ELÍSEO JOJI SEKIYA

**Avaliação do efeito de células-tronco mesenquimais humanas de várias
origens na atividade de linhagem de células tumorais HepG-2**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**SÃO PAULO
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sekiya, Elíseo Joji

Avaliação do efeito de células-tronco mesenquimais humanas de várias origens na atividade de linhagem de células tumorais HepG-2 / Elíseo Joji Sekiya. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Líquido amniótico 3.Tecido adiposo 4.Geléia de Wharton 5.Meios de cultivo condicionados 6.Carcinoma hepatocelular

USP/FM/DBD-321/14

Dedicatória

Este trabalho é dedicado
aos meus Pais Goro e Miyoko,
à minha esposa Roselaine e
aos meus filhos Felipe e Ângela

Agradecimentos

Ao professor Sérgio Paulo Bydlowski pela orientação experiente e profissionalismo exemplar que tornaram viáveis a realização deste estudo.

Aos meus pais por sempre me apoiarem na minha formação pessoal e profissional.

À Roselaine por estar sempre ao meu lado em todas as nossas lutas, desde que nossas vidas se uniram anos atrás.

A todos os colegas de trabalho do Laboratório de investigação médica LIM-31, especialmente ao Jorge e à Débora que com grande profissionalismo viabilizaram tecnicamente este estudo.

Ao Dr. Adelson, a Sra. Niolanda e ao Sr. Antônio que sempre me incentivaram e apoiaram meu desenvolvimento científico e profissional.

A todos os amigos e familiares pela torcida.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Células-tronco	1
1.2	Células-tronco Mesenquimais	3
1.3	Diferentes Populações de Células-tronco Mesenquimais	4
1.4	Células-tronco Mesenquimais e Câncer	6
1.5	O ciclo celular e a proliferação celular	9
1.6	A senescência celular	13
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
4	MÉTODOS	20
4.1	Linhagens celulares utilizadas no estudo	21
4.2	Meios condicionados de Células-tronco Mesenquimais	21
4.3	Linhagens de células tumorais hepáticas humanas	22
4.4	Experimentos	22
4.5	Delineamento Experimental	24
4.6	Efeito na viabilidade celular in vitro do meio condicionado de Células Mesenquimais de diferentes origens sobre linhagem de Hepatocarcinoma	25
4.7	Efeito do meio condicionado de CTM de diferentes origens sobre o ciclo celular de linhagem de Hepatocarcinoma	26
4.8	Regulação da expressão gênica por meio condicionado de CTM de diferentes origens sobre linhagens de células tumorais	27
4.9	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular através do marcador Ki67	30
4.10	Efeito do MC de CTM sobre o número de mitocôndrias de células tumorais por marcação com Mitotracker	31
4.11	Efeito do MC de CTM sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais por marcação com JC1	31
4.12	Efeito do MC de CTM sobre apoptose de células tumorais por marcação com Anti-survivina	32

4.13	Efeito do MC de CTM sobre a proliferação de células tumorais por quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular - PCNA.....	33
4.14	Efeito do MC de CTM sobre a apoptose de células tumorais por marcação com anticorpos Anti-Bcl2.	34
4.15	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Teste de Viabilidade celular.....	36
5.2	Alterações no ciclo celular.....	39
5.3	Expressão gênica de linhagens de células tumorais.....	45
5.4	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular.....	46
5.5	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular através do marcador Ki67.....	47
5.6	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre o número de mitocôndrias em células tumorais por marcação com MitoTracker.....	49
5.7	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais por JC1.....	50
5.8	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a expressão da proteína survivina por células tumorais HepG-2.	51
5.9	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação de células tumorais por marcação com o antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA.....	53
5.10	Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a expressão de Bcl-2 por células tumorais HepG-2.	54
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO.....	60
8	ANEXO.....	61
8.1	Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-HCFMUSP - CAPPesq.....	61
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE SÍMBOLOS

AF	Amniotic Fluid
AF-CM	Amniotic fluid conditioned media
AT-CM	Adipose tissue conditioned media
ATP	Adenosine Triphosphate
BM	Bone Marrow
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
CKI	Cyclin-kinase inhibitor
CT	Células-tronco
CTA	Células-tronco Adultas
CTE	Células-tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DP	Desvio Padrão
G0	Gap 0
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GW	Geleia de Wharton
H&E	hematoxilina-eosina
HepG-2	Linhagem celular de Hepatocarcinoma humano
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen
IC50	Inhibitory Concentration
IgG	Imunoglobulina G
iPS	Induced Pluripotent Stem Cell

KDa	quilodaltons
LA	Líquido Amniótico
M	Fase mitótica
MC	Meio Condicionado
MC-GW	Meio condicionado de geleia de Wharton
MC-LA	Meio condicionado de líquido amniótico
MC-TA	Meio condicionado de tecido adiposo
MO	Medula óssea
MSC	Mesenchymal Stem Cells
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
OCT-4	Octamer-binding Transcription Factor 4
PBS	Phosphate Buffer Saline
pH	potencial Hidrogeniônico
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
S	Fase de síntese
SFB	Soro Fetal Bovino
TA	Tecido Adiposo
USP	Universidade de São Paulo
WJ-CM	Wharton jelly conditioned media
α -MEM	Alfa Modification Minimum Essential Medium Eagle

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo	24
Figura 2 - Efeito dos Meios Condicionados de Células Mesenquimais de Tecido Adiposo sobre a Viabilidade celular linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa do tratamento em relação ao controle da própria célula (MC-HepG-2): * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$	36
Figura 3 - Viabilidade de linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação com meios condicionados de células mesenquimais de líquido amniótico, segundo a concentração de MC-LA e desvio padrão. Asterisco indica diferença significativa do tratamento em relação ao controle da própria célula (MC-HepG-2): ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$	37
Figura 4 - Viabilidade de linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação com Meios Condicionados de Células Mesenquimais de geleia de Wharton, segundo a concentração de MC-GW e desvio padrão. *** $p < 0,001$	38
Figura 5 - Efeito de meios condicionados de células-tronco mesenquimais de líquido amniótico (MC-LA) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do Ciclo Celular. Três amostras de MC-LA obtidas de três cultivos de CTM. Para controle do teste foi utilizado o meio condicionado da própria linhagem de células. ** $p < 0,01$	39
Figura 6 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de líquido amniótico (MC-LA) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular. ** $p < 0,01$	40
Figura 7 - Efeito de Meios Condicionados de Células-tronco Mesenquimais de geleia de Wharton (MC-GW) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do Ciclo Celular. Três amostras de MC-LA obtidas de três cultivos de CTM. Para controle do teste foi utilizado o meio condicionado da própria linhagem de células.....	41
Figura 8 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais	

HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de geleia de Wharton (MC-GW) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.....	41
Figura 9 - Efeito de meios condicionados de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MC-TA) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do ciclo celular.....	42
Figura 10 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de Tecido Adiposo (MC-TA) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.....	43
Figura 11 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com seus próprio meios condicionados e analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.....	44
Figura 12 - Expressão gênica de células HepG-2 tratadas com 50% de Meios Condicionados de células mesenquimais de líquido amniótico e de tecido adiposo por 24 horas. Os genes testados foram CCD-1, Bcl-2 e Bcl-6...	45
Figura 13 – Número total de células HepG-2 segundo o tipo de tratamento com meio condicionado. Núcleos corados com Hoechst 33342. * $p<0,05$ e ** $p<0,01$	46
Figura 14 – Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com Ki67. A coloração Azul: Hoechst 33342; Coloração verde: Ki 67. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.....	47
Figura 15 – Percentual de células HepG-2 positivas para Ki-67 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA. *** $p<0,001$	48
Figura 16 - Intensidade de fluorescência de células HepG-2 positivas para Ki-67 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA.	48
Figura 17 - Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com mitotracker. A coloração Azul corresponde ao Hoechst 33342 e a coloração vermelha a mitocôndria. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.....	49

Figura 18 – Intensidade de fluorescência de células HepG-2 positivas para mitotracker segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA. $P < 0,01$	50
Figura 19 - Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com JC1 - Mitoscreen. A coloração Azul corresponde ao Hoechst 33342, a coloração vermelha a agregados de JC1 e verde a monômeros de JC1. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.	50
Figura 20 - Células HepG-2 positivas para JC1 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com o meio condicionado da própria célula. *** $p < 0,001$	51
Figura 21 - Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas para identificação de survivina. A coloração verde corresponde a survivina. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.	52
Figura 22 – Células HepG-2 positivas para Survivina segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.....	52
Figura 23 – Intensidade de fluorescência de Células HepG-2 positivas para Survivina segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.	53
Figura 24 – Células HepG-2 positivas para PCNA segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula. * $p < 0,05$	54
Figura 25 – Percentual de Células HepG-2 positivas para Bcl2 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.	55
Figura 26 – Intensidade de fluorescência de Células HepG-2 positivas para Bcl2 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.	55

RESUMO

Sekiya, E. J. Avaliação do efeito de células mesenquimais humanas de várias origens na atividade de linhagem de células tumorais HepG-2. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

INTRODUÇÃO O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano, segundo dados da OMS. As mortes por câncer são provocadas por tumores que se originam em órgãos como pulmão, fígado, estômago, intestino, mama e esôfago. As células-tronco mesenquimais (CTM) foram identificadas em vários órgãos e estudos da sua interação com células tumorais têm apresentado resultados indicando ação inibitória sobre alguns tipos de tumores. Para explorar essa questão foram analisados os efeitos sobre células tumorais de carcinoma hepatocelular humano (HepG-2) do meio condicionado (MC) obtido do cultivo de CTM isoladas de tecido adiposo (TA), líquido amniótico (LA) e geleia de Wharton (GW). **MÉTODOS** Os MCs foram coletados após 24 horas de incubação das CTM sub-confluentes com α -MEM contendo 20% de soro fetal bovino (SFB). Os MCs foram centrifugados e passados através de filtros de 0,22 μ m e armazenadas a -20 °C. O MC da própria célula HepG-2 foi utilizado como controle. Os efeitos dos MCs sobre a proliferação de células HepG-2 foram testados por ensaio MTT, em várias concentrações após 24 h de incubação. O ciclo celular de células HepG-2 tratadas com MC a 25%, 50% ou 75% foi analisado por citometria de fluxo (coloração IP) utilizando o software Modfit LT. A expressão dos genes bcl-2, bcl-6, CCND1 foi analisada por RT-PCR. A proliferação celular foi avaliada pela expressão das proteínas survivina, Bcl-2, PCNA e Ki-67 e pela quantificação de mitocôndrias com corante MitoTracker, assim como pelo potencial de membrana mitocondrial por corante JC-1 Mitoscreen utilizando equipamento de *high content analysis*. **RESULTADOS** Os meios condicionados de células-tronco de tecido adiposo (MC-TA) não alteraram a proliferação de células tumorais HepG-2 e os meios condicionados de células-tronco de líquido amniótico (MC-LA) e de geleia de Wharton (MC-GW) provocam aumento da proliferação, confirmada pela contagem de células com núcleos corados com Hoescht 33342. A análise de alterações do ciclo celular demonstrou que a exposição de células HepG-2 aos meios MC-LA diminuem as células na fase G0/G1 e aumentam na fase G2/M do ciclo celular. A expressão dos genes CCND1, Bcl2 e Bcl6 que estão relacionados à proliferação e morte celular não apresentaram alteração. A quantificação das proteínas PCNA e survivina não apresentou alteração sob efeito dos MC, porém a comparação direta entre células tratadas com MC-LA e MC-TA indicou a tendência das células tratadas com MC-LA proliferarem. O percentual de células HepG-2 expressando a proteína Ki-67 foi significativamente menor em relação ao controle quando tratadas com MC-TA, não apresentando diferenças quando tratadas com MC-LA e MC-GW. A contagem de mitocôndrias evidenciou aumento de mitocôndrias nas células HepG-2 tratadas com MC-LA e efeito não significativo dos tratamentos com MC-TA e MC-GW. A diferença do potencial de membrana mitocondrial por JC-1 apresentou aumento da polarização nas células HepG-2 cultivadas com MC-TA. **CONCLUSÃO** Os resultados confirmam que as células-tronco mesenquimais diferem de acordo com a sua origem tecidual em sua ação na proliferação das células HepG-2. Mais estudos são necessários para estabelecer a causa destas ações, que não parecem ser devido a mediadores mais comuns na proliferação e morte celular.

DESCRITORES Células-tronco mesenquimais, Líquido amniótico, Tecido Adiposo, geleia de Wharton, Meios de cultivo condicionados, carcinoma hepatocelular

ABSTRACT

Sekiya, EJ Evaluation of the effect of human mesenchymal cells from several sources in the activity of tumor cells line. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

INTRODUCTION Cancer is a leading cause of death worldwide, accounting for about 8 million deaths per year, according to WHO data. Cancer deaths are caused by tumors that originate in organs such as lung, liver, stomach, bowel, breast and esophagus. The mesenchymal stem cells (MSCs) have been identified in many organs and studies of their interaction with tumor cells have shown results indicating an inhibitory effect on some types of tumors. To explore this question the effects of the conditioned medium (CM) obtained from mesenchymal stem cell isolated from adipose tissue (AT), amniotic fluid (AF) and Wharton jelly (WJ) on tumor cells of human hepatocellular carcinoma (HepG-2) were analyzed.

METHODS The MSC CM was collected after 24 hours incubation of sub confluent MSC with α -MEM containing 20% fetal bovine serum (FBS). The MSC CM were centrifuged and passed through 0.22 μ M filter and stored at -20° C. The CM of HepG-2 cell itself was used as control. The effects of contrast media on proliferation of HepG-2 cells were tested by MTT assay at various concentrations after 24 h of incubation. The cell cycle HepG-2 cells treated with CM at 25%, 50% or 75% was analyzed by flow cytometry (PI staining) using Modfit software LT. The expression of the genes Bcl-2, Bcl-6, CCND1 was analyzed by RT-PCR. Cell proliferation was assessed by the expression of survivin, Bcl-2, Ki-67 and PCNA proteins, and the quantization of mitochondrial by MitoTracker dye, as well as the mitochondrial membrane potential by JC-1 Mitoscreen dye using high content analysis equipment. **RESULTS** The conditioned media of mesenchymal stem cells (MSC) from adipose tissue (AT-CM) did not alter the proliferation of tumor HepG-2 cells and conditioned media of MSC cells from amniotic fluid (AF-CM) and Wharton jelly (WJ-CM) caused increased proliferation, confirmed by counting cells with nuclei stained with Hoechst 33342. The cell cycle analysis showed that exposure of HepG-2 cells to AF-CM means decrease the cells in G0 / G1 cell cycle phase and increase in phase G2 / M. The expression of Bcl2, Bcl6 and CCND1 genes that are related to proliferation and cell death did not change. The quantization of PCNA and survivin protein did not change under the effect of conditioned media, but a direct comparison between cells treated with AF-CM and AT-CM indicated the tendency of cells treated with AF-CM proliferate. The percentage of HepG-2 cells expressing the protein Ki-67 was significantly lower than the control when treated with AT-CM and no differences when treated with AF-CM and WJ-CM. The counting of mitochondria showed increased mitochondria in HepG-2 cells treated with AF-CM and no significant effect of treatment with WJ-CM and AT-CM. The difference in mitochondrial membrane potential by JC-1 showed an increase in polarization in HepG-2 cells cultured with AT-CM. **CONCLUSION** The results confirm that mesenchymal stem cells differ according to their tissue origin in its action on the proliferation of HepG-2 cells. More studies are needed to establish the cause of these actions, which seem to be not related to the most common mediators in cell proliferation and death.

KEYWORDS Mesenchymal stem cells, amniotic liquid, Adipose Tissue, Wharton jelly, Culture media conditioned, hepatocellular carcinoma

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco

Atualmente o termo Células-Tronco é utilizado para definir uma população de células indiferenciadas que apresentam a capacidade de auto-renovação e de diferenciação, o que significa que são capazes de se transformarem em outras células especializadas (1).

As células-tronco humanas podem ser classificadas como células-tronco embrionárias, encontradas na fase inicial de desenvolvimento do embrião, ou células-tronco adultas, presentes no tecido humano já formado. As células-tronco embrionárias são obtidas de células geradas a partir de processos de fecundação artificial em laboratórios, quando são gerados os embriões para posterior implantação no útero materno. Após o isolamento *in vitro* da massa interna do blastocisto, estas células promovem a divisão assimétrica, com alta taxa de replicação, indiferenciação por tempo prolongado e formação de corpos embrióides que podem se diferenciar em todos os tecidos de um organismo adulto (2).

As células-tronco adultas são pequenas populações celulares indiferenciadas e quiescentes, ou seja, com progressão lenta do ciclo celular. Estas células são encontradas nos diversos tecidos do organismo, sendo demonstrado que, quando estimuladas, se autorrenovam e originam células maduras funcionais, regenerando o tecido onde se localizam (3). A Medula Óssea e o Sangue de Cordão Umbilical são fontes das células-tronco

hematopoiéticas que geram as linhagens celulares do sangue, sendo estas as células-tronco adultas mais conhecidas e utilizadas em tratamentos de doenças onco-hematológicas através do transplante.

A investigação da presença de células-tronco em outros tecidos levou a identificação das células-tronco nos tecidos que promovem o suporte para a gestação sendo estas consideradas células-tronco fetais (2). Inicialmente estudadas no sangue e tecidos de cordão umbilical, as células-tronco fetais foram recentemente isoladas de vários tecidos (líquido amniótico, cordão umbilical, geleia de Wharton, âmnio e placenta), sendo facilmente acessíveis, apresentando altos índices de proliferação, sem formar teratomas. As suas características funcionais indicam que elas apresentam propriedades intermediárias entre as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas (4).

Considerando a plasticidade, ou seja, a capacidade de gerar células e tecidos especializados durante o desenvolvimento de um organismo, as células-tronco são classificadas em totipotente, pluripotente, multipotente e unipotente . As totipotentes originam todos os tecidos, incluindo anexos embrionários e extra-embrionários. Nesta categoria encontramos a célula-ovo ou zigoto. As células pluripotentes podem originar todas as células de um indivíduo adulto, porém não desenvolvem os anexos embrionários, sendo exemplo as células-tronco embrionárias e as células pluripotentes induzidas (iPS) (5). As células multipotentes são comprometidas com folhetos embrionários específicos, originando células somente deste folheto. São exemplos as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais. Finalmente, as células-tronco podem ser unipotentes, ou seja, capazes de originar apenas um tipo de

tecido, sendo responsáveis pela regeneração tecidual (4).

1.2 Células-tronco Mesenquimais

As células mesenquimais foram isoladas em cultura pela primeira vez por Friedenstein et al (1976) na década de 70, sendo caracterizadas como células clonais derivadas da medula óssea, aderentes ao plástico, capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e denominadas inicialmente como “células estromais de medula” (6). O termo “células-tronco mesenquimais” para descrever esta população de células homogêneas derivadas da medula foi introduzida por Caplan et al. (1991) no início da década de 90 (7).

Com o objetivo de estabelecer um consenso na caracterização molecular das Células-Tronco Mesenquimais (CTM) foram definidos critérios mínimos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT). Assim as células devem apresentar propriedades de adesão à superfície do recipiente plástico de cultura, expressar moléculas de superfície típica da mesoderme, tais como CD105, CD73, CD90 e ausência de antígenos característicos de células progenitoras hematopoiéticas e endoteliais como o CD34, leucocitários como CD45, marcadores de monócitos e macrófagos como CD14, de células B como CD19 e HLA-DR. Finalmente, devem demonstrar a capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (8).

Estas células constituem um versátil grupo de células-tronco não hematopoiéticas com elevado potencial de proliferação e diferenciação, sendo encontrados em vários tecidos perinatais como o sangue e o tecido do cordão

umbilical, o líquido amniótico e em tecidos adultos como a medula óssea e o tecido adiposo. A facilidade de isolamento destas células e sua elevada capacidade de proliferação *in vitro*, aliado ao potencial elevado de diferenciação celular têm gerado grande interesse no seu uso terapêutico em medicina regenerativa (9).

Estudos posteriores permitiram identificar células multipotentes que satisfazem os critérios definidores das CTM em outros tecidos adultos como o tecido adiposo (10), sangue periférico (11) e a polpa dental (12).

Trabalhos publicados mais recentemente, identificaram células que atendem critérios para classificação como CTM obtidas a partir de tecidos fetais e perinatais como sangue do cordão umbilical (13), placenta (14), líquido amniótico (15), e geleia de Wharton (16).

Os tecidos perinatais são descartados após o nascimento e são fontes ideais para a obtenção de CTM porque permitem fácil acesso a população de células-tronco exibindo altas taxas de proliferação e baixa imunogenicidade e tumorigenicidade, sem as preocupações éticas verificadas com células-tronco embrionárias quanto a sua utilização em estudos pré-clínicos e clínicos (17).

1.3 Diferentes Populações de Células-tronco Mesenquimais

As CTM originadas a partir de diferentes tecidos podem exercer atividades biológicas diferentes *in vivo*, apesar da sua morfologia e imunofenotipagem uniforme. Estes achados foram considerados consistentes com os perfis diferentes de cada população de CTM em relação a sua origem e direcionam para a possibilidade de aperfeiçoar a utilização de determinados

subconjuntos de CTM para indicações clínicas mais específicas (18).

Estudos recentes evidenciaram que as CTM de tecidos fetais apresentam capacidades adicionais em comparação com CTM derivadas de tecidos adultos, tais como capacidade proliferativa aumentada, maior potencial de diferenciação e vida útil (19).

As células-tronco do líquido amniótico representam uma população heterogênea derivadas de todas as três camadas germinais. As CTM do Líquido Amniótico exibem uma série de marcadores específicos de células estromais como Oct-4, Nanog e SSEA-4 e têm uma ampla gama de potencial de diferenciação (15).

As células-tronco da geleia de Wharton são células estromais da região externa do cordão umbilical, conhecido como geleia de Wharton, tendo sido recentemente isoladas e caracterizadas. Elas expressam marcadores de células embrionárias como Oct-4, Sox-2 e Nanog, juntamente com um padrão típico de marcadores mesenquimais (20).

As CTMs são encontrados em praticamente todos os órgãos, sendo a CTM de Medula óssea o tipo melhor caracterizadas e mais comumente utilizadas em ensaios clínicos. Em estudo comparativo entre os dois tipos, Strioga et al (2012) (21) demonstraram que, embora existam algumas diferenças entre CTM-MO e CTM-TA em seu perfil de expressão gênica, o seu potencial angiogênico e secreção de fatores são semelhantes. Apesar disso, as CTM-TA podem ser obtidas em quantidades substancialmente maiores que CTM-MO sendo o tecido adiposo mais facilmente acessível com menor morbidade na coleta em comparação com a medula óssea. Os dados de estudos pré-clínicos e clínicos suportam o uso de ambas as populações CTM

em várias aplicações clínicas (18).

1.4 Células-tronco Mesenquimais e Câncer

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, sendo responsável por cerca de 8 milhões de mortes por ano. As mortes por câncer são provocadas por tumores que se originam em órgãos como pulmão, fígado, estômago, intestino, mama e esôfago (22).

O carcinoma hepatocelular é a sexta neoplasia mais comum e a terceira causa mais frequente de morte por câncer, sendo a principal causa de morte entre pacientes com cirrose (23).

Os estudos dos mecanismos de ação das CTM sugerem que estas apresentam potencial de aplicação terapêutica através da liberação de mediadores solúveis (24) e uma atividade imunossupressora, com potencial imunogênico mínimo ou quase ausente (25). Outros trabalhos demonstraram que as CTM expressam receptores de quimiocinas e moléculas de adesão que permitem o seu direcionamento aos locais lesionados *in vivo*, em resposta a gradientes de quimiocinas específicas (26).

Em relação à interação com as células tumorais, foi demonstrado que as CTM apresentam efeitos anti-proliferativos contra tumores primários de derivação mesenquimal como o sarcoma de Kaposi *in vitro* através de ativação da proteína-quinase Akt (27). Apesar disso, foi relatado Ramasamy et al . (2007) que as CTM induziram a permanência de células tumorais na fase G1 do ciclo celular, porém acompanhada por uma redução na taxa de apoptose

(28).

As CTM de diferentes fontes foram avaliadas quanto a diferenças em seus fenótipos assim como em suas moléculas de superfície e sua sensibilidade a fatores solúveis que ativam as funções imunológicas e de direcionamento da movimentação celular, sugerindo que estas propriedades podem ser uma opção para uma ampla variedade de terapias anti-câncer (19).

O estado "imuno-privilegiado" das CTM, ou seja, atividade imunossupressora com fraca imunogenicidade, tem sido relacionado com a baixa expressão de antígenos do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) de classe I de superfície, bem como à falta dos determinantes de CPH de classe II e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40, e CD40L. Assim, experimentos em modelos de estudo da citotoxicidade mediada por células natural killer (NK) *in vitro* demonstraram que as CTM são capazes de escapar à citotoxicidade celular, sugerindo que a ausência de interação entre as células NK e as CTM poderia ocorrer em hospedeiros transplantados com CTM quer autóloga ou alogênica (29).

Além disso, as CTM expressam certo número de moléculas de superfície, incluindo CD90 (Thy-1), CD106 (molécula-1 de adesão celular vascular), a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), ICAM-2 e CD166 molécula de adesão de leucócitos aditivados (ALCAM), que tem conexões com células T e constitutivamente produzem quantidades variáveis de fatores solúveis imunologicamente ativos, incluindo fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), IL-2, IL-8, IL-10, bem como indolamina 2,3-dioxigenase, o óxido nítrico (NO) e prostaglandina E2 (30).

Assim, embora os mecanismos subjacentes às interações entre as CTM e as células imunes sejam pouco conhecidos, admite-se que são mediadas tanto pelas interações diretas célula-célula como pelos fatores solúveis (31).

As células-tronco mesenquimais e as células tumorais compartilham muitas características apesar de suas origens distintas. As vias de sinalização que regulam a auto-renovação e a diferenciação, incluindo a Wnt, Notch entre outras são semelhantes. A sinalização Wnt regula genes que estão envolvidos no metabolismo celular, na proliferação, na regulação do ciclo celular e na apoptose. Os genes da Survivina e do Bcl-2 são alvos da sinalização Wnt (32).

O conhecimento atual sobre os mecanismos moleculares subjacentes que ligam CTM ao microambiente do tumor ou sobre como CTM regulam a expressão gênica de células tumorais ainda é escasso, sendo importante campo de estudo a análise da relação entre as células tumorais e CTM. (33)

As descobertas atuais indicam que a influência das células-tronco adultas no crescimento do tumor é paradoxal. Por um lado, os fatores angiogênicos secretados por células-tronco são conhecidas por serem essenciais para a vascularização do tumor. Por outro lado, fatores derivados de células-tronco podem induzir a diferenciação do tumor ou a morte direta das células tumorais (34).

Estudos recentes identificaram CTM isoladas do estroma de tumores sólidos de ovário, intestino, osteossarcomas e câncer de mama e demonstraram que as CTM associadas ao estroma do tumor podem ser induzidas por células tumorais a secretar fatores de crescimento e quimiocinas que desempenham papéis importantes na progressão tumoral (35).

Considerando o exposto, o aprofundamento do conhecimento acerca da

interação entre as células-tronco mesenquimais de diversas origens e as células tumorais, permitirá compreender melhor o papel das células-tronco mesenquimais nos processos tumorais e avaliar possíveis aplicações terapêuticas das suas propriedades.

1.5 O ciclo celular e a proliferação celular

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da conclusão do ciclo celular (36). O ciclo celular é o processo pelo qual as células eucarióticas se duplicam e se dividem, sendo constituído por duas fases específicas e distintas: a interfase (uma fase entre os eventos de mitose) e mitose. Existem três fases sucessivas, distintas dentro da interfase, chamados G1, S, e fases G2. Durante G1, as células monitoram seu ambiente e após a recepção de sinais necessários, induzem o crescimento pela síntese de RNA e proteínas. Se as condições forem adequadas, as células iniciam a síntese de DNA (fase S) e replicam seu DNA cromossômico. A fase seguinte é a G2 na qual as células continuam a crescer e se preparam para a mitose (37).

A fase G2 permite à célula assegurar o tempo para que a replicação do DNA esteja completa antes de iniciar a mitose. Na mitose existem quatro fases sucessivas denominadas prófase, metáfase, anáfase e telófase que são acompanhadas por divisão citoplasmática (citocinese), dando origem a duas células filhas. Após a conclusão do processo, cada célula filha contém o mesmo material genético que a célula-mãe original.

Além destes estágios específicos, a fase G0 foi descrita para as células que saem do ciclo celular e entram num estado de repouso onde não se dividem. Em resposta a estímulos externos, algumas células quiescentes podem sofrer reativação e expressar genes de resposta inicial (38). A transição G0-G1 é marcada por um crescimento celular com os aumentos mensuráveis no RNA recém-sintetizados e as proteínas.

Os estudos que levaram a descoberta de que o controle interno do ciclo celular envolve os complexos ciclina/CDK começaram a partir da década de 70 e o reconhecimento da contribuição dos pesquisadores Hartwell (39), Evans (40) e Nurse (41) se deu em 2001 com o prêmio Nobel de medicina, dada a importância da descoberta. As CDKs (Cyclin-Dependent Kinases) são uma família de serina/treonina quinases, cuja oscilação da atividade controla a progressão no ciclo. Embora a expressão das CDKs seja constante ao longo do ciclo, sua atividade é controlada principalmente pela ligação dessas proteínas a membros de outra família de proteínas conhecidas como ciclinas.

Os níveis celulares de ciclinas variam ao longo do ciclo, tanto por variação da expressão, como por modulação da degradação (42). Uma vez ligadas às ciclinas, que são as subunidades regulatórias do complexo, as CDKs podem fosforilar diversos alvos intracelulares para levar a progressão no ciclo.

Os principais membros da família das CDKs envolvidos diretamente no controle do ciclo celular são CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6 que são controladas por 4 classes principais, as ciclinas A, B, D e E. As diferentes ciclinas podem combinar-se com diferentes CDKs e os complexos formados vão atuar em momentos específicos do ciclo celular (42).

Classicamente, células quiescentes respondem a sinais mitogênicos

externos com o rápido aumento da expressão dos chamados genes de resposta primária. Dentre estes genes, alguns codificam fatores de transcrição que vão induzir a expressão de ciclinas D; estas se associam às CDKs 4 e 6, que vão fosforilar proteínas da família de pRB. Essa fosforilação libera os fatores de transcrição E2F da repressão imposta por pRB. Os fatores de transcrição da família de E2F vão promover a expressão de diversas proteínas; entre elas, ciclina E. Estas ciclinas E recém sintetizadas vão se associar à CDK2 e a atividade desse complexo promove a completa fosforilação das proteínas pRB e consequente liberação total de E2F, que garante a síntese de outras proteínas necessárias à transição G1-S. Em seguida, também pela ação de E2F, os níveis de ciclina A aumentam. Esta se liga à CDK2 e promove a progressão até o final da fase S onde também se liga e ativa CDK1 para favorecer a entrada na mitose. Após isso os níveis de ciclina A caem e então ciclina B pode se associar à CDK1 e governar a progressão das células pela mitose (43).

As ciclinas D, e em especial ciclina D1 são responsáveis por conectar vias de sinalização ativadas por sinais externos, ao controle do ciclo pela ativação das CDKs 4 e 6. Apesar disso, essa ciclina pode, dependendo do contexto celular, desempenhar funções diferentes do tradicional controle de quiescência/proliferação.

A atividade dos complexos ciclina/CDK também é modulada por uma classe de proteínas conhecidas como CKIs (CDK Inhibitors). Os CKIs são divididos em duas classes de acordo com sua estrutura e com os alvos: a classe dos INK4 inclui p16-INK4a, p15-INK4b, p18-INK4c e p19-INK4d sendo estes inibidores caracterizados por se ligar apenas às CDKs 4 e 6 e não a

outras CDKs ou mesmo às ciclinas D. A ligação desses inibidores às CDKs 4 e 6 inibe a ligação destas às ciclinas D e, conseqüentemente, sua atividade. A outra classe de CKIs, conhecida como Cip/Kip, é composta pelas proteínas p21-Cip1, p27-Kip1 e p57-Kip2. Estas são capazes de interagir tanto com ciclinas quanto com CDKs e inibir a atividade dos complexos, no caso de complexos com CDK2; ou estimular tal atividade, no caso de CDKs dependente de ciclinas D (44).

Além da atuação dos CKIs, a atividade dos complexos ciclina/CDK também é modulada pela presença ou não de fosfatos ativadores ou inibidores no complexo. Essa regulação é especialmente importante no caso do complexo ciclina B/CDK1 que controla a mitose; onde a retirada do fosfato inibidor do complexo é executada por uma fosfatase ativada pelo próprio complexo (41), (45).

As células normais dispõem de mecanismos de checagem em pontos do ciclo para certificar que as condições necessárias para progredir estão preenchidas. No ciclo celular existem 3 principais pontos de checagem. O primeiro, antes da transição G1-S, verifica principalmente se o tamanho celular e o microambiente são favoráveis para que a célula se comprometa com um novo ciclo. O segundo, logo antes da mitose, verifica se a duplicação do DNA ocorreu corretamente e o terceiro, durante a mitose, verifica se o fuso mitótico está devidamente montado para a separação correta dos cromossomos. Qualquer problema em um desses pontos de checagem leva a inibição dos complexos ciclina/CDK atuantes, e a parada no ciclo celular (46).

1.6 A senescência celular

A senescência é um processo de parada irreversível da progressão no ciclo celular. Diferente do estado de quiescência (G0), onde a célula é capaz de responder a estímulos e voltar a proliferar, a senescência é caracterizada por alterações da cromatina e alta expressão de proteínas inibidoras do ciclo, levando a uma interrupção permanente do ciclo. Esse processo foi descrito pela primeira vez por Hayflick; Moorhead (1961) (47) em um estudo com fibroblastos humanos normais que eram capazes de entrar em um estado de repressão de crescimento irreversível após o cultivo in vitro.

A senescência pode ser induzida por encurtamento dos telômeros como na chamada senescência replicativa e pode ser induzida também pelo aumento da atividade de oncogênes em determinadas células (48). Outros estresses, especialmente os genotóxicos, podem levar as células à senescência. A senescência muitas vezes funciona como um mecanismo protetor contra a tumorigênese sendo a busca da ampliação do conhecimento sobre os mecanismos para induzir senescência em células tumorais uma das estratégias para o desenvolvimento de novos tratamentos (49).

As Células tumorais não entram nesse estado de parada do ciclo celular como as células senescentes e proliferaram por tempo indeterminado (47). Desta forma, o processo de senescência celular apresenta efeito antiproliferativo que o coloca como possível supressor do mecanismo tumoral (50).

As células senescentes têm como característica uma parada de ciclo na fase G1 e uma proporção significativamente reduzida da razão núcleo-

citoplasma (tamanho do genoma/massa celular) em relação às células em atividade no ciclo celular. Com relação ao fenótipo celular, o estado quiescente de células senescentes difere da quiescência induzida pela inibição da densidade, pois a primeira está associada com uma redução na proporção núcleo-citoplasma, enquanto a última é associada com um aumento da razão núcleo-citoplasma. Essas características apresentadas pelas células quando estão senescentes podem ser estimuladas por vários fatores, podendo ser sinais intrínsecos e extrínsecos (51).

Algumas proteínas que estão relacionadas com o desenvolvimento normal do ciclo celular também são codificadas por genes regulados em resposta a estresse oncogênico e podem desencadear o processo de senescência celular. Estas proteínas são p15 INK4b, p16 INK4a, p19 ARF, p21 Cip1 e p27 Kip1. (50)

A proteína p16 INK4a pode ser um indutor da senescência celular em fibroblastos humanos primários e o aparecimento do fenótipo de senescência correlaciona-se com a produção tanto de p16 INK4a como de p53. (52)

O acúmulo de p16 INK4a em culturas de células senescentes foi observado (53), porém, evidências recentes sugerem que p16 INK4a sozinho pode não ser suficiente e deve haver outro fator que colabora ou fatores que podem ser necessários para executar o programa de senescência (54), sendo encontrado que p53 e a p21 Cip1 desempenham um papel central no início da senescência, enquanto que a função p16 INK4a pode estar envolvida na manutenção da senescência (55).

Além da atividade da p16, p19, p21, p27 e p53, alguns autores citam que a senescência celular replicativa também exige a atividade da pRb. A pRb e a

p53 são conhecidas como supressores tumorais que regulam as vias celulares que podem sofrer mutações na maioria dos cânceres de mamíferos (56), (57). Apesar de p53 e pRb serem necessárias para o estabelecimento da parada do crescimento, as funções precisas de cada uma não são totalmente compreendidas. A p53 reconhece os telômeros disfuncionais e o DNA danificado, desencadeando a resposta de senescência, acredita-se que, pelo menos em parte, isso se deve ao aumento da expressão da quinase p21-dependente de ciclina (inibidor CdKI). A p21 Cip1 por sua vez impede a fosforilação e inativação da pRb (44).

Apesar da definição atual de senescência, alguns resultados de estudos sugerem que a irreversibilidade da senescência causada por disfunção do telômero é reversível, sendo mantida principalmente pela p53 e revertida por inativação da p53. Em algumas células humanas, no entanto, p16 INK4a fornece uma posição dominante, aparentemente irreversível, que não pode ser completamente superada pela inativação posterior da p53, indicando que deve existir uma distinção de dois tipos de senescência, uma reversível, mediado por p53 e uma irreversível mediada pela ação concomitante do INK4a/Rb e vias com p53 (58). O efeito duplo de p53 no envelhecimento e na tumorigênese parece depender da intensidade da atividade da p53 (59). Quando ocorrem níveis normais ou moderados de danos, como durante o envelhecimento fisiológico, haverá a eliminação de danos por p53. Em contraste, a atividade descontrolada da p53 ou a presença de grandes danos ao DNA, resulta na eliminação excessiva de células por p53 que esgota a capacidade de regeneração dos tecidos, levando ao envelhecimento precoce (52).

As chamadas espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species –

ROS) são outros agentes que podem interferir na atividade das proteínas regulatórias do ciclo celular e senescência (60). Essas espécies são associadas à senescência replicativa telômero-dependente, ao estresse ou à senescência induzida por oncogenes (61). As ROS aceleram o encurtamento dos telômeros e podem danificar o DNA induzindo diretamente danos ao DNA e senescência (62), (63), (64). Inversamente, a ativação de efetores de danos ao DNA e pontos de verificação na senescência pode induzir a produção de ROS (65).

As relações de causa-efeito entre ROS celular e a senescência ainda não são suficientemente claras. Alguns estudos sugerem que ROS e os antioxidantes podem agir nos níveis de p53 e que o alto nível de expressão dessa proteína leva as células a um aumento do nível de ROS intracelular (66). Em algumas células, embora altos níveis de p53 induzam apoptose, níveis de expressão da p53 ligeiramente menores podem desencadear resposta senescente com parada do crescimento. A superexpressão de p53 e p21 Cip1 resultou em um aumento de ROS intracelular e induziu a senescência celular (65).

A senescência celular é considerada uma barreira à tumorigênese e vários estudos sugerem que as interações das ROS com a rede de G1-CdK/CKI têm um papel fundamental no processo (67). O tratamento com H₂O₂ em cultura de células primárias leva as células ao processo de senescência celular. Curiosamente, a concentração elevada de H₂O₂ e outras espécies reativas, parecem ser um gatilho ao processo de apoptose sendo que em concentrações mais baixas, parecem favorecer a senescência (68). Em baixas concentrações de H₂O₂ ocorrem aumento dos níveis de p53 e o

consequente aumento de p21 Cip1, levando à parada do ciclo celular em G1.

O papel das ROS na senescência iniciada por danos ao DNA ou disfunções dos telômeros gera a retroalimentação positiva entre dano ao DNA e a produção de ROS (69). As ROS contribuem para a manutenção de focos de danos ao DNA em longo prazo e isto é necessário e suficiente para manter a supressão da proliferação, em resposta ao dano no DNA durante a criação de um fenótipo de senescência irreversível. Os resultados fornecem evidências experimentais de que a sinalização dependente de ROS é necessária para o estabelecimento da senescência irreversível das células (69).

Com relação ao envelhecimento e o câncer, os genes envolvidos na transformação celular parecem também estar envolvidos na regulação de ROS intracelular (70). Essas observações argumentam contra um modelo em que oxidantes funcionam de uma forma aleatória e sugerem um papel específico para ROS na indução da senescência celular (60).

Um subconjunto de células em senescência precoce foi identificado em melanomas decorrentes de exposições a irradiações UV em ratos transgênicos, evidenciado pela coloração positiva, com a senescência associada a β -galactosidase ácida (β -Gal) (71). A avaliação da senescência pela medida da atividade da β -galactosidase ácida é muito utilizada. A maioria das células expressa uma β -galactosidase lisossomal, que possui atividade ótima em pH em torno de 4, entretanto, em células senescentes a β -Gal apresenta maior atividade em pH em torno de 6, servindo como um marcador de senescência em várias linhagens celulares (72).

2 JUSTIFICATIVA

As CTM provenientes de líquido amniótico (LA), geleia de Wharton (GW) e de tecidos adiposo (TA) podem produzir substâncias com efeitos diversos na interação com células tumorais.

A avaliação da hipótese de que o meio condicionado proveniente de CTM obtidas de diferentes tecidos apresenta efeitos diversos sobre o comportamento das Células Tumorais pode contribuir para ampliar o conhecimento sobre o papel das células mesenquimais na regulação da atividade de células tumorais.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo examinar os efeitos dos meios condicionados provenientes da cultura de células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton do líquido amniótico e do tecido adiposo, analisando a Viabilidade e a Proliferação de células da linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG-2).

4 MÉTODOS

O presente estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM-31 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, previamente aprovado pela Comissão de ética em Pesquisas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq - protocolo de pesquisa nº 10159/12) em anexo.

As CTM derivadas de diferentes origens compartilham muitas características, porém elas diferem em aspectos do perfil de expressão gênica e fisiologia (73).

O potencial terapêutico das CTM em relação ao câncer tem sido demonstrado por vários estudos, porém há evidências de que estas células podem produzir efeitos inibitórios em algumas condições, mas também podem promover a atividade das células tumorais (74).

Para execução do estudo foram selecionadas células mesenquimais obtidas de tecido adiposo, geleia de Wharton e líquido amniótico. A geleia de Wharton e o líquido amniótico foram escolhidos por representarem fontes abundantes de CTM em estágio mais primitivo, provocando menor resposta imunológica e com grande capacidade de expansão (73). As células mesenquimais de tecido adiposo por serem facilmente isoladas por métodos convencionais e apresentarem grande capacidade de auto-renovação, podendo ser cultivada por vários meses com baixos níveis de senescência e mantendo o potencial de diferenciação (75). A linhagem celular de carcinoma hepatocelular HepG-2 foi escolhida devido a sua importância epidemiológica e

a estabilidade em cultura.

Os efeitos dos meios condicionados sobre a proliferação, o ciclo celular, expressão de genes e morte das células HepG-2 foi estudada.

4.1 Linhagens celulares utilizadas no estudo

As células-tronco mesenquimais de tecido de cordão umbilical, líquido amniótico e tecido adiposo foram obtidas de um repositório de células criopreservadas com mais de cinco anos do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As células tumorais humanas utilizadas foram linhagens celulares comerciais adquiridas na American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). As células escolhidas para o estudo foram HepG-2 (carcinoma hepatocelular humano, ATCC: 77400).

4.2 Meios condicionados de Células-tronco Mesenquimais

Para o preparo dos meios condicionados foram selecionadas 3 culturas de CTM de geleia de Wharton, 3 culturas de CTM de líquido amniótico e 3 culturas de CTM de tecido adiposo. Após incubação de 24h em α -MEM com 20% de SFB, foram separadas 3 amostras do meio de cultura de cada tipo de célula mesenquimal cultivada.

Os meios condicionados obtidos foram purificados por filtração utilizando

filtro de seringa Millex 0,22 μ m (Millipore, Billerica, MA) para remoção de restos celulares sendo corrigidos o pH e a osmolaridade antes da utilização.

Os meios condicionados de CTM foram preparados em três concentrações a partir do meio condicionado puro (100%). Os meios condicionados obtidos foram armazenados a temperatura de -80°C até a sua utilização. As diluições no novo meio foram preparadas de acordo com o método utilizado em cada experimento, mantendo percentuais de meio nutritivo para as células em teste.

4.3 Linhagens de células tumorais hepáticas humanas

As linhagens de células tumorais (HepG-2) foram descongeladas e cultivadas no seu meio de cultura D-MEM 10% conforme especificado pela ATCC.

Após incubação por 24 horas, foram separados e os meios condicionados gerados pelas próprias células cultivadas para utilização como meio de controle neste experimento.

4.4 Experimentos

Para avaliação dos efeitos dos meios condicionados de cada fonte de CTM (MC-LA, MC-GW, MC-TA) sobre a linhagem de células HepG-2 foram realizados os seguintes experimentos:

- Avaliação do efeito do MC de CTM de diferentes origens sobre a viabilidade celular *in vitro* de cultura de células tumorais HepG-2 por teste de MTT.
- Avaliação do efeito do MC de CTM de diversas origens sobre o ciclo celular de cultura de células tumorais HepG-2 por iodeto de propídio.
- Avaliação do efeito do MC de CTM de diversas origens sobre a expressão gênica de CCD1, Bcl2 e Bcl6 na cultura de células tumorais HepG-2 por Rt-PCR.
- Avaliação do efeito do MC de CTM de diversas origens sobre a proliferação celular de cultura de células tumorais HepG-2 por expressão das proteínas Survivina, Bcl2, PCNA, Ki-67 e dos corantes Mitotrack e JC-1 Mitoscreen

4.5 Delineamento Experimental

Figura 1 - Delineamento experimental do estudo

4.6 Efeito na viabilidade celular *in vitro* do meio condicionado de Células Mesenquimais de diferentes origens sobre linhagem de Hepatocarcinoma

O teste MTT foi utilizado para analisar o efeito dos Meios condicionados de células mesenquimais de diversas origens (MC-LA, MC-GW, MC-TA) na viabilidade celular de linhagens de células de hepatocarcinoma humano (HepG-2). O experimento testou meios condicionados adicionados ao meio nutritivo nas concentrações de 50,00%, 25,00%, 12,50%, 6,250%, 0,6250%, 0,0625%, 0,00625%, 0,00025%. O controle para comparação foi composto por meio condicionado da própria célula (MC-HepG-2) e meio de cultura sem meio condicionado.

Neste ensaio, a proliferação de células vivas foi mensurada quantitativamente através da atividade da desidrogenase mitocondrial, ou seja, as mitocôndrias viáveis reduzem o 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, ou MTT, gerando MTT com cristais de formazan que são mensuráveis por espectrofotometria.

As linhagens de células em estudo HepG-2 foram cultivadas em meio RPMI-1640 e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C sob uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂.

A densidade de semeadura para linhagens de HepG-2 foi 5000 células/poço semeadas em placas de 96 poços, 18 horas antes da adição de meios condicionados.

O procedimento experimental foi realizado com células tratadas com meios condicionados com doses que variaram de 0,00025% a 50% durante 24

horas. No final do período de incubação, 5 mG/mL de solução de MTT foi adicionado aos poços e 4 h depois os cristais de formazan foram dissolvidos (utilizando DMSO anidro para HepG-2 de células) e medido espectrofotometricamente a 570 nM e a 630 nM.

4.7 Efeito do meio condicionado de CTM de diferentes origens sobre o ciclo celular de linhagem de Hepatocarcinoma

O DNA fragmentado de baixo peso molecular pode ser extraído de células durante o processo de coloração em soluções aquosas. Esta extração se realiza quando as células são tratadas com fixadores precipitantes tais como o etanol ou o metanol. As células apoptóticas apresentam uma diminuição do conteúdo de DNA e após coloração com fluorocromo específico do DNA elas podem ser reconhecidas por citometria de fluxo como células com teor de DNA fracionário.

Neste experimento as células HepG-2 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37 ° C sob uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂. A seguir, as células HepG-2 foram semeadas em placas de 12 poços na densidade de 500.000 células / poço, 18 horas antes da adição de Meios Condicionados.

O procedimento experimental consistiu no tratamento das células com 50% de Meios Condicionados ao longo de 24 horas.

No final do período de incubação, as células foram colhidas e lavadas com PBS antes da adição lenta de etanol frio a 75% e foram mantidas a -20°C

até a coloração com 40 ug / ml de iodeto de propídio e uma solução de 100 ug / ml de RNase. Após a coloração, a análise de citometria foi realizada utilizando um sistema de citometria de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

A percentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada utilizando o software Modfit LT (Verity Software House, Topsham, ME).

O índice de Proliferação (IP) foi calculado pela aplicação da fórmula como $(S+G2/M) * 100 / (G0/G1+S+G2/M)$. (76)

4.8 Regulação da expressão gênica por meio condicionado de CTM de diferentes origens sobre linhagens de células tumorais.

A avaliação do efeito dos meios condicionados de células-tronco mesenquimais sobre a expressão gênica das células tumorais HepG-2 foi realizada pela quantificação relativa da expressão dos genes que codificam as proteínas Ciclina D1, Bcl-2 e Bcl-6. Estas proteínas participam dos processos de apoptose e proliferação celular.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real time PCR) é usada para amplificar e quantificar simultaneamente um DNA alvo ou molécula de RNA. Ela permite tanto a detecção e quantificação como número absoluto de cópias ou quantidade relativa quando normalizado para DNA ou RNA de entrada ou genes normalizadores adicionais de uma ou mais sequencias específicas em uma amostra DNA ou de RNA.

Para este experimento foram utilizados meios condicionados obtidos de

três amostras células-tronco mesenquimais de líquido amniótico (MC-LA) e uma amostra de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MC-TA) previamente isoladas e caracterizadas no laboratório LIM-31. Os meios condicionados destas células foram gerados por incubação de 24h em α -MEM, suplementado com 20% de SFB, posteriormente centrifugado e filtrado em filtros de 0,22 μ M. Em seguida o produto foi aliquotado e armazenado a -20 ° C. Para utilização como controle foram obtidos meios condicionados das células HepG-2 em 20% de α -MEM (MC-HepG-2).

As células HepG-2 foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) a 37°C sob uma atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂, sendo semeadas em placas de 12 poços na densidade de 500.000 células / poço por 18 horas antes da adição de MC.

As células foram tratadas com 50% de MC-LA e MC-TA durante 24 horas e no final do período de incubação, foram colhidas e o RNA total foi extraído, adicionando 1 ml de Trizol (Invitrogen, EUA) para cerca de $1-5 \times 10^6$ células e homogeneizado com uma pipeta e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. Após adição de 200 μ l de clorofórmio foi agitado vigorosamente por 15 segundos, seguido de repouso por 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo previamente esterilizado, adicionado 500 μ l de isopropanol e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e homogeneizado em vórtex, suavemente, por 15 segundos. A seguir foi centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C,

descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi colocado para secar por 15 minutos à temperatura ambiente e dissolvido em 50 µL de água tratada com DEPC (77).

O tratamento com DNase foi realizado utilizando-se 1000ng de RNA diluído em água DEPC em volume final de 16 uL. Ao RNA diluído foi acrescentado 2 uL de tampão de DNase 10X concentrado (Promega Corporation – cod. M610A) e 2 uL de DNase, seguido por incubação a 37oC por 30 min. Para finalizar a reação adicionou-se 2 uL de solução “stop” do kit com incubação a 65oC por 10 min.

O DNA complementar foi sintetizado utilizando-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies). Em todos os ensaios foram utilizadas amostra-referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionada amostra.

Os experimentos de PCR quantitativo foram realizados utilizando-se 100ng de cDNA e o TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), em volume final de 10 µl. A condição de programação dos ciclos foram 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. O termociclador utilizado foi um 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies).

Os sistemas taqman utilizados para avaliação da expressão gênica foram os seguintes: Ciclina D1 (Hs00765553_m1) Bcl6 (HS00153368_m1) Bcl2 (Hs00608023_m1).

4.9 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular através do marcador Ki67

Para avaliação comparativa do efeito dos meios condicionados de células-tronco mesenquimais sobre o ciclo celular de células HepG-2 foi realizado teste utilizando o anticorpo Ki67 – FITC Mouse Anti-Human Ki-67 (clone B56) – BD Pharmingen.

O Ki-67 é uma proteína nuclear, que consiste em dois componentes de 345 kDa e 395 kDa. A proteína Ki-67 está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e M), mas está ausente em células em repouso (G0). Assim, a presença de Ki-67 nas células analisadas permite identificar a fração que se encontra em crescimento em grande número de neoplasias. O alto índice de células positivas para Ki-67 tem forte correlação com o alto grau de atividade da neoplasia, sendo associadas a um menor tempo de sobrevida livre de doença (78).

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionada anticorpo Ki67 – FITC Mouse Anti-Human Ki-67 (clone B56) – BD Pharmingen. Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA).

4.10 Efeito do MC de CTM sobre o número de mitocôndrias de células tumorais por marcação com Mitotracker.

A análise do efeito dos meios condicionados sobre a quantidade de mitocôndrias das células tumorais foi realizada utilizando o Mito Tracker.

O MitoTracker Red CMXRos é um corante vermelho-fluorescente que cora mitocôndrias nas células vivas e sua acumulação é dependente do potencial de membrana. O corante é bem retido após a fixação de aldeído.

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionado Mitotracker – MitoTracker Red – Life technologies. Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA).

4.11 Efeito do MC de CTM sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais por marcação com JC1.

O JC-1 é um fluorocromo lipofílico que pode existir em dois estados diferentes: agregados (em maior concentração) e monômeros (em baixa concentração), cada um com diferentes espectros de emissão. A absorção de monômeros de JC-1 pela mitocôndria é conduzida pelo potencial transmembrana. O potencial das mitocôndrias normais e saudáveis é polarizado e o JC-1 é rapidamente captado pelas mitocôndrias. Esta absorção

aumenta a concentração de JC-1 levando à formação dos agregados de JC-1 no interior da mitocôndria. Os agregados de JC-1 exibem a espectro vermelho que resulta em altos níveis de fluorescência vermelha.

O potencial transmembrana mitocondrial foi avaliado usando-se o Mitoscreen (BD Biosciences) e o fluorocromo JC-1 (5,5',6,6'-Tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina iodado).

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionada a solução de JC-1 (200nM). Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA).

4.12 Efeito do MC de CTM sobre apoptose de células tumorais por marcação com Anti-survivina.

A avaliação do efeito dos meios condicionados sobre a apoptose de células tumorais foi realizada pela quantificação da proteína survivina, utilizando os anticorpos Anti-survivina (clone 71G4B7) Abcam e Hoerchst 33342 – Sigma.

A survivina é uma proteína membro da família de inibidores de apoptose, encontrada em grande quantidade nos tecidos embrionários e inexistente nos tecidos maduros diferenciados, com exceção do timo, células epiteliais da camada basal e células endoteliais (79).

A expressão de survivina no citoplasma de células tumorais está associada a um mau prognóstico em pacientes com câncer gástrico. Em contraste, a expressão survivina no núcleo não tem um impacto significativo na sobrevida global dos pacientes (80).

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionada anticorpo Anti-Survivina (clone 71G4B7) Abcam e Hoerchst 33342 – Sigma. Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA).

4.13 Efeito do MC de CTM sobre a proliferação de células tumorais por quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular - PCNA.

O efeito dos meios condicionados sobre a proliferação celular foi verificada pela quantificação do antígeno nuclear de proliferação celular utilizando o anticorpo PCNA – FITC Mouse Anti-PCNA (clone PC10) – Chemicon.

O Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma molécula de 36 kDa altamente conservada entre as espécies, tendo sido identificada pela primeira vez como o antígeno para uma subpopulação de auto-anticorpos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Desde então, foi verificado que o

PCNA começa a acumular-se durante a fase G1 do ciclo celular, torna-se mais abundante durante a fase S e diminui durante a fase G2 / M. A especificidade temporal da expressão do PCNA torna-o um marcador ideal para a proliferação celular (81).

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionado anticorpo PCNA – FITC Mouse Anti-PCNA (clone PC10) – Chemicon. Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular Devices, USA).

4.14 Efeito do MC de CTM sobre a apoptose de células tumorais por marcação com anticorpos Anti-Bcl2.

O anticorpo Bcl2 - PE Mouse Anti-Human Bcl2 (clone Bcl2/1000 - BD Pharmigen foi utilizado para avaliar a apoptose de células tumorais HepG-2 mediada pela proteína Bcl2 sob efeito de meios condicionados de células-tronco mesenquimais.

As células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA e com o MC-HepG-2 (controle) foram suspensas em meio contendo 10% de SFB e posteriormente foi adicionado o anticorpo Bcl2 - PE Mouse Anti-Human Bcl2 clone Bcl2/1000 - BD Pharmigen. Após lavagem com PBS, foram centrifugadas a 300g e após incubação por 15 min. à temperatura ambiente, no escuro, a fluorescência foi medida por Image X Press Micro High Content (Molecular

Devices, USA).

4.15 Análise estatística

A análise foi realizada para verificar se existe uma diferença significativa entre as médias dos resultados dos experimentos realizados e se os fatores exerceram influência em alguma variável dependente. A verificação de diferenças estatisticamente significativas foi realizada usando análise da variância amostral ANOVA uma via e ANOVA duas vias com comparações múltiplas de Bonferroni utilizando o pacote estatístico (GraphPad Prism™). Os resultados foram expressos como média $\pm$ dp de três diferentes réplicas para ensaios individuais e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de Viabilidade celular

Os resultados dos testes de MTT demonstraram diminuição na porcentagem de células viáveis após incubação com meio condicionado por 24 horas apenas no experimento que utilizou meio condicionado de células-tronco mesenquimais obtidas de tecido adiposo (MC-TA).

Os efeitos sobre a viabilidade de linhagens HepG-2 tratadas com MC-TA nas concentrações acima de 50% de meio condicionado apresentou significância estatística ($P < 0.05$) para MC-TA 1 e MC-TA 2. (Figura 2)

Figura 2 – Efeito dos Meios Condicionados de Células Mesenquimais de Tecido Adiposo sobre a Viabilidade celular linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação. Os asteriscos indicam diferença estatística significativa do tratamento em relação ao controle da própria célula (MC-HepG-2): * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A incubação com meios condicionados de células-tronco mesenquimais de líquido amniótico (MC-LA) e de geleia de Wharton (MC-GW) aumentaram a porcentagem de células viáveis quando incubadas em concentrações de 50%.

O aumento no percentual de viabilidade celular das linhagens HepG-2 tratadas com concentrações de 50% de MC-LA apresentou significância estatística após análise ANOVA com pós-teste de Bonferroni. (Figura 3).

Figura 3 - Viabilidade de linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação com meios condicionados de células mesenquimais de líquido amniótico, segundo a concentração de MC-LA e desvio padrão. Asterisco indica diferença significativa do tratamento em relação ao controle da própria célula (MC-HepG-2): ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Os resultados das análises estatísticas demonstraram ausência de efeitos citotóxicos de MC-GW sobre linhagens HepG-2 e aumento na porcentagem de viabilidade celular quando tratadas com meios condicionados nas concentrações 50%. (Figura 4).

Figura 4 - Viabilidade de linhagens celulares HepG-2 após 24h de incubação com Meios Condicionados de Células Mesenquimais de geleia de Wharton, segundo a concentração de MC-GW e desvio padrão. *** $p < 0,001$.

5.2 Alterações no ciclo celular

As linhagens de células HepG-2 incubadas com os meios condicionados de líquido amniótico (MC-LA) apresentaram diferenças significativas de concentração de células nas fases G0/G1 e G2/M na concentração de 75% (MC-LA 75%), quando comparadas às células que receberam o seu próprio meio nas mesmas concentrações. (Figura 5).

As células HepG-2 que receberam MC-LA a 75% demonstram diminuição de 6,23% nas fases G0/G1 e aumento de 76,54% na fase G2/M em relação ao controle (figura 5).

Figura 5 - Efeito de meios condicionados de células-tronco mesenquimais de líquido amniótico (MC-LA) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do Ciclo Celular. Três amostras de MC-LA obtidas de três cultivos de CTM. Para controle do teste foi utilizado o meio condicionado da própria linhagem de células. **p<0,01

Figura 6 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de líquido amniótico (MC-LA) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular. ** $p < 0,01$.

A linhagem de células HepG-2 incubadas com os meios condicionados de geleia de Wharton (MC-GW) não apresentaram diferenças estatísticas na concentração de células nas diferentes fases dos ciclo celular quando comparadas às células que receberam o seu próprio meio nas mesmas concentrações.

Figura 7 - Efeito de Meios Condicionados de Células-tronco Mesenquimais de geleia de Wharton (MC-GW) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do Ciclo Celular. Três amostras de MC-LA obtidas de três cultivos de CTM. Para controle do teste foi utilizado o meio condicionado da própria linhagem de células

Figura 8 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de geleia de Wharton (MC-GW) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.

Finalmente, as linhagens de células HepG-2 incubadas com os meios condicionados de tecido adiposo (MC-TA) não apresentaram diferenças significativas nas diferentes fases do ciclo celular quando comparadas às células que receberam o seu próprio meio nas mesmas concentrações. (Figuras 4 e 5).

Figura 9 - Efeito de meios condicionados de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (MC-TA) sobre a distribuição das células HepG-2 nas diferentes fase do ciclo celular.

Figura 10 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com meios condicionados provenientes de CTM de Tecido Adiposo (MC-TA) analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.

A análise por citometria de fluxo da distribuição de células HepG-2 nas diversas fases do ciclo celular quando incubadas com o seu próprio meio condicionado (MC-HepG-2) foi comparada com a distribuição das células que não receberam meios condicionados.

O resultado demonstrou que não houve diferença na distribuição das células, conforme a figura 3.

Figura 11 – Gráficos representativos da distribuição percentual das células tumorais HepG-2 tratadas com seus próprio meios condicionados e analisadas por citometria de fluxo segundo a fase do ciclo celular.

5.3 Expressão gênica de linhagens de células tumorais

Neste experimento o efeito sobre a expressão dos genes que codificam as proteínas Bcl-2 Bcl-6 e Ciclina-D1 não apresentou diferenças em relação ao meio utilizado como controle. (Figura 11).

Figura 12 - Expressão gênica de células HepG-2 tratadas com 50% de Meios Condicionados de células mesenquimais de líquido amniótico e de tecido adiposo por 24 horas. Os genes testados foram CCD-1, Bcl-2 e Bcl-6.

5.4 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular

O número total de células HepG-2 foi significativamente maior quando tratadas com MC-LA e MC-GW. Não houve diferença no número de células HepG-2 tratadas com MC-TA quando comparado com as células tratadas com MC-HepG-2.

Figura 13 – Número total de células HepG-2 segundo o tipo de tratamento com meio condicionado. Núcleos corados com Hoechst 33342. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

5.5 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação celular através do marcador Ki67

Figura 14 – Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com Ki67. A coloração Azul: Hoechst 33342; Coloração verde: Ki 67. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.

O percentual de células HepG-2 marcadas com Ki-67 foi significativamente menor quando tratadas com MC-TA em relação ao controle, enquanto as células tratadas com MC-GW e MC-LA não apresentaram diferenças em relação ao controle.

Figura 15 – Percentual de células HepG-2 positivas para Ki-67 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA. *** $p < 0,001$.

A intensidade de fluorescência não apresentou diferença estatística entre os diversos tratamentos com meios condicionados.

Figura 16 – Intensidade de fluorescência de células HepG-2 positivas para Ki-67 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA.

A análise celular multiparamétrica utilizando anticorpo Ki-67 e corante Hoechst 33342 confirmou consistentemente a diminuição de células marcadas com Ki-67 quando tratadas com MC-TA.

5.6 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre o número de mitocôndrias em células tumorais por marcação com MitoTracker .

Figura 17 – Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com mitotracker. A coloração Azul corresponde ao Hoechst 33342 e a coloração vermelha a mitocôndria. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.

O numero relativo de mitocôndrias foi identificado através do Mitotracker e demonstrou que células tratadas com MC-LA apresentam maior quantidade de mitocôndrias, evidenciada pela intensidade de fluorescência das (Figura 18)

Figura 18 – Intensidade de fluorescência de células HepG-2 positivas para mitotracker segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA. $P < 0,01$.

5.7 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais por JC1

Figura 19 - Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas com JC1 - Mitoscreen. A coloração Azul corresponde ao Hoechst 33342, a coloração vermelha a agregados de JC1 e verde a monômeros de JC1. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.

A quantidade de células HepG-2 expressando agregados de JC-1 foi significativamente maior quando tratadas com MC-TA em relação ao controle.

Figura 20 - Células HepG-2 positivas para JC1 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com o meio condicionado da própria célula. *** $p < 0,001$

5.8 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a expressão da proteína survivina por células tumorais HepG-2.

A expressão da proteína survivina por células HepG-2 tratadas com meios condicionados (MC-GW, MC-LA e MC-TA) não apresentou diferença estatística na comparação com células tratadas com meio condicionado da própria célula (MC-HepG-2), evidenciado pela análise do número de células positivas para survivina e pela intensidade de fluorescência expressa pelas células positivas (Figuras 21, 22 e 23).

Figura 21 - Imagens de células HepG-2 tratadas com diferentes meios condicionados e coradas para identificação de survivina. A coloração verde corresponde a survivina. A: MC-GW; B: MC-LA; C: MC-TA; D: controle MC-HepG-2.

Figura 22 – Células HepG-2 positivas para Survivina segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.

Figura 23 – Intensidade de fluorescência de Células HepG-2 positivas para Survivina segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.

5.9 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a proliferação de células tumorais por marcação com o antígeno nuclear de proliferação celular – PCNA

Os testes realizados não evidenciaram aumento das células HepG-2 positivas para PCNA quando tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA em relação ao controle que recebeu MC-HepG-2. A análise comparativa entre as células tratadas com MC-LA e MC-TA, entretanto, demonstrou maior número de células positivas para PCNA quando tratadas com MC-LA (Figura 24).

Figura 24 – Células HepG-2 positivas para PCNA segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula. * $p < 0,05$

5.10 Efeito do MC de CTM de várias origens sobre a expressão de Bcl-2 por células tumorais HepG-2.

A análise comparativa de células HepG-2 tratadas com MC-LA, MC-GW, MC-TA não apresentou diferença significativa na porcentagem de células positivas para Bcl2 em relação ao controle que recebeu meio condicionado da própria célula MC-HepG-2. (Figura 25)

Figura 25 – Percentual de Células HepG-2 positivas para Bcl2 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.

A expressão quantitativa da proteína Bcl2 pelas células tratadas também não apresentou diferença estatística na comparação com o controle, conforme evidenciado pela intensidade de fluorescência. (Figura 26).

Figura 26 – Intensidade de fluorescência de Células HepG-2 positivas para Bcl2 segundo tratamento com MC-LA, MC-GW e MC-TA em comparação com o controle tratado com meio da própria célula.

6 DISCUSSÃO

A escolha de meios condicionados com fatores solúveis produzidos pelas células mesenquimais em cultura para estudo considerou dados da literatura que usaram meios condicionados em linhagens de glioblastomas (82), osteosarcomas (83) e hepatocarcinoma (84).

Inicialmente verificaram-se os efeitos dos meios condicionados sobre a viabilidade da linhagem celular HepG-2 por MTT. A principal observação nesta análise foi que os meios condicionados de células-tronco de tecido adiposo (MC-TA) na concentração de 50% de MC diminuíram significativamente a proliferação de células tumorais HepG-2 pelo MTT, porém a contagem de núcleos por Hoechst 33342 realizada posteriormente não se alterou. Os motivos desta discrepância ainda não são conhecidos.

Os meios condicionados de células-tronco de líquido amniótico (MC-LA) e de geleia de Wharton (MC-GW) por sua vez provocaram aumento da proliferação. Para confirmação deste resultado, realizou-se a contagem de células com núcleos corados com Hoescht 33342 que mostrou aumento significativo no número de células HepG-2 tratadas com os meios condicionados de ambas as células mesenquimais em relação ao controle. O número de células HepG-2 tratadas com MC-TA não apresentou alteração significativa.

O achado de diminuição da proliferação celular observado após a incubação de 24 horas com o MC-TA é compatível com o achado no estudo de Hou et al (2014) (84) que encontrou resultado semelhante, utilizando meio condicionado de linhagem de CTM comercial sobre células cultivadas HepG-2. Assim como o nosso resultado, no experimento citado houve inibição da

proliferação a partir da concentração de 40% do meio condicionado. Este efeito também foi observado por Yang et al (2014) (85) em experimento realizado com MC-TA em linhagem comercial de glioma humano. Neste mesmo experimento foi demonstrado o efeito inibitório do MC de cordão umbilical sobre linhagem de glioma. Um recente trabalho publicado por Akimoto et al (2013) (82) comparou os efeitos do MC de CTM de Sangue de Cordão Umbilical com MC de CTM de TA sobre linhagem de células de glioblastoma multiforme e verificou efeitos diversos entre as linhagens celulares estudadas. O MC-SCU inibiu a proliferação da linhagem de glioblastoma, enquanto o MC-TA promoveu o crescimento do glioblastoma. O autores atribuíram o aumento ao mecanismo de inibição da apoptose e promoção da angiogênese. Gauthaman et al (2012) (83) analisaram especificamente o efeito de MC-GW sobre linhagens comerciais de adenocarcinoma de ovário, adenocarcinoma de mama e osteosarcoma e verificaram a inibição do crescimento de culturas das três linhagens utilizando as técnicas de MTT e BrdU.

O segundo experimento visando analisar as alterações do ciclo celular demonstrou que a exposição de células HepG-2 aos meios MC-LA diminui as células na fase G0/G1 e aumentam na fase G2/M do ciclo celular. As células que receberam MC-GW e MC-TA não apresentaram alteração significativa no ciclo celular. A análise dos achados sugere que o MC-LA promoveu o aumento da proliferação celular por interferência direta no ciclo celular, aumentando a atividade mitótica das células HepG-2.

A partir destes achados demonstrando alterações promovidas pelos MC-LA sobre a proliferação celular e sobre o ciclo celular neste estudo, foi realizada análise de expressão dos genes CCND1, e Bcl-6 e Bcl-2 que estão

relacionados à proliferação e morte celular, somente nas células tratadas por estes meios condicionados. A CCND1 está relacionada ao início da progressão da fase G1 e transição para S no ciclo celular (42). Neste ensaio, CCND1, Bcl6 e Bcl2 não apresentaram alteração.

A análise da expressão da proteína survivina pelas células HepG-2 não apresentou alteração quando tratadas com MC-LA, MC-GW e MC-TA em relação ao controle. A survivina é um inibidor da apoptose de proteínas expresso na fase G2 / M do ciclo celular e está associada com microtúbulos do fuso mitótico no início da mitose, numa reação específica e saturável regulada pela dinâmica dos microtúbulos (86). A ausência de diferença de expressão da survivina sugere que as células não utilizaram a via da survivina para proliferação quando tratadas com MC-LA e MC-GW.

A análise de expressão da proteína PCNA (proteína expressa na fase S do ciclo celular) pelas células HepG-2 também não apresentaram alterações significativas quando comparadas com o controle, porém a comparação direta entre células tratadas com MC-LA e MC-TA indicou diferença na expressão desta proteína quando comparadas com células tratadas com MC-TA que apresentam tendência à parada do ciclo celular.

O percentual de células HepG-2 expressando a proteína Ki-67 foi significativamente menor em relação ao controle quando tratadas com MC-TA, não apresentando diferenças quando tratadas com MC-LA e MC-GW. Como a proteína Ki-67 está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0 do ciclo celular (87), este achado mostra a tendência das células HepG-2 tratadas com MC-TA entrarem em senescência, uma vez que Ki-67 é um marcador quantitativo tanto de proliferação quanto de senescência celular (87).

A quantificação de mitocôndrias avaliadas pelo corante MitoTracker evidenciou aumento no número de mitocôndrias nas células HepG-2 tratadas com MC-LA e não mostrou efeito nos tratamentos com MC-TA e MC-GW. Estes dados parecem ser compatíveis com a necessidade da produção de energia para o aumento da proliferação celular.

A análise da diferença do potencial de membrana por JC-1 apresentou aumento da polarização quando se realizou tratamento com MC-TA. A Hiperpolarização mitocondrial faz parte dos momentos iniciais do processo apoptótico (88), porém os resultados obtidos com a expressão de genes relacionados com à apoptose não permite supor que este processo de morte celular esteja ocorrendo. Assim, a hiperpolarização pode estar indicando a presença de outro fenômeno no qual ela ocorre: a entrada das células em processo de senescência. Mais estudos são necessários para aprofundar o fenômeno observado.

Apesar das extensas investigações publicadas, o impacto das células-tronco mesenquimais na progressão tumoral ainda não está claro. Muitos estudos têm demonstrado que as CTM promovem a progressão de tumores e metástases, enquanto outros estudos relatam que as CTM podem suprimir o crescimento do tumor (74). No presente estudo observou-se que a origem da célula-tronco mesenquimal produz efeitos na resposta de proliferação celular em linhagem celular de HepG-2 e que as vias envolvidas também são diferentes.

A razão para estas diferenças ainda é desconhecida, mas pode ser atribuída a diferenças nos modelos tumorais, a heterogeneidade das CTM, a dose ou outros fatores intrínsecos do indivíduo do qual se obteve a CTM.

7 CONCLUSÃO

As células-tronco mesenquimais de geleia de Wharton e líquido amniótico exercem efeitos diferentes das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo sobre linhagem de células HepG-2. O meio condicionado de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo mantém a proliferação celular após 24 horas de incubação com indução da parada do ciclo celular em fase G0 e leva ao aumento do potencial de membrana mitocondrial. As células-tronco mesenquimais de geleia de Wharton e líquido amniótico propiciam aumento da proliferação das células HepG-2, sendo que somente o meio condicionado de líquido amniótico leva ao aumento de células em fase G2 e M do ciclo celular e aumento do número de mitocôndrias.

Os resultados confirmam que as células-tronco mesenquimais diferem de acordo com a sua origem tecidual em sua ação na proliferação das células HepG-2. A causa destas ações não parecem ser devido a mediadores mais comuns na proliferação e morte celular.

8 ANEXO

8.1 Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP-HCFMUSP - CAPPesq

<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP</p>
--	--

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO EFEITO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS HUMANAS DE VÁRIAS ORIGENS NA ATIVIDADE DE DIVERSAS LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Pesquisador: Sergio Paulo Bydlowski

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 11152313.5.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 222.951

Data da Relatoria: 06/02/2013

Apresentação do Projeto:

As células-tronco mesenquimais provenientes de tecidos perinatais e de tecidos adultos podem produzir substâncias com efeitos diferentes sobre células tumorais. As CTM de tecidos adultos podem ter perdido a capacidade de produzir algumas substâncias que afetariam as células tumorais de forma diferente. As Células tumorais de órgãos sólidos podem apresentar comportamento diferente das células tumorais de origem hematológica em meio de cultura, quando expostas a substâncias provenientes do meio condicionado de CTM. Assim sendo, justifica-se a avaliação da hipótese de que o meio condicionado proveniente de CTM obtidas de tecidos perinatais apresenta efeitos diferentes sobre o comportamento das Células Tumorais quando comparadas com meio condicionado de CTM obtidas de tecidos adultos.

Objetivo da Pesquisa:

Examinar a capacidade das Células-tronco Mesenquimais derivadas de tecidos perinatais e adultos de interferir na atividade in vitro e in vivo de células tumorais de origem hematológica e de tumores sólidos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos.

Endereço:	Rua Ovídio Freire de Campos, 225 5º andar	
Bairro:	Quinta Casa	CEP: 05.403-010
UF:	SP	Município: SAO PAULO
Telefone:	(11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hcfm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O assunto é interessante e inédito.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos podem ser considerados completos.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Projeto pode ser aprovado pela CAPPEsq

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 19 de Março de 2013

Assinado por:

Luiz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Presa de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: maria.carvalho@hcfm.usp.br

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1044: p. 132-138.
2. Slack W JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science.* 2008; 322(5907): p. 1498-1501.
3. Díaz-Flores L, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, et al. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol.* 2006; 21(9): p. 995-1027.
4. Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med.* 2009; 4(3): p. 423-433.
5. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126(4): p. 663-676.
6. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4(5): p. 267-274.
7. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9(5): p. 641-650.
8. Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): p. 315-317.
9. Feng B, Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm.* 2009; 24(6): p. 717-721.
10. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006; 24(4): p. 150-154.
11. Cao C, Dong Y, Dong Y. [Study on culture and in vitro osteogenesis of blood-derived human mesenchymal stem cells]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2005; 19(8): p. 642-647.
12. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009; 88(9): p. 792-806.
13. Ciavarella S, Dammacco F, Matteo MD, Loverro G, Silvestris F. Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts. *Stem Cells Dev.* 2009; 18(8): p. 1211-1220.
14. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem*

- Cells. 2008; 26(2): p. 300-311.
15. Coppi PD, Bartsch G, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 2007; 25(1): p. 100-106.
 16. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells.* 2004; 22(7): p. 1330-1337.
 17. O'Donoghue K, Chan J. Human fetal mesenchymal stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 1(3): p. 371-386.
 18. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25(11): p. 2739-2749.
 19. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011; 9: p. 12.
 20. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 2007; 25(2): p. 319-331.
 21. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012; 21(14): p. 2724-2752.
 22. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2): p. 69-90.
 23. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012; 379(9822): p. 1245-1255.
 24. Horwitz EM, Dominici M. How do mesenchymal stromal cells exert their therapeutic benefit? *Cytotherapy.* 2008; 10(8): p. 771-774.
 25. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(9): p. 726-736.
 26. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonné A, Delorme B, Hérault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells.* 2007; 25(7): p. 1737-1745.
 27. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med.* 2006; 203(5): p. 1235-1247.
 28. Ramasamy R, Lam EWF, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal

- stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2007; 21(2): p. 304-310.
29. Suck G, Branch DR, Smyth MJ, Miller RG, Vergidis J, Fahim S, et al. KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity. *Exp Hematol*. 2005; 33(10): p. 1160-1171.
 30. 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): p. 143-147.
 31. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006; 36(10): p. 2566-2573.
 32. Abd-Allah SH, Shalaby SM, El-Shal AS, Elkader EA, Hussein S, Emam E, et al. Effect of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells on hepatoma. *Cytotherapy*. 2014; 16(9): p. 1197-1206.
 33. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res*. 2008; 18(4): p. 500-507.
 34. Marleau AM, McDonald G, Koropatnick J, Chen CS, Koos D. Reduction of tumorigenicity by placental extracts. *Anticancer Res*. 2012; 32(4): p. 1153-1161.
 35. Yan XL, Jia YL, Chen L, Zeng Q, Zhou JN, Fu CJ, et al. Hepatocellular carcinoma-associated mesenchymal stem cells promote hepatocarcinoma progression: role of the S100A4-miR155-SOCS1-MMP9 axis. *Hepatology*. 2013; 57(6): p. 2274-2286.
 36. Hall PA, Levison DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*. 1990; 43(3): p. 184-192.
 37. Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(7): p. 2776-2778.
 38. Kapinas K, Grandy R, Ghule P, Medina R, Becker K, Pardee A, et al. The abbreviated pluripotent cell cycle. *J Cell Physiol*. 2013; 228(1): p. 9-20.
 39. Hartwell LH, Culotti J, Reid B. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1970; 66(2): p. 352-359.
 40. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983; 33(2): p. 389-396.
 41. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 1990; 344(6266): p. 503-508.
 42. Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997; 13: p. 261-291.

43. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(6): p. 459-465.
44. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12): p. 1501-1512.
45. Lindqvist A, Källström H, Lundgren A, Barsoum E, Rosenthal CK. Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol*. 2005; 171(1): p. 35-45.
46. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989; 246(4930): p. 629-634.
47. HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25: p. 585-621.
48. Campisi J. Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol*. 2003; 38(1-2): p. 5-11.
49. Nardella C, Clohessy JG, Alimonti A, Pandolfi PP. Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11(7): p. 503-511.
50. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell*. 2007; 130(2): p. 223-233.
51. Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulić V. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(3): p. 2109-2117.
52. Lin AW, Barradas M, Stone JC, Aelst Lv, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev*. 1998; 12(19): p. 3008-3019.
53. Dimri GP. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell*. 2005; 7(6): p. 505-512.
54. Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med*. 2006; 355(10): p. 1037-1046.
55. Poole RH, Okorokov AL, Jardine L, Cummings J, Joel SP. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2002; 62(6): p. 1876-1883.
56. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 1997; 88(5): p. 593-602.
57. Dimri GP, Itahana K, Acosta M, Campisi J. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol*. 2000; 20(1): p. 273-285.

58. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, Narita M, Lowe SW, Yaswen P, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 2003; 22(16): p. 4212-4222.
59. Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, et al. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* 2004; 18(3): p. 306-319.
60. Colavitti R, Finkel T. Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life.* 2005; 57(4-5): p. 277-281.
61. Ramsey MR, Sharpless NE. ROS as a tumour suppressor? *Nat Cell Biol.* 2006; 8(11): p. 1213-1215.
62. Zglinicki Tv. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27(7): p. 339-344.
63. Chen JH, Hales CN, Ozanne SE. DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(22): p. 7417-7428.
64. Rai P, Onder TT, Young JJ, McFaline JL, Pang B, Dedon PC, et al. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(1): p. 169-174.
65. Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(23): p. 8576-8585.
66. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(21): p. 11848-11852.
67. Burhans WC, Heintz NH. The cell cycle is a redox cycle: linking phase-specific targets to cell fate. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(9): p. 1282-1293.
68. Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J.* 1998; 332 (Pt 1): p. 43-50.
69. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol.* 2010; 6: p. 347.
70. Vafa O, Wade M, Kern S, Beeche M, Pandita TK, Hampton GM, et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell.* 2002; 9(5): p. 1031-1044.

71. Ha L, Ichikawa T, Anver M, Dickins R, Lowe S, Sharpless NE, et al. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(26): p. 10968-10973.
72. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(20): p. 9363-9367.
73. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006; 24(5): p. 1294-1301.
74. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*. 2011; 29(1): p. 11-19.
75. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7(2): p. 211-228.
76. Song H, Wang Z, Zhao Y, Chen X, Zhang Y, Li B. [Interventional effect of platelet lysate on osteogenic differentiation of BMSCs in rats]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2008; 22(6): p. 737-741.
77. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1): p. 156-159.
78. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol*. 2006; 206(3): p. 624-635.
79. Antonio CH, Cheng L, Chang KY, Chen HH, Chang JY. Investigations of survivin: the past, present and future. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011; 16: p. 952-961.
80. Liu JL, Gao W, Kang QM, Zhang XJ, Yang SG. Prognostic value of survivin in patients with gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2013; 8(8): p. e71930.
81. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res*. 1986; 166(1): p. 209-219.
82. Akimoto K, Kimura K, Nagano M, Takano S, Salazar GT, Yamashita T, et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells inhibit, but adipose tissue-derived mesenchymal stem cells promote, glioblastoma multiforme proliferation. *Stem Cells Dev*. 2013; 22(9): p. 1370-1386.
83. Gauthaman K, Yee FC, Cheyyatraivendran S, Biswas A, Choolani M, Bongso A. Human umbilical cord Wharton's jelly stem cell (hWJSC) extracts inhibit cancer cell

- growth in vitro. *J Cell Biochem.* 2012; 113(6): p. 2027-2039.
84. Hou L, Wang X, Zhou Y, Ma H, Wang Z, He J, et al. Inhibitory effect and mechanism of mesenchymal stem cells on liver cancer cells. *Tumour Biol.* 2014; 35(2): p. 1239-1250.
 85. Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, et al. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: p. 109389.
 86. Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(1): p. 46-54.
 87. Lawless C, Wang C, Jurk D, Merz A, Zglinicki Tv, Passos JF. Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp Gerontol.* 2010; 45(10): p. 772-778.
 88. Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev.* 2009; 5(3): p. 231-246.
 89. Hui LL, Yue W, Zhu F, Li S, Li W. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2011; 226(7): p. 1860-1867.