

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**POLIANA RODRIGUES ALVES**

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE  
CARDIOESFERAS DE CAMUNDONGOS CD1**

Uberlândia

2013

POLIANA RODRIGUES ALVES

**ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS DERIVADAS DE  
CARDIOESFERAS DE CAMUNDONGOS CD1**

Dissertação de mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde, da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal de Uberlândia, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende.

Co-orientação: Profa Dra. Adriana Bastos  
Carvalho.

Uberlândia

2013

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Poliana Rodrigues Alves

### **Isolamento, cultivo e caracterização de células derivadas de cardioesferas de camundongos CD1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em ciências da saúde.

Aprovado em 28 de fevereiro de 2013.

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Elmiro Santos Resende – FAMED/ UFU

Orientador

---

Prof. Dra. Patrícia Fidelis de Oliveira – Unesp/ Botucatu

Membro da banca examinadora

---

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti – ICBIM/ UFU

Membro da banca examinadora

---

Prof. Dr. José Roberto Mineo – ICBIM/ UFU

Membro suplente da banca examinadora

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Aldaci Rodrigues Alves e José  
Mateus Alves, pelo amor  
incondicional e incentivo constante.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me conceder a vida, familiares e amigos!!! Obrigada Senhor!

Aos meus pais pelo amor, educação e incentivo constante!

Aos meus familiares e amigos por todo apoio e compreensão.

Ao Fabrício, pelo constante carinho, presença e incentivo.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Elmiro Santos Resende, agradeço sua confiança e paciência, é um privilégio poder trabalhar e conviver com o Senhor. Muito Obrigada por todos seus constantes ensinamentos, fundamentais em minha formação pessoal e científica, e por tornar viável a realização deste trabalho. Muito Obrigada...

A minha co-orientadora Professora Dra. Adriana B. Carvalho, pelo incentivo, aprendizado e parceria, muito importante para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wilson Felipe Pereira, primeiro orientador, grande incentivador. MUITÍSSIMO obrigada por cada momento de aprendizado!!!

Ao querido primo José Martins por viabilizar meu primeiro contato com o LCCM!!! Obrigada!

Sra. Ivone e Sr. José F, pelo carinho e confiança com que me acolheram em sua casa, MUITO OBRIGADA!

À amigas e companheiras constantes de trabalho grandes incentivadoras Silvana Andrade, Maria Inês Bernardes e Elaine Silvério, Muito Obrigada!!!

Aos amigos Jeovane, Fernanda, Thiago e Fernando, muito obrigada pelo apoio!!

Aos Laboratórios de Imunologia e Histologia da UFU pelo constante apoio e parceria. Muito Obrigada!

Aos alunos da iniciação científica, parceiros e amigos Débora Chagas, Lucas Cota e Mariana Gregório, obrigada por toda ajuda e apoio, estarei sempre torcendo por vocês!!

A toda a equipe do Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica da UFRJ, por me acolherem e contribuírem de forma significativa em minha formação científica.

A amiga Susana K. Abreu, por sua importante contribuição e ensinamentos, grande incentivadora, um exemplo de trabalho e dedicação. Muito obrigada!!

A Taís Kasai-Brunswick, Débora Mello e Victor Resende, pelo apoio e contribuição, muito obrigada!

Aos Professores do Curso de Graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Uberlândia, que muito contribuíram em minha formação acadêmica!!

Aos Professores da Pós Graduação em Ciências da Saúde/ UFU, pelos bons momentos de aprendizado.

A FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

*“A vida sem luta é um mar  
morto no centro do organismo  
universal.”*

*Machado de Assis*

## RESUMO

Alves, P.R. Isolamento, cultivo e caracterização de células derivadas de cardioesferas de camundongos CD1 (Mestrado em Ciências da Saúde – Pós Graduação em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina – UFU.

No Brasil, como em todo o mundo, as doenças cardiovasculares têm sido uma das principais causas de morte. A alta mortalidade e as poucas alternativas terapêuticas para estas doenças têm estimulado a investigação no campo das células estaminais. Recentemente, alguns grupos têm mostrado a presença de células-tronco/progenitoras residentes no coração. Estas poderiam ser cultivadas diretamente a partir de tecidos cardíacos produzindo aglomerados esféricos denominados Cardioesferas as quais, contém células proliferativas que dão origem, após o plaqueamento, a uma população heterogênea denominada: células derivadas de cardioesferas (CDCs). O objetivo deste estudo foi isolar, cultivar e caracterizar as CDCs de camundongos da linhagem CD1. Para isto, as células primárias foram isoladas a partir de corações de camundongos adultos da linhagem CD1 após a digestão de pequenos fragmentos do órgão em colagenase tipo II 420U/ml por 20 minutos a 37°C. Nas análises por citometria de fluxo (FACS) foram observadas baixa expressão das moléculas de CD19 (0,4%), CD45 (0,5%) e CD90 (4,7%), e alta expressão das moléculas CD73 (71,4%), CD105 (25,1%), CD14 (25,1%). Nos ensaios de imunofluorescência foi possível observar a expressão das proteínas no citoplasma dos cardiomiócitos: vimentina, desmina e alfa actina de músculo liso, além da expressão do filamento intermediário nestina. Ao analisar a expansão celular por *population doubling time* foi observado que as CDCs duplicaram sua população original em cerca de 1,8 dias. Estes resultados sugerem que as CDCs isoladas a partir de camundongos da linhagem CD1, são células que apresentam características de células mesenquimais, constituindo uma população celular a ser testada nos estudos em terapias celulares. Estes resultados motivam o estabelecimento de protocolos que visem investigar possíveis efeitos parácrinos benéficos, bem como o potencial angiogênico e cardiogênico destas células.

Palavras-chave: Células Derivadas de Cardioesferas. Células tronco cardíacas. Caracterização.



## **ABSTRACT**

**Alves, P.R. Isolation, culture and characterization of cardiospheres-derived cells from CD1 mice** (Master of Health Sciences-College of Medicine-UFU)

In Brazil, as in the world, cardiovascular diseases have been a major cause of death. The high mortality and few therapeutic alternatives for this disease have stimulated research on the stem cell field. Recently some groups have shown the presence of resident stem cells in the heart that can generate new cardiomyocytes. However, the cardiac stem cells exist in small amounts in vivo and their isolation and ex vivo expansion is a challenge for clinical use. In this study, our goal was to isolate, characterize and grow cardiosphere-derived cells from CD1 mice. Surface molecules present in these cells were analyzed by flow cytometry and expression of cytoplasmic proteins was analyzed by immunofluorescence. Primary cells were isolated from the hearts of adult mice after digestion of the organ into small pieces using 420U/ml of collagenase II in four cycles of 5 minutes at 37°C. Subsequently, cells were maintained in culture in an incubator at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for approximately 3 weeks. The immunofluorescence assays and flow cytometry were performed between passages 3 and 5 which 0.25% trypsin was used. The cells expressed the following proteins in their cytoplasm: vimentin, desmin, nestin and  $\alpha$ -smooth muscle actin and population doubling time was 1.8 days. Additionally, flow cytometry showed low expression of the molecules CD19 (0.4), CD45 (0.5) and CD90 (4.77), and higher expression of CD73 (71.47), CD105 (25.1), CD14 (25.17). These results suggest that the CDC isolated from CD1 mice are cells with a mesenchymal phenotype, but their beneficial potential in cardiac repair remains to be tested.

**Key words:** CDCs. Cardiac Stem Cells. Characterization.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aspecto morfológico das células derivadas do tecido cardíaco.....	24
<b>Figura 2.</b> Aspecto morfológico das <i>Phase bright cells</i> .....	25
<b>Figura 3.</b> Aspecto morfológico das cardioesferas.....	26
<b>Figura 4.</b> Aspecto morfológico das células derivadas de cardioesferas (CDCs).....	27
<b>Figura 5.</b> Campos representativos relacionando os dias pós- <i>plaqueamento</i> com a densidade celular.....	28
<b>Figura 6.</b> Curva exponencial positiva representando a quantidade de CDCs contadas por mm <sup>2</sup> e relacionada aos dias de ensaio do <i>population doubling time</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Tempo que a população de células levou para dobrar de tamanho (PDT) obtido ao calcular o inverso do coeficiente angular da reta por meio da transformação em escala de log <sub>2</sub> .....	30
<b>Figura 8.</b> Caracterização por citometria de fluxo das células derivadas de cardioesferas (CDCs) de camundongos da linhagem CD1. Comparação da expressão das moléculas de superfície nas CDCs.....	31
<b>Figura 9.</b> Caracterização por citometria de fluxo das células derivadas das cardioesferas (CDCs).....	32
<b>Figura 10.</b> Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo III $\alpha$ -actina de músculo.....	33
<b>Figura 11.</b> Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo III desmina.....	34
<b>Figura 12</b> Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo IV nestina.....	35
<b>Figura 13</b> Células derivadas de cardioesferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo III vimentina.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
CD	do inglês “ <i>Cluster of differentiation</i> ”
CD1	Linhagem de Camundongos
CD45	Antígeno Comum de Leucócitos
CDC	Células Derivadas de Cardioesferas
CPC	Células Progenitoras Cardíacas
DAPI	4’- 6’ Diamidino 2 Phenylindole
DCV	Doenças Cardiovasculares
Fc	Porção constante do anticorpo
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
FITC	Fluoresceína de Isotiocianato
HAM’S F12	Meio de Cultura
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
iPSC	do inglês “ <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> ”
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
PBS	Solução Tampão de Fosfato
PDT	do inglês “ <i>Population Doubling time</i> ”
PE	Ficoeritrina
SFB	Soro Fetal Bovino

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1. Células-tronco .....	13
1.2. Doenças cardiovasculares e células tronco residentes cardíacas .....	13
1.3. Células derivadas de cardioesferas e potencial terapêutico nas doenças cardiovasculares .....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1. Animais .....	19
3.2. Obtenção das células do tecido cardíaco .....	19
3.3. Obtenção das células aderentes e formação das cardioesferas .....	19
3.4. Caracterização por citometria de fluxo .....	20
3.5. Caracterização por imunofluorescência .....	21
3.6. Ensaio de <i>population doubling time</i> .....	22
3.7. Análise estatística .....	23
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1. Cultura de células do tecido cardíaco e formação das cardioesferas .....	24
4.2. Obtenção de células derivadas de cardioesferas (CDCs) .....	26
4.3. <i>Population Doubling Time</i> .....	27
4.4. Caracterização das CDCs por citometria de fluxo .....	30
4.5. Caracterização por imunofluorescência .....	32
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....</b>	<b>42</b>

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Células-tronco**

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas e não especializadas, com capacidade de se dividirem por longos períodos. Associada a essa característica de auto-renovação possui grande potencial de diferenciação em diversos tipos celulares. Em função de sua origem, classificam-se em dois grandes grupos: embrionárias e somáticas (THOMPSON et al., 1998).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto e são capazes de se diferenciarem em todas as células dos três folhetos embrionários: mesoderma, endoderma e ectoderma. Em função das questões éticas que envolvem a utilização das células-tronco embrionárias humanas em pesquisas, foi desenvolvida a técnica de reprogramação genética de células somáticas adultas.

Em 2006, Takahashi e Yamanaka conseguiram reprogramar geneticamente células diferenciadas de indivíduos adultos em células pluripotentes com características semelhantes aos das células embrionárias, sendo por este motivo denominadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

As células somáticas são células mitóticas não envolvidas na reprodução que podem pertencer a qualquer órgão como pele, coração, rins e outros. Além disso, podem ser reprogramadas por transferência do seu conteúdo nuclear em oócitos (WILMUT et al., 1997) ou por fusão com células embrionárias (COWAN et al., 2005; TADA et al., 2001), uma vez que os oócitos não fertilizados e células embrionárias contêm fatores de transcrição que podem conferir totipotência ou pluripotência a células somáticas.

### **1.2 Doenças cardiovasculares e células-tronco residentes cardíacas**

No Brasil, assim como em todo mundo, as doenças cardiovasculares têm sido uma das maiores causas de morte. Em 2007, por exemplo, no Brasil ocorreram 308.466 óbitos em decorrência de doenças do aparelho circulatório. Além disso, as doenças cardiovasculares são responsáveis por alta frequência de internações, ocasionando elevados custos médicos e socioeconômicos (SBC, 2010). Um estudo prospectivo mostrou que as doenças isquêmicas do coração serão a terceira principal causa de morte em 2030 estando atrás apenas do HIV/AIDS e dos distúrbios depressivos unipolares respectivamente (MATHERS E LONCAR, 2006).

Apesar dos avanços notáveis no tratamento das doenças coronarianas, quase um terço dos pacientes que sobrevivem a um infarto do miocárdio (IAM) desenvolvem insuficiência cardíaca no prazo de cinco anos (VELAGALETI *et al.*, 2008). A alta mortalidade e as poucas alternativas terapêuticas para estas patologias têm levado a pesquisas com células-tronco utilizando vários modelos de doenças cardíacas.

As terapias em que se utilizam células-tronco é uma das abordagens mais recentes em medicina regenerativa. Visando a substituição ou reparação de órgãos e tecidos, diferentes tipos de células têm sido utilizados (ALVAREZ-DOLADO *et al.*, 2003). O sucesso das terapias celulares está baseado na origem das células e sua subsequente amplificação, a fim de obter a quantidade de células necessárias para a implantação no órgão alvo e por consequência a segurança do enxerto (MURRY *et al.*, 2004).

Recentemente diversos grupos demonstraram, de forma independente, a presença de células-tronco residentes no coração (ANVERSA *et al.*, 2003; LAUGWITZ *et al.*, 2008; KAJSTURA *et al.*, 2008, 2010; WU *et al.*, 2008; BERGMANN *et al.*, 2009; HANSSON *et al.*, 2009; MARBÁN *et al.*, 2010;). Esta descoberta tem despertado grande interesse visando futuras aplicações clínicas (BELTRAMI *et al.*, 2001 e BEARZI *et al.*, 2007). Entretanto, as células-tronco cardíacas existem em pequena quantidade *in vivo* e seu isolamento e expansão *ex vivo* constituem um desafio para seu uso clínico (JOHNSTON *et al.*, 2009).

As células-tronco residentes cardíacas são particularmente promissoras, uma vez que apresentam a capacidade intrínseca de promover cardiogênese e angiogênese, tanto através da regeneração direta do tecido cardíaco quanto indiretamente através de efeitos parácrinos que permitem o recrutamento de progenitores endógenos (LI *et al.*, 2010).

Em 2004, Messina e colaboradores demonstraram pela primeira vez que poderiam cultivar Células Progenitoras Cardíacas (CPCs) diretamente a partir de tecido cardíaco. Estas células produzem aglomerados esféricos multicelulares denominados cardiosferas, que contêm muitas células proliferativas. As cardiosferas possuem fenótipo misto e são constituídas de camadas distintas, com a expressão do marcador c-kit na região central e o marcador mesenquimal CD105 em sua periferia (DAVIS *et al.*, 2009). Após serem plaqueadas, as cardiosferas dão origem a uma população celular heterogênea denominada: Células Derivadas de Cardiosferas (CDCs) (MESSINA *et al.*, 2004). Estas CDCs expressam marcadores tipicamente mesenquimais e um grau variável do marcador de células progenitoras, o receptor tirosina kinase c-kit (KREKE *et al.*, 2012).

### **1.3 Células derivadas de cardioesferas e potencial terapêutico nas doenças cardiovasculares**

Diante da possibilidade da formação de cardioesferas a partir de corações murinos e de biópsia de coração humano, bem como da verificação que estas são clonogênicas, expressam marcadores para células progenitoras endoteliais e parecem ter as propriedades de células estaminais adultas cardíacas sendo capazes de, em longo prazo, se auto-renovarem e se diferenciarem *in vitro*, criaram novas perspectivas acerca da utilização das mesmas para a terapia celular em casos de doenças cardiovasculares (MESSINA *et al.*, 2004).

Além disso, eles demonstraram pela primeira vez, que é possível isolar as células de fragmentos muito pequenos de coração humano e expandir essas células *in vitro* (em quantidades adequadas para transplantes *in vivo*) sem perder seu potencial de diferenciação (BERILE *et al.*, 2007).

Em 2007, Smith e colaboradores também demonstraram, que culturas primárias de biópsia endomiocárdica de humanos e suínos desenvolvem aglomerados multicelulares conhecidos como cardioesferas, as quais foram plaqueadas para se obter CDCs. Ao investigar se as CDCs derivadas de tecido humano e suíno possuíam a capacidade de diferenciação cardiogênica, foram observados que as CDCs expressam marcadores com características antigênicas de células-tronco, bem como proteínas vitais para manutenção da função contrátil e elétrica do coração.

Além disso, as CDCs humanas e suínas quando co-cultivadas com miócitos ventriculares de ratos neonatais exibiram características de cardiomiócitos. Nos ensaios *in vivo*, as CDCs humanas, quando injetadas na borda da região do infarto agudo em ratos imunodeprimidos, migraram para a área do infarto e, após 20 dias, a porcentagem de miocárdio viável dentro da área do infarto foi maior no grupo tratado com CDCs que no grupo controle. Do mesmo modo, a fração de ejeção ventricular esquerda foi superior no grupo tratado com CDCs (SMITH *et al.*, 2007).

Embora as CDCs apresentem um potencial para a utilização em transplante autólogo cardiogênico, os estudos relatados ressaltam um fator que necessita ser melhor investigado para o transplante de CDCs: a avaliação da segurança na diferenciação celular. Nos estudos citados não foi observada nenhuma evidência de tumores *in vivo* ou morte súbita nos animais

tratados com CDCs (SMITH *et al.*, 2007). No entanto, o uso das CDCs em quantidade menor de passagens para expansão pode minimizar os riscos (DAVIS *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que as variações em condições de cultura podem alterar sua eficiência e o fenótipo das CDCs (DAVIS *et al.*, 2009). Davis e colaboradores observaram que quanto menor picotar o tecido cardíaco no procedimento de obtenção das CDCs, maior será o rendimento na produção de cardioesferas. Além disso, a digestão inicial do tecido também desempenha um papel fundamental no tempo necessário para a cultura atingir a confluência.

Estudos demonstram os benefícios das CDCs na diminuição da área lesionada pelo infarto e melhora da função cardíaca (SMITH *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2009). Embora a diferenciação das CDCs transplantadas ocorra de forma lenta, há importante contribuição dos seus efeitos parácrinos tanto na preservação do tecido quanto no recrutamento de células para ativação da regeneração endógena (CHIMENTI *et al.*, 2010).

Lee e colaboradores em 2011, testaram a segurança e a eficácia da injeção direta de CDCs ou cardioesferas em um modelo de insuficiência cardíaca após infarto em porcos de pequeno porte. As células foram cultivadas a partir de biópsias cardíacas e injetadas através de toracotomia quatro semanas após o infarto ântero-septal. As CDCs foram marcadas com luciferase e os porcos foram aleatoriamente escolhidos para o grupo CDCs, placebo e cardioesferas. Neste estudo, foi demonstrado que as injeções diretas de cardioesferas ou CDCs são seguras e eficazes para preservação da função ventricular em porcos portadores de cardiomiopatia isquêmica. Além disso, embora as CDCs e as cardioesferas tenham tido efeitos equivalentes na fração de ejeção, as cardioesferas foram superiores na melhora da hemodinâmica, função regional cardíaca e na atenuação do remodelamento ventricular e não houve qualquer formação de tecido tumoral (LEE *et al.*, 2011).

Mediante os resultados motivadores das pesquisas experimentais onde houve a redução da cicatriz pós infarto do miocárdio e melhora da função cardíaca em modelos pré clínicos, foi realizado um estudo pioneiro intitulado Cardiosphere-Derived Autologous Stem Cells to reverse ventricular dysfunction (CADUCEUS) (MAKKAR *et al.*, 2012), o estudo foi delineado, buscando verificar o potencial terapêutico das CDCs onde houve a redução de cicatrizes pós-infarto do miocárdio e melhora de função cardíaca em modelos pré-clínicos. Este estudo foi realizado de maio de 2009 a 16 de dezembro de 2010. Foram incluídos 31 pacientes dos quais 25 foram elegíveis. Destes, 17 foram do grupo CDCs e 8 foram



atendimento padrão. Os resultados demonstraram que a infusão intracoronária de CDCs autólogas após o infarto do miocárdio é segura, garantindo a expansão das células e que os aumentos sem precedentes observados no miocárdio viável são consistentes com a terapêutica regenerativa e merecem uma avaliação mais aprofundada (MAKKAR *et al.*, 2012).

Partindo de evidências já descritas na existência de células-tronco em tecidos adultos e de células progenitoras que tendem a se diferenciar em células do tecido de origem, torna-se notável a necessidade de identificação e caracterização de tais células para expansão e viabilização de estudos clínicos (BELTRAMI *et al.*, 2001).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

- Isolar, cultivar e caracterizar células derivadas de cardioesferas de camundongos da linhagem CD1.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estudar a expressão de moléculas de superfície nas células derivadas de cardioesferas utilizando citometria de fluxo.
- Verificar a expressão de proteínas citoplasmáticas nessas células pela técnica de imunofluorescência.
- Quantificar a proliferação das células derivadas de cardioesferas através do ensaio de *population doubling time*.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Neste estudo foram utilizados camundongos da linhagem CD1 fornecidos pelo biotério local vinculado ao Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada entre 22°C e 24°C e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram respeitadas as normas recomendadas pelo Comitê de Uso de Animais do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Protocolo - IBCCF 006) e pelo Comitê de Ética Animal (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo 24/2011).

#### **3.2 Obtenção das células do tecido cardíaco**

Camundongos da linhagem CD1 entre 8 e 12 semanas de vida foram utilizados para extração das células do coração. Os animais foram anestesiados com isoflurano (VET ONE, Boise, Estados Unidos) e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. O protocolo de isolamento foi realizado como descrito previamente (BELTRAMI et al., 2003) com algumas modificações. Os corações foram retirados com auxílio de pinça e tesoura e lavados em solução tampão de fosfato (PBS) para retirada o excesso de sangue. Em seguida, átrios e ventrículos foram cortados em pequenos pedaços denominados explantes, de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Estes foram colocados em Erlenmeyers juntamente com uma solução contendo collagenase tipo II na concentração de 420U/ml (Worthington, Lakewood) em meio HAM's F12 (LGC Biotecnologia, Rio de Janeiro). Os Erlenmeyers foram vedados cuidadosamente e submetidos a quatro ciclos de cinco minutos cada de digestão enzimática a 37°C sob leve agitação. Ao fim de cada ciclo, a suspensão celular foi coletada e centrifugada a 300g durante 5 minutos à 4°C. O sedimento celular foi ressuspensão em meio nutritivo para posterior plaqueamento bem como os explantes remanescentes do processo de digestão enzimática.

#### **3.3 Obtenção das células aderentes e formação das cardiosferas**

Após a digestão enzimática, os explantes remanescentes e os sobrenadantes foram plaqueados separadamente em placas de poliestireno de 100 mm (Falcon 353003, Becton

Dickson and Company), contendo meio HAM's F12 (Gibco) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco), 10 ng/ml de fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF – Peprotech), 0,005 unidades/ml de eritropoietina (Sigma-Aldrich) e 10ng/ml de fator inibitório de leucemia (Recombinant murine LIF, ®Millipore). As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera úmida em presença de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após três dias, o meio de cultura foi trocado parcialmente e as células não aderentes removidas da cultura. Aproximadamente uma semana após o plaqueamento, as células começaram a se desprender dos explantes e aderir ao frasco de cultura formando uma monocamada. Sobre as células que formavam a monocamada migraram espontaneamente pequenos grupos de células arredondadas denominadas “*phase-bright cells*” (células brilhantes). Nas placas onde foram plaqueadas a suspensão celular do sobrenadante, uma população aderente também foi observada, bem como as “*phase-bright cells*”.

Para a formação das cardioesferas, primeiramente as “*phase-bright cells*” (células que ainda não aderiram as placas de cultura e se mostra em visualização microscópica sobrenadante) foram coletadas cuidadosamente das placas de cultura utilizando uma solução tampão de fosfato (PBS). Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada a 300xg. O sobrenadante contendo PBS foi descartado e o sedimento celular contendo as “*phase-bright cells*” transferidos para placas de cultura de 35 mm tratadas com Poly 2-hidroxyethylmethacrylate (Poly-Hema-Sigma) a fim de impedir a aderência das células e possibilitar a formação das cardioesferas.

Três dias após a formação das cardioesferas na placa de cultura não-aderente, as mesmas foram transferidas para uma nova placa de cultura de poliestireno de 100 mm onde permaneceram aderidas e expandiram, formando as células derivadas de cardioesferas (CDCs). A partir deste ponto, o meio de cultura foi trocado a cada três dias, sendo realizada a passagem enzimática com tripsina 0,05% (Sigma). Os resultados deste trabalho foram obtidos de culturas entre a terceira e quarta passagem.

### **3.4 Caracterização por Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo foi realizada para caracterizar imunofenotipicamente a população de CDCs. As células foram sendo incubadas com anticorpos específicos

relacionados à linhagem hematopoiética, mesenquimal e marcadores de células-tronco/progenitoras.

Para tanto, as células foram removidas da placa de cultura utilizando-se solução de dissociação não enzimática (Sigma) com o objetivo de preservar as moléculas de superfície. Após a centrifugação, as CDCs foram ressuspensas em solução tampão de fosfato e uma pequena alíquota da suspensão celular foi retirada para a realização da contagem celular em hematocítômetro e a avaliação da viabilidade celular foi feita através da exclusão do corante Azul de Trypan. Em seguida, as células foram colocadas em tubos de poliestireno (cerca de  $10^5$  células por tubo de 10ml, Falcon) para a incubação por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  com anticorpos específicos na concentração de 1:30. Os anticorpos contra os mesmos isotipos associados a cada molécula analisada foram utilizados nas mesmas concentrações de cada anticorpo específico analisado.

Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD90 conjugado à Fluoresceína de isotiocianato (FITC) e anti-CD73 conjugado à Ficoeritrina (PE) para identificação de células mesenquimais; anti-CD45 conjugado ao APC Cy7, anti-CD19 conjugado à FITC e anti-CD14 conjugado à PE para identificação de células hematopoiéticas; anti-CD105 conjugado à 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) para identificação de células progenitoras.

Os dados foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo BD FACS ARIA II (BD Biosciences) e analisados através do software FlowJo, BD Biosciences.

### **3.5 Caracterização por Imunofluorescência**

Para investigar a expressão de proteínas citoplasmáticas por imunofluorescência, as CDCs foram cultivadas sobre lamínulas de vidro tratadas previamente com solução de gelatina 0,1% (Sigma-Aldrich) a uma densidade de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 24 poços (Falcon). As células foram cultivadas com meio de cultura Ham's F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 10ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF – Peprotech), 0,005 unidades/mL de eritropoietina (Sigma-Aldrich) e 10 ng/ml de fator inibitório de leucemia (Recombinant murine LIF, Millipore).

Inicialmente, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas uma vez com PBS e imersas em fixador (paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi retirado e as células fixadas foram lavadas três vezes com PBS durante 5 minutos cada. Em seguida as lamínulas foram permeabilizadas durante 15 minutos com uma solução contendo Triton X-100 diluído em PBS na concentração de 0,1%. Após a permeabilização, as células foram incubadas com uma solução de bloqueio contendo 5% de soro de cabra em PBS durante 30 minutos para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo com componentes celulares. Em seguida, as células foram mantidas em uma câmara úmida e incubadas durante a noite à 4°C com os anticorpos primários diluídos em PBS adicionado a 1% de soro de cabra. Os anticorpos primários utilizados foram: vimentina (1:100; mouse-monoclonal, Sigma),  $\alpha$  actina de músculo liso (1:200; mouse-monoclonal, Abcam), desmina (1:200; mouse-monoclonal, Sigma) e nestina (1:100; mouse-monoclonal, Abcam).

No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS por três vezes de cinco minutos cada. Logo após a lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo secundário cabra anti-camundongo conjugado a Alexa 488 (1:400, Invitrogen) durante 1 hora à temperatura ambiente. Concluída esta etapa, as lamínulas foram lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada com e incubadas durante cinco minutos com DAPI, um corante nuclear. Após este período, as lamínulas foram montadas utilizando Vectashield (Vector Laboratories). A observação e captura das imagens foram feitas em microscópio de fluorescência invertido microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

### **3.6 Ensaio de *population doubling time* (PDT)**

Para a avaliação do crescimento populacional, as CDCs foram cultivadas em placas de cultura de 35 mm que contém quadriculados com 1 mm<sup>2</sup> de área na concentração de  $2 \times 10^5$  CDCs/placa. No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram contadas em quatro quadrantes escolhidos aleatoriamente, com o auxílio do microscópio invertido Olympus modelo CKX41 no aumento de 40x. Este processo foi realizado diariamente até a cultura atingir um estágio de confluência. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Finalizado o ensaio, a quantidade de células contadas foi calculada a fim de se obter um gráfico com a quantidade média de células por unidade de área por cada dia de experimento.

O tempo que a população original levou para dobrar sua quantidade (PDT) foi obtido pelo cálculo inverso do coeficiente angular da reta obtida por meio da transformada deste gráfico para escala de  $\log_2$ .

### **3.7 Análise estatística**

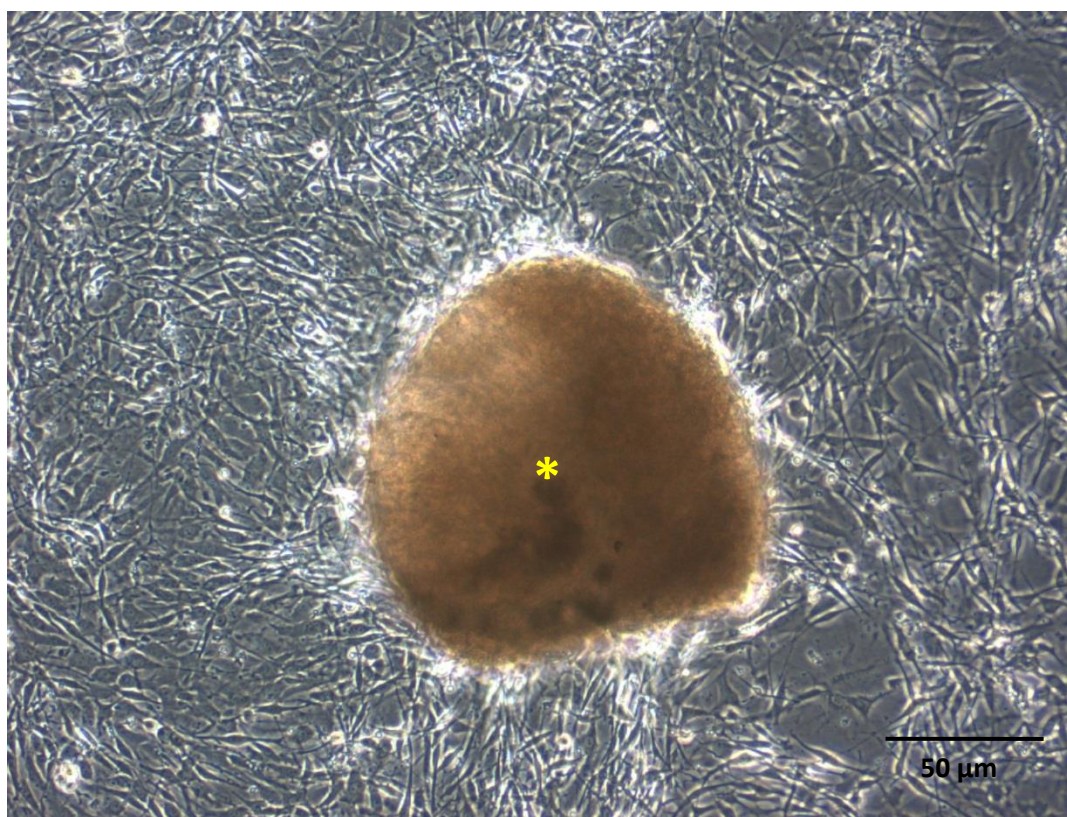
Os resultados obtidos foram apresentados de forma descritiva.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Cultura de células do tecido cardíaco e formação das cardioesferas

A demonstração da presença de células-tronco e/ou de células progenitoras no coração e que estas poderiam ser cultivadas diretamente a partir de tecido cardíaco, possibilitando a formação dos agregados celulares esféricos denominados cardioesferas, trouxeram novas perspectivas para a terapia celular (MESSINA *et al.*, 2004; SMITH *et al.*, 2007). Por preencher os critérios que definem uma população de células-tronco, a primeira etapa de nosso trabalho foi cultivar as células derivadas do tecido cardíaco de camundongos da linhagem CD1 e avaliar a eficiência do protocolo de formação das cardiosferas já validado pela literatura.

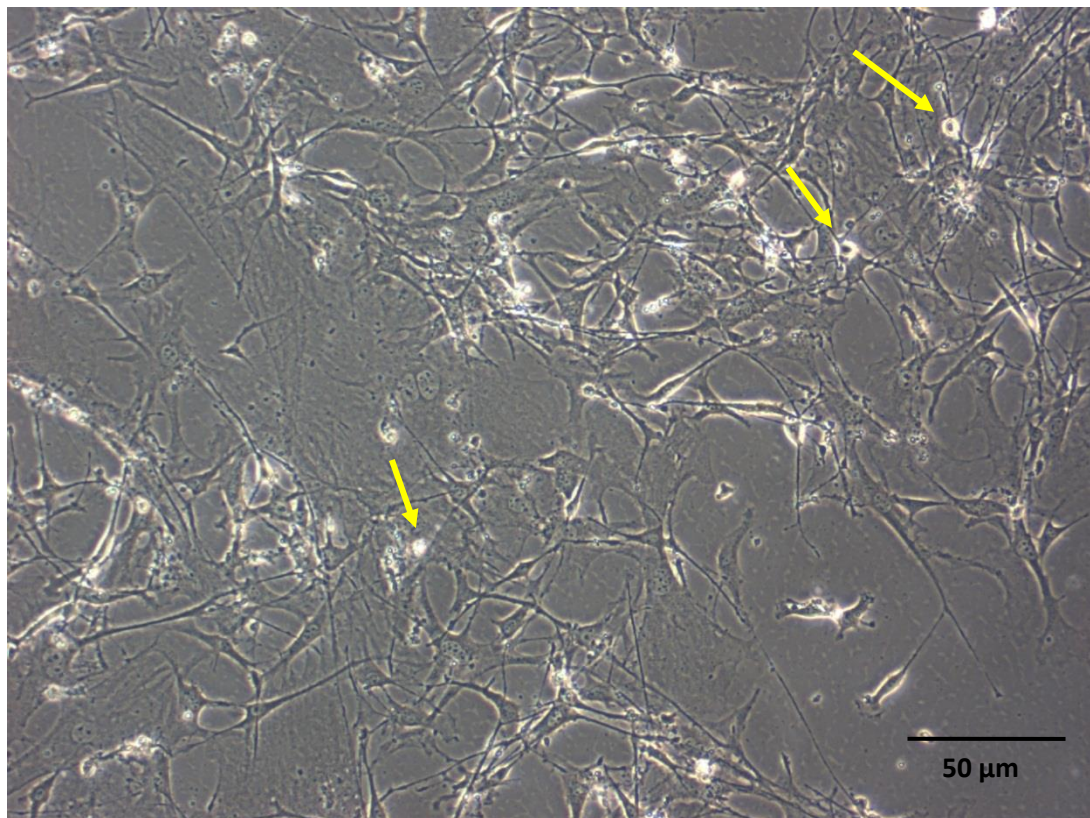
A Figura 1 mostra um campo representativo de culturas de células derivadas dos explantes cardíacos de camundongos da linhagem CD1. Uma semana após o plaqueamento inicial, pequenas células aderentes, com aspecto fibroblastóide, migram do explante.



**Figura 1:** Aspecto morfológico das células derivadas do tecido cardíaco. Pequenas células migram a partir de explante cardíaco (\*) uma semana após o plaqueamento. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.



Aproximadamente dez dias após o plaqueamento inicial, pequenas células brilhantes, as *phase bright cells*, são observadas sobre a monocamada aderente. Estas são coletadas para a formação das cardiosferas (Figura 2).



**Figura 2** – Aspecto morfológico das *Phase bright cells*: Pequenas células brilhosas (setas em amarelo) sobre a monocamada aderente observadas 10 dias após o plaqueamento. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

Com o intuito de formar as cardiosferas, tal como descrito por Messina *et al.*, (2004), as *phase bright cells* foram coletadas com *pasteur* descartável de 3ml o auxílio de uma pipeta e transferidas para placas não aderentes. Aproximadamente três dias após o plaqueamento, foi possível observar os aglomerados celulares ou cardiosferas (Figura 3).

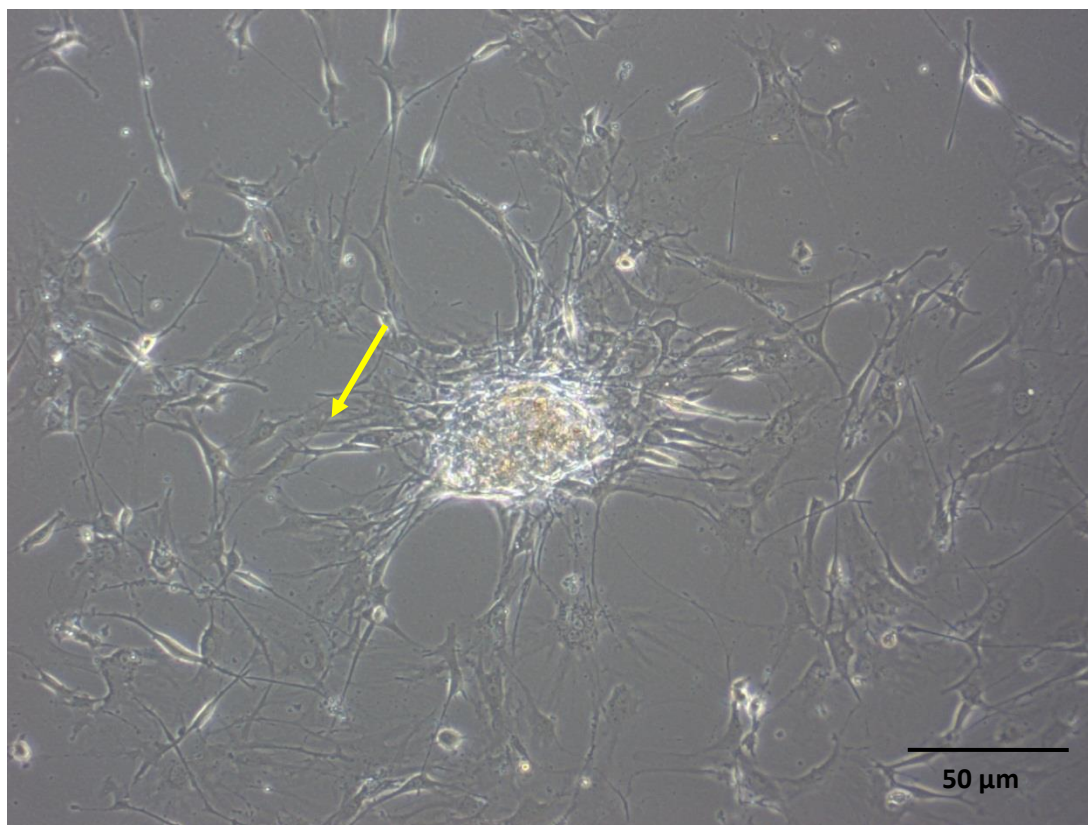


**Figura 3** - Aspecto morfológico das cardiosferas: após três dias de cultivo em placas de culturas de 35 mm não aderentes, as “*phase bright cells*” formam aglomerados celulares denominados cardiosferas. Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

#### 4.2 Obtenção das células derivadas das cardiosferas (CDCs)

Dada a importância da avaliação da eficiência do método de isolamento e expansão direcionado para a linhagem estudada (DAVIS *et al.*, 2009), a próxima etapa do presente experimento foi a obtenção das células derivadas de cardiosferas (CDCs).

Após a formação das cardiosferas (Figura 3), as mesmas foram transferidas para placas não tratadas, para permitir a aderência celular. Três dias após o plaqueamento, pequenas células aderentes migram das cardiosferas dando origem às células derivadas de cardiosferas (CDCs - Figura 4).



**Figura 4** – Aspecto morfológico das células derivadas de cardiosferas (CDCs): três dias após plaqueamento das cardiosferas em placas aderentes, células migram das cardiosferas dando origem às CDCs (seta em amarelo). Imagem representativa registrada utilizando o microscópio invertido Olympus modelo CKX41.

As células derivadas das cardiosferas foram mantidas em cultura para expansão. Todos os ensaios para a caracterização foram realizados entre a terceira e a quarta passagem.

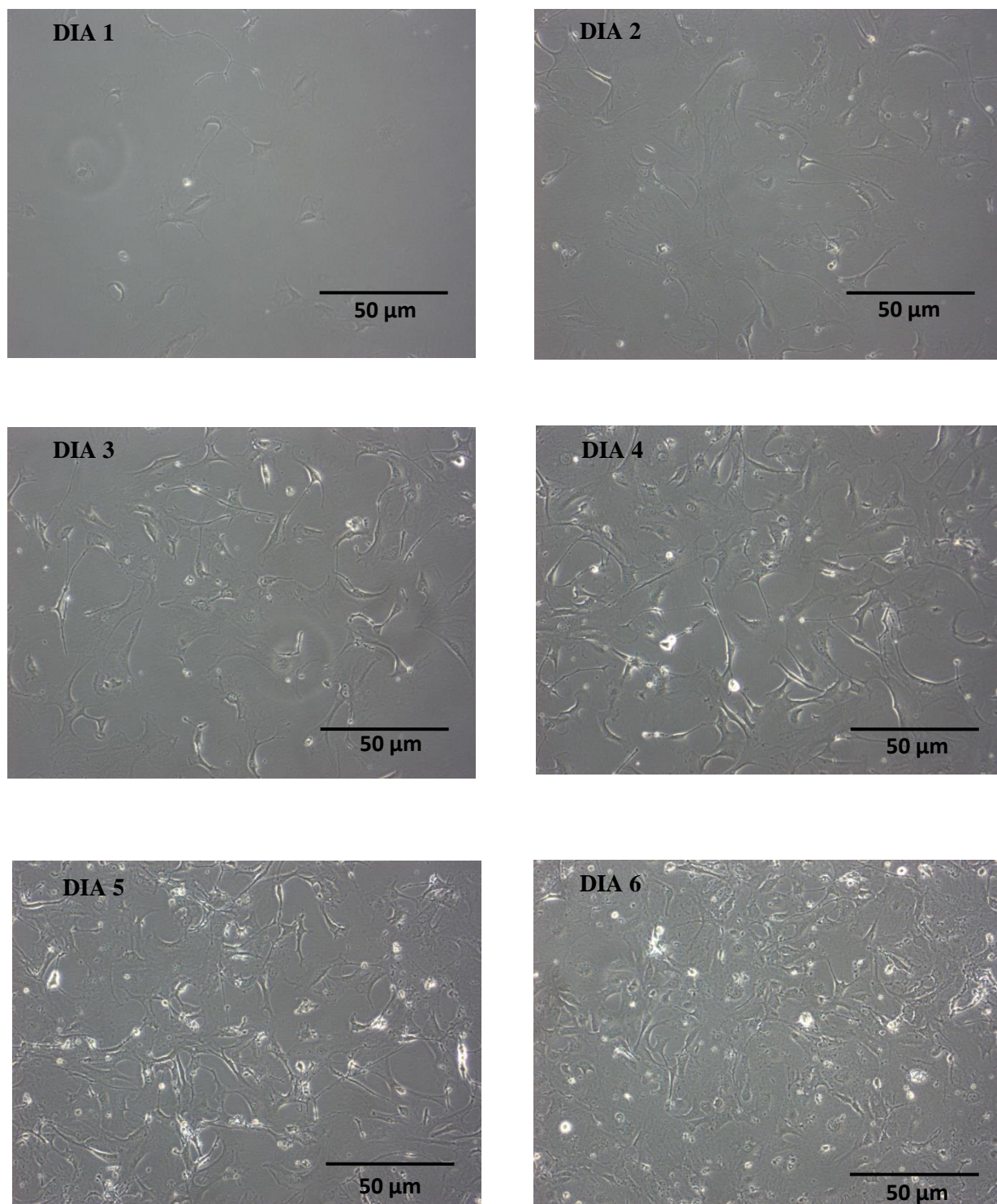
### 4.3 *Population DoublingTime*

O ensaio *population doubling time*, foi realizado para avaliar a taxa de duplicação da população original. Foram analisadas três amostras. O *population doubling time* foi obtido ao calcular o inverso do coeficiente angular da reta obtida por meio da transformação deste gráfico para escala de log2.

A quantidade de células observadas em quatro quadrantes escolhidos aleatoriamente foi contada diariamente. No sexto dia, quando a cultura atingiu um estágio de monocamada

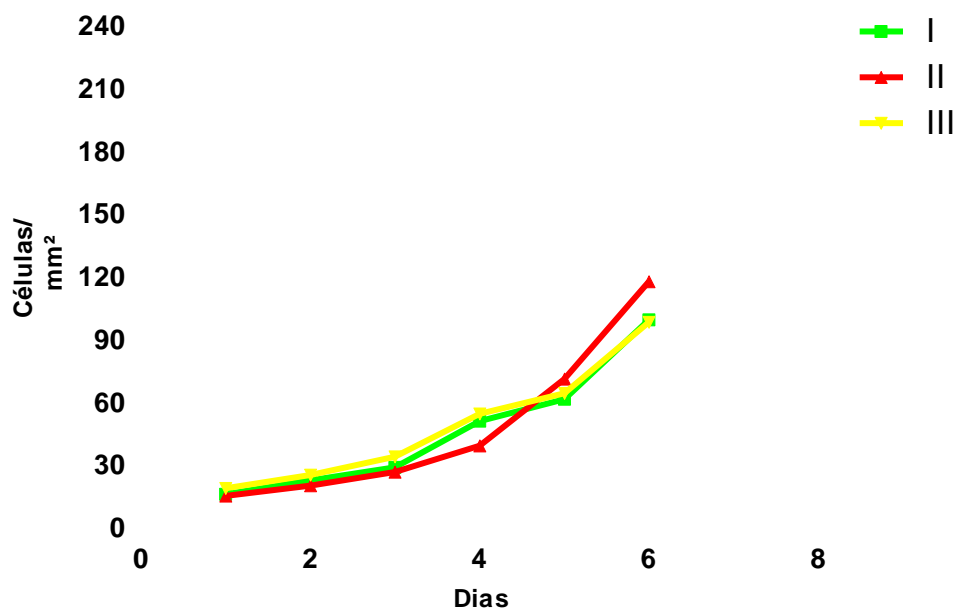


confluente, a contagem foi finalizada. Campos representativos relacionando os dias pós-plaqueamento com a densidade celular estão demonstrados na Figura 5.

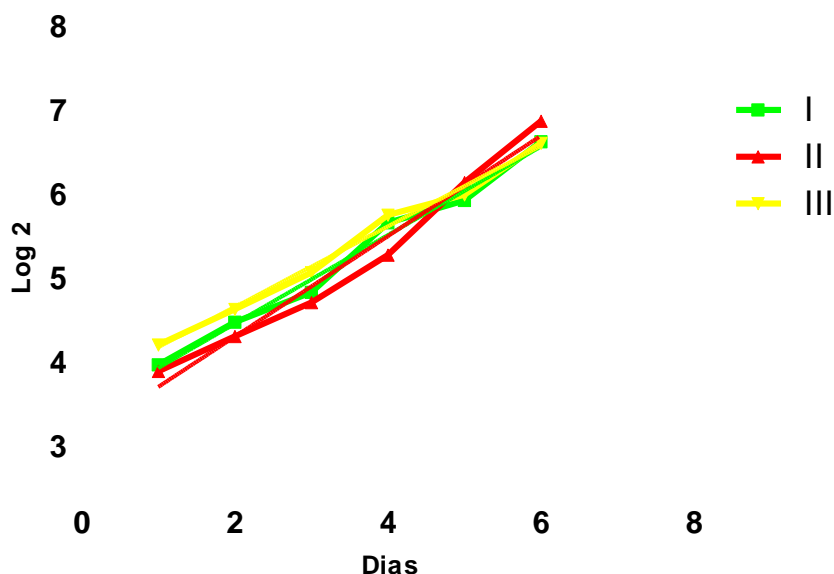


**Figura 5:** Campos representativos relacionando os dias pós-plaqueamento com a densidade celular.

Concluída a contagem, obteve-se uma quantidade média de células por unidade de área, durante cada dia do experimento. Os resultados estão demonstrados no gráfico com curva exponencial positiva (Figura 6). O tempo em que a população de células original levou para dobrar seu tamanho (*population doubling time*) foi de 1,8 dias (Figura 7).



**Figura 6:** Curva exponencial positiva representando a quantidade de CDCs contadas por  $\text{mm}^2$  observada nos respectivos dias de ensaio do *population doubling time*.

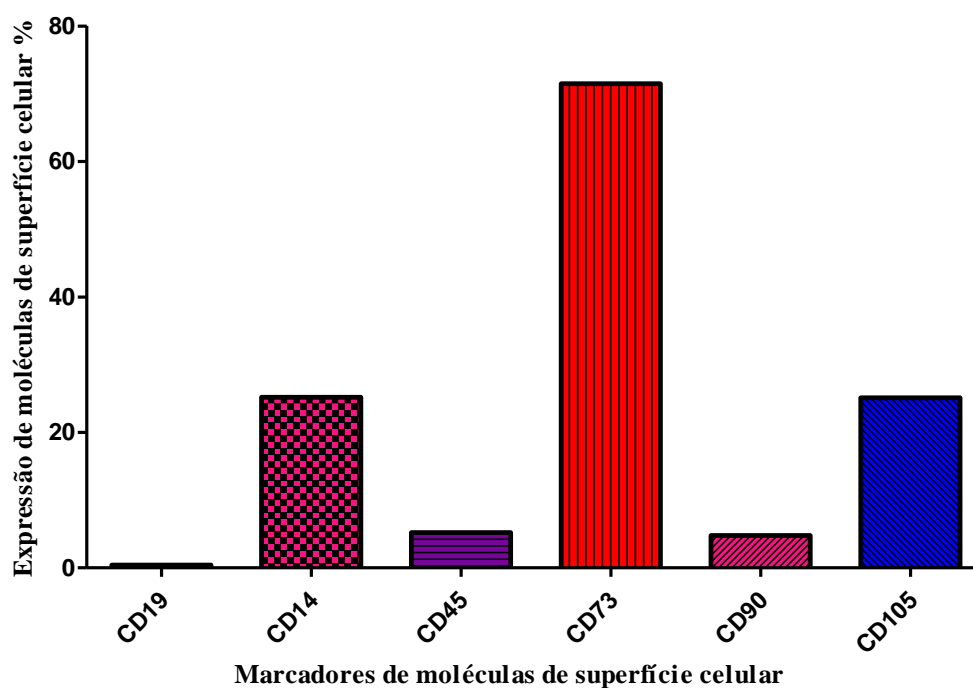


**Figura 7:** Tempo que a população de células levou para dobrar de tamanho (PDT) obtida ao calcular o inverso do coeficiente angular da reta obtida por meio da transformação em escala de log2.

#### 4.4 Caracterização das CDCs por citometria de fluxo

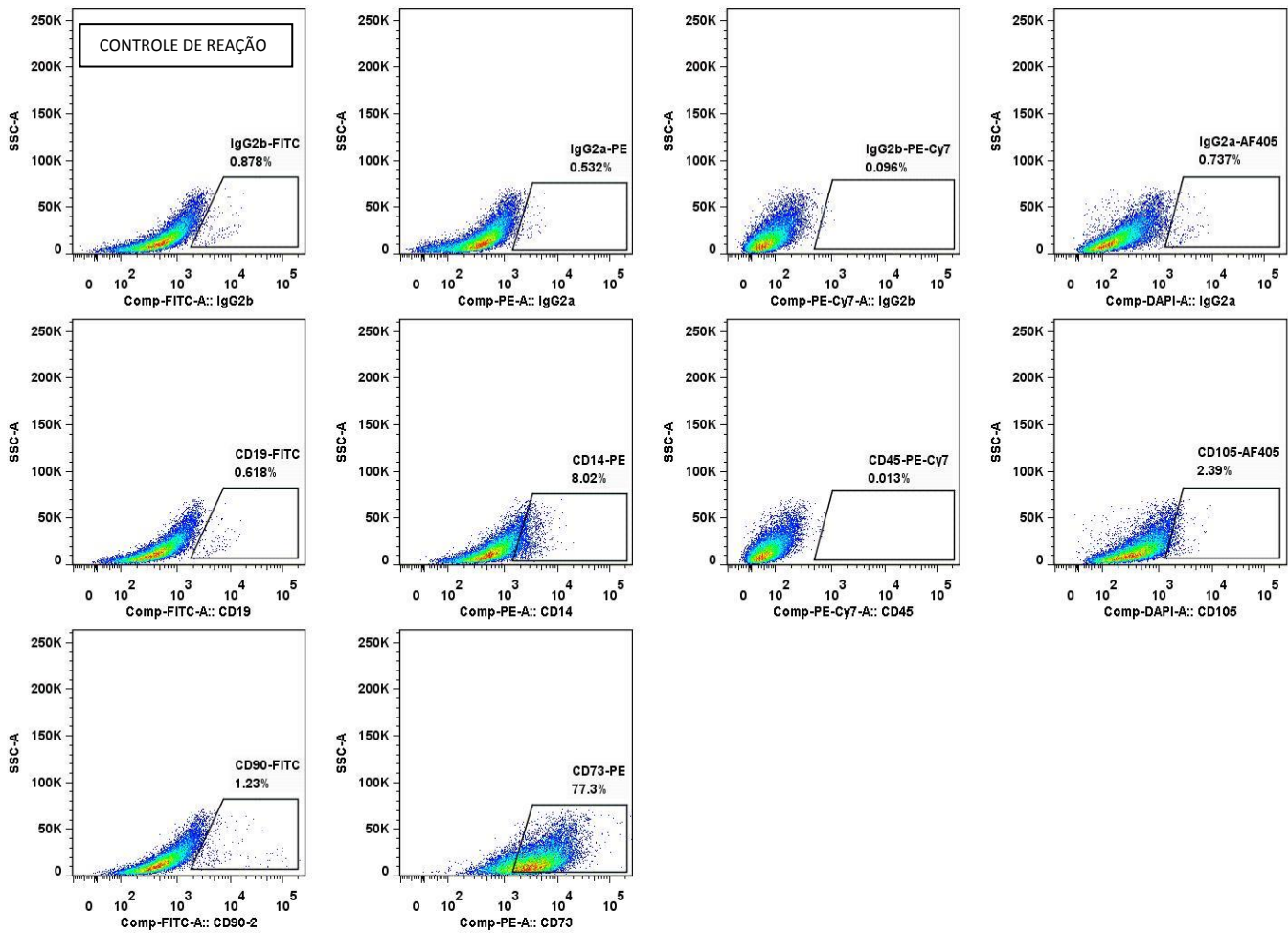
Com o intuito de investigar e quantificar, com precisão, o percentual da expressão de moléculas que caracterizam as células mesenquimais, hematopoiéticas e progenitoras, as CDCs em cultura de três amostras foram estudadas utilizando citometria de fluxo.

Nas amostras de CDCs analisadas, observou-se baixa expressão das moléculas CD19 (0,4%), CD45 (0,5%) e CD90 (4,7%) e uma elevada expressão da molécula CD73 (71,4%). As moléculas CD105 (25,1%) e CD14 (25,1%) também foram observadas nas CDCs. A viabilidade celular foi de 98,5%. As moléculas de superfície observadas nas CDCs estão representadas na Figura 8.



**Figura 8:** Expressão média das caracterizações realizadas por citometria de fluxo das células derivadas de cardioesferas (CDCs) de camundongos da linhagem CD1.

A Figura 9 mostra os *dot plots* representativos de uma das amostras analisadas de CDCs onde se pode observar a alta expressão da molécula CD73, para todas marcações estudadas foi realizado controle de reação. Além disso, a expressão de CD 90, uma molécula amplamente observada em células cardíacas murinas.



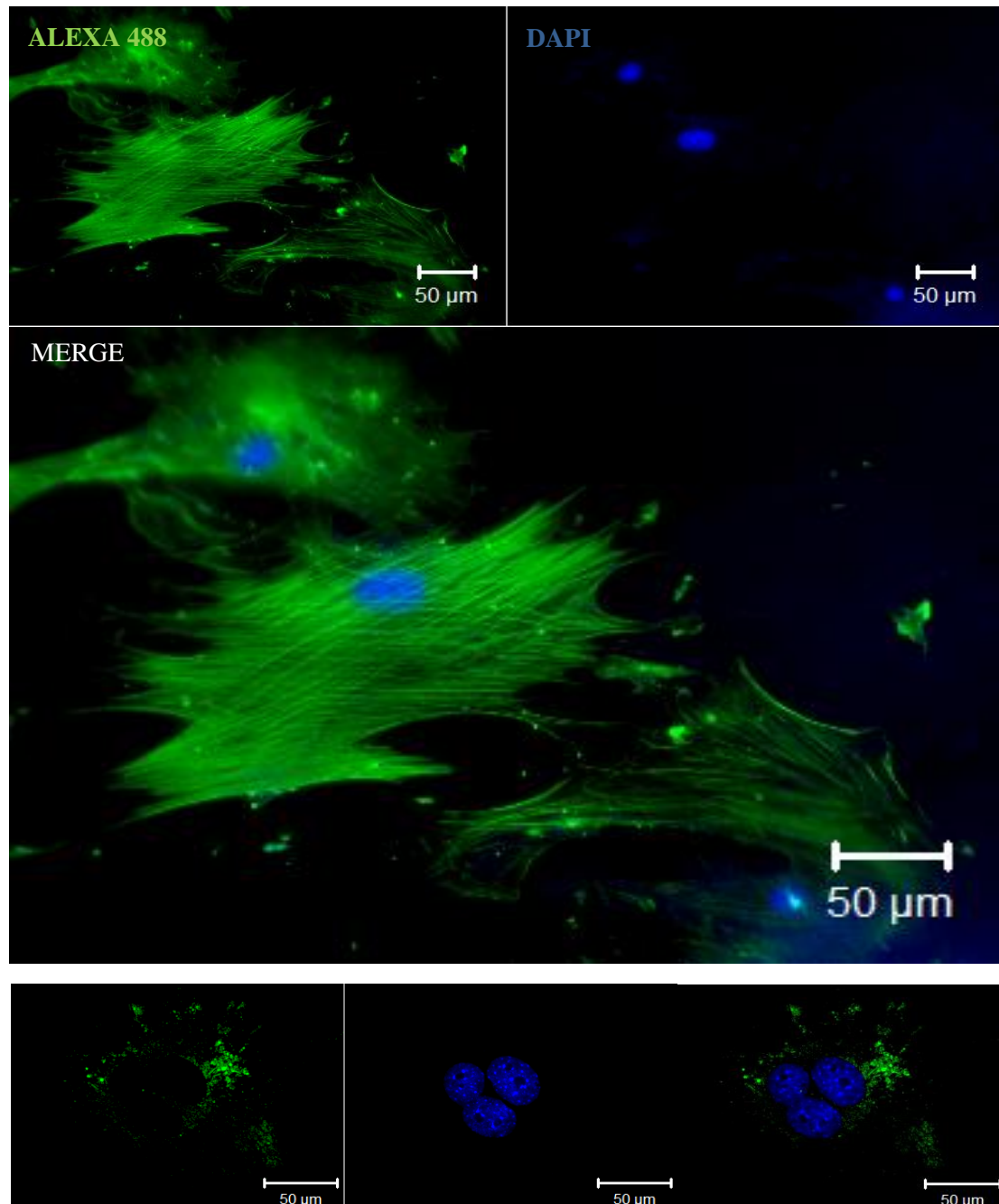
**Figura 9:** Caracterização por citometria de fluxo das células derivadas das cardioesferas (CDCs). *Dot plots* representativos de uma das amostras analisadas mostrando a intensidade de fluorescência dos canais associados a cada anticorpo e/ou isotipo, no eixo X, e da granulosidade (SSC) no eixo Y.

#### 4.5 Caracterização por imunofluorescência

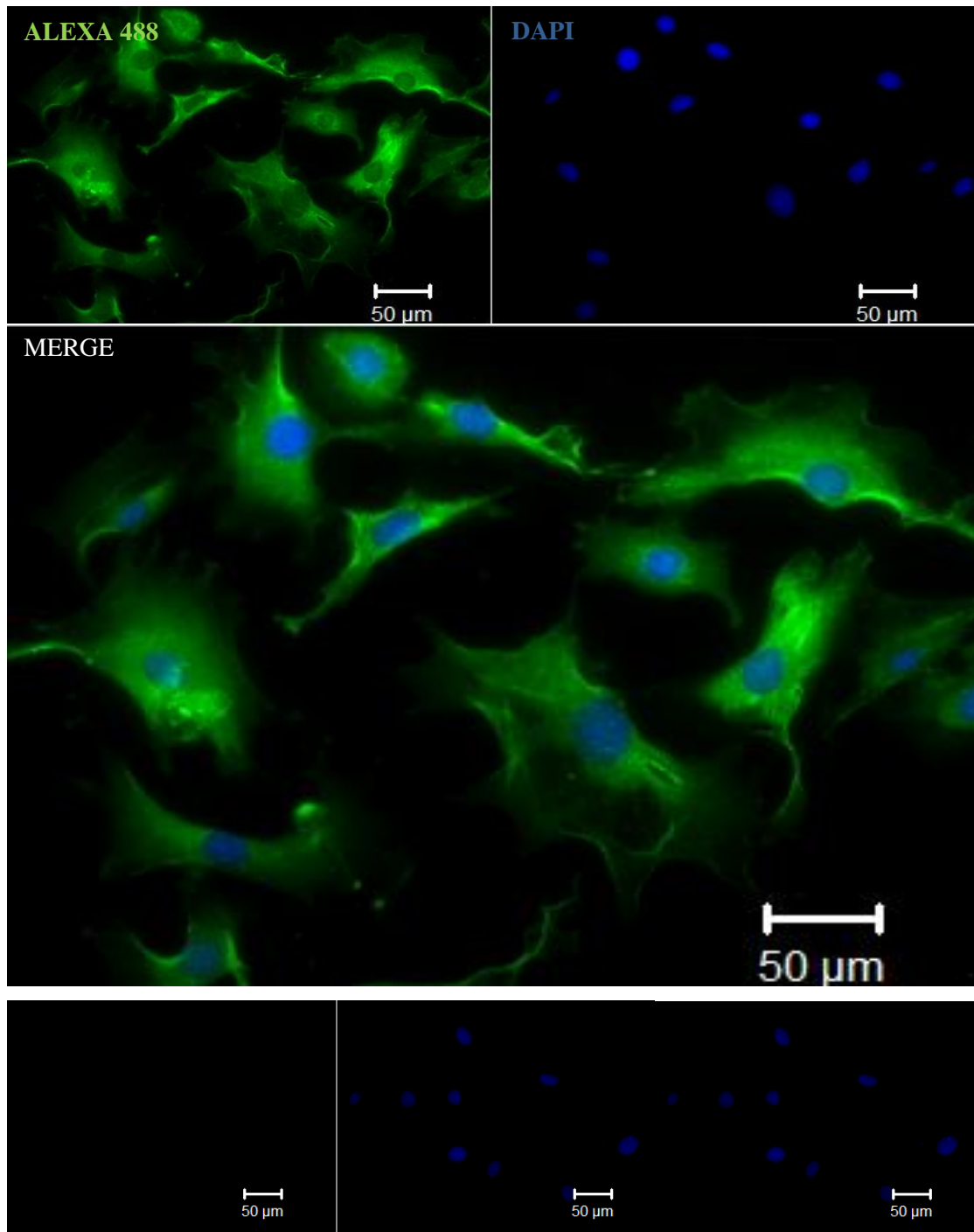
Para avaliar a presença de proteínas citoplasmáticas, as CDCs foram plaqueadas em lamínulas para os ensaios de imunofluorescência.

A expressão das proteínas  $\alpha$ -actina de músculo liso (Figura 10) e desmina (Figura 11) foram detectadas nas CDCs analisadas. Para todas as proteínas estudadas foram realizados os respectivos controles de reação. Além disso, a nestina, uma proteína citoplasmática conhecida por ser um marcador específico de células progenitoras neurais, foi observada nas células derivadas de cardioesferas de camundongos CD1 (Figura 12). A presença de vimentina (Figura 13) também foi observada nas CDCs.

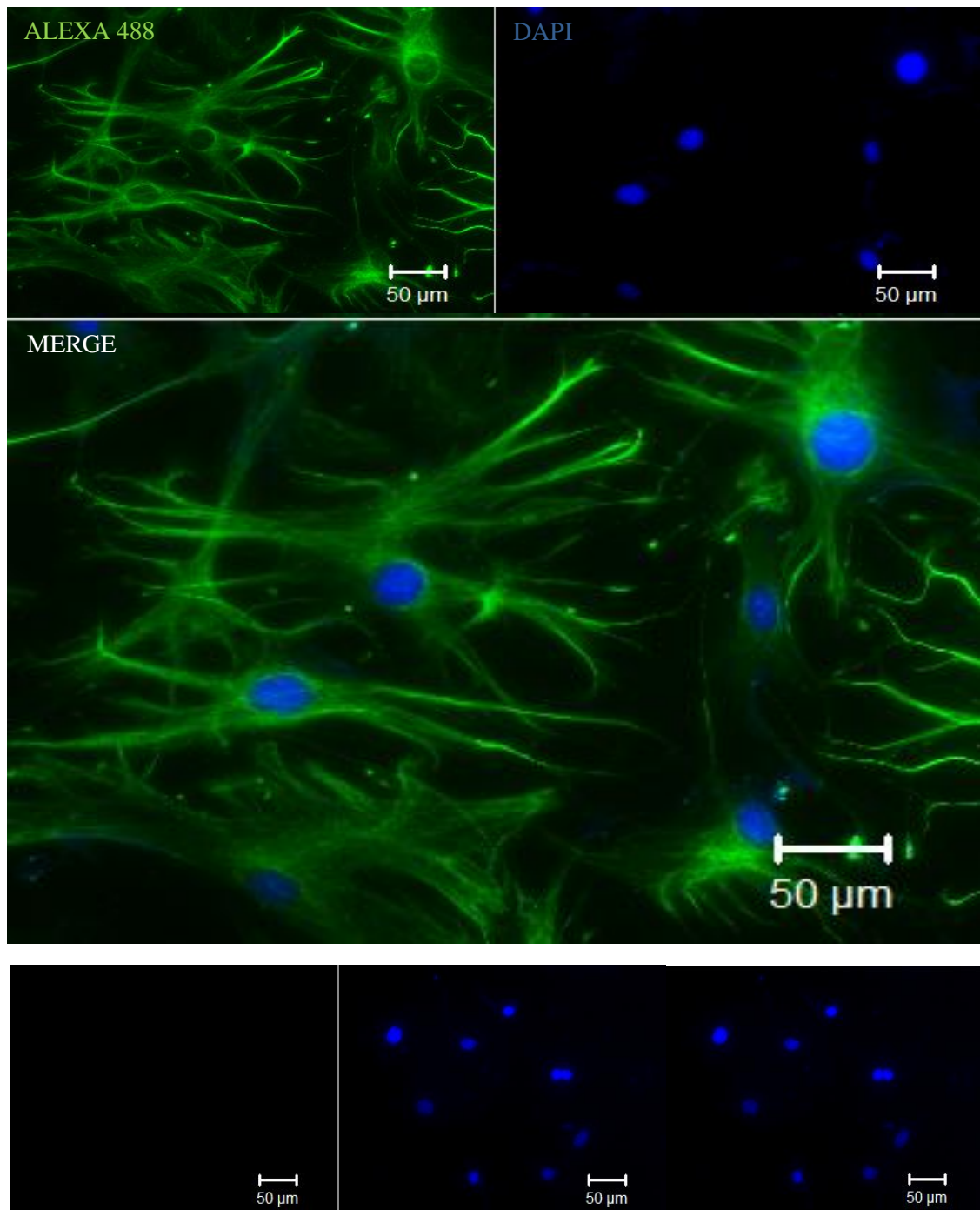




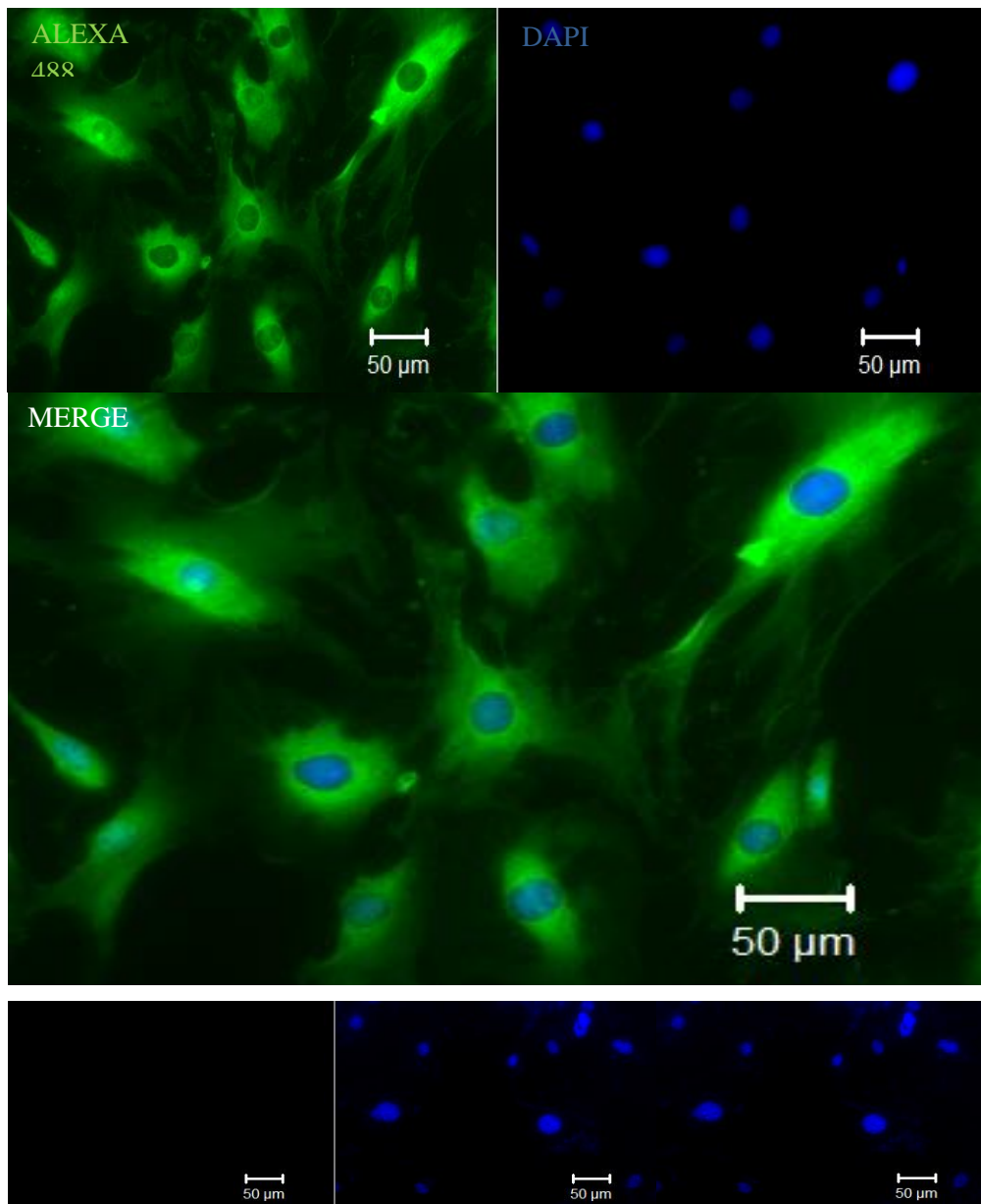
**Figura 10:** Células derivadas de cardiosferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo III  $\alpha$ -actina de músculo liso. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.



**Figura 11:** Células derivadas de cardioesferas mostrando que expressão da proteína de filamento intermediário tipo III **desmina**. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (®Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.



**Figura 12:** Células derivadas de cardiosferas mostrando a expressão da proteína de filamento intermediário tipo IV **nestina**, característica de células progenitoras neurais. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (@Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.



**Figura 13:** Células derivadas de cardiosferas mostrando que expressão da proteína de filamento intermediário tipo III **vimentina**. Imagem representativa adquirida utilizando microscópio de epifluorescência (®Zeiss Imager. M2) acoplado ao sistema apotome.

## 5 DISCUSSÃO

As principais propriedades de células-tronco são a auto-renovação, a sobrevivência e a manutenção da integridade genômica, descritos pela primeira vez por Till e McCulloch em 1961 ao reconhecer o potencial da medula óssea. Além da medula, a maioria dos tecidos adultos possuem potencial de produzir células estaminais residentes, ou seja, células capazes de produzir linhagens de células diferenciadas apropriada para a sua localização (ALISON *et al.*, 2008).

Neste contexto, o conceito clássico de que o coração é um órgão sem capacidade de se regenerar tem sido contestado nas últimas duas décadas com o reconhecimento da presença de células-tronco cardíacas. A descoberta de que células-tronco cardíacas (CSCs) residem no coração e podem se diferenciar em várias linhagens mudou radicalmente a compreensão a cerca da biologia do miocárdio. Além disso, a identificação de células progenitoras cardíacas trouxe entusiasmo para a medicina regenerativa, assim como o reconhecimento de que os cardiomiócitos são capazes de proliferar (ANVERSA *et al.*, 1998; NAKAJIMA *et al.*, 2004).

No entanto, decifrar os processos biológicos que levam a renovação do miócito é uma tarefa desafiadora, uma vez que a regeneração cardíaca pode ser obtida por algumas prováveis vias como: compromisso das células-tronco multipotentes em gerar todas as linhagens especializadas dentro do parênquima, a ativação de células progenitoras unipotentes com potencial de diferenciação restrito, a replicação de células pré-existentes diferenciadas, a transdiferenciação das células progenitoras por secreção de fatores exógenos e a desdiferenciação dos cardiomiócitos a reinserir no ciclo celular. Estes múltiplos mecanismos de crescimento celular podem atuar na regeneração de complexas estruturas e restaurar a função do órgão alvo (ANVERSA *et al.*, 2006)

Em 2004, Messina e colaboradores demonstraram pela primeira vez que as células progenitoras cardíacas poderiam ser cultivadas e o promissor potencial terapêutico dos agregados esféricos derivados de tecidos cardíacos, as chamadas cardiosferas, poderiam ser estudados.

No presente estudo, a metodologia de isolamento e cultivo de CDCs utilizados foi estabelecida, com boa recuperação celular e poderá ser empregada com o intuito de se preparar células para testes terapêuticos. Os principais problemas encontrados foram relacionados à contaminação das culturas, talvez ligado ao tempo necessário de manutenção

em estufa. O tempo para expansão celular é relativamente longo e novas técnicas para acelerar o desenvolvimento das células devem ser encontradas.

Davis *et al.*, (2009) demonstraram ampla aplicabilidade da técnica utilizada para a cultura e expansão de células progenitoras cardíacas (CPCs) a partir do tecido miocárdico. No presente estudo demonstrou-se, a aplicabilidade da técnica de cultivo celular. O isolamento de células derivadas de cardiosferas (CDCs) a partir de corações de camundongos da linhagem CD1 foi conseguido de forma relativamente simples utilizando-se o método previamente descrito na literatura (MESSINA *et al.*, 2004 e SMITH *et al.*, 2007; DAVIS *et al.*, 2009;).

Outro aspecto que merece destaque é a caracterização das células expandidas. As células localizadas no centro da cardiosfera expressam o antígeno de células-tronco c-kit e está envolta por uma camada exterior composta de células CD105 positivas, uma glicoproteína de membrana comumente expressa em células-tronco mesenquimais de medula óssea. No entanto, faz-se necessária a expansão *ex vivo* de células estaminais residentes cardíacas em quantidade celular mínima necessária para a utilização em processos terapêuticos (MARBÁN *et al.*; 2012).

As células cultivadas no presente estudo apresentaram baixa expressão das moléculas hematopoiéticas CD19 e CD 45 e alta expressão das moléculas mesenquimais CD 105 e CD 73. Isso evidencia que as células identificadas, entre a terceira e a quarta passagem, apresentam características que permitem caracterizá-las como células mesenquimais e, este resultado, pode auxiliar metodologias visando à obtenção de quantidades maiores destas células com finalidade terapêutica.

Neste contexto, Smith *et al.*, (2007), publicaram estudo em que desenvolveram uma cultura primária utilizando fragmentos de biópsia endomiocárdica de humanos e suínos, evoluindo a cultura até a obtenção das CDCs (células derivadas de cardiosferas). Neste estudo, após injetarem as CDCs humanas na área limítrofe do infarto, em camundongos imunodeprimidos, observaram que as CDCs migraram para a zona do infarto e que a fração de ejeção ventricular esquerda aumentou concluindo-se que as CDCs são capazes de promover regeneração cardíaca e melhora da função ventricular (SMITH *et al.*, 2007).

O isolamento de células derivadas de cardiosferas, contudo tem sido motivo de controvérsias na literatura (DAVIS *et al.*, 2009 e ANDERSEN *et al.*, 2009).

Uma variedade de marcadores de superfície, fatores de transcrição e ensaios funcionais têm sido realizados a fim de caracterizar e definir as diferentes populações de células progenitoras (LERI *et al.*, 2011). No presente estudo a viabilidade celular encontrada foi de 98,5%, considerada muito satisfatória na obtenção das CDCs. Também evidenciou-se uma baixa expressão das moléculas hematopoiéticas CD19 (0,4%) e CD45 (0,5%) e aumento nas expressões das moléculas mesenquimais CD73 (71,47%) e CD105 (25,1%), como já referido. Este resultado é corroborado no trabalho de Davis *et al.*, (2009). Notou-se também no presente estudo, uma baixa expressão da molécula CD90, de marcação mesenquimal. Este resultado não era esperado, porém pode ser justificado por uma especificidade da linhagem murina estudada. Estas pequenas variações nas expressões moleculares também está de acordo com a literatura já descrita (MARBÁN *et al.*; 2012).

Alguns estudos têm investigado qual população ou populações de células-tronco adultas fornecem melhores resultados em termos de reparo muscular e revascularização. A caracterização das CDCs indicam um promissor potencial a ser testado na medicina regenerativa, podendo atuar, direta e indiretamente, na cardiogênese e angiogênese.

No ensaio de imunofenotipagem, as marcações citoplasmáticas típicas em células cardíacas foram observadas no presente estudo. As CDCs foram marcadas para alfa actina de músculo liso, nestina, vimentina e desmina. Chan *et al.*, (2012) também notaram estas marcações em CDCs humanas, reforçando os atuais resultados. Um relevante resultado semelhante aos já descritos na literatura obtido neste estudo foi à presença do conhecido marcador de células progenitoras neurais, a nestina. As CDCs ainda expressaram, no presente estudo, as proteínas características de cardiomiócitos: vimentina, desmina e  $\alpha$  actina de músculo liso, corroborando os achados da literatura (MESSINA *et al.*, 2004).

Avaliou-se a taxa proliferativa das células derivadas de cardioesferas (CDCs) através do ensaio *population doubling time*. Observou-se que as CDCs originalmente plaqueadas, necessitam de 1,8 dias para duplicar sua população inicial. Estes resultados mostram que as CDCs são uma promissora população de células progenitoras, no que diz respeito à expansão celular para sua posterior aplicação clínica para estudos em modelos de doenças cardiovasculares.

Na expansão e utilização das CDCs é importante minimizar a contaminação por fibroblastos, pois não há seleção antigênica ou de separação celular e sabe-se que nas CDCs há subpopulações de células mesenquimais e, possivelmente, outros tipos de células. Mais

estudos são necessários para definir as vantagens e desvantagens relativas à utilização de células progenitoras, as CDCs, como terapia na medicina regenerativa.

A partir desta caracterização o potencial destas células precisa ser investigado em modelos experimentais capazes de induzir diferentes tipos de lesão miocárdica. Nesses modelos, uma questão a ser infocada deverá ser a capacidade de diferenciação celular em cardiomiócitos e endotélio.



## **6 CONCLUSÕES**

O presente estudo demonstrou que a metodologia de isolamento e cultivo de CDCs utilizada é facilmente estabelecida, com boa recuperação celular. As células obtidas constituem um grupo heterogêneo, podendo ser promissor no campo da terapia celular.

## REFERÊNCIAS

ALISON, M.R.; ISLAM, S. Attributes of adult stem cells. **The Journal of pathology**, London, v. 217, n.2, p.144-60, Jan 2009.

ALVAREZ-DOLADO, M.; PARDAL, R.; GARCIA-VERDUGO, J.M. et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. **Nature**, London, v.425, n.6961,p. 968-73, Oct 2003.

AMOH, Y.; LI, L.; KATSUOKA, K.; PENMAN, S.; et al. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair follicle-bulge stem cells can form neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, USA, v.102, n.15, p.5530-4, Apr 2005.

ANDERSEN, D.C.; ANDERSEN, P.; SCHNEIDER, M. et al. Murine “Cardiospheres” Are Not a Source of Stem Cells with Cardiomyogenic Potential. **Stem Cell**, Ohio, v. 27, n. 7, p. 1571–81, Jul 2009.

ANVERSA, P.; KAJSTURA, J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. **Circulation Research**, v. 83, n. 1, p.1–14, Jul 1998.

ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; LERI, A. If I can stop one heart from breaking. **Circulation**,USA, v.115, n.7, p. 829–832, Feb 2007.

ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; LERI, A.; BOLLI, R. Life and Death of Cardiac Stem Cells a Paradigm Shift in Cardiac Biology. **Circulation**, USA, v. 113, n. 11, p.1451-1463, Mar 2006.

ANVERSA, P.; LERI, A.; ROTA, M. et al. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. **Stem Cells**, USA, v. 25, n.3, p.589–601, Mar 2007.

AVILION, A.A., NICOLIS, S.K.; PEVNY, L.H. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes Development**, v. 17, n.1, p. 126–140. Jan 2003.

BARILE, L.; MESSINA, E.; GIACOMELLO, A.; MARBÁN, E. Endogenous Cardiac Stem Cells. **Progress in Cardiovascular Diseases**, US, v. 50, n.1, p. 31- 48, Jul-Aug 2007.

BEARZI, C.; ROTA, M.; HOSODA, T. et al. Human cardiac stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, NY, v. 104, p. 14068 - 14073, Aug 2007.

BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D.; et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. **Cell**, NY, v. 114, p. 763–776, Sep 2003.

BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after infarction. **New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 344, n. 23, p. 1750 –1757, Jun 2001.

BÉQUIN, P.C.; EL-HELOU, V.; GILLIS, M-A. et al. Nestin Stem Cells Independently Contribute to Neural Remodelling of the Ischemic Heart. **Journal of cellular physiology**, Quebec, v.226, n.5, p.1157–1165, May 2011.

BERGMANN, O.; BHARDWAJ R.D.; BERNARD, S. et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. **Science**, NY, v.324, n. 5923, p. 98-102. Apr 2009.

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

CARR, C.A.; STUCKEY, D.J.; TAN, J.J. et al. Cardiosphere-Derived Cells Improve Function in the Infarcted Rat Heart for at Least 16 Weeks – an MRI Study. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n.10, Oct 2011.

CASINI, S.; TAN, H.L.; BHUIYAN, Z.A. et al. Characterization of a novel SCN5A mutation associated with Brugada syndrome reveals involvement of DIIS4-S5 linker in slow inactivation. **Cardiovascular Research**, London, v.76, n. 3, p. 418–429, Dec 2007.

CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M. et al. Functional expression cloning of nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n.5, p.643–655. May 2003.

CHAN, H.H.; MEHER HOMJI Z.; GOMES RS.; et al. Human cardiosphere-derived cells from patients with chronic ischaemic heart disease can be routinely expanded from atrial but not epicardial ventricular biopsies. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 5, n.5, p.678-87, Oct 2012.

CHENG K, BLUSZTAJN A, SHEN D. et al. Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel. **Biomaterials, Amsterdam**, v. 33, n. 21, p. 5317-24, Jul 2012.

CHIMENTI, I; SMITH, R.R.; LI, T.S. et al. Relative Roles of Direct Regeneration Versus Paracrine Effects of Human Cardiosphere-Derived Cells Transplanted Into Infarcted Mice. **Circulation Research**, US, v. 106, n. 5, p.971-80, Mar 2010.

COUSIN, B.; ANDRÉ. M.; ARNAUD. E. et al. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, NY, v. 301, n. 4, p. 1016–1022, Feb. 2003.

COWAN, C.A.; ATIENZA, J.; MELTON, D.A. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science**, NY, 309, n.5739, p.1369-73, Aug 2005

DAHLKE, M. H.; LARSEN, S. R.; RASKO, J. E. et al. The biology of CD45 and its use as a therapeutic target. **Leukemia & lymphoma**, v.45, n.2, p. 229-236, Feb 2004.

DAVIS, D. R.; RUCKDESCHEL SMITH, R. and MARBÁN, E. Human cardiospheres are a source of stem cells with cardiomyogenic potential. **Stem Cells**, Ohio v.28, n. 5, p.903-904, May 2010.

DAVIS, D. R.; ZHANG, Y.; SMITH, R.R et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. **PLoS One**, San Francisco, v.4, n.9, Sep 2009.

FODOR WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reprod Biol Endocrinol**. v.1, p.102. 2003.

HANSSON, E.M., LINDSAY, M.E. CHIEN K.R. Regeneration next: toward heart stem cell therapeutics. **Cell Stem Cell**, v.5, n.4, p. 364–377, Oct 2009.

JOHNSTON, PV.; SASANO, T.; MILLS, K.; et al. Engraftment, Differentiation, and Functional Benefits of Autologous Cardiosphere Derived Cells in Porcine Ischemic Cardiomyopathy. **Circulation**, Baltimore, v. 120, n. 12, p. 1075-1083, Sep 2009.

KAJSTURA, J.; URBANEK, K.; ROTA, M. et al. Cardiac stem cells and myocardial disease. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London,v.45, n. 4, p.505–513, Oct 2008.

KAJSTURA, J.; URBANEK, K.;PERL, S.; et al. Cardiomyogenesis in the adult human heart. **Circulation Research**, Baltimore, v.107, n. 2, p.305–315, Jul 2010.

KREKE M, SMITH RR, MARBÁN L, MARBÁN E. Cardiospheres and cardiosphere-derived cells as therapeutic agents following myocardial infarction. **Expert Rev Cardiovasc Ther**, London, v. 10, n. 9, p. 185-94, Sep 2012.

KUBO, H.; JALEEL, N.; KUMARAPELI, A.; et al. Margulies, K.B. Increased cardiac myocyte progenitors in failing human hearts. **Circulation**, Dallas, v. 118, n.6, p.649 - 657, Aug 2008.

LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. **Nature Biotechnology**, NY, v. 23, n.7, p. 845-56, Jul 2005.

LAUGWITZ, K.L.; MORETTI, A.; CARON, L.; et al. Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages? **Development**, Boston, v. 135, n.2, p. 193–205, Jan 2008.

LAUGWITZ, K.; MORETTI, A.; LAM, J. et al. Postnatal isl1<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. **Nature**, v. 460, n. 7026, p. 647–653, Feb 2005.

LEE, S.T.; WHITE, A.J.; MATSUSHITA, S.; et al. Intramyocardial Injection of Autologous Cardiospheres or Cardiosphere-Derived Cells Preserves Function and Minimizes Adverse Ventricular Remodeling in Pigs With Heart Failure Post-Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, NY, v.57, n.4, p. 455-65, Jan 2011.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L.B.; MCKAY, R.D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, Cambridge, p. 585–595, Feb1990.

LI, L.; MIGNONE, J.; YANG, M. et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. USA. v. 100, n.17, p. 9958 –9961, Aug 2003.

MAKKAR, R. R.; SMITH, R. R.; CHENG, K. et al. Intracoronary cardiosphere derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. **Lancet**, v. 379, n. 9819, p. 895-904, Mar 2012.

MALLIARAS, K.; LI, T.S.; LUTHRINGER, D. et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. **Circulation**, Dallas, v.125, n.1, p. 100-12, Jan 2012.

MARBÁN, E.; CHENG, K. Heart to heart: The elusive mechanism of cell therapy. **Circulation**, Dallas, v.121, n.18, p.1981-4, May 2010.

MARBÁN, E.; CINGOLANI, E. Heart to heart: cardiospheres for myocardial regeneration. **Heart Rhythm**, NY, v. 9, n.10, p. 1727-31, Oct 2012.

MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, San Francisco, v.3, n.11, Nov 2006.

MESSINA, E.; ANGELIS, L.; FRATI, G. et al. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells From Human and Murine heart. **Circulation Research**, London, v. 95, n.9, p. 911-921, Oct 2004.

MEZEY, E.; CHANDROSS, K.J.; HARTA, G. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, Washington, v. 290, n. 5497, p. 1779-1782, Dec 2000.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, Cambridge, v. 113, n.5, p. 631-642. May 2003.

MUSUNURU, K.; DOMIAN, I. J.; CHIEN, K. R. Stem Cell Models of Cardiac Development and Disease. **Annual review of cell and developmental biology**. US, v. 26, p. 667 - 687, 2010.

NAKAJIMA, H.; NAKAJIMA, H.O.; TSAI, S.C. et al. Expression of mutant p193and p53 permits cardiomyocyte cell cycle reentry after myocardial infarction in transgenic mice. **Circulation Research**, Baltimore, v. 94, n.12, p. 1606 –1614, Jun 2004.

NICHOLS, J.; ZEVIK, B.; ANASTASSIADIS, K. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, Cambridge, v. 95, n.3, p.379–391, Oct 1998.

NIWA, H.; BURDON, T.; CHAMBERS, I. et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Development**, v.12, n.13, p. 2048–2060, Jul 1998.

SMITH, R.R.; BARILE, L.; CHO, H.C. et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. **Circulation**, Dallas, v.115, n. 7, p. 896 –908, Feb 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v. 95, n.1, sup. 1, p. 1-51, 2010.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**, NY, v. 241, n.4861, p.58 – 62, Jul 1988.

TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. **Current biology: CB**, London, v.11, n.19, p.1553–1558, Oct 2001.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 663–676, Aug 2006.

THOMPSON JA.; ITSKOVITZ-ELDOR J.; SHAPIRO SS. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, v. 282, n.5391, p. 1145–7, Nov 1998.

VELAGALETI, R. S.; PENCINA, M.J.; MURABITO, J.M. et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. **Circulation**, Dallas, v.118, n. 20, p. 2057-62, Nov 2008.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v. 385, n. 6619, p. 810-13, Feb 1997.

WU, S.M.; CHIEN, K.R.; MUMMERY C. Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. **Cell**, Cambridge, v.132, n.4, p. 537-43, Feb 2008.