2007.

HEHLMANN, R; HOCHHAUS, A; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. **Lancet**, v. 370, p. 342-350, 2007.

HOCHHAUS, A; ROSÉE, P. Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. **Leukemia**, v. 18, p. 1321-1331, 2004.

HOFFBRAND, A.V; PETIT, J.E; MOSS, P.A. Genética das Doenças Hematológicas Malignas. In: **Fundamentos em Hematologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 153-169, 2004.

HOLTZ, M., et al. Imatinib mesylate (STI571) inhibits growth of primitive malignant progenitors in chronic myelogenous leukemia through reversal of abnormally increased proliferation. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3792- 3800, 2002.

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

HUBIN, F., et al. Murine Bone Marrow Stromal Cells Sustain In Vivo the Survival of Hematopoietic Stem Cells and the Granulopoietic Differentiation of More Mature Progenitors. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1626-1633, 2005.

HUNTLY, B.J.P; GILLILAND, D.G. Summing up cancer stem cells. **Nature News**, v. 435, p. 1169-1170, 2005.

ILANCHERAN, S; MOODLEY, Y; MANUELPIILLAI, U. Human Fetal Membranes: A Source of Stem Cells for Tissue Regeneration and Repair? **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 2-10, 2009.

JABBOUR, E., et al. Current and Emerging Treatment Options in Chronic Myeloid Leukemia. **Cancer**, v. 109, n. 11, p. 2171-2181, 2007.



JABBOUR, E; CORTES, J; KANTARJIAN, H. Target therapy in chronic myeloid leukemia. **Current Clinical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 99-110, 2008.

JANG, Y. K., et al. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. **Annals of Hematology**, v. 85, n. 4, p. 212-225, 2006.

JAVAZON, E; BEGGS, K; FLAKE, A. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 414-425, 2004.

JESUS, C.R; VITURI, C.L. Avaliação de parâmetros laboratoriais e clínicos de pacientes portadores de leucemia mielóide crônica submetidos ao tratamento com mesilato de imatinibe e sua relação com alterações observadas no estroma da medula óssea. Resumo de Tese. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 342-343, 2008.

KADEREIT, S., et al. Expansion of LTC-ICs and maintenance of p21 and BCL-2 expression in cord blood CD34(+)/CD38(-) early progenitors cultured over human MSCs as a feeder layer. **Stem Cells**, v. 20, n. 6, p. 573-582, 2002.

KANTARJIAN, H., et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 645-652, 2002.

KANTARJIAN, H.M., et al. Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 1089-1097, 2007.

KEMP, K., et al. Chemotherapy-induced mesenchymal stem cell damage in patients with hematological malignancy. **Annals of Hematology**, v. 89, n. 7, p. 701-713, 2010.

KOLLET, O., et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 657-664, 2006.

LAKSHMIPATHY, U; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, v. 19, n. 1, p. 29-38, 2005.

LARSON, R.A., et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. **Blood**, v. 111, p. 4022-4028, 2008.

LAZENNEC, G; JORGENSEN, C. Concise Review: Adult Multipotent Stromal Cells and Cancer: Risk or Benefit? **Stem Cells**, v. 26, n. 6, p. 1387-1394, 2008.

LI, J., et al. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. **British Journal of Haematology**, v. 127, n. 3, p. 326-334, 2004.

MAJUMDAR, M. K., et al. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. **Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research**, v. 9, n. 6, p. 841-848, 2000.

MARIN, D., et al. The use of imatinib (STI571) in chronic myeloid leukemia: some practical considerations. **Haematologica**, v. 87, n. 9, p. 979-988, 2002.

MARTIN, H.C., et al. Approval Summary for Imatinib Mesylate Capsules in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 935-942, 2002.

MAURO, M.J., et al. STI571: A Paradigm of New Agents for Cancer Therapeutics. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 1, p. 325-334, 2002.

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

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

MELZER, D., et al. Imatinib mesylate (STI571) considerably affects normal human bone marrow stromal cell growth in vitro. **Blood**, v. 104, Abstract 2330, 2004.

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

MORRISON, S.J; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 29, p. 1068 – 1074, 2006.

MUELLER, L., et al. Presence of Mesenchymal stem cells in human bone marrow after exposure to chemotherapy: evidence of resistance to apoptosis induction. **Stem Cells**, v. 24, n. 12, p. 2753-2765, 2006.

NAVEIRAS, O., et al. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. **Nature**, v. 460, p. 259-263, 2009.

NILSSON, S.K., et al. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitors cells. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1232-1239, 2005.

O'DWYER, M.E., et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with Imatinib mesylate. **Blood**, v. 103, n. 2, p.451-55, 2004.

OWEN, M; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation Symposium**, v. 136, p. 42-60, 1988.

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**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PEI, D. Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 6, p. 3365-3369, 2009.

PESSINA, A., et al. Application of the CFU-GM assay to predict acute drug-induced neutropenia: an international blind trial to validate a prediction model for the maximum tolerated dose (MTD) of myelosuppressive xenobiotics. **Toxicological Sciences**, v. 75, n. 2, p.355-367, 2003.

PHINNEY, D.G. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cells populations. **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2884-2889, 2007.

PIETERNELLA, S., et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, 2004.

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

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

RANDOLPH, T.R. Chronic myelocytic leukemia-Part I: History, clinical presentation, and molecular biology. **Clinical Laboratory Science**, v. 18, n.1, p. 38-48, 2005.

SABATINI, F., et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, v. 85, p. 962-971, 2005.

SANCHEZ-GUIJO, F.M., et al. Effects of imatinib mesylate on normal bone marrow cells from chronic myeloid leukemia patients in complete cytogenetic response. **Leukemia Research**, v. 33, n. 1, p. 170–173, 2009.

SANTOS, F.P.S; RAVANDI, F. Advances in treatment of chronic myelogenous leukemia – new treatment options with tyrosine kinase inhibitors. **Leukemia and Lymphoma**, v. 50, n. 2, p. 16-26, 2009.

SAVAGE, D.G; ANTMAN, K.H. Imatinib mesylate – a new oral targeted therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 346, p. 683-693, 2002.

SOUZA, C.A. Leucemia Mielóide Crônica – Novas drogas em desenvolvimento. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 1, p. 32-36, 2008.

TAGAMI, M., et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and Tissue Research**, v. 312, n. 1, p. 31-40, 2003.

TEFFERI, A., et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, n. 3, p. 390-402, 2005.

THIELE, J., et al. Bone marrow changes in chronic myelogenous leukemia after long-term treatment with the tyrosine kinase inhibitor STI571: na immunohistochemical study on 75 patients. **Histopathology**, v. 46, n. 5, p. 540-550, 2005.

TIBULLO, D., et al. Effects of imatinib mesylate in osteoblastogenesis. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 4, p. 461-468, 2009.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

VITTAL, R., et al. Effects of the Protein Kinase Inhibitor, Imatinib Mesylate, on Epithelial/Mesenchymal Phenotypes: Implications for Treatment of Fibrotic Diseases. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 321, N 1321, p. 35–44, 2007.

YOUNG, H.E., et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

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

ZHANG, Y., et al. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34+ cells. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 7, p. 657-664, 2004.

ZUK, P.A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

## 9 ANEXOS

## Anexo A - Termo de consentimento livre e esclarecido das gestantes participantes do estudo



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

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: Expansão *ex vivo* de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica.

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

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Geremias, Maristela Martini, Evelyn Wintler, Lisiane Paynussal, Maria Cecília Kohler, Rossana Simão, Ellen Marcelina Spillere, Iris Mattos Santos

Estamos desenvolvendo Projeto de Pesquisa envolvendo a utilização de células tronco hematopoiéticas (CTHs) e células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta. Estas células são importantes para os transplantes e recuperação do sangue nos casos de leucemias e em tumores malignos. Entretanto algumas dificuldades são observadas: 1) baixo número de doadores disponíveis; 2) a compatibilidade do doador com o receptor; 3) baixo número de CTHs no sangue do cordão umbilical. Neste projeto esperamos fazer um enriquecimento em CTHs para a sua utilização clínica. É possível se obter células tronco mesenquimais (CTMs) do cordão umbilical e da placenta. As CTMs podem formar tecidos como muscular, sanguíneo e neural. Neste projeto estamos interessados em obter e amplificar *ex vivo* CTHs humanas de cordão umbilical/placenta de neonatos a termo, assim como obter, caracterizar e re-programar CTMs obtidas mesmo tecido. Investigaremos também como células-tronco mesenquimais obtidas de placenta/cordão umbilical, podem melhorar a amplificação de CTHs *in vitro*. Esperamos que esta pesquisa traga benefícios, como o aumento no sucesso de procedimentos como transplante de medula óssea. A placenta/cordão umbilical obtida será processada no Laboratório as CTHs e CTMs, onde isolaremos as células e manteremos em cultura para testarmos qual o melhor metodologia de amplificação destas células. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: 48 333 16905, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, posso garantir que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior procedimento.

Pesquisador Responsável: Marcio Alvarez Silva

Pesquisador Principal: Maria Cecilia Kohler

Eu Sergio Swers, fui esclarecido (a) sobre a Pesquisa "Expansão *ex vivo* de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica" e concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical, e que meus dados seja utilizadas, na realização da pesquisa.

Florianópolis, 20 de março de 2009.

Assinatura: Sergio Swers

RG: 9 304 4226



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

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

TÍTULO DO PROJETO: Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica.

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

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Talita da Silva Geremias, Maristela Martini, Evelyn Winter, Lisiane Paynussat, Maria Cecilia Kohler, Rossana Simão, Ellen Marcelina Spillere, Iris Mattos Santos

Estamos desenvolvendo Projeto de Pesquisa envolvendo a utilização de células tronco hematopoiéticas (CTHs) e células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta. Estas células são importantes para os transplantes e recuperação do sangue nos casos de leucemias e em tumores malignos. Entretanto algumas dificuldades são observadas: 1) baixo número de doadores disponíveis; 2) a compatibilidade do doador com o receptor; 3) baixo número de CTHs no sangue do cordão umbilical. Neste projeto esperamos fazer um enriquecimento em CTHs para a sua utilização clínica. É possível se obter células tronco mesenquimais (CTMs) do cordão umbilical e da placenta. As CTMs podem formar tecidos como muscular, sanguíneo e neural. Neste projeto estamos interessados em obter e amplificar ex vivo CTHs humanas de cordão umbilical/placenta de neonatos a termo, assim como obter, caracterizar e re-programar CTMs obtidas mesmo tecido. Investigaremos também como células-tronco mesenquimais obtidas de placenta/cordão umbilical, podem melhorar a amplificação de CTHs in vitro. Esperamos que esta pesquisa traga benefícios, como o aumento no sucesso de procedimentos como transplante de medula óssea. A placenta/cordão umbilical obtida será processada no Laboratório as CTHs e CTMs, onde isolaremos as células e manteremos em cultura para testarmos qual o melhor metodologia de amplificação destas células. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: 48 333316905, Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular.

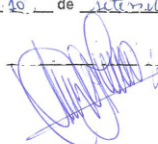
Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, posso garantir que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior procedimento.

Pesquisador Responsável: Diana Beck

Pesquisador Principal: Marcio Alvarez Silva

Eu Micheli F. G. Moura, fui esclarecido (a) sobre a Pesquisa "Expansão ex vivo de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica" e concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical, e que meus dados seja utilizadas, na realização da pesquisa.

Florianópolis, 10 de setembro de 2000.

Assinatura:  Alex G. Moura RG: 09459586-1





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
LABORATÓRIO DE CÉLULAS TRONCO E REGENERAÇÃO TECIDUAL  
BEG-CCB

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

TÍTULO DO PROJETO: Expansão *ex vivo* de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL (ORIENTADOR): Prof. Márcio Alvarez da Silva

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Maristela Martini, Diego Amarante da Silva, Diana Heck, Sarah Carneiro, Mariane Dahmer

Estamos desenvolvendo um Projeto de Pesquisa envolvendo a utilização de células tronco hematopoiéticas (CTHs) e células tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta. Estas células são importantes para transplantes e recuperação do sangue nos casos de leucemias e tumores malignos. Entretanto algumas dificuldades são observadas: 1)baixo número de doadores disponíveis; 2)a compatibilidade do doador com o receptor; 3)baixo número de CTHs no cordão umbilical. Neste projeto esperamos fazer um enriquecimento em CTHs para a sua utilização clínica. É possível se obter CTMs do cordão umbilical e da placenta. As CTMs podem formar tecidos como muscular, ósseo, sanguíneo e neural. Neste projeto estamos interessados em obter e amplificar *ex vivo* CTHs humanas de cordão umbilical/placenta de neonatos a termo, assim como obter, caracterizar e re-programar CTMs obtidas do mesmo tecido. Investigaremos também como CTMs obtidas de placenta/cordão umbilical podem melhorar a amplificação de CTHs *in vitro*. Esperamos que esta pesquisa traga benefícios, como o aumento no sucesso de procedimentos como transplante de medula óssea. A placenta/cordão umbilical obtida será processada no Laboratório, onde isolaremos as células e manteremos em cultura para testarmos qual a melhor metodologia de amplificação destas células. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: (48) 33316905, Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT).

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, posso garantir que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior procedimento.

Pesquisador responsável: Diego Amarante da Silva

Pesquisador principal: Márcio Alvarez

Eu Daniela Carolina F. da Silva, fui esclarecido(a) sobre a Pesquisa "Expansão *ex vivo* de células tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica" e concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical e que meus dados sejam utilizados na realização da pesquisa.

Florianópolis, 02 de março de 2013.

Assinatura: Daniela Carolina F. da Silva RG: S. da Silva