FELIPE PEROZZO DALTOÉ

**Isolamento, caracterização e análise da resposta ao trauma de células-
tronco epiteliais da mucosa bucal humana**

São Paulo

2013

FELIPE PEROZZO DALTOÉ

**Isolamento, caracterização e análise da resposta ao trauma de células-
tronco epiteliais da mucosa bucal humana**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade de São Paulo.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Mantesso Pobocik

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Daltoé, Felipe Perozzo.

Isolamento, caracterização e análise da resposta à injúria de células tronco epiteliais da mucosa bucal humana / Felipe Perozzo Daltoé; orientadora Andrea Mantesso Pobocik. -- São Paulo, 2013.

98 p.: il.: fig.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Células epiteliais. 2. Células-tronco. 3. Epitélio bucal. 4. Mucosa bucal. I. Pobocik, Andrea Mantesso. II. Título.

Daltoé, FP. Isolamento, caracterização e análise da resposta **ao trauma** de células-tronco epiteliais da mucosa bucal humana. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico esta obra aos meus maiores mestres, mentores e amores; pai e mãe, Elio e Docelina.

AGRADECIMENTOS

Aos meus mentores acadêmicos nesta jornada, **Professora Dra. Andrea Mantesso Pobocik** (FOUSP) e **Professor Dr. Paul T. Sharpe** (KCL), a minha sincera gratidão. Vocês são grandes exemplos de dedicação e ética profissional. Valores estes que certamente me servem de bom exemplo para alcançar muitos dos meus objetivos na vida.

À todos os demais **mestres** que já passaram na minha vida, pelo carinho e dedicação com que me repassaram os seus conhecimentos. Dentre eles, em especial a minha própria mãe, que foi a minha professora no ensino primário e que sempre me estimulou a desenvolver a perspicácia e amor pelo estudo.

À **Professora Dra. Cibeli Peroni** e ao Pós-Doutorando, **Dr. Nélío A. J. Oliveira**, ambos do IPEN, por abrirem as portas dos seus laboratórios e me ensinarem os princípios básicos do cultivo celular de queratinócitos com muito carinho e dedicação.

À **CAPES**, pela concessão de bolsa sanduíche de estudos para o desenvolvimento de parte das minhas pesquisas no *King's College London*. Processo número 2586-11-8.

À **FAPESP**, pela concessão de auxílio pesquisa (processo número 2008/11641-9), bolsa de doutorado no país (processo número 2010/06574-0) e auxílio pesquisa Chamada FAPESP/*King's College London 2010* (processo número 2010/51462-6).

Ao **Biomedical Reserach Center** (BRC) do *King's College London* por prover toda a infra-estrutura necessária para separação celular e análise de fenótipo celular por citometria de fluxo. Concomitantemente, agradeço ao **National Institute**

of Health Research (NIHR), ao *National Health Service Foundation Trust* (NHSFT) e ao **King`s College London** por darem suporte a este serviço.

Ao **Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo**, com especial atenção à Alessandra, Kátia e Veridiana, pela eficiência, profissionalismo e carinho com o qual me ajudaram com tantos dos trâmites acadêmicos.

Ao gerenciador de laboratório e querido amigo **Dr. Christopher Healy**, por me abrilhantar com suas ideias, compartilhar tantas experiências e me dar tanto suporte no desenvolvimento das minhas pesquisas.

Aos funcionários do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN) **Carlos** e **Beth** e à funcionária **Susmitha Rao**, do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial do KCL, pelo apoio técnico na irradiação das células utilizadas em alguns dos meus experimentos, sempre que necessário.

Às secretárias **Zilda Natalina Ramos Alves**, **Neia Barbosa** e **Nair Maria Pereira**, do Departamento de Patologia Bucal e Estomatologia Aplicada da FOUSP e **Angela Gates** e **Sharon Pudaruth**, e do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial do KCL, por todo o seu carinho e suporte nas minhas atividades acadêmicas.

Ao apoio técnico dos colegas Dr **Alisdair** (KCL), no processamento histológico, **Adriana Fraga Costa** (FOUSP) pela ajuda e ensinamentos relacionados a cultivo celular e **Elisa Maria** (FOUSP) por todo carinho, amizade e ajuda com processamento histológicos e reações imunoistoquímicas.

Aos queridos amigos e funcionários empenhados em me ajudar com os trabalhos de experimentação animal: **Marcelo Iadocicco** e **Renaide Rodrigues Ferreira** do Biotério Central do ICB-USP, **Maria Neide Ferreira Mascarenhas** do Biotério do IPEN e **Alex Huhn**, do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial do KCL.

Aos colegas **Jifan Feng, Adam L e Fátima Kingbleil** pelos ensinamentos relacionados à técnicas laboratoriais.

À todos os **meus verdadeiros amigos** que, estando longe ou perto, direta ou indiretamente, estiveram envolvidos nessa caminhada, compartilharam de momentos de alegria e me deram o suporte necessário para enfrentar com serenidade todas as adversidades. Em especial, às seis grandes mulheres que fizeram a diferença durante o meu doutorado: Karin Fernandes, Carla Siqueira, Rita Barcessat, Maria Aparecida Lyra, Ludmila Rabelo e Ambart Covarrubias.

Aos **meus familiares**. Juntos somos mais fortes. Juntos sonhamos e juntos conquistamos. Juntos chegamos até aqui! Amor sem fim.

E, por fim, com especial atenção e merecimento, **aos meus pais, Elio Daltoé e Docelina Perozzo Daltoé**. Ao longo deste tempo realmente provamos que o amor transcende fronteiras, tempo e espaço. Feliz daqueles que sabem que estarão tão bem acompanhados, para todo o sempre. Amor e gratidão eternos.

Para sempre...

E chega o dia que olhamos para traz e tudo faz sentido. Percebemos o quanto fomos capazes e o quanto somos felizes [...]. Já temos saudades [...]. Nem acabou e já queremos recomeçar. Acabar? Não se acaba o que não tem fim! Então só nos resta aprender a conviver com a saudade.

RESUMO

Daltoé FP Isolamento, caracterização e análise da resposta ao trauma de células-tronco epiteliais da mucosa bucal humana [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Avanços na identificação e caracterização de diferentes populações de células-tronco tem melhorado as perspectivas do seu uso clínico. A maioria dos estudos obtêm as células-tronco com base na expressão de marcadores de superfície celular e testa as suas propriedades por meio de ensaios funcionais *in vitro* e *in vivo*. Na presente pesquisa foram isoladas diferentes populações de células epiteliais com base na expressão de dois marcadores de células-tronco epiteliais descritos pela literatura, o receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) e o receptor de transferrina 1 (CD71). Uma vez isso feito, foi avaliado a co-expressão de outros marcadores de células-tronco epiteliais, como as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$, e realizado ensaios de eficiência de formação de colônias, potencial de crescimento celular, capacidade de reconstrução epitelial *in vitro*, análise da resposta ao trauma e avaliação da capacidade de auto renovação. Os resultados mostram que as células p75NTR⁺ tem um desempenho funcional melhor do que as p75NTR⁻ na maioria dos ensaios funcionais realizados, exceto pela capacidade de responder ao trauma e de se auto-renovar. Ademais, comprovou-se que células p75NTR⁺ expressam em maior proporção as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ e que o isolamento de células por dupla marcação (p75NTR⁺CD71⁻) possibilita a obtenção de uma população de células epiteliais ainda mais enriquecida com estes marcadores. No entanto, foi observado também que independentemente da população celular estudada e do tempo em cultivo, as populações de células epiteliais alteraram drasticamente o seu fenótipo quando de tal forma que as populações celulares inicialmente positivas se tornaram majoritariamente negativas e que as populações celulares inicialmente negativas passaram a ter células positivas em seu meio.

Palavras-chave: células epiteliais, células-tronco, resposta **ao trauma**, alteração do fenótipo.

ABSTRACT

Daltoé FP. Isolation, characterization and response to damage of human epithelial stem cells from human oral mucosa. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

Recent advances in cell sorting and characterization technics of stem cells have provided new insights and perspectives for clinical applications of this particular cell population. Most of the studies isolate stem cells based on the expression of cell surface markers and evaluate their stem cells-like proprieties by performing *in vitro* and *in vivo* assays. Here we isolated different populations of keratinocytes based on the expression of the epithelial stem cell markers neurotrophin receptor p75 (p75NTR) and transferrin receptor 1 (CD71). The co-expression of other epithelial stem markers such as integrins $\alpha 6$ and $\beta 1$ was also assessed and *in vitro* functional assays such as colony-forming efficiency; long-term growth potential, *in vitro* epithelial reconstruction-capacity and response to damage and self-renew capacity. Our results showed that p75NTR^{+ve} cells have better functional proprieties in most of the assays however they did not respond to damage neither presented self-renew capacity. Additionally, p75NTR^{-ve} cells express higher percentage of other epithelial stem cell markers such as integrins $\alpha 6$ and $\beta 1$ when compared to p75NTR^{-ve} cells and the double staining (p75NTR^{+ve}CD71^{-ve}) contributes to isolate a more enriched cell population based on the expression of the integrins. Nevertheless, independently of the cell population or of the amount of time in culture, cells have changed dramatically their phenotype in a way that the cell population initially p75NTR^{+ve} lost the expression of the p75NTR and the negative population have gained it.

Keywords: epithelial cells, stem cells, response to damage, phenotype changes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cél	Célula
min	Minutos
h	Horas
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> , traduzido como Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
UI	Unidades internacionais de medida
U	Unidades
mg	Miligramas
µg	Microgramas
ng	Nanograma
µm	Micrometros
ml	Mililitros
nM	Nanomolar
cm²	Centímetros quadrados

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
$\text{\textcircled{R}}$	Registro de marca
μ	Micrômetro
#	Número de catálogo
%	Porcentagem
CO^2	Gás carbônico
Gy	Gray (unidade de medida de radiações)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 TECIDO EPITELIAL: DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E FUNÇÃO.....	21
2.2 MUCOSA BUCAL: CONCEITOS GERAIS.....	22
2.3 CONCEITOS BÁSICOS SOBRE CÉLULAS-TRONCO.....	24
2.4 CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS: CONCEITOS GERAIS E FORMAS DE IDENTIFICAÇÃO.....	26
2.4.1 Marcadores para identificação de células-tronco epiteliais.....	27
2.4.1.1 Receptor de neurotrofina p75 (p75NTR).....	27
2.4.1.2 Receptor de transferrina (CD71).....	28
2.4.1.3 Integrinas.....	28
2.4.2 Retenção de marcadores de ciclo celular.....	30
2.5 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS.....	31
2.5.1 Separação celular por citometria de fluxo (FACS).....	32
2.5.2 Separação celular por meio de colunas magnéticas (MACS).....	33
2.5.3 Morfologia celular.....	34
2.5.4 Capacidade de adesão rápida ao colágeno tipo IV.....	34
2.5.5 Eficiência no efluxo de Hoechst 33342.....	34
3 PROPOSIÇÃO.....	36
3.1. OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	39
4.3 TÉCNICA DE CULTIVO DE QUERATINÓCITOS.....	40
4.3.1 Cultivo de fibroblastos 3T3-J2 (camada de sustentação).....	40
4.3.2 Cultivo primário de queratinócitos.....	41
4.4 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO CELULAR.....	43
4.4.1 Separação celular magneticamente mediada (MACS).....	43
4.4.2 Separação celular por citometria de fluxo (FACS).....	46

4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	44
4.5.1. Análise morfológica das colônias celulares.....	45
4.5.2. Curva de crescimento celular.....	45
4.5.3. Potencial de expansão.....	46
4.5.4 Eficiência de formação de colônia (EFC).....	46
4.5.5 Capacidade de reconstrução epitelial <i>in vitro</i>	47
4.5.6 Análise da resposta ao trauma das células-tronco epiteliais.....	48
4.5.7 Análise da capacidade de auto-renovação celular.....	49
4.6 ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE QUERATINÓCITOS BUCAIS AO LONGO DO CULTIVO.....	50
4.7 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS- TRONCO AO LONGO DO COCULTIVO DAS CÉLULAS P75NTR ⁺ E P75NTR ⁻	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS EM CULTURA.....	54
5.1.1 Análise morfológica das colônias celulares.....	54
5.1.2 Curva de crescimento celular.....	55
5.1.3 Potencial de expansão.....	56
5.1.4 Eficiência de formação de colônia (EFC).....	57
5.1.5 Avaliação funcional das células epiteliais através da reconstrução epitelial <i>in vitro</i>	58
5.1.6 Análise da resposta ao trauma das células-tronco epiteliais em modelo animal.....	60
5.1.7 Análise da capacidade de auto-renovação celular.....	64
5.2 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS QUERATINÓCITOS BUCAIS SEPARADOS POR MACS.....	65
5.3 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS QUERATINÓCITOS BUCAIS SEPARADOS POR FACS.....	68
5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS- TRONCO AO LONGO DO COCULTIVO DAS CÉLULAS P75NTR ⁺ E P75NTR ⁻	71
6 DISCUSSÃO.....	74

7 CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
ANEXOS.....	95

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os tecidos de metazoários são complexos e compostos por estruturas dinâmicas cuja manutenção depende dos mesmos processos de proliferação e diferenciação celular responsáveis pelo desenvolvimento de embriões. Enquanto algumas células tem um tempo de vida indeterminado, outras vivem por curtos períodos de tempo e são repostas constantemente, o que requer, portanto, que células proliferem e se diferenciem. Frequentemente, são as células-tronco a fonte celular que possibilita isso. Essas células são caracterizadas por possuírem a habilidade tanto de produzir células filhas diferenciadas quanto de se auto-renovarem quando necessário, tendo a capacidade única, portanto, de fazer divisões simétricas ou assimétricas, de acordo com a necessidade do tecido (Fuchs; Horsley, 2011).

As primeiras evidências da existência de células-tronco datam do início dos anos 60, em estudos envolvendo o tecido hematopoiético (Till; McCulloch, 1961). Desde então, células tronco vem sendo estudadas nos mais diferentes tecidos do corpo humano e, juntamente com as células-tronco hematopoiéticas, uma das populações celulares que mais entrou em evidência foi a das células-tronco epiteliais (Rheinwald; Green, 1975; Rizvi; Wong, 2005).

Embora as células-tronco sejam extremamente importantes, a sua identificação permanece um desafio. A grande quantidade de tipos celulares dentro de cada tecido, a complexidade com que as células-tronco se comunicam entre si e a ausência de marcadores específicos para cada um dos diferentes tipos de células-tronco contribuem para isso (Fuchs; Horsley, 2011).

Para o estudo das células-tronco epiteliais, diferentes técnicas de identificação e isolamento celular têm sido utilizadas (Dunnwald et al., 2001; Larderet et al., 2006; Nakamura et al., 2007). A maior parte dos estudos faz o isolamento das células de interesse por meio de marcadores de superfície celular e, na maioria das vezes, comprova as propriedades de células-tronco por meio de ensaios funcionais *in vitro* (Jones; Watt, 1993; Li et al., 1998; Okumura et al., 2003; Nakamura et al., 2007). Além disso, a caracterização das células-tronco epiteliais de mucosa humana ainda é muito pobre, e questões como a capacidade de resposta

ao trauma e potencial de auto-renovação nunca foram estudadas. Ademias, não há estudos que avaliem se a manipulação celular *in vitro* pode alterar as características fenotípicas/genotípicas celulares iniciais, e se isso pode ter ou não alguma implicação negativa futura.

De maneira geral, células epiteliais tem sido usadas com sucesso para diversas aplicações clínicas, a exemplo de regeneração de derme em casos de queimaduras graves (McAree et al., 1993; Still et al., 1994), reconstrução do trato gastro-intestinal pós ressecção de tumores (Takagi et al., 2012), reconstrução do epitélio límbico da superfície da córnea após queimaduras químicas (Pellegrini et al., 1997) e bioengenharia de dentes (Angelova et al., 2013).

A emergência das pesquisas sobre células-tronco epiteliais, traz à comunidade científica a esperança de poder fazer o uso destas células, teoricamente mais potentes que as células epiteliais comuns, para terem resultados ainda mais promissores (De Luca et al., 2006; Watt et al., 2006).

No entanto, fica claro que as pesquisas científicas nessa área de conhecimento devem ser aprofundadas para que as promessas de futuras terapias se concretizem de maneira segura é preciso aprimorar as técnicas de isolamento celular e, sobretudo, entender melhor o impacto da manipulação celular *in vitro* sobre as populações celulares isoladas.

É neste contexto, portanto, que o presente trabalho se insere. Objetivou-se isolar células-tronco epiteliais de mucosa bucal humana baseando-se na expressão de marcadores celulares descritos na literatura. Foi feita a caracterização e avaliação das suas propriedades funcionais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, assim como, paralelamente, avaliado o fenótipo celular durante o cultivo celular.

As bases científicas que justificam todo esse processo de pesquisa, os detalhes da metodologia utilizada e os resultados obtidos estão detalhadamente descritas nos capítulos que se seguem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO EPITELIAL: DESENVOLVIMENTO, MORFOLOGIA E FUNÇÃO

Epitélios de revestimento são comumente formados por lençóis contínuos de células fortemente aderidas entre si e que revestem as superfícies externas (pele, córnea e mucosa bucal, por exemplo) e internas do corpo (endotélio nos vasos sanguíneos e epitélio respiratório nos pulmões, por exemplo) (Junqueira; Carneiro, 2004; Blanpain et al., 2007).

Os epitélios são tecidos avascularizados e que dependem, portanto, da nutrição proveniente dos tecidos adjacentes. Eles podem ser compostos por múltiplas camadas (epitélios estratificados) ou por uma camada única de células (epitélios simples) (Junqueira; Carneiro, 2004; Blanpain et al., 2007).

A função dos epitélios é bastante variável, dependendo da sua localização. Assim, eles podem assumir funções como produção de enzimas (epitélio hepático), hormônios (epitélio pancreático), controle do fluxo de água, gases e eletrólitos (endotélio, em vasos sanguíneos, e epitélio alveolar, nos pulmões, por exemplo) e manutenção da integridade física por oferecer proteção mecânica à agentes externos (pele) (Junqueira; Carneiro, 2004).

Os epitélios podem se originar dos três folhetos embrionários, de acordo com o órgão/região do organismo do qual fazem parte. Como exemplo disso, podemos citar o tecido endotelial, que é de origem endodérmica, o pericárdio e o peritônio, de origem mesodérmica, e a pele, córnea e mucosa bucal, de origem ectodérmica (Junqueira; Carneiro, 2004; Blanpain et al., 2007).

Ainda do ponto de vista de desenvolvimento embrionário, ao se formarem, os epitélios se unem fortemente à membrana basal, rica em matriz extracelular e fatores de crescimento (Blanpain et al., 2007). Tanto a adesão célula epitelial-célula epitelial quanto célula epitelial-membrana basal é feita por componentes celulares estruturais como as integrinas, por exemplo. São essas estruturas que controlam também o desprendimento das células da camada basal e migração/diferenciação das mesmas em direção à superfície (Watt, 2002).

De maneira geral, os epitélios ainda podem ser classificados em duas grandes categorias baseando-se no tempo de renovação celular: os epitélios rapidamente auto-renováveis e os epitélios persistentes. Os primeiros são comumente encontrados em locais expostos ao meio externo do corpo, como a pele, intestino e olhos. A função primária destes seria, de maneira simplificada, a proteção física e o controle da perda de água. A propósito, esses são os epitélios mais bem estudados e conhecidos do ponto de vista de desenvolvimento, morfologia e funcionalidade. Em contrapartida, os epitélios persistentes como o renal, hepático e o das glândulas mamárias, por exemplo, se multiplicam com menor frequência e os mecanismos de renovação celular destes tecidos são menos entendidos (Rizvi; Wong, 2005; Neal et al., 2011).

Como visto, existe um grande número de tecidos epiteliais e um grande variedade de particularidades em cada um deles. Neste sentido, uma vez que a presente pesquisa se refere às células epiteliais que compõe a mucosa bucal humana, é sobre ela, em especial, que serão apresentados mais detalhes a seguir.

2.2 MUCOSA BUCAL: CONCEITOS GERAIS

Imediatamente após a gastrulação, durante o desenvolvimento embrionário, as células da neuroectoderme que estão localizadas na superfície do embrião se diferenciam e dão origem aos tecidos que revestem externamente o embrião, no caso, tanto a pele quanto às mucosas (Giancotti; Tarone, 2003).

Pele, mucosa e seus apêndices são responsáveis por um grande número de funções essenciais para a sobrevivência dos seres humanos e animais. Essas estruturas desempenham um papel importante na manutenção da integridade do organismo através da regulação das concentrações de água e eletrólitos, mudanças de temperatura, proteção contra radiação, traumatismos e infecções. Ademais, pele e mucosas provêm sensibilidade tátil e interferem nos processos de interação social (Urmacher, 1990; Sloan et al., 1991; Alonso; Fuchs, 2003; Blanpain; Fuchs, 2006).

Estruturalmente, tanto a pele quanto a mucosa bucal são formadas por camadas organizadas de células epiteliais, também chamadas de queratinócitos, as quais formam o epitélio propriamente dito, e uma camada de tecido conjuntivo de sustentação que, na mucosa bucal recebe o nome de lâmina própria e, na pele, derme (Stephens; Genever, 2007).

Tanto a lâmina própria quanto a derme têm em comum a presença de fibroblastos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e nervos. No entanto, glândulas salivares são exclusivas da lâmina própria, enquanto que folículos pilosos e glândulas sebáceas, da pele. Mais profundamente nestes tecidos, encontra-se a hipoderme e submucosa, no que se refere a derme e da lâmina própria, respectivamente (Stephens; Genever, 2007).

Entre os epitélios de revestimento e o tecido conjuntivo subjacente (lâmina própria/derme) existe uma fina camada acelular, com 1 a 2 μm de espessura, chamada de membrana basal. A camada de células epiteliais que está em contato direto com a membrana basal chama-se camada basal e é à ela que é atribuído um certo grau de indiferenciação e maior capacidade proliferativa. À medida que as células da camada basal se dividem, diferenciam-se e movem-se em direção à superfície, formando os diferentes estratos celulares, como a camada espinhosa, a granulosa e a córnea, por exemplo (Watt, 1989; Alonso; Fuchs, 2003; Moharamzadeh et al., 2007).

O tipo de célula comumente encontrada dentro dos epitélios que compõem a pele e a mucosa bucal é o queratinócito. Os queratinócitos recebem esse nome em virtude da capacidade que possuem de sintetizar queratina ao longo da sua vida. Outras células presentes nos tecidos epiteliais, porém em menor número, incluem os melanócitos, as células de langerhans e as células de merkel (Stephens; Genever, 2007).

Apesar de todas as queratinócitos da camada basal serem mais indiferenciados em relação às células epiteliais dos estratos superiores, acredita-se que a homeostase tecidual é mantida pela presença de uma pequena e distinta população celular, chamada de células-tronco epiteliais, localizada nesta área do tecido (Watt; Hogan, 2000; Clayton et al., 2007). Mais detalhes sobre essa população celular, em especial, bem como conceitos básicos sobre célula-tronco em geral, serão abordados a seguir.

2.3 CONCEITOS BÁSICOS SOBRE CÉLULAS-TRONCO

Conceitualmente, células-tronco são células progenitoras indiferenciadas e que possuem a capacidade de se dividir tanto de maneira assimétrica, dando origem à células diferenciadas, quando simétrica, dando origem à células idênticas a si, e tendo, portanto, capacidade de se auto-renovar (Thomson et al., 1998; Thomson; Marshall, 1998; Pittenger, et al., 1999; Clayton et al., 2007).

Cientistas normalmente creditam aos trabalhos de Till e McCulloch, realizados em 1961, a primeira evidência científica da existência de células-tronco em tecidos adultos (Till; McCulloch, 1961). Neste trabalho, os autores demonstraram que o transplante de uma única colônia de células hematopoiéticas era capaz de reconstituir todo o sistema hematopoiético de hospedeiros que haviam tido o seu sistema hematopoiético depletado por irradiação. Foi a partir deste momento que se postulou as teorias de que células-tronco eram raras, podendo ser responsáveis tanto pela homeostase tecidual como pela reparação tecidual pós-lesão e que poderiam possuir a capacidade de diferenciação em multilinhagem.

O que se sabe hoje é que existe dois tipos principais de células-tronco: as *células-tronco embrionárias* e as *células-tronco adultas*. As primeiras, como o próprio nome sugere, são derivadas de estruturas embrionárias no estágio de blastocisto (Thomson et al., 1998) e, as segundas, em teoria, de qualquer um dos tecidos celularizados de organismos multicelulares (Watt; Hogan, 2000; Clayton et al., 2007).

Células-tronco embrionárias são obtidas de embriões com 4 a 5 dias de formação, vistos à microscopia de luz como um pequeno conjunto de células formando uma estrutura esférica chamada de blastocisto (Thomson et al., 1998). Teoricamente, essas células possuem potencial de proliferação e diferenciação ilimitados (Thomson; Marshall, 1998), e são capazes formar estruturas derivadas de todos os três folhetos embrionários (Thomson et al., 1998).

Conforme previamente abordado, as células-tronco adultas são virtualmente encontradas em todos os tecidos celularizados de organismos multicelulares e a sua função primária seria manter a homeostase tecidual, ou seja, repor as células perdidas ao longo do tempo (Watt; Hogan, 2000; Clayton et al., 2007; Da Silva Meirelles et al., 2008).

As células-tronco embrionárias são caracterizadas por terem altas taxas de proliferação, pois são biologicamente programadas para se dividir inúmeras vezes com o intuito de formar um ser vivo (Thomson et al., 1998; Thomson; Marshall, 1998). Em contrapartida, as células-tronco adultas são células de ciclagem lenta, ou seja, que se dividem com menos frequência do que as demais células dos tecido ou órgão do qual fazem parte (Blanpain et al., 2007).

Em tecidos adultos, quando as células-tronco se dividem de maneira assimétrica, podem ainda dar origem a uma população de células indiferenciadas, mas que não tem mais a capacidade de auto-renovação. Essas últimas, ainda apresentam alta capacidade proliferativa e são denominadas de células amplificadoras transitórias (Blanpain et al., 2007).

No que concerne a capacidade de diferenciação celular, as células-tronco embrionárias tem, em teoria, a capacidade de formar um número muito maior de tecidos comparativamente às células-tronco adultas e, por isso, são classificadas como pluripotentes (Thomson; Marshall, 1998). Enquanto isso, as células-tronco adultas podem ser multi ou unipotentes. No primeiro caso, podem formar diferentes estruturas/tecidos, normalmente derivadas do mesmo folheto embrionário do que lhe deu origem, como o caso das células-tronco da medula óssea que podem se diferenciar tanto em células da linhagem hematopoiéticas quanto em células de linhagem estromal (adipócitos e fibroblastos, por exemplo). No caso das células-tronco unipotentes, elas tem uma capacidade restrita de diferenciação, sendo capazes apenas de dar origem ao mesmo tipo de célula do tecido do qual fazem parte, mas ainda são capazes de se auto-renovarem (Watt; Hogan, 2000; Clayton et al., 2007; Da Silva Meirelles, et al., 2008; Notta et al., 2011).

O caminho a ser escolhido para diferenciação de células-tronco parece depender tanto de fatores intrínsecos, como informações genéticas, por exemplo, quanto extrínsecos, com fatores liberados pelo meio, por exemplo, no caso de necessidade de reparar um tecido pós-trauma (Gurdon, 1988; Watt; Hogan, 2000; Clayton et al., 2007).

Por fim, do ponto de vista de aplicabilidade clínica direta, apesar das células-tronco embrionárias terem uma capacidade de diferenciação ilimitada, elas podem causar rejeição imunológica e gerar tumores. No caso do emprego de células-tronco adultas provenientes do próprio paciente, esse risco é praticamente inexistente (Thomson et al., 1998; Fang et al., 2004).

2.4 CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS: CONCEITOS GERAIS E FORMAS DE IDENTIFICAÇÃO

Estima-se que cada um dos tecidos celularizados que compõe um organismo vivo contenha células-tronco e que as mesmas estejam localizadas em nichos específicos (Lajtha, 1979; Lavker; Sun, 1982; Potten; Loeffler, 1990; Watt; Hogan, 2000; Lechler; Fuchs, 2005; Rizvi; Wong, 2005; Da Silva Meirelles et al., 2006; Blanpain; Fuch., 2009; Feng et al., 2011).

Ao contrário das células-tronco embrionárias, que tem uma localização específica (camada interna do blastocisto) e um método de obtenção bem estabelecido (remoção mecânica) (Thomson, et al., 1998), a maioria das populações de células-tronco adultas estudadas não tem um critério unânime de identificação e, tão pouco, de isolamento. O problema reside em que cada tecido adulto do corpo humano abriga células-tronco adultas diferentes entre si, as quais desempenham funções biológicas próprias e produzem e expressam proteínas específicas (Blanpain et al., 2007; Clayton et al., 2007; Da Silva Meirelles et al., 2008).

Alguns tecidos, no entanto, já tiveram as suas células-tronco isoladas e extensivamente estudadas como, por exemplo, a medula óssea (Rossi et al., 2011) e o cordão umbilical (Secco et al., 2008). No entanto, mesmo essas populações celulares são consideradas pobremente caracterizadas (Secco et al., 2008; Rossi et al., 2011).

No que concerne a pele, sabe-se que dentro dela existem diferentes populações de células-tronco epiteliais residindo em diferentes locais e com capacidade de diferenciação bastante variável (Blanpain; Fuch., 2009; Silva-Vargas et al., 2005; Nguyen et al., 2009). Há evidências de que em condições de

homeostase, as células-tronco das diferentes regiões do tecido são encarregadas por perpetuarem as linhagens celulares do local onde se localizam. Dessa forma, células-tronco do folículo capilar seriam capazes pela manutenção da progênie celular relacionada à formação de cabelo, por exemplo, e células-tronco interfoliculares, pelas camadas superficiais da pele. Contudo, em resposta ao trauma ou à manipulação genética, sabe-se que essas populações de células tronco adquirem a capacidade de diferenciação em multilinhagem (Watt et al., 2006).

Dentre as células-tronco epiteliais mais bem caracterizadas, destacam-se as de uma região da pele chamada bulbo capilar (Silva-Vargas et al., 2005; Nguyen et al., 2009). Morfologicamente, esta região é definida como o local de inserção do músculo eretor do pelo e, inicialmente, foi indicada como um possível nicho para células-tronco epiteliais pela presença de células de ciclagem lenta (Watt et al., 2006). Com o passar do tempo, outras maneiras de identificação das células-tronco epiteliais localizadas no bulbo capilar foram sugeridas, dentre elas, o uso de marcadores celulares como o CD34, SOX9, LGR5, CK15 e integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ (Fuchs et al., 2004; Morris et al., 2004; Tumber, et al., 2004; Cotsarelis, 2006; Watt et al., 2006; Nowak et al., 2008; Jaks et al., 2008).

A medida que se aprofundaram as pesquisas sobre caracterização das células-tronco epiteliais do bulbo capilar, foram descobertas outras populações de células-tronco logo acima dessa região, no ístimo capilar (essas células são LGR6+ e/ou MTS24+) (Nijhof, et al., 2006; Snippert et al., 2010), e na zona do epitélio juncional (células LRIG1+) (Jensen et al., 2009). O que pode ser notado em cada um destes estudos é que cada uma dessas populações, apesar de estarem muito próximas umas das outras fisicamente, expressam marcadores celulares distintos e tem comportamento biológicos bastante específicos.

Na mucosa bucal, sabe-se que as células-tronco estão localizadas na camada basal do epitélio mas identifica-las precisamente permanece um desafio. A maior parte dos estudos o faz baseado na expressão de proteínas específicas sendo as principais, sob o nosso ponto de vista, abordadas a seguir:

2.4.1 Marcadores para identificação de células-tronco epiteliais

2.4.1.1 Receptor de neurotrofina p75 (p75NTR)

O receptor de neurotrofina p75 (p75NTR) é um membro da superfamília de receptores TNF e parece ter um papel importante no controle da diferenciação celular de queratinócitos (Rodriguez-Tebar et al., 1992).

Há indícios de que o p75NTR tenha influência direta sobre o ciclo celular, influenciando na sobrevivência e apoptose de neurônios (Dechant; Barde, 1997).

Em 1998, Kunimura et al. mostraram que o p75NTR estava expresso em queratinócitos que permanecem em G0 (ou seja, células que ciclam lentamente), contrastando com a localização das células que expressam Ki-67 *in vivo* (células proliferativas) (Kunimura et al., 1998).

Em 2003, outros autores apontaram o p75NTR como um dos marcadores mais promissores para identificação de células-tronco epiteliais em epitélio esofágico, mostrando que além das células positivas para esta proteína serem de ciclagem lenta, tinham maior capacidade de proliferação *in vitro* (Okumura et al., 2003),

Mais recentemente, Nakamura et al. (2007) demonstraram que as células p75NTR⁺ também não se dividem frequentemente *in vivo*, têm maior capacidade proliferativa que as p75NTR⁻ *in vitro*, formam mais colônias e o p75NTR está fortemente expresso nas células das colônias celulares do tipo holoclone (resultados confirmados através da análise da expressão do mRNA e da proteína) e moderadamente ou pouco expresso nas colônias celulares do tipo mero ou paraclone (Nakamura et al., 2007). Desde então o p75NTR tem sido considerado um dos marcadores mais promissores para se identificar células-tronco epiteliais.

Nesse sentido, o p75NTR foi ainda recentemente considerado como um marcador de células-tronco epiteliais saudáveis em laringe (Li et al., 2012) e a sua maior expressão em células de carcinomas epidermóides de boca tem sido associada a

um pior prognóstico para o paciente (Søland et al., 2008). Por fim, vale dizer ainda que células que expressam o p75NTR têm demonstrado resistência ao tratamento quimioterápico em carcinomas de esôfago (Huang et al., 2009).

2.4.1.2 Receptor de transferrina 1 (CD71)

O receptor de transferrina 1, também conhecido como CD71, é uma glicoproteína transmembrânica homodimérica (180kDa) responsável, dentre outras coisas, pela internalização de íons ferro para dentro da célula. Isso torna o ferro disponível para uma série de processos metabólicos, incluindo os relacionados ao transporte de elétrons, fixação de oxigênio e nitrogênio, síntese de DNA e divisão celular (Aisen, 2004; Ponka; Lok, 1999).

O CD71 é encontrado em altos níveis em células com grande demanda por ferro, como eritrócitos, e em células com alta taxa de proliferação, como células da camada basal em pele e epitélio intestinal (Ponka; Lok, 1999; Daniels et al., 2006a, Daniels et al., 2006b).

Neste sentido, no que tangencia o estudo de células-tronco epiteliais, Tani et al. (2000) demonstraram que os queratinócitos que não expressavam o receptor de transferrina 1 (células CD71⁻) eram células de ciclagem lenta, co-expressavam altos níveis de integrina $\alpha 6$ e tinham um aspecto morfológico de célula epitelial indiferenciada (relação núcleo-citoplasma aumentada). Além disso, esses autores também demonstraram que as células epiteliais que se localizam na região do bulbo capilar – região essa sabidamente armazenadora de células-tronco epiteliais em pele (Fuchs et al., 2004) – não expressavam CD71 (Tani et al., 2000).

Poucos anos após, também comprovou-se que os altos níveis de integrina $\alpha 6$ e os baixos níveis de CD71 eram determinantes para se selecionar uma população de células-tronco na epiderme humana (Webb et al., 2004).

2.4.1.3 Integrinas

As integrinas constituem uma grande família de receptores de superfície celular que mediam as interações célula-célula e célula-matriz extra celular. Cada integrina é, na verdade, um heterodímero composto por uma subunidade “ α ” e uma “ β ”, ambas transmembrânicas (Hynes, 1992).

As integrinas são essenciais para o controle da diferenciação celular e morfogênese tecidual (Levy et al, 2000; Watt, 2002). Quando desreguladas, podem contribuir para o desenvolvimento de doenças, como o câncer, por exemplo (Bagutti et al. 1998; Ferreira et al., 2009).

Como grande parte das pesquisas na área de células-tronco epiteliais está focada em identificar as células-tronco baseando-se no princípio de que estas células estão localizadas na camada basal dos epitélios; o isolamento das mesmas baseado na expressão de integrinas responsáveis pela adesão das células à lâmina própria parece conveniente (Hall; Watt, 1989; Sonnenberg et al., 1991; Levy et al., 2000).

Dentre os vários tipos integrinas descritos na literatura como sendo úteis para a identificação de células-tronco epiteliais, as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ se destacam (Hertle et al., 1991; Li et al., 1998).

Neste sentido, sabe-se que células epiteliais que expressam as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ possuem uma maior capacidade de proliferação celular quando comparadas às células que não as expressam (Hertle et al., 1991; Li et al., 1998). Isso, no entanto, não quer dizer que esses marcadores sejam exclusivamente expressos pelas células-tronco epiteliais. Relata-se, por exemplo, que aproximadamente 40% das células da camada basal expressam integrina $\beta 1$ (Jones; Watt, 1993; Jones et al., 1995) e que a integrina $\alpha 6$ também é expressa pelas células amplificadoras transitórias (Li et al., 1998, Kaur et al., 2000). Ou seja, ambas integrinas ($\alpha 6$ e $\beta 1$) não são exclusivamente expressas pelas células-tronco epiteliais mas há fortes indícios de que compreendem essa população (Hertle et al., 1991; Li et al., 1998).

2.4.2 Retenção de marcadores de ciclo celular

Levando em consideração que as células-tronco adultas são sabidamente células de ciclagem lenta, quando comparadas com as demais células do tecido do qual fazem parte, a seleção de células que se dividem com menos frequência tem sido sugerida como um método de identificação de células-tronco adultas (Till; McCulloch, 1961).

Nesse ínterim, ao se administrar uma substância que possa ser incorporada ao DNA das células (como o análogo de nucleosídeos BrdU, por exemplo); células que se dividem com alta frequência o diluirão rapidamente enquanto que as células que se dividem menos frequentemente (ou que não tenham se dividido durante o período de tempo da administração da substância), o retêm (Cotsarelis et al., 1990; Potten 2004; Fuchs; Horsley, 2011).

Essa técnica tem sido particularmente utilizada com sucesso em experimentos de localização de células-tronco epiteliais em pele, particularmente as da região do bulbo capilar (Cotsarelis et al., 1990) e células-tronco epiteliais responsáveis pela regeneração da córnea, localizadas na região do limbo ocular (Cotsarelis et al., 1989).

Embora essa técnica pareça ser muito útil para identificação de células-tronco, ela apresenta algumas falhas importantes. Um exemplo é que a incorporação das substâncias que se ligam ao DNA celular só ocorre em células que estão em divisão celular no momento da administração da droga (Schneider, 1976; Bickenbach, 1981; Cotsarelis et al. 1990). Com isso, células-tronco que não tenham se dividido naquele período de tempo, não são identificadas. Além disso, como a marcação celular está localizada no interior do núcleo das células, é necessário permeabilizar as células para identifica-las. Isso inviabiliza o uso de células viáveis selecionadas com base na retenção de marcadores de ciclo celular (Schneider, 1976; Bickenbach, JR, 1981; Cotsarelis et al. 1990).

2.5 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO EPITELIAIS

Não existe um critério unânime para a identificação, e, tão pouco para o isolamento de células-tronco adultas. No entanto, algumas técnicas vem sendo investigadas e são descritas a seguir:

2.5.1 Separação celular por citometria de fluxo (FACS)

Esse é um método de separação celular que pode ser feito baseado na expressão de marcadores celulares específicos (como alguns dos descritos anteriormente) e detecção dos mesmos em um equipamento laboratorial chamado citômetro de fluxo.

A técnica em si é popularmente conhecida como FACS (do inglês, “*fluorescence-activated cell sorting*”) e, mais especificamente, consiste no procedimento de marcar uma estrutura ou proteína celular alvo em células em suspensão, com fluorocromos. O citômetro de fluxo, por sua vez, tem a habilidade de analisar célula por célula e separar as células marcadas com um ou mais fluorocromos de interesse, se assim for desejado, ou apenas identificar o percentual de células que expressam cada um dos marcadores escolhidos para estudo (Grindem 1996, Herzenberg et al., 2002).

Aliás, além de avaliar a presença ou não de um fluorocromo, as células podem ser avaliadas e separadas de acordo com o tamanho celular (“*Forward scatter – FSC*”), granulosidade ou complexidade interna da célula (“*Side Scatter – SSC*”) e intensidade da fluorescência. A separação celular pode ainda ser realizada com base na expressão de vários marcadores celulares simultaneamente. O número de fluorocromos (espectro de cores) que pode ser identificado de uma única vez, em conjunto com as outras variáveis, depende da marca e do modelo do citômetro de fluxo utilizado (Grindem 1996, Herzenberg et al., 2002).

2.5.2 Separação celular por meio de colunas magnéticas (MACS)

A separação celular por meio de colunas magnéticas (MACS - *magnetic activated cell sorting*) é um método onde estruturas ou proteínas celulares alvo são

marcadas com anticorpos que, ao invés de serem conjugados com um fluorocromo, são conjugados com micro esferas magnéticas. Após marcadas com os anticorpos conjugados às partículas magnéticas, as células passam por um aparelho que emite um campo magnético capaz de atrair as micro partículas magnéticas que, por conseguinte, arrastam consigo as células que tem os anticorpos a elas ligados. Dessa forma, tem-se, em uma área as células que sabidamente expressam uma proteína ou que possuem uma estrutura de interesse e, em outra, as demais (Miltenyi et al., 1990).

A vantagem em relação ao método anterior é que as células não são submetidas a alta pressão para passarem pelos finos capilares de leitura e separação celular dos citômetros de fluxo, o que inevitavelmente leva a morte de muitas células. A desvantagem da separação celular magneticamente mediada é que ela não permite dupla marcação uma vez que o campo magnético não é seletivo para um tipo de marcador em detrimento de outro (Miltenyi et al., 1990). Já, no caso de citômetro de fluxo, pode-se fazer a separação celular utilizando até 18 marcadores celulares diferentes, simultaneamente (informações do fabricante de citômetros BD Bioscience®).

2.5.3 Morfologia celular

A separação de células-tronco baseado na morfologia celular é uma técnica particularmente utilizada para seleção de queratinócitos mais clonogênicos (Barradon; Green, 1987; Kang et al., 2000; Izumi et al., 2007).

O primeiro estudo a este respeito data de 1985 e demonstrou que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a habilidade dos queratinócitos formarem colônias diminui à medida que eles aumentam de tamanho (Barradon; Green, 1985). Dois anos depois, o mesmo grupo de pesquisadores (Barradon; Green, 1987) aponta a existência de três diferentes tipos de colônias de células epiteliais e a identificação de células-tronco com base na sua morfologia. O primeiro tipo de colônias seria o das constituídas por queratinócitos pequenos e com um alto potencial proliferativo, denominadas de *holoclones*. O segundo tipo de colônia de queratinócitos conteria células relativamente maiores do que as encontradas nos holoclones, com um

potencial de proliferação decrescente ao longo do tempo e denominadas então de *meroclones*. Por fim, os autores descreveram a existência de colônias celulares com baixo potencial de proliferação e com crescimento limitado, geralmente pequenas, disformes e compostas por queratinócitos grandes. Este último tipo de colônia celular foi denominada de *paraclone* (Barradon; Green, 1987).

Barradon e Green (1987) também especulam que as células geradoras dos *holoclones in vitro* deveriam ser as células-tronco epiteliais *in vivo*. Estudos mais recentes corroboram com a teoria de que quanto maior for o tamanho do queratinócito, menor a sua capacidade proliferativa e maior é o seu grau de diferenciação (Kang et al., 2000).

Esse método de seleção dos queratinócitos baseado na sua morfologia pode ser um jeito prático de se obter uma subpopulação de células mais indiferenciadas (ou tronco) a partir de uma cultura de queratinócitos, mas não é específico (Barradon; Green, 1987; Kang et al., 2000; Izumi et al., 2007).

2.5.4 Capacidade de adesão rápida ao colágeno tipo IV

O método de seleção de células-tronco epiteliais baseado na capacidade dos queratinócitos se aderirem rapidamente ao colágeno tipo IV foi pioneiramente idealizado por Dunnwald et al. (2001). Esse método consiste em se plaquear os queratinócitos em placas de cultivo contendo colágeno tipo IV e, após 10 minutos, remover as células que permanecem em suspensão. Somente as células que tiverem se aderido no decorrer desse curto período de tempo permanecem em cultura (Dunnwald et al., 2001; Xie et al., 2007).

Outros estudos evidenciaram que as células que têm a capacidade de se aderirem rapidamente ao colágeno do tipo IV compreendem uma quantidade maior de células de ciclagem lenta, de células com maior capacidade de formar colônias e de células que expressam com maior prevalência outros marcadores de células-tronco epiteliais tais como as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ (Igarashi et al., 2008; Kim et al., 2004).

2.5.5 Eficiência no efluxo de Hoechst 33342

O ensaio de efluxo de Hoechst 33342 foi pioneiramente descrito por Goodell et al. (1996), que fez o uso dessa técnica para o isolamento de uma população de células-tronco hematopoiéticas. Esses autores dissolveram o corante fluorescente Hoechst 33342 junto ao meio de cultura das suas células, por um determinado período de tempo e depois analisaram as células que o retiveram comparativamente com as que o expeliram.

O Hoechst 33342 era utilizado até aquele momento como um identificador de células de ciclagem lenta, uma vez que sabia-se que ele se liga ao DNA celular e que, portanto, células que se dividem com frequência, o diluem enquanto que células quiescentes, o retém (Darynkiewicz, 1986). No entanto, Goodell et al. (1996), constataram que havia uma pequena população de células-tronco hematopoiéticas que não retinha o Hoechst 33342 e que tinha 1000 vezes mais capacidade de reconstituir o tecido hematopoiético de camundongos que tiveram o seu sistema hematopoiético previamente desvitalizado por irradiação. De maneira intrigante, essa característica parecia não ter relação alguma com o fato destas células serem ou não células de ciclagem lenta (Goodell et al., 1996).

Desde então, o método de seleção de células com base na maior eficiência do efluxo no Hoechst 33342 tem sido utilizado com populações celulares de diversos tecidos. Como exemplo disso pode-se citar o isolamento de populações de células-tronco epiteliais das glândulas mamárias (Clarke et al., 2005), da córnea (De Paiva et al., 2005) e da pele (Larderet et al., 2006; Redvers et al., 2006). Interessantemente, ao menos em pele, as células-tronco selecionadas por este método parecem não expressar importantes marcadores de células-tronco descritos previamente na literatura, a exemplo das integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ (Terunuma et al., 2003). Fatos como esse denotam a necessidade de mais estudos para entender a correlação entre o fenótipo celular, o comportamento biológico e os diversos tipos de isolamento de células-tronco.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é isolar, caracterizar e avaliar a resposta **ao trauma** de células-tronco epiteliais de mucosa bucal humana ao longo do cultivo celular *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolar populações de queratinócitos a partir de mucosa bucal humana com base na expressão dos marcadores celulares p75NTR e CD71.

Caracterizar as populações positivas e negativas em relação a marcadores de células-tronco previamente descritos pela literatura.

Verificar *in vitro* as capacidades funcionais das diferentes populações celulares isoladas.

Avaliar a resposta ao trauma e a capacidade de auto-renovação das diferentes populações celulares obtidas em ensaios funcionais *in vivo*.

Analisar possíveis alterações fenotípicas das populações obtidas quando isoladas por diferentes métodos (FACS e MACS) e cultivadas isoladamente ou em condições de cocultivo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Para este estudo foram utilizadas amostras de tecido epitelial fresco saudável, provenientes da mucosa bucal humana (gengiva inserida).

Os pacientes foram selecionados de maneira randomizada e foram adultos, com idade entre 22 e 42 anos, voluntários, saudáveis, que não faziam uso de fumo, álcool ou qualquer outro tipo de droga.

O tecido epitelial foi retirado por cirurgiões-dentistas durante ato cirúrgico, conforme indicação clínica por eles estabelecida. Foram feitas duas coletas, onde em cada uma delas foram obtidas fragmentos de tecido epitelial de 6 diferentes doadores, com a finalidade de se formar, portanto, duas populações celulares compostas por um *pool* de células. Essas populações celulares foram denominadas por nós de KSC-I e KSC-II, respectivamente..

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo, Brasil (registro de protocolo 02/09 - Anexo A), pelo CONEP (processo número 332/2012) e pelo comitê de ética do Reino Unido a partir de registro do King's College London sob a licença nº 70/6870.

Todos os pacientes foram previamente informados do procedimento de coleta do material, concordam em participar voluntariamente da pesquisa e leram e assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” determinado para este protocolo (Anexo B).

O projeto de pesquisa que originou o presente trabalho recebeu financiamento da FAPESP nas modalidades de Auxílio Regular a Pesquisa (processo número 2008/11641-9), auxílio a pesquisa na modalidade Chamada

FAPESP/*King's College London 2010* (processo número 2010/51462-6) e bolsa de doutorado no país pela FAPESP (processo número 2010/06574-0) e bolsa de doutorado sanduíche pela CAPES (processo número 2586-11-8).

4.3 TÉCNICA DE CULTIVO DE QUERATINÓCITOS

4.3.1 Cultivo de fibroblastos 3T3-J2 (camada de sustentação)

O protocolo de cultivo de queratinócitos utilizado na presente pesquisa envolveu o uso de fibroblastos murinos 3T3-J2 letalizados por irradiação gama, conforme previamente descrito na literatura (Rheinwald; Green, 1975). A linhagem de fibroblastos 3T3-J2 utilizada na presente pesquisa foi gentilmente cedida pela Prof^a. Dr^a. Cibele Nunes Peroni, do Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN).

Os fibroblastos murinos foram cultivados em meio de cultura composto por 88% de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; marca SIGMA, # D6429), 10% de soro bovino de neonato (LifeTechnologies, #16030074), 1% de solução de penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 µg/ml), gentamicina (80 µg/ml) e anfotericina B (50 µg/ml) (Invitrogen, #15140-163) e 1% de solução tamponante (Gibco, #15630).

Os fibroblastos foram mantidos em estufa de cultivo celular a 37°C de temperatura com 5% de CO². Quando atingiram 70-80% de confluência, foram sempre removidos do frasco de cultivo com TrypLE™ (Gibco, #12563) e, conforme a necessidade, plaqueados em baixa densidade (2x10⁵ cél/cm²), congelados para posterior utilização ou irradiados para uso imediato como camada de sustentação para os queratinócitos.

Para o procedimento de irradiação, os fibroblastos eram removidos dos frascos de cultivo, conforme previamente descrito, transferidos para um tubo cônico tipo Falcon contendo meio de cultura e submetidos à fonte de irradiação gama em bomba de cobalto-60 a uma dose de 60 Gy.

Após a irradiação, os fibroblastos 3T3-J2 eram centrifugados a 1300 rpm por 5 minutos, o sobrenadante era removido, as células precipitadas eram resuspensas e homogeneizadas em meio de cultura e, por fim, plaqueadas em alta densidade (2×10^6 cél/cm²). Vinte e quatro horas após terem sido irradiados e plaqueados, os fibroblastos encontravam-se prontos para receberem os queratinócitos.

4.3.2 Cultivo primário de queratinócitos

Assim que os fragmentos de mucosa bucal foram coletados dos pacientes, foram imediatamente acondicionados em solução de DMEM com 2% de solução de antibióticos e antimicóticos, composta por penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 µg/ml), gentamicina (80 µg/ml) e anfotericina B (50 µg/ml) (Invitrogen, #15140-163) e transportados em temperatura ambiente até o laboratório de cultivo celular.

A partir daí, todo o material foi manipulado em capela de fluxo laminar nível II de segurança biológica. Os espécimes teciduais foram lavados 2 vezes com solução de PBS estéril com 2% de antibióticos/antimicótico, transferidos para um frasco contendo DMEM, dispase 2,5 mg/ml (Gibco, #17105-041) e 2% de solução de antibióticos/antimicóticos, onde permaneceram a 4°C por 12-16h.

Transcorrido esse período de tempo, os fragmentos foram lavados com PBS e transferidos para uma placa de petri, também estéril, contendo PBS. Com a ajuda de uma pinça e bisturis, os epitélios foram facilmente destacados do tecido conjuntivo subjacente e transferidos para outra placa de petri (Figura 4.1A) contendo TrypLE™ (Gibco, #12563) sob a qual os tecidos foram picotados até formarem uma mistura homogênea. Essa mistura foi transferida para um frasco de vidro contendo 3ml de TrypLE™ e um agitador magnético onde os tecidos epiteliais foram mantidos em agitação, à 37°C. A cada 30 min o sobrenadante era removido e dispensado em um tubo tipo Falcon contendo 3 ml de DMEM com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos/antimicóticos e centrifugado a 1500 rpm por 5 min. O precipitado celular era resuspenso em meio de cultura e ao frasco contendo os tecidos epiteliais em processo de digestão enzimática era adicionada TrypLE™ em quantidade igual ao volume anteriormente removido do frasco. O processo de retirada do sobrenadante

e adição de mais TrypLE™ se repetiu tantas vezes quanto necessário até que houvesse completa dissociação das células.

Por fim, as células resuspensas em meio de cultivo foram passadas por um filtro de nylon 70 µm (*Cell strainer*, BD Falcon, #352350) com o intuito de reter grumos celulares e debris maiores.

Uma vez tendo os queratinócitos isolados, as células foram cultivadas conforme descrito no texto que se segue ou marcadas com anticorpos específicos para serem analisadas e/ou separadas por MACS ou FACS.

Os queratinócitos bucais foram cultivados na densidade de 7×10^3 cél/cm² e sobre uma camada de fibroblastos 3T3-J2 irradiados e plaqueados nas condições previamente descritas.

Para expansão dos queratinócitos, o conjunto queratinócitos/fibroblastos foi cultivado em meio de cultura apropriado para crescimento dos queratinócitos composto por 60% de meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, marca SIGMA, #D6429), 30% de nutriente Ham F-12 (LifeTechnologies, #11765070), 10% de soro fetal bovino (Hyclone, #SH30109.03), 1% de solução de penicilina (200 U/ml), estreptomicina (200 µg/ml), gentamicina (80 µg/ml) e anfotericina B (50 µg/ml) (Invitrogen, #15140-163) e 1% de solução tamponante (Gibco, #15630). A este meio de cultivo ainda foram adicionados 0,1 nM de toxina colérica (SIGMA, #C8052), 0,4 ng/mL de hidrocortisona (SIGMA, #H0396), 5 µg/ml de insulina (SIGMA, #I1882), 20 pM de triiodotironina (SIGMA, #058K8704), 0,18 mM de adenina (SIGMA, #A9795) e 10 ng/ml de fator de crescimento epidermal humano (EGF) (SIGMA, #E9644).

A medida que os queratinócitos se expandiam, naturalmente deslocavam os fibroblastos adjacentes (Figura 4.1B), que com o tempo se desprendiam da placa e ficavam em suspensão. O meio de cultivo era trocado a cada 48 horas ou de acordo com as necessidades metabólicas das células.

Figura 4.1 – Fragmentos de tecido epitelial de mucosa bucal obtidos após terem sido separados da lâmina própria (A). Colônia de queratinócitos na nona passagem se proliferando em meio aos fibroblastos murinos 3T3-J2 (B).

4.4 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO CELULAR

4.4.1 Separação celular magneticamente mediada (MACS)

Esse processo de separação celular foi realizado apenas com base na expressão do receptor de neurotrofina p75NTR utilizando para isso o kit com anticorpos anti-p75NTR, conjugados com micro esferas magnéticas (Miltenyi Biotec, #130-092-283), colunas para filtragem para retenção da população celular de interesse (Miltenyi Biotec, #130-042-201) e magneto *MiniMACStm separator* (Miltenyi Biotec, #130-042-102).

As concentrações do anticorpo anti-p75NTR e as condições de uso do kit e do magneto foram fidedignamente seguidas de acordo com as instruções do fabricante.

Ao término do procedimento de separação celular, as células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ foram plaqueadas separadamente uma das outras, sob a camada de sustentação de fibroblastos murinos 3T3-J2, e cultivadas sob as condições de cultivo previamente descritas.

Esse procedimento foi realizado em duplicata, utilizando as células da populações KSC-I e KSC-II, respectivamente, imediatamente após a obtenção dessa células de tecido fresco (ou seja, células em P0).

4.4.2 Separação celular por citometria de fluxo (FACS)

Imediatamente após obtenção de células a partir de tecido fresco (ou seja, células em P0), as células foram marcadas com anticorpos específicos anti-p75NTR e/ou anti-CD71 e separadas fazendo o uso de citômetro de fluxo do tipo FACS Aria, da marca BD Bioscience.

Para tal, as células eram contadas e resuspensas em solução de PBS com 2% de soro fetal bovino (Hyclone, #SH30109.03) na concentração de 10^6 cél/ml. Em seguida, eram incubadas por 30 min com cada um dos anticorpos: anti-p75NTR PE-conjugado (Biolegend, #345105), na concentração de 1:100 e anti-CD71 APC-conjugado (eBioscience, #17-0719) na concentração de 1:50.

A incubação de cada um dos anticorpos foi realizada em câmara escura, a 4°C e precedida de 3 lavagens de 5 minutos com 2% de soro fetal bovino diluído em PBS.

A separação celular foi realizada selecionando-se 4 populações distintas: as células p75NTR⁺ e p75NTR⁻, para uma parte dos experimentos, e as células p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺, para outra. Os dados obtidos no ensaio de citometria de fluxo foram analisados com o software FlowJo 8.7 (Tree Star Inc.; Ashland, OR).

Após separação celular por citometria de fluxo, cada uma das populações celulares foi plaqueada separadamente uma das outras, sob a camada de sustentação de fibroblastos murinos 3T3-J2, seguido as condições de cultivo previamente descritas.

Por fim, vale dizer que a concentração adequada de cada um dos anticorpos foi previamente avaliada através de curvas de titulação. Além disso, antes de cada experimento, o citômetro de fluxo era calibrado com controles positivos e negativos (AbC™ Bead Kits, #A10344 e #A10389) para cada uma das cores analisadas e as células mortas eram excluídas da amostra com base nos parâmetros de tamanho relativo da célula (*Forward scatter* – FSC) e de granulosidade ou complexidade interna da célula (*Side Scatter* – SSC).

Tanto o procedimento de separação celular por FACS quando por MACS,

foram realizados em duplicata e utilizando, separadamente, células das duas linhagens celulares obtidas neste estudo (KSC-I e KSC-II).

4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS EM CULTURA

4.5.1 Análise morfológica das colônias celulares

A morfologia das colônias celulares foi analisada em todas as placas de cultivo de ambas as linhagens celulares (KSC-I e KSC-II positivas e negativas para o receptor de neurotrofina P75NTR) ao longo de todos os experimentos realizado *in vitro*. Dessa forma, ao menos 3 diferentes campos, escolhidos aleatoriamente, foram fotografados em cada um dos quatro quadrantes de placas ou frascos de cultivo celular. A morfologia das colônias celulares foi avaliada em microscópio invertido da marca Nikon, modelo TS100, e fotografada com câmera digital DS-F1.

Em relação à análise da morfologia das colônias celulares, foram observados a forma e o tamanho das colônias, a forma e o tamanho das células que compunham cada colônia e o grau de diferenciação celular (formação de pérolas de queratina).

4.5.2 Curva de crescimento celular

Esse experimento teve por objetivo avaliar de maneira quantitativa o crescimento das populações celulares p75NTR⁺ e p75NTR⁻ ao longo do tempo.

Para tanto, foram plaqueadas 10^4 queratinócitos de cada uma das linhagens (KSC-I e KSC-II, positivas e negativas para o receptor de neurotrofina p75NTR) em 9 poços de cultivo celular com $9,6 \text{ cm}^2$ de área cada, sob uma camada de *feeder layer* plaqueada com 24h de antecedência.

As células foram removidas de 3 poços a cada vez (experimento em triplicata) por meio da ação do reagente TrypLE™ (Gibco, #12563), no terceiro, sexto e nono dia após terem sido plaqueadas, respectivamente.

Após removidas, as células de cada poço foram contadas em câmara hemocitométrica e a média aritmética dos valores obtidos dos 3 poços resultou em um valor absoluto que retrata a média do número de células em cultivo, naquele momento. Por fim, o desvio padrão foi calculado.

4.5.3 Potencial de expansão

Para este experimento, os queratinócitos na passagem P0, de cada uma das populações celulares estudadas, foram serialmente subcultivados na densidade (7×10^3 cél/cm²) e condições de cultivo previamente descritas no item 4.3.2, até o momento que perderam totalmente a capacidade de proliferação.

O potencial de expansão celular foi avaliado em ambas as populações celulares p75NTR⁺ e p75NTR⁻ separadas tanto por MACS quanto por FACS assim como nas populações p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ obtidas pela separação por FACS. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e com células das duas linhagens celulares estudadas (KSC-I e KSC-II).

4.5.4 Eficiência de formação de colônia (EFC)

A habilidade de crescimento clonal de cada uma das populações celulares isoladas (células que expressavam e que não expressavam os marcadores celulares de interesse em cada experimento) foi determinada através da EFC.

Para isso, foram utilizados queratinócitos que estavam sempre na terceira passagem de cada uma das populações estudadas (células positivas e negativas para os marcadores estudados), em ambas as linhagens estudadas (KSC-I e KSC-II). Esse experimento foi realizado sempre em triplicata.

Os queratinócitos foram cultivados em baixa densidade (10^4 células em cada placa de $78,5 \text{ cm}^2$ de área de cultivo) e, após 8 dias em cultivo, foram fixados com metanol a -20°C por 10 min, coradas com Azul de Toluidina por 5 min e analisados em microscópio de luz invertida (Zeiss Axiovert-10).

Somente as colônias com 50 células ou mais foram contabilizadas e a média aritmética do total de colônias obtidas em cada uma das três placas de cultivo resultou no coeficiente interpretado como eficiência de formação de colônias.

4.5.5 Capacidade de reconstrução epitelial *in vitro*

Queratinócitos bucais $p75\text{NTR}^+$ e $p75\text{NTR}^-$ que encontravam-se na segunda passagem, foram plaqueados na densidade usual ($7 \times 10^3 \text{ cél/cm}^2$), em triplicata, e mantidos em cultivo por 3 dias após já terem atingido confluência. Para este experimento também foram avaliadas as células em ambas linhagens celulares KSC-I e KSC-II, que haviam sido obtidas por separação via MACS.

Para análise do tecido epitelial formado na placa de cultivo, o meio de cultivo foi removido, as células foram lavadas com PBS e removidas em camada única usando-se dispase (SIGMA, #D4693) dissolvida em meio de cultura dos queratinócitos na concentração de 2,5 mg/ml, seguido de incubação a 37°C por 1h.

Por fim, os tecidos foram lavados em PBS e fixados em solução de formaldeído 10% por 12h, desidratados em cadeia crescente em concentração de álcool, diafanizados com xilol, emblocados em parafina, corados com hematoxilina e eosina e analisados histologicamente em microscopia de luz.

4.5.6 Análise da resposta ao trauma das células-tronco epiteliais

A análise da resposta **ao trauma** das células-tronco epiteliais foi realizada *in vivo* utilizando-se, para isso, como modelo animal os camundongos imunocomprometidos do tipo SCID.

Sob sedação, 6 animais tiveram dois pequenos cortes (0.5 cm) realizados em seus dorsos, com uma lâmina de bisturi. Um do lado direito (preconizado como receptor das células epiteliais) e outro do lado esquerdo (lado controle que recebeu igual quantidade em volume de solução contendo apenas meio de cultura DMEM) com lâmina de bisturi estéril.

Imediatamente após a realização **do trauma**, foram inoculadas 11×10^6 células, subepidermicamente, 2mm além da borda posterior do ferimento (abaixo do tecido epitelial sadio e ao lado da área do trauma). As células injetadas eram p75NTR⁺, da populações KSC-I e estavam na terceira passagem de cultivo e na terceira passagem após terem sido obtidas por MACS. Como veículo carreador, utilizou-se 150ul de meio de cultivo (DMEM, Lonza #12-604) livre de soro fetal bovino e de qualquer outro suplemento.

A análise da resposta **ao trauma** das células epiteliais foi realizada 24, 48, 72h e 5 dias após terem sido injetadas nos camundongos. Para tanto, a área onde as células foram injetadas foi removida cirurgicamente com uma margem de segurança de 2cm. Em seguida, os tecidos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% de concentração por 16h, a 4°C, seguido de processamento histológico (desidratação em etanol e diafanização em xilol) para posterior emblocamento em parafina.

Por fim, cortes histológicos seriados com 5um de espessura foram obtidos de toda a amostra, em micrótomo e parte do material foi corado com Hematoxilina e Eosina e parte foi submetida a reações de imuno-histoquímica com os anticorpos primários anti-núcleo celular humano, 1:50 (Millipore, #MAB1281), anti-CK14, 1:500 (BioGenex [LL002], #MU 146-UC) e anti-Ki-67, 1:75 (Dako [MIB1], #M7240).

Quando utilizado o anticorpo primário anti-núcleo celular humano, a recuperação antigênica foi realizada com solução de Ácido Cítrico 10mM, pH 6.0, em banho maria a 95°C, por 30 minutos e o anticorpo secundário utilizado foi o Alexa Fluor 488, 1:500 (Invitrogen, #A11070). A contra-coloração celular foi realizada com o meio de montagem fluorescente, com DAPI (Vectashield, #H-1200).

Para as reações imuno-histoquímicas envolvendo os anticorpos primários anti-CK14 e anti-Ki67, a recuperação antigênica também foi realizada com solução de Ácido Cítrico 10mM, pH 6.0, em banho maria a 95°C, e os anticorpos secundários e kit de revelação com DAB faziam parte do Kit LSAB (Dako, #K0690).

As imagens dos cortes histológicos em HE e das reações de imunohistoquímica para os anticorpos anti-CK14 e anti-Ki67 foram analisadas em microscopia de luz convencional (Axioskop2 plus, Zeiss) e fotografadas com câmera digital (Axiocam HRC, Zeiss). Enquanto isso, os resultados das reações utilizando o anticorpo primário anti-núcleo humano foram analisados e microscópio com luz fluorescente (Zeiss, Axioskope 2 plus) e capturadas com câmera digital (Zeiss, AxioCam HRC).

4.5.7 Análise da capacidade de auto-renovação celular

Com o intuito de averiguar se as células epiteliais estudadas possuíam uma das características mais determinantes para se caracterizar uma célula como “tronco” – a capacidade de auto-renovação – idealizamos a possibilidade de re-isolar as células após diferentes períodos de desenvolvimento das mesmas *in vivo*.

Para isso, as células epiteliais p75NTR⁺ das linhagens KSC-I e KSC-II (também em terceira passagem após terem sido obtidas por MACS) foram marcadas com o produto CellTrace™ CFSE (Invitrogen #C34554), seguindo-se as instruções do fabricante, previamente à inoculação em modelo animal (camundongos imunocomprometidos do tipo SCID). Segundo o fabricante do CFSE, esta é uma substância capaz de se difundir passivamente para dentro das células e de se ligar permanentemente à diferentes grupos proteicos. Uma vez presente no meio intracelular, sofre clivagem dos seus grupos acetatos emitindo fluorescência no comprimento de onda de 492 a 517nm.

Dessa forma, imediatamente após a marcação das células epiteliais com CellTrace™ CFSE, elas foram inoculadas (11×10^6 células epiteliais por ponto de aplicação), subepidermicamente, no dorso de 6 animais.

Para a realização do re-isolamento celular o primeiro passo foi fazer a coleta das células através de remoção mecânica cirúrgica das mesmas. A região aonde as células foram inoculadas foi coletada para análise 48h e 5 dias após a inoculação das células. Três animais foram analisados em cada um dos dias de coleta.

Após a remoção dos tecidos dos animais, eles foram lavados 5x em PBS contendo 2% de antibióticos (Invitrogen, #15140-163), homogeneizados (cortados inúmeras vezes) com lâminas de bisturi e digeridos enzimaticamente em 3 ml de TrypLE™ (Gibco, #12563) por 30 min à 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas com 10% de SFB (Hyclone, #SH30109.03) diluído em PBS, filtradas em filtro de nylon 40um (BD Falcon™ Cell Strainer, #352340) e isoladas por citometria de fluxo (FACS Aria III BD®) baseado-se na presença do fluoróforo proveniente da marcação com o CFSE.

Imediatamente após o isolamento das células por FACS, elas foram plaqueadas sob camada de sustentação com fibroblastos 3T3-J2, em alta densidade (500.000 células por poço de placa de cultivo de 6 poços). As demais condições de cultivo foram as mesmas já estabelecidas e descritas anteriormente (item 4.3.2).

4.6 ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE QUERATINÓCITOS BUCAIS AO LONGO DO CULTIVO

A expressão dos marcadores p75NTR e/ou CD71 assim como a de outros dois marcadores de células-tronco epiteliais, as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$, foi avaliada nas diferentes populações de células do estudo (células p75NTR⁺, p75NTR⁻, p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺), provenientes de ambas as linhagens celulares KSC-I e KSC-II.

No caso das células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ obtidas por MACS, o fenótipo foi avaliado três passagens após a separação celular. No caso das células p75NTR⁺, p75NTR⁻, p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ obtidas por FACS, o fenótipo foi avaliado quando as células atingiram semi-confluência (uma semana após separação e plaqueamento). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. E, por último, no caso onde as células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ foram cocultivadas (experimento descrito a seguir) o fenótipo das células foi avaliado no quarto dia de cultivo. Este último experimento foi realizado em triplicata.

O protocolo utilizado para marcação das células com os respectivos anticorpos foi o mesmo utilizado para realização da separação celular por FACS. A

diferença é que, neste momento, a análise da expressão desses marcadores celulares foi realizada em um citômetro de fluxo do tipo FACSCanto (BD Bioscience) e não FACSaria. Os resultados obtidos também foram analisados com o software FlowJo 8.7.

4.7 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO AO LONGO DO COCULTIVO DAS CÉLULAS P75NTR⁺ E P75NTR⁻

Populações de queratinócitos p75NTR⁺ e p75NTR⁻ em P0 foram plaqueadas em conjunto, na densidade celular habitual (7×10^3 cél/cm²) e proporção de 1:1.

Esse experimento foi realizado em triplicata, em poços de cultivo de placas de 6 poços, com células da população celular KSC-I.

Com o intuito de analisar as possíveis alterações fenotípicas de maneira individual, dentro de cada uma das populações positivas e negativas para o marcador de interesse (p75NTR), as células p75NTR⁻ foram marcadas com *Cell TraceTM Violet Cell Proliferation Kit* (Molecular Probes, #C34557) imediatamente antes de serem plaqueadas juntamente com as células p75NTR⁺. Ou seja, primeiro as populações celulares p75NTR⁺ e p75NTR⁻ foram obtidas por FACS, em seguida a população p75NTR⁻ foi marcada com uma substância que permitia a sua identificação futura e, por fim, as células foram plaqueadas em conjunto, na mesma proporção.

De maneira mais detalhada, vale dizer que o experimento constou então de 3 grupos distintos de células analisadas: grupo I, com placas de cultivo com 100% das células p75NTR⁺; grupo II, com placas de cultivo com 100% das células p75NTR⁻ e, por fim; grupo III, com placas de cultivo contendo 50% de células p75NTR⁺ e 50% de células p75NTR⁻.

No momento que as células atingiram semi-confluência (4 dias após o plaqueamento), elas foram removidas do frasco de cultivo e a expressão do receptor de neurotrofina p75NTR foi avaliada em cada um dos grupos (grupos I, II e III) e, individualmente, dentro de cada uma das populações inicialmente p75NTR⁺ e p75NTR⁻ (esta última identificada pelo *Cell TraceTM*)

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL DAS CÉLULAS EM CULTURA

5.1.1 Análise morfológica das colônias celulares

Independentemente da população investigada (células p75NTR⁺, p75NTR⁻, p75NTR⁻CD71⁺ ou p75NTR⁺CD71⁻) foi observado que a morfologia das colônias celulares era largamente diversificada dentro de cada uma das placas de cultivo analisadas. Ou seja, células de uma mesma população, em uma mesma passagem, apresentam características morfológicas bastante diversificadas (Figura 5.1).

Neste sentido, pode-se observar que em praticamente todas as placas de cultivo haviam colônias com formato circular e simétrico, compostas por células pequenas e com tamanho uniforme que, algumas vezes mantinham-se como colônias pequenas por muitos dias (Figura 5.1A), enquanto que outras atingiam rapidamente grandes proporções, mas mantinham as características de simetria e de serem compostas por células relativamente pequenas e indiferenciadas (Figura 5.1B). Concomitantemente, haviam colônias com um padrão de crescimento assimétrico, que possuíam células disformes, com citoplasma amplo e granular, raramente atingindo grandes proporções (Figura 5.1C), e colônias que mesmo sendo simétricas, apresentavam diferenciação precoce, com formação de pérolas de queratina (Figura 5.1D).

Figura 5.1 - Exemplos do aspecto morfológico de diferentes colônias de queratinócitos em uma mesma placa de cultivo celular de células p75NTR⁺, da população KSC-II, na segunda passagem. Colônia de queratinócitos pequena, simétrica, composta por queratinócitos também pequenos, indiferenciados e que assim permaneceu por vários dias de cultivo (A). Colônia também simétrica e composta por células pequenas, mas com um potencial de proliferação relativamente maior, atingindo rapidamente grandes proporções (B). Colônia celular disforme, assimétrica, com células exibindo intenso pleomorfismo celular e nuclear e diferenciação avançada (C). Colônia celular pequena, relativamente simétrica, mas contendo células com tamanhos e formas variadas, além de diferenciação precoce, com evidente formação de pérola de queratina (D). Figuras A e B em aumento de 10x e figuras C e D em aumento de 20x.

5.1.2 Curva de crescimento celular

Conforme descrito anteriormente (item 4.5.2), as células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ da população KSC-I foram coletadas das placas de cultivo e contadas no terceiro, sexto e nono dia após terem sido plaqueadas.

A média aritmética do número de células obtidas em cada um dos dias analisados, em ambas as populações celulares avaliadas (células p75NTR⁺ e p75NTR⁻), está representada no Gráfico 5.1.

Gráfico 5.1 - Curva de crescimento celular das células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ ao longo do terceiro, sexto e novo dia em cultivo.

O que pode ser observado com os resultados apresentados no gráfico é que principalmente ao redor do sexto dia de cultivo, as células p75NTR⁺ proliferam mais. No entanto, logo entram em confluência, e por inibição de contato, diminuem a sua taxa de proliferação e permitem que as células p75NTR⁻ se multipliquem e atinjam um número semelhante de células.

5.1.3 Potencial de expansão

Não foi possível observar diferença no potencial de expansão ao se comparar as populações p75NTR⁺ e p75NTR⁻ obtidas seja FACS seja por MACS, em nenhuma das duas linhagens celulares estudadas (KSC-I e KSC-II). Ambas as

populações entraram em senescência na 13^o ou 14^o passagens após terem sido separadas.

As células das populações separadas por dupla marcação (p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺) também apresentaram um potencial de crescimento semelhante entre si, e muito mais inferior que as células separadas utilizando-se apenas o marcador p75NTR. De maneira geral, as células de ambas populações p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ entraram em senescência na 2^o e 3^o passagens após terem sido separadas por FACS.

5.1.4 Eficiência de formação de colônia (EFC)

A média aritmética do número de colônias encontrados em cada uma das populações (p75NTR⁺ e p75NTR⁻), nas 3 placas de cultivo para cada experimento, está representada no gráfico da Figura 5.2. Exemplos do aspecto morfológico macroscópico das colônias celulares formadas por essas mesmas células estão ilustrados na Figura 5.2A e B.

Esses resultados mostram que, em média, o número de colônias celulares formadas pela população de células p75NTR⁺ é expressivamente maior do que as p75NTR⁻ e, do ponto de vista morfológico, as colônias celulares formadas pelas células positivas são comumente maiores também.

Este experimento não foi realizado com as células das populações p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ por que as mesmas entraram em senescência na segunda ou terceira passagem, não sendo disponíveis em número e/ou em condições funcionais para este experimento.

Figura 5.2 - O gráfico representa o número de colônias celulares com 50 células ou mais nas populações de células p75NTR⁺ (barra azul) e p75NTR⁻ (barra amarela) nas duas linhagens estudadas (KSC-I e KSC-II). As figuras A e B mostram exemplos de aspecto morfológico das colônias formadas pelas células p75NTR⁻ e p75NTR⁺, respectivamente.

5.1.5 Avaliação funcional das células epiteliais através da reconstrução epitelial *in vitro*

Os epitélios formados pelas células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ (Figura 5.3A) permitiram constatar que as células p75NTR⁺ tem uma capacidade maior de formar,

espontaneamente, epitélios do tipo pavimentoso estratificado com mais estratos comparativamente às células p75NTR⁻ (Figura 5.3B eC). Esse experimento também não pode ser realizado com as células das populações p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ por que as mesmas entraram em senescência ainda nas primeiras passagens.

Figura 5.3 – Aspecto morfológico macroscópico dos epitélios formados *in vitro* pelas células p75NTR⁺. (A) Cortes histológicos dos epitélios formados *in vitro* com as células p75NTR⁺ (B) e p75NTR⁻ (C), respectivamente. Note que as células p75NTR⁺ formam um epitélio mais robusto, composto por mais camadas de queratinócitos.

5.1.6 Análise da resposta ao trauma das células-tronco epiteliais em modelo animal

Após a inoculação das células p75NTR⁺ subepidemicamente (Figura 5.4A), conforme descrito previamente no item 4.5.6, a área de inoculação das células foi removida cirurgicamente (Figura 5.4B) nos tempos de 24h, 48h, 72h e 5 dias.

Os resultados da análise histológica mostram que no lado onde houve a inoculação das células P75NTR⁺ houve a formação de uma massa celular coesiva (Figura 5.4A-C e F). Individualmente, as células mostravam-se ora poliédricas, com limites imprecisos e apresentando pleomorfismo celular e nuclear, alteração da relação núcleo citoplasma e formação de perolas córneas; e ora com aspecto fibroblástico e estrelário (Figura 5.4D, E, G, H e H'). Essa massa celular mostrou capacidade de crescimento constante aumentando de tamanho de 24hs (primeiro período de análise) até 5 dias (último período de análise) (Figura 5.4C-H). No entanto, em todos os tempos de análise, as células apresentavam-se contidas localmente sem evidências de invasão das áreas adjacentes ou migração para a área do trauma.

A análise imuno-histoquímica para a expressão da proteína nuclear humana evidenciou a presença das células epiteliais humanas em meio a essa massa celular. Essas células eram pouco numerosas e estavam predominantemente localizadas agrupadas, em ilhas, apesar de também estarem presentes em meio a massa celular composta também por células do hospedeiro. A expressão imunohistoquímica de citoqueratina 14 (CK14) nas amostras coletadas dos animais comprova que a massa celular observada apresenta células epiteliais localizadas preferencialmente nas pérolas córneas (Figura 5.5A e B). A expressão de Ki67 evidencia o pequeno número de células com atividade mitótica. Essas células em proliferação apresentavam-se com frequência na periferia das perolas córneas (Figura 5.5C e E). Aparentemente, o número de células positivas para o anticorpo (ou seja, células humanas presentes no tecido) foi decrescente ao longo dos diferentes períodos de tempo analisados (Figura 5.4I e J).

Sendo assim, nota-se que a maioria das células que formavam a massa celular no local da inoculação das células P75NTR⁺ não era de origem epitelial e não eram humanas, sendo portanto, provenientes do hospedeiro.

Figura 5.4 – Inoculação das células epiteliais p75NTR⁺ à 2mm das margens da lesão em dorso dos camundongos (A). Visão macroscópica, a partir da derme, da área aonde as células foram inoculadas (área esbranquiçada, na foto) e da área da lesão (traço pontilhado) (B). Observa-se em (C) cortes histológicos corados em HE (aumento de 2,5x) das células epiteliais inoculadas há 72h evidenciando a presença das células epiteliais concentradas em uma massa celular. Em (D) e (E) observamos, em maior detalhe (20x), as áreas onde as células epiteliais estavam se desenvolvendo, bem como o seu aspecto morfológico, de célula tipicamente diferenciada (abundante produção de ceratina). As figuras (F) (aumento de 2,5x), (G, H) (aumento de 20x) e H' (aumento de 40x) mostram as células epiteliais no quinto dia após terem sido inoculadas. Neste caso, fica evidente que a massa celular aumentou de tamanho, comparativamente com as células que permaneceram nos tecidos por apenas 72h mas também que as células epiteliais não migraram para a área do trauma (seta). Cortes histológicos contendo as mesmas regiões apresentadas nas figuras G e H foram submetidas à reações de imunohistoquímica com anticorpo primário anti-núcleo humano que evidenciou, em verde, a presença das células das epiteliais inoculadas e, em azul, o núcleo das demais células presentes no tecido (E).

Figura 5.5 – Expressão imunohistoquímica de CK14, evidenciando a presença de ilhas de células epiteliais em meio aos tecidos do hospedeiro (A e B). A rara expressão do anticorpo Ki67 demonstra a baixa atividade mitótica das células inoculadas (C e D). Figuras A e C aumento de 10x e figuras B e D 40x.

5.1.7 Análise da capacidade de auto-renovação celular

Previamente à inoculação das células epiteliais nos animais imunocomprometidos elas foram marcadas com CellTrace™ CFSE. Dessa forma, com base na expressão do CellTrace, foi possível efetuar o re-isolamento das mesmas após os diferentes períodos de tempo se desenvolvendo *in vivo*.

Neste sentido, observamos que após 48 horas da inoculação foi possível re-isolar 419.841 células CFSE positivas, no entanto, após 5 dias, não foi mais possível efetuar o reisolamento.

As pouco mais de 4×10^5 células reisoladas após 48h da inoculação foram plaqueadas em uma placa de cultivo com $9,6\text{cm}^2$ de área. Dentro de 24h observou-se que a maioria das células epiteliais plaqueadas se aderiu à placa (Figura 5.6A e 5.6A') mas nenhuma delas chegou a se dividir nos 8 dias de acompanhamento (Figura 5.6B) o que nos levou a concluir que, ao menos com a metodologia utilizada nesta pesquisa, as células p75NTR⁺ não mostraram possuir capacidade de auto-renovação.

Figura 5.6 – Queratinócitos bucais que foram reisolados após 48h da inoculação *in vivo* e plaqueados sob *feeder layer* (A). Após 24h de cultivo, as grande maioria dos queratinócitos (seta amarela) mostrava-se aderida na placa, entremeados ao *feeder layer* (seta vermelha) (A'). No decorrer dos 8 dias subsequentes, uma quantidade significativa dos queratinócitos morreu e se desprende da placa. Os que permaneceram aderidos não se dividiram (B). Figuras A e B, aumento de 20x e Figura A' aumento de 40x.

5.2 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS QUERATINÓCITOS BUCAIS SEPARADOS POR MACS

As células epiteliais de tecido fresco que haviam sido previamente separadas por MACS baseadas na expressão do receptor de neurotrofina p75NTR, tiveram o seu fenótipo analisado, quando estavam na terceira passagem de cultivo. Esse procedimento foi realizado em citômetro de fluxo e objetivou não só a análise da expressão de p75NTR em ambas as populações (p75NTR⁺ e p75NTR⁻), mas também a análise da expressão de CD71 e das integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$.

Inicialmente, foi possível constatar que as integrinas $\alpha 6$ e integrina $\beta 1$ se coexpressam, ou seja, células que expressam uma destas integrinas, expressam a outra (Figura 5.7). Ademais, observou-se que após 3 passagens da separação, apenas 6.93% da população p75NTR⁺ reteve a expressão de p75NTR (Figura 5.8A) enquanto uma quantidade similar de células (5.46%) passou a expressar esse receptor de membrana na população inicialmente negativa para ele (Figura 5.8B).

Ao se analisar a co-expressão de marcadores de células-tronco epiteliais, como as integrina $\alpha 6$ e $\beta 1$ pelas células p75NTR⁺ e p75NTR⁻, constatou-se que 88% das células p75NTR⁺ co-expressavam ambas integrinas, contrastando com apenas 28% das p75NTR⁻. Esses resultados estão representados na Figura 5.8C.

Além disso, quando os dados obtidos pela citometria de fluxo foram analisados de forma a mensurar a expressão de ambas as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ pelas populações de células p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺, constatou-se que 99% das células p75NTR⁺CD71⁻ expressavam ambas integrinas, contrastando com apenas 56% das células p75NTR⁻CD71⁺ (Figura 5.2.2C). Em outras palavras, a população p75NTR⁺CD71⁻ é uma população quase exclusiva de células integrinas $\alpha 6\beta 1$ positiva.

Resumidamente, estes resultados mostram que células p75NTR⁺ expressam ambas as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ e que a negatividade para o CD71 ajuda a selecionar uma população ainda mais enriquecida com estes marcadores celulares. Além disso, a expressão de ambas as integrinas ocorre concomitantemente na grande maioria das células.

Não houve diferença em nenhum dos resultados acima apresentados quando comparado as células das linhagens KSC-I e KSC-II.

Figura 5.7 – Análise da expressão de integrina $\alpha 6$ e $\beta 1$ por células epiteliais.

Figura 5.8 – Análise da expressão de p75NTR nas populações obtidas por MACS e inicialmente p75NTR⁺ (A) e p75NTR⁻ (B). Os números dentro das áreas demarcadas representam a quantidade de células que expressam o receptor de neurotrofina p75NTR em cada uma das populações estudadas (p75NTR⁺ e p75NTR⁻), 3 passagens após terem sido separadas por MACS. Em C, observa-se a representação gráfica do percentual de coexpressão de marcadores de células-tronco epiteliais nas populações de células p75NTR⁺, p75NTR⁻, p75NTR⁺ CD71⁻ e p75NTR⁻ CD71⁺ que estavam na terceira passagem após terem sido separadas por MACS.

5.3 ANÁLISE DO FENÓTIPO DOS QUERATINÓCITOS BUCAIS SEPARADOS POR FACS

Em um segundo momento, procedeu-se a separação dos queratinócitos bucais baseados na expressão do mesmo receptor de membrana p75NTR, só que usando um citômetro de fluxo e não por MACS. Diferentemente de quando as células foram separadas por MACS, o fenótipo celular não foi avaliado três passagens após as células terem sido separadas nas populações positivas e negativas mas sim uma semana após as células terem sido separadas (quando atingiram a semi-confluência).

Haja visto que no experimento anterior ficou claro que células que expressam o p75NTR e não expressam o CD71 (células p75NTR⁺CD71⁻) constituem uma população mais enriquecida com outros marcadores de células-tronco, como as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$, optou-se agora por também se fazer a separação celular de uma terceira e de uma quarta populações celulares adicionais: a das células p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺ (além das populações p75NTR⁺ e p75NTR⁻).

Como resultado, analisando as populações isoladas somente com base na expressão do marcador p75NTR, observou-se que uma semana após a separação celular, apenas 7.48% das células p75NTR⁺ permaneceu expressando o receptor de neurotrofina p75NTR, enquanto que 11.9% das células p75NTR⁻ passaram a expressá-lo. Cem por cento das células p75NTR⁺ não expressavam CD71. Esses resultados estão representados na Figura 5.9A, B e C.

Concomitantemente, analisando as populações isoladas com base na expressão de p75NTR e CD71 (células p75NTR⁺CD71⁻ e p75NTR⁻CD71⁺), notou-se que apenas 1.74% das células p75NTR⁺CD71⁻ continuaram expressando o marcador p75NTR e que 0.32% delas passaram a expressar CD71. Em compensação, uma porcentagem significativa de células p75NTR⁻CD71⁺ (6.72%) passaram a expressar p75NTR e apenas 0.4% das células mantiveram a expressão de CD71 (Figura 5.10A, B e C).

Uma compilação dos resultados numéricos mais interessantes descritos acima encontram-se explicitados na Tabela 5.1.

Figura 5.9 – Expressão de p75NTR e CD71 na população p75NTR⁺ (A) e p75NTR⁻ (B) decorrido 7 dias da sua obtenção por FACS. A figura (C) apresenta um organograma do percentual de células que expressam os marcadores analisados, ao longo do experimento.

Figura 5.10 – Expressão de p75NTR e CD71 na população p75NTR⁺CD71⁻ (A) e p75NTR⁻CD71⁺ (B) decorrido 7 dias da sua obtenção por FACS. Em (C) observamos um organograma representativo desses resultados.

Tabela 5.1– Percentual de células expressando o receptor de neurotrofina p75NTR e a proteína CD71 nas populações celulares inicialmente p75NTR⁺, p75NTR⁻, p75NTR⁺CD71⁻, p75NTR⁻CD71⁺, após uma semana em cultivo.

População celular	Percentual de Células Positivas e Negativas	
	P75NTR ⁺	P75NTR ⁻
P75NTR ⁺	7,48%	-
P75NTR ⁻	11,9%	-
P75NTR ⁺ CD71 ⁻	1,74%	0,32%
P75NTR ⁻ CD71 ⁺	6,72%	0,4%

Como parâmetro para saber o quanto as condições de cultivo celular por si só poderiam estar afetando a expressão dos marcadores celulares estudados, a expressão de p75NTR foi analisada em tecido fresco (amostra de epitélio oral proveniente de gengiva), sem cultivo prévio. Como resultado, obteve-se que o percentual médio de expressão de p75NTR é de 1.4%.

5.4 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO AO LONGO DO COCULTIVO DAS CÉLULAS P75NTR⁺ E P75NTR⁻

Com o intuito de investigar se o cultivo de células p75NTR⁻ em conjunto com as p75NTR⁺ resultaria em uma manutenção ou alteração maior do fenótipo de ambas as populações, optamos por estudar o fenótipo de cada uma destas populações celulares na condição de cocultivo.

Com isso, observou-se que mesmo fazendo o cocultivo das células p75NTR⁺ e p75NTR⁻ e mantendo essas populações celulares em cultivo por um período de tempo ainda menor (apenas 4 dias), 94.78% das células inicialmente p75NTR⁺ perderam a expressão do receptor p75NTR. Ao mesmo tempo, uma quantidade pequena (0.22%), das células p75NTR⁻ passaram a expressá-lo (Figura 5.11A).

Quase 1% das células originalmente p75NTR⁻ e que não foram cocultivadas com as células p75NTR⁺, ganhou a expressão de p75NTR (Figura 5.11B). Em contraste, nas populações de células p75NTR⁺ que também foram cultivadas separadamente das demais, ou seja, não foram cocultivadas com p75NTR⁻, a perda

de expressão de p75NTR foi ainda maior. Menos de 0.6% das células p75NTR⁺ mantiveram a expressão de p75NTR (Figuras 5.11C).

Todos os resultados descritos acima estão sumariamente representados no organograma da Figura 5.11.D.

Figura 5.11 – Expressão de p75NTR em queratinócitos p75NTR⁺ e p75NTR⁻ em cocultura. A população inicialmente identificada como p75NTR⁻ pode ser evidenciada pelo CellTrace™, nas células que estavam em cocultivo (A). As figuras B e C representam a expressão de p75NTR nas populações originalmente p75NTR⁻ (B) e p75NTR⁺ (C), respectivamente, cultivadas separadamente uma das outras. O organograma representado na figura (D) representa de maneira esquemática esses resultados.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Queratinócitos de mucosa bucal tem sido usados com sucesso para vários propósitos, incluindo reconstrução do próprio epitélio bucal após ressecção tumoral (Lauer; Schimming, 2001) e colocação de implantes bucais (Tsai et al., 1997), reepitelização da córnea (Nishida et al., 2004), regeneração da pele (Iida et al., 2005), diferenciação em epitélio odontogênico (Nakagawa et al., 2009) e criação de células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, *induced pluripotent stem cells* - iPS) (Aasen et al., 2008).

Com o intuito de obter resultados clínicos ainda mais promissores, diversos grupos científicos tem se dedicado à isolar células-tronco epiteliais uma vez que elas, teoricamente, teriam um desempenho funcional melhor. A maior parte desses grupos de pesquisadores faz o isolamento dessas células a partir do epitélio de revestimento da pele e das mucosas e baseiam-se apenas na expressão de marcadores de superfície celular (Jones; Watt 1993; Jones et al., 1995; Li et al., 1998; Okumura et al., 2003; Nakamura et al., 2007). Como mencionado, e de maneira curiosa, o isolamento das células de interesse é baseado no fenótipo das mesmas, mas nenhum desses estudos avalia de fato se esse fenótipo se mantém ao longo dos experimentos. Apenas pressupõe-se que, uma vez isoladas, as células em cultura mantêm o fenótipo de quando foram selecionadas e, ainda, apresentam as mesmas propriedades.

Neste sentido a literatura afirma que a seleção de células baseadas no seu fenótipo garante a obtenção de uma população celular com ganhos funcionais (Jones; Watt, 1993; Jones et al., 1995; Kunita et al., 1998; Li et al., 1998; Kaur; Li, 2000; Tani et al., 2000; Okumura et al., 2003; Webb et al., 2004; Nakamura et al., 2007). No entanto, apresentamos que de fato algumas populações celulares, a exemplo das células p75NTR⁺, tiveram um desempenho funcional melhor do que as células p75NTR⁻, em alguns ensaios realizados. As células p75NTR⁺ formaram mais colônias celulares e deram origem a epitélios reconstruídos do tipo pavimentoso estratificado com mais camadas de células quando comparados com os epitélios gerados pelas células P75NTR negativas, por exemplo. No entanto, as populações P75NTR⁺ se propagavam em cultivo pelo mesmo número de passagens que as

p75NTR⁻, apresentavam uma grande variação na apresentação da morfologia das colônias celulares e, assim como as p75NTR⁻ mudam drasticamente o seu fenótipo quando em cultivo.

No que concerne a análise da resposta ao trauma das células-tronco epiteliais, constatamos que não existe uma metodologia consagrada para se estudar tal propriedade e que, por isso, diferentes grupos de pesquisadores têm utilizado diferentes metodologias (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Morris et al., 2004).

Dentre eles, podemos citar Taylor et al. (2000) que, ao realizar danos mecânicos à pele de camundongos, constataram que as células da região interfolicular, adjacente à área lesionada se dividiam (ciclavam) extensivamente. Nos seus experimentos, os autores analisaram os tecidos 10, 20 e 30hs após a realização do trauma e constataram que a atividade mitótica era decrescente no decorrer dos períodos de tempo analisados (Taylor et al., 2000). Em 2001, Oshima et al. transplantaram diferentes partes de folículo piloso intra-dermicamente, no dorso de camundongos, e observaram a formação completa dos folículos capilares, inclusive com crescimento de pelos (Oshima et al., 2001). Vale ressaltar que esses autores não transplantaram células isoladas e sim partes de um tecido. O transplante por si só desse material foi considerado pelos autores como uma maneira de avaliar a capacidade de resposta ao trauma das células contidas nos tecidos transplantados.

No entanto, foi no ano de 2004 que um grupo de pesquisadores (Morris et al., 2004) publicou um trabalho em uma revista do grupo *Nature* que trouxe uma outra metodologia para a análise da resposta ao trauma das células epiteliais. Esses autores isolaram células-tronco epiteliais do bulbo capilar por FACS (células EGFP⁻ e integrina $\alpha 6^{+}$), as injetaram subepidermicamente em área sadia e mostraram que elas tinham a capacidade de migrar para a superfície da pele dos camundongos e formar todos os tecidos epiteliais da região, incluindo folículos pilosos, epiderme e glândulas sebáceas (Morris et al., 2004).

A metodologia utilizada em nossa pesquisa em relação a este experimento foi muito parecida com a de Morris et al (2004), com a diferença principal de que fizemos uma área de trauma adicional (não somente aquela ocasionada pela injeção das células) na pele do camundongo receptor, buscando não apenas analisar se as células migrariam para a superfície da epiderme sadia, mas, principalmente, se elas migrariam para a área do trauma. Outras diferenças importantes são que Morris et

al. (2004) injetaram as células epiteliais em conjunto com células mesenquimais de camundongo neonato e analisaram os tecidos após um período de tempo maior (4 semanas). Em nosso estudo, foi injetada uma quantidade de células epiteliais quase 10 vezes maior que a de Morris et al. (2004), mesmo assim, as nossas células não pareceram migrar para lugar algum e tão pouco se diferenciaram em diferentes linhagens.

A análise imuno-histoquímica da expressão da proteína nuclear humana evidenciou que a maioria das células pertencentes à massa celular que se formou no animal hospedeiro após a inoculação das células epiteliais P75NTR⁺ não era de origem humana. A expressão de CK14 mostrou que uma pequena porção de células nessa massa celular era de fato de origem epitelial. Vale lembrar ainda que a não expressão da CK14 pelas demais células da massa celular por si só não quer dizer que elas não sejam de origem epitelial, uma vez que sabe-se que células mudam de seu fenótipo em processos neoplásicos (Markiewicz et al., 2013; Beha G., 2012)

Esses resultados indicam, portanto, que apesar das células epiteliais inoculadas serem capazes de sobreviver em um ambiente novo e possivelmente adverso, elas aparentemente apenas sofrem um processo de maturação local. Além disso, a presença maciça de células do hospedeiro aponta para a existência de uma reação local em resposta às células inoculadas.

Assim, entende-se que a massa celular que surge no local da inoculação das células epiteliais p75NTR⁺, não pode ser considerada de natureza neoplásica. Esse fato é importante uma vez que a capacidade de iniciar uma neoplasia é sabidamente uma capacidade de células-tronco neoplásicas (Biddle et al., 2011). Ademais, a esparsa expressão de Ki67 evidenciando o pequeno número de células com atividade mitótica e a aparente contenção local da massa celular sem a invasão de tecidos adjacentes corrobora para essa conclusão.

Conforme discutido até agora, apesar de diferentes autores terem avaliado, à sua maneira, a resposta ao trauma das células epiteliais (Taylor et al., 2000; Oshima et al., 2001; Morris et al., 2004), nenhum deles fez o re-isolamento das mesmas pós-transplante *in vivo* para avaliar a sua capacidade de auto-renovação. Esse tipo de experimento, no entanto, é considerado o padrão ouro para avaliar a capacidade de auto-renovação de células-tronco mesenquimais, por exemplo (Gronthos et al., 2002). Conforme descrito em nossos resultados, as células

epiteliais p75NTR⁺, injetadas nos camundongos e re-isoladas após 2 e 5 dias, respectivamente, não demonstraram possuir tal propriedade, ao menos nos experimentos realizados. Uma das hipóteses que talvez justifique isso pode ser o precoce processo de maturação das células inoculadas, conforme previamente mencionado.

Além disso, se o isolamento de células-tronco baseando-se no seu fenótipo sempre resultasse em um ganho funcional, conforme frequentemente afirmado pela literatura (Jones; Watt, 1993; Jones et al., 1995; Kunimura et al., 1998; Li et al. 1998; Kaur; Li, 2000; Tani et al., 2000; Okumura et al., 2003; Webb et al., 2004; Nakamura et al., 2007) as células p75NTR⁺CD71⁻, que, em quase que sua totalidade, também expressavam as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$, deveriam ter apresentado os melhores resultados. No entanto, foram justamente essas células separadas por dupla marcação que tiveram as piores performances nos ensaios funcionais *in vitro*, não se perpetuando por mais do que 2 ou 3 passagens. E, a propósito, essas células também mudaram drasticamente o seu fenótipo quando em cultivo.

Isso nos leva a questionar até que ponto a separação de uma determinada população celular com um fenótipo específico é melhor, do ponto de vista de aplicabilidade clínica, do que trabalhar com uma população celular mista, formada por um pool de células. Trabalhos pioneiros na área de bioengenharia de tecidos tem feito exatamente isso, e apresentam resultados promissores (Angelova et al., 20013).

Todas as populações celulares sempre foram plaqueadas na mesma densidade e submetidas às mesmas condições de cultivo o que, portanto, exclui estes fatores como possíveis variáveis para influenciar no comportamento biológico ou no fenotípico das células.

Outra constatação importante é que o método de separação celular (FACS ou MACS) não parece ter tido interferência nos resultados apresentados, nem no que se refere a alteração do fenótipo das células. Células separadas por ambos os métodos apresentaram alterações importantes.

Independentemente do método utilizado para separação celular, dos marcadores utilizados para isso e da população celular em questão (positiva ou negativa para quaisquer um dos outros marcadores em questão), a morfologia das colônias de células epiteliais era largamente diversificada em cada um dos frascos/placas de cultivo celular, variando tanto em número de células por colônia,

grau de diferenciação celular, formato e número de colônias por placa/frasco de cultivo.

Isso deixa claro que mesmo com um fenótipo teoricamente similar, diferentes clones podem ter características e propriedades completamente distintas e que a separação celular baseada somente na presença dos marcadores analisados não pode ser utilizada como um critério único para o isolamento e caracterização de células-tronco epiteliais humanas, conforme sugerido pela literatura (Jones et al. 1995; ; Li et al., 1998; Okumura et al. 2003; Kim et al., 2004; Izumi et al., 2007; Nakamura et al., 2007).

Além disso, não importou quanto tempo as células permaneceram em cultivo (3 passagens, uma semana ou apenas 4 dias), elas mudaram drasticamente o seu fenótipo. Dessa forma, de maneira geral, células que expressavam p75NTR, na sua maioria, passaram a não expressar esse receptor, enquanto uma pequena proporção de células que originalmente não expressavam p75NTR, passaram a expressá-lo.

Intrigantemente, o número de células que reteve a expressão de p75NTR na população originalmente p75NTR⁺ foi muito similar ao número de células que passou a expressar o p75NTR nas populações de células originalmente p75NTR⁻. Quando realizado o experimento de análise da expressão de p75NTR em queratinócitos bucais de tecido fresco (sem cultivo prévio) observou-se que em condições normais de desenvolvimento da mucosa bucal, a proporção de células p75NTR⁺ é muito pequena (1,4%).

Nos experimentos dessa pesquisa, a porcentagem de células p75NTR⁺ também é muito pequena, principalmente quando considerado que essa população era proveniente de um montante 100% positivo. Interpretamos, dessa forma, que os resultados obtidos sugerem a existência de um processo de equilíbrio entre as populações celulares p75NTR⁺ e p75NTR⁻ tal qual ocorre no organismo humano. Ficando claro, contudo, que novas pesquisas científicas são necessárias para confirmar essa hipótese.

Neste sentido Nakamura et al. (2007), também analisaram a expressão de p75NTR em queratinócitos bucais de tecido fresco e constataram que apenas uma parcela minoritária das células expressavam esse receptor em condições normais (apenas $7.35 \pm 3.41\%$ das células). De maneira similar, Kunimura et al. (1998)

encontraram uma proporção ainda menor de células epiteliais de mucosa bucal expressando p75NTR nas suas amostras (1.5% do total) e ainda mais próximo, portanto, dos resultados por nós obtidos. Embora ambos autores tenham relatado ganhos funcionais das células que expressavam p75NTR, assim como nós também o notamos, em relação às que não o expressavam – como maior eficiência na formação de colônias e capacidade de formação de epitélios *in vitro* - nenhum deles analisou o fenótipo celular após a separação celular, como nós o fizemos.

Outrossim, vale dizer que independentemente das células mudarem o seu fenótipo quando em cultivo, mostramos de maneira concisa que os marcadores de células-tronco epiteliais integrina $\alpha 6$ e $\beta 1$ se co-expressam. Apesar da expressão dessas proteínas ser relatada pela literatura como comum às células-tronco epiteliais (Li et al., 1998; Jones e Watt, 1993; Jones et al., 1995), ainda não haviam trabalhos mostrando a sua co-expressão com o receptor de neurotrofina p75NTR. Além disso, esses resultados deixam claro que outros marcadores de células-tronco epiteliais sugeridos pela literatura, como por exemplo, a Integrina $\alpha 6$ e a Integrina $\beta 1$, não são exclusivamente expressos pelas células p75NTR⁺ mas sim estão presentes em maior quantidade (88% do total de células) do que quando comparado com a população p75NTR⁻.

De maneira geral, não houve diferença alguma no percentual de células que expressam os marcadores celulares analisados ao se comparar a população KSC-I com a KSC-II. Observamos também que nenhum dos estudos descritos na literatura envolvendo os marcadores de células-tronco utilizados na presente pesquisa se preocupou em fazer o mesmo, ou seja, a revalidação dos seus resultados em uma segunda população celular (Jones; Watt, 1993; Jones et al., 1995; Kunitura et al., 1998; Li et al. 1998; Kaur; Li, 2000; Tani et al., 2000; Okumura et al., 2003; Webb et al., 2004; Nakamura et al., 2007).

Já, no que se refere ao desempenho funcional de ambas as linhagens celulares, observou-se que as células p75NTR⁺ da população celular KSC-II foi mais eficiente na formação de colônias do que as da população KSC-I. Em todos os outros ensaios, o desempenho das populações KSC-I e KSC-II foi similar.

Por fim, optamos por realizar o experimento de cocultivo de ambas as populações celulares (p75NTR⁺ e p75NTR⁻) na proporção de 1:1 com vistas à analisar se isso poderia contribuir para que ambas as populações mantivessem o

seu fenótipo. No entanto, conforme abordado, em apenas 4 dias de cultivo celular, aproximadamente 95% das células inicialmente p75NTR⁺ perderam a expressão desse marcador enquanto que 0.22% da população inicialmente p75NTR⁻ passou a expressá-lo fazendo com que o total de células em cultivo que expressavam p75NTR ficasse em percentual próximo ao encontrado nos demais experimentos.

De fato há uma forte evidência de que o comportamento das células-tronco é afetado pelo ambiente em que vivem. Neste sentido, sabe-se que fatores como presença de matriz extracelular, tensão superficial e concentrações de oxigênio parecem influenciar diretamente nas características celulares (Watt; Hogan, 2000 ; Morrison; Spradling, 2008).

É importante que se considere, portanto, que as técnicas de cultivo utilizadas na presente pesquisa, possam por si só ter influenciado no comportamento biológico e alteração de fenótipo das células em cultura, ou que as próprias células teriam mecanismos intrínsecos de busca de um equilíbrio entre as frações de células que expressam determinado marcador celular e as que não o expressam, tal qual ocorre no corpo humano.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1) É possível isolar diferentes populações de células epiteliais progenitoras a partir da mucosa bucal humana, baseando na expressão das proteínas p75NTR e CD71.

2) As células p75NTR⁺ tem um desempenho funcional melhor do que as p75NTR⁻, mas não respondem à injúria e não mostram capacidade de auto-renovação.

3) As células p75NTR⁺ expressam, em maior quantidade, outros marcadores de células-tronco epiteliais, como as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$, e o isolamento de células por dupla marcação (p75NTR⁺CD71⁻) possibilita a obtenção de uma população de queratinócitos ainda mais enriquecida em células que expressam as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$.

4) Não importa a técnica de isolamento celular (FACS ou MACS) ou o tempo de cultivo, as populações epiteliais estudadas alteram drasticamente o seu fenótipo quando cultivadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS¹

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 2008;26:1276-284.

Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(11):2137-43.

Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *PNAS.* 2003;100(1):11830-5.

Angelova Volponi A, Kawasaki M, Sharpe PT. Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res.* 2013;92(4):329-34.

Bagutti C, Speight PM, Watt FM. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol.* 1998;186:8-16.

Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of the clone-forming ability of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82(16):5390-4.

Barrandon Y, Green H. Three clonal types with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci.* 1987;84:2302-6.

Beha G, Sarli G, Brunetti B, Sassi F, Ferrara D, Benazzi C. Morphology of the myoepithelial cell: immunohistochemical characterization from resting to motile phase. *ScientificWorldJournal.* 2012;2012:252034.

Bickenbach, JR. Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J. Dent. Res.* 1981;60:1611-20.

Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res.* 2011;71(15):5317-26.

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(3):207-17.

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:339-73.

Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell*. 2007;128(3):445-58.

Clarke RB, Spence K, Anderson E, Howell A, Okano H, Potten CS. A putative human breast stem cell population is enriched for steroid receptor-positive cells. *Dev. Biol*. 2005;15;277(2):443-56.

Clayton E, Doupé DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature*. 2007;446(7132):185-9.

Cotsarelis G, Sun TT e Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990;61(7):1329-37.

Cotsarelis G. Gene expression profiling gets to the root of human hair follicle stem cells. *J Clin Invest*. 2006;116:19-22.

Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. 1989;57:201-9.

Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*. 1990;61:1329-37.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(9):2287-99.

Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-13.

Daniels TR, Delgado T, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part II: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clin Immunol*. 2006a;121(2):159-76

Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol*. 2006b;121(2):144-58.

Darzynkiewicz GJW. Techniques in cell cycle analysis. Clifton: Humana Press; 1986.

De Luca M, Pellegrini G, Green H. Regeneration of squamous epithelia from stem cells of cultured grafts. *Regen Med.* 2006;1(1):45-57.

De Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li DQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells.* 2005;23:63-73.

Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr. Opin Neurobiol.* 1997;7:413-8.

Dunnwald M, Tomanek-Chalkley A, Alexandrunas D, Fishbaugh J, Bickenbach JR. Isolating a pure population of epidermal stem cells for use in tissue engineering. *Exp Dermatol.* 2001;10(1):45-54.

Fang TC, Alison MR, Wright NA, Poulsom R. Adult stem cell plasticity: will engineered tissues be rejected? *Int J Exp Pathol.* 2004;85(3):115-24.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2011;108(16):6503-8.

Ferreira M, Fujiwara H, Morita K, Watt FM. An activating beta1 integrin mutation increases the conversion of benign to malignant skin tumors. *Cancer Res.* 2009;69(4):1334-42.

Fuchs E, Horsley V. Ferreting out stem cells from their niches. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):513-8.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116:769-78.

Giancotti FG, Tarone G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 2003;19:173-206.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med.* 1996;183:1797-806.

Grindem CB. Blood cell markers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1996;26(5):1043-64.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.

Gurdon JB. A community effect in animal development. *Nature.* 1988;336(6201):772-4.

Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development.* 1989;106:619-33.

Hertle MD, Adams JC, Watt FM. Integrin expression during human epidermal development in vivo and in vitro. *Development.* 1991;112:193-206.

Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48(10):1819-27.

Huang SD, Yuan Y, Liu XH, Gong DJ, Bai CG, Wang F. Self-renewal and chemotherapy resistance of p75NTR positive cells in esophageal squamous cell carcinomas. *BMC Cancer.* 2009;9:9 1-12.

Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11-25.

Igarashi T, Shimmura S, Yoshida S, Tonogi M, Shinozaki N, Yamane GY. Isolation of oral epithelial progenitors using collagen IV. *Oral Dis.* 2008;14(5):413-8.

Iida T, Takami Y, Yamaguchi R, Shimazaki S, Harii K. Development of a tissue-engineered human oral mucosa equivalent based on an acellular allogeneic dermal matrix: a preliminary report of clinical application to burn wounds. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2005;39(3):138-46.

Izumi K, Tobita T, Feinberg SE. Isolation of human oral keratinocyte progenitor/stem cells. *J Dent Res.* 2007;86(4):341-6.

Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, et al. Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet.* 2008;40(11):1291-9.

Jensen KB, Collins CA, Nascimento E, Tan DW, Frye M, Itami S, et al. Lrig1 expression defines a distinct multipotent stem cell population in mammalian epidermis. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):427-39.

Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell.* 1993;73(4):713-24.

Jones PH, Harper S, Watt FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell.* 1995;80(1):83-93.

Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia Básica*, 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kang MK, Bibb C, Baluda MA, Rey O, Park NH. *In vitro* replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 2000;258:288-97.

Kaur P, Li A. Adhesive properties of human basal epidermal cells: an analysis of keratinocyte stem cells, transit amplifying cells, and postmitotic differentiating cells. *J. Invest. Dermatol.* 2000;114:413-20.

Kim DS, Cho HJ, Choi HR, Kwon SB, Park KC. Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol. Life Sci.* 2004;61(21):2774-81.

Klingbeil MF, Mathor MB, Giudice FS, Yoshito D, dos Santos Pinto D Jr. Is it safe to utilize in vitro reconstituted human oral epithelium? An oncogenetic pathway study. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):27-35.

Kunimura C, Keiji K, Nuzhat A, Akio S, Shigeru Y. Telomerase activity in a specific cell subset co-expressing integrin β 1/EGFR but not p75NGFR/bcl2/integrin β 4 in normal human epithelial cells. *Oncogene.* 1998;17:187-97.

Lajtha LG. Stem cell concepts. *Differentiation.* 1979;14:23-34.

Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, et al. Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells*. 2006;24(4):965-74.

Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001;59(2):169-75.

Lavker RM, Sun TT. Heterogeneity in epidermal basal keratinocytes: morphological and functional correlations. *Science*. 1982;215:1239-41.

Lechler T, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature*. 2005;437:275-80.

Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM. beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell*. 2000;11(2):453-66.

Li A, Simmons PJ, Kaur P. Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998;95(7):3902-07.

Li X, Shen Y, Di B, Li J, Geng J, Lu X, He Z. Biological and clinical significance of p75NTR expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol.* 2012;132(3):314-24.

Markiewicz A, Książkiewicz M, Seroczyńska B, Skokowski J, Szade J, Wełnicka-Jaśkiewicz M, et al. Heterogeneity of mesenchymal markers expression-molecular profiles of cancer cells disseminated by lymphatic and hematogenous routes in breast cancer. *Cancers (Basel)*. 2013 Nov 8;5(4):1485-503.

McAree KG, Klein RL, Boeckman CR. The use of cultured epithelial autografts in the wound care of severely burned patients. *J Pediatr Surg*. 1993;28(2):166-8.

Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*. 1990;11(2):231-8.

Moharamzadeh K, Brook IM, Van Noort R, Scutt AM, Thornhill MH. Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature. *J Dent Res*. 2007;86(2):115-24.

Moore KA, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006;311:1880-5.

Morris RJ, Liu Y, Marles L, Yang Z, Trempus C, Li S, et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol*. 2004;22:411-7.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008;132:598-611.

Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I. Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J Dent Res*. 2009;88(3):219-23.

Nakamura T, Ang LP, Rigby H, Sekiyama E, Inatomi T, Sotozono C, et al. The use of autologous serum in the development of corneal and oral epithelial equivalents in patients with Stevens Johnson syndrome. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:909-16.

Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells*. 2007;25(3):628-38.

Neal MD, Richardson WM, Sodhi CP, Russo A, Hackam DJ. Intestinal stem cells and their roles during mucosal injury and repair. *J. Surg. Res*. 2011;167(1):1-8.

Nguyen H, Merrill BJ, Polak L, Nikolova M, Rendl M, Shaver TM, Pasolli HA, Fuchs E. Tcf3 and Tcf4 are essential for long-term homeostasis of skin epithelia. *Nat Genet*. 2009;41(10):1068-75.

Nijhof JG, Braun KM, Giangreco A, van Pelt C, Kawamoto H, Boyd RL, et al. The cell-surface marker MTS24 identifies a novel population of follicular keratinocytes with characteristics of progenitor cells. *Development*. 2006;133(15):3027-37.

Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J. Med*. 2004;351(12):1187-96.

Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-21.

Nowak JA, Polak L, Pasolli HA, Fuchs E. Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*. 2008;3(1):33-43.

Okumura T, Yutaka S, Masayuki I, Shigeru Y. Neurotrophin receptor p75NTR characterizes human esophageal keratinocyte stem cells *in vitro*. *Oncogene*. 2003;22:4017-26.

Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001;104:233-45.

Pellegrini G, De Luca M, Arsenijevic Y. Towards therapeutic application of ocular stem cells. *Semin. Cell Dev Biol*. 2007;18(6):805-18.

Pellegrini G, Rama P, Mavilio F, De Luca M. Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy. *J Pathol*. 2009;217(2):217-28.

Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997;349(9057):990-3.

Pessina A, Gribaldo L. The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives. *Curr Med Res Opin*. 2006;22(11):2287-300.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.

Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *Int. J. Biochem Cell Biol*. 1999;31(10):1111-37.

Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990;110(4):1001-20.

Potten CS. Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2004;9(3):183-95.

Redvers RP, Li A, Kaur P. Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:13168-173.

Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 1975;6(3):331-43.

Rizvi AZ, Wong MH. Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells*. 2005;23(2):150-65.

Rodriguez-Tebar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA. Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J*. 1992;11:917-22.

Rossi L, Challen GA, Sirin O, Lin KK, Goodell MA. Hematopoietic stem cell characterization and isolation. *Methods Mol Biol*. 2011;750:47-59.

Schneider EL, Chaillet JR, Tice RR. *In vivo* BUdR labeling of mammalian chromosomes. *Exp Cell Res*. 1976;100(2):396-9.

Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaça LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008;26(1):146-50.

Silva-Vargas V, Lo Celso C, Giangreco A, Ofstad T, Prowse DM, Braun KM, et al. Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev. Cell*. 2005;9(1):121-31.

Sloan P, Picardo M, Schor SL. The structure and function of oral mucosa. *Dent. Update*. 1991;18(5):208-12.

Snippert HJ, Haegebarth A, Kasper M, Jaks V, van Es JH, Barker N, et al. Lgr6 marks stem cells in the hair follicle that generate all cell lineages of the skin. *Science*. 2010;327(5971):1385-9.

Søland TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M. Nerve growth factor receptor (p75NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2008;53:62–72.

Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, et al. Integrin $\alpha 6/\beta 4$ complex is located in the hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J Cell Biol*. 1991;113(4):907-17.

Stephens P, Genever P. Non-epithelial oral mucosal progenitor cell populations. *Oral Dis*. 2007;13(1):1-10.

Still JM Jr, Orlet HK, Law EJ. Use of cultured epidermal autografts in the treatment of large burns. *Burns*. 1994;20(6):539-41.

Takagi R, Yamato M, Kanai N, Murakami D, Kondo M, Ishii T, et al. Cell sheet technology for regeneration of esophageal mucosa. *World J Gastroenterol*. 2012;18(37):5145-50.

Tani H, Morris RJ, Kaur P. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *PNAS*. 2000;97(20):10960-5.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. 2000;102:451-61.

Terunuma A, Jackson KL, Kapoor V, Telford WG, Vogel JC. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J Invest Dermatol*. 2003;121(5):1095-103.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.

Thomson JA, Marshall VS. Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol*. 1998;38:133-65.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-22.

Tsai C, Ueda M, Hata K, Horie K, Hibino Y, Sugimura Y, et al. Clinical results of

cultured epithelial cell grafting in the oral and maxillofacial region. *J Cranio-Maxill Surg.* 1997;25(1):4-8.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004;303:359-63.

Urmacher C. Histology of normal skin. *Am J Surg.* 1990;14(7):671-86.

Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287(5457):1427-30.

Watt FM. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr Opin Cell Biol.* 1989;1:1107-15.

Watt FM. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *EMBO J.* 2002;21(15):3919-26.

Watt FM, Lo Celso C, Silva-Vargas V. Epidermal stem cells: an update. *Curr Opin Genet Dev.* 2006;16(5):518-24.

Webb A, Li A, Kaur P. Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation.* 2004;72(8):387-95.

Xie JL, Li TZ, Qi SH, Huang B, Chen XG, Chen JD. A study of using tissue-engineered skin reconstructed by candidate epidermal stem cells to cover the nude mice with full-thickness skin defect. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2007;60(9):983-90.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 02/09

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa-Subcomissão de Bioética de Animais da FOU SP, **APROVOU** o protocolo de pesquisa: "***Isolamento e caracterização e análise da resposta a injúria de células-tronco epiteliais da mucosa buca humana***", de responsabilidade do Pesquisador: Felipe Perozzo Daltoé , sob orientação da Professora Doutora Andrea Mantesso.

Cabe ao responsável enviar relatórios referentes ao andamento da pesquisa após 06 (seis) meses e 01 (um) ano desta data, bem como cópia do trabalho em "cd" ou "disquete" ao finalizá-lo, conforme legislação vigente.

São Paulo, 16 de março de 2009.

Prof. Dr. **CELSON LUIZ CALDEIRA**
PRESIDENTE DA SUB-COMISSÃO DE BIOÉTICA DE ANIMAIS DA FOU SP

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: Isolamento, caracterização e análise da resposta à injúria de células-tronco epiteliais da mucosa bucal humana.

Pesquisador responsável: Dr. Andrea Mantesso (coordenadora) e Felipe Perozzo Daltoé (participante)

Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo / Departamento de Estomatologia

Telefone para contato: do responsável pela pesquisa: (11) 7529 8969 ou do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo localizado: 3091 7960.

Local da coleta de dados: Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e Clínicas Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa de forma totalmente voluntária.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa, é muito importante que você compreenda todas as informações e instruções contidas neste documento.
- O pesquisador responsável deverá responder todas as suas dúvidas antes que você decida participar.
- Você tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem que ocorra qualquer alteração no tratamento que está sendo desenvolvido na FOUSP.

Objetivo do estudo: estudar as células-tronco que existem na pele que reveste a boca.

O que é necessário para participar da pesquisa?

Sua participação nesta pesquisa consistirá em apenas nos doar os fragmentos de gengiva que forem removidos durante a cirurgia que o senhor se submeterá, lembrando que material de nosso interesse é justamente aquele que não poderá ser mais recolocado na sua boca e, portanto, iria para o lixo.

Quais são os benefícios para o participante?

Esta pesquisa ajudará os cientistas a conhecerem melhor um tipo de célula que existe na boca. Isso é importante porque é provável que no futuro essa célula irá ajudar na recuperação de tecidos que foram perdidos ou estão danificados por causa de acidentes ou mesmo lesões na boca. Mas, gostaríamos que você ficasse ciente que a pesquisa vai lhe trazer nenhum benefício direto e/ou imediato.

Estaremos sempre à disposição para lhe tirar dúvidas ou prestar maiores esclarecimentos sobre os resultados da pesquisa através dos telefones ou e-mail descritos no início deste documento.

Existe algum risco para quem participa?

O senhor está sujeito aos riscos normais de qualquer cirurgia na boca uma vez que esse procedimento será realizado pelo seu dentista. Esses riscos serão controlados por meio de medicamentos quando indicados e orientações recebidas do seu cirurgião-dentista, previamente ao ato cirúrgico. O armazenamento do material em si, que será realizado por nós, não causa qualquer tipo de risco.

Deixamos claro que o material que iremos utilizar para a nossa pesquisa, será um material que iria ser removido e dispensado de qualquer maneira devido ao tipo de cirurgia que o senhor fará. O fato do Sr(a) participar desta pesquisa não implicará numa remoção de tecido em maior ou menor quantidade do havia sido previamente programado pelo seu dentista.

Não nos responsabilizamos por qualquer tipo de indenização que o Sr(a) possa vir a solicitar. No entanto, nos comprometemos a utilizar este material apenas para a nossa pesquisa e, depois, destruí-lo completamente quando a pesquisa acabar.

É um estudo sigiloso?

As informações fornecidas pelo Sr(a) serão confidenciais e de conhecimento apenas do pesquisador responsável. Através deste documento, nos comprometemos em não divulgar sua identidade de forma alguma e em momento

algum, mesmo que os resultados dessa pesquisa sejam publicados em congressos ou revistas científicas especializadas.

Estando certo de que o Sr(a) leu todo o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e não tem nenhuma dúvida do mesmo, peço-lhe agora para que leia e assine a seguinte declaração:

Eu _____,
portador do RG número _____ declaro que, tendo lido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar voluntariamente deste estudo e autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentações em Congressos. Declaro ainda ter recebido uma cópia do termo de informação e autorização para participar da pesquisa e estar ciente que a minha participação pode ser interrompida a qualquer momento sem que isso acarrete em nenhuma alteração no meu tratamento.

Assinatura do Paciente

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

São Paulo, de de .

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL:**

Nome: _____

Identidade no: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Telefones: _____