CAROLINA MARTINEZ ROMÃO

**Expressão da P-gp, MRP1 e LRP em
células-tronco mesenquimais humanas derivadas
do líquido amniótico e medula óssea**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

São Paulo

2012

CAROLINA MARTINEZ ROMÃO

**Expressão da P-gp, MRP1 e LRP em
células-tronco mesenquimais humanas derivadas
do líquido amniótico e medula óssea**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Romão, Carolina Martinez

Expressão da P-gp, MRP1 e LRP em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea / Carolina Martinez Romão. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sergio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimais 2.Líquido amniótico 3.Medula óssea 4.Resistência a medicamentos 5.Glicoproteínas p

USP/FM/DBD-098/12

DEDICATÓRIA

Aos meus pais...

minha dádiva, minha fortaleza

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a vida e ter me ajudado até aqui.

Aos meus anjos Angela e Vanildo, meus pais, meus exemplos de caráter, meus heróis, por todo sustento, presença constante, amor e compreensão.

Ao Dr. Sergio, pela oportunidade em seu laboratório, e por tentar me trazer à realidade quando as idéias me levaram longe dela.

Aos queridos Felipe e Jorge, meus professores que se tornaram grandes amigos, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e carinho.

Às queridas Rita e Adriana pelos ensinamentos, amizade, trocas de experiências e exemplos de atitudes e força.

À Cleidinha pelo carinho maternal, ao cuidar de mim e de todos do LIM-31.

À Naná, pela grande amizade, e pelos momentos revigorantes de sua companhia.

À Débora, pela ajuda e ensinamentos preciosos, e à Luciana pelo acolhimento e sensibilidade oferecidos.

Às flores Karen, Karol, Vivi e Ivana pela infinita amizade e cumplicidade em todos os momentos, levarei vocês em meu coração por toda minha vida.

Ao André pelo apoio, amizade e consideração, e à Nany, por arrasar sempre.

À Denise, pelos ensinamentos e partilhar suas experiências. Ao Seu Joel, pela ajuda e simpatia.

À Natalia pela amizade e ajuda, que só você soube me dar.

À Rô, Magna, Carol, Tal e Bruna, pela amizade e agradável companhia.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Borges Lopes e toda equipe do Departamento de Obstetrícia, bem como, ao Prof. Dr. Alexandre Fogaça Cristante e aos

integrantes do Departamento de Ortopedia e Traumatologia, ambos do HC-FMUSP, pelo auxílio na coleta das amostras.

À Cléo, que com paciência, dedicação e simplicidade me ajudou muito. Assim como a todos os integrantes do LIM-29.

À Dra. Juliana Pereira por abrir as portas de seu laboratório, e à Carla, Graciela e Liz pela simpatia com que sempre disponibilizaram seus auxílios.

A Dra. Maria Mirtes pela oportunidade e à Patrícia, Lúcia e Cidinha que me ensinaram com paciência e carinho, e à todos do setor de citometria de fluxo do Laboratório Central do HC.

Aos queridos e inesquecíveis amigos e companheiros do LIM-16: Daniela, Dr. Joel, Ivone, Luzia que desde a iniciação científica me ensinam o valor e o amor pela pesquisa científica.

Aos companheiros de laboratório: Dr. Sérgio Duarte, Linah, Livia, Dr Augusto, Dra. Estela, Paulinha, Joel, Ana e Bruno, cuja convivência contribuiu para meu crescimento pessoal. À equipe de manutenção do Hemocentro do HCFMUSP: Jeferson, Almir e René, pela camaradagem e pronta ajuda sempre que preciso.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À minha gatinha de estimação, por bagunçar meus artigos, rasgar minhas anotações, pisar no teclado do computador e pelo carinho durante as horas ininterruptas de redação deste trabalho.

Em especial, aos pacientes, cuja notável contribuição viabilizou a execução deste trabalho.

E a todos que integraram minha vida até aqui. Meu muito obrigado!

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“[...] cumpre, entretanto, indagar quem sabe melhor e não quem sabe mais [...] o saber é uma boa droga, mas não há droga suficientemente forte para resistir às falhas do recipiente [...]”

Michel de Montaigne

“Com o avanço do conhecimento, alarga-se o desconhecido [...] Qualquer que seja o objeto do conhecimento. Por mais que se conheça, sempre será possível conhecer mais [...] Nem sempre o que era desconhecido, mas veio a tornar-se conhecido, restringe-se à descoberta de coisas que são meramente complementares ao estoque de saber preexistente [...] O novo conhecimento gerado pode alterar radicalmente o nosso entendimento acerca da natureza do saber preexistente e do seu valor de verdade [...] Certeza absoluta, portanto, não há [...]”

Eduardo Giannetti

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

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras e tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 REVISÃO DA LITERATURA	
3.1. Biologia das células-tronco	12
3.2. Células-tronco embrionárias	14
3.3. Células-tronco adultas	16
3.4. Células-tronco fetais	18
3.5. Células-tronco mesenquimais: Medula óssea vs. Líquido amniótico	20
3.6. Resistência a drogas	26
3.6.1. P-glicoproteína	30
3.6.2. MRP1 (<i>Multidrug resistance-related Protein 1</i>)	33
3.6.3. LRP (<i>Lung resistance-related protein</i>)	35
3.7. Células-tronco mesenquimais e resistência às drogas	39
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Casuística	44
4.2. Pré-cultivo	
4.2.1. Líquido amniótico	
4.2.1.1. <i>Coleta</i>	45
4.2.1.2. <i>Processamento</i>	46
4.2.2. Medula óssea	
4.2.2.1. <i>Coleta</i>	47
4.2.2.2. <i>Processamento</i>	48
4.3. Cultivo	49

4.4. Caracterização das células-tronco mesenquimais	
4.4.1. Expressão dos genes de indiferenciação	51
4.4.2. Imunofenotipagem	52
4.4.3. Ensaio de Diferenciações	53
4.4.3.1. <i>Diferenciação Osteogênica</i>	54
4.4.3.2. <i>Diferenciação Adipogênica</i>	54
4.4.3.3. <i>Diferenciação condrogênica</i>	55
4.5. Condições das reações de RT-PCR	55
4.6. Caracterização da P-glicoproteína	
4.6.1. Caracterização do controle positivo de resistência	57
4.6.2. Imunocitoquímica da P-gp	58
4.6.3. Ensaio de viabilidade celular	59
4.6.4. Exclusão de Rhodamina 123	61
4.7. Expressão dos genes de resistência às drogas	62
4.7.1. Gene normalizador	63
4.7.2. Curva padrão de eficiência	64
4.7.3. Condições das reações de RT-PCR em tempo real	66
4.7.4. Análise dos resultados	66
4.8. Preparo das amostras para biologia molecular	
4.8.1. Extração de RNA pelo método Trizol	67
4.8.2. Síntese do DNA complementar	68
4.9. Análise estatística	69
5 RESULTADOS	
5.1. Cultivo	72
5.2. Caracterização em células-tronco mesenquimais	
5.2.1. Expressão dos genes de indiferenciação	74
5.2.2. Imunofenotipagem	75

5.2.3. Ensaio de Diferenciações	76
5.3. Caracterização da P-glicoproteína	
5.3.1. Caracterização do controle positivo de resistência	80
5.3.2. Imunocitoquímica da P-gp	81
5.3.3. Ensaio de viabilidade celular	82
5.3.4. Exclusão de Rhodamina 123	85
5.3.5. Curva padrão de eficiência	87
5.3.6. Padronização do gene normalizador	87
5.3.7. Expressão dos genes de resistência às drogas	89
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES	108
8 ANEXOS	111
9 REFERÊNCIAS	134

LISTA DE SÍMBOLOS

KDa	quilodaltons
R²	coeficiente de correlação
v:v	volume : volume
X g	vezes gravidade
ABCB1	<i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 1</i>
ABCC1	<i>ATP-binding cassette, sub-family C, member 1</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 2</i>
ADP	<i>Adenosine Diphosphate</i>
AEC	3-Amino 9-3 Ethyl Carbazole
AF	<i>Amniotic Fluid</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
ATV	<i>Associate Tripsine Versene</i>
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BM	<i>Bone Marrow</i>
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CT	Células-tronco
C_t	threshold cycle
CTA	Células-tronco Adultas
CTE	Células-tronco Embrionárias
CTH	Células-tronco Hematopoiéticas
CTM	Células-tronco Mesenquimais

DC	<i>Dendritic Cell</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	desoxirribonucleotídeo
DOX	Doxorrubicina
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FAP	Fator de Agregação Plaquetária
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GSH	Glutathiona reduzida
GUSB	Glucuronidase beta
H&E	hematoxilina-eosina
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IC50	<i>Inhibitory Concentration</i>
IgG	Imunoglobulina G
iPS	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>
LA	Líquido Amniótico
LRP	<i>Lung Resistance Protein</i>
LTC4	Leucotrieno C4
M1	<i>markers</i>
MDR1	<i>Multidrug Resistance protein 1</i>

MES-S	MES-SA (linhagem comercial de sarcoma uterino sensível à doxorubicina)
MES-DX	MES-SA/DX5 (linhagem comercial de sarcoma uterino resistente à doxorubicina)
MO	Medula Óssea
MRP1	<i>Multidrug Resistance-related Protein 1</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MVP	<i>Major Vault Protein</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OCT-4	<i>Octamer-binding Transcription Factor 4</i>
pb	Pares de Base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
P-gp	P-glicoproteína
pH	potencial Hdrogeniônico
PPAr-γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
RFPL1	Ret Finger Protein-like 1
Rh 123	Rhodamina 123
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SH2	<i>Src Homology 2</i>
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular

TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TGF-β1	<i>Transforming growth factor beta</i>
THY-1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UK	<i>United Kingdom</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
vRNA	Vault RNA
α-MEM	<i>Alfa Modification</i> Minimum Essential Medium Eagle

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Esquema ilustrativo da evolução das células-tronco nos diferentes estágios do desenvolvimento e as respectivas classificações quanto ao potencial de diferenciação: células-tronco embrionária – pluripotentes; células-tronco fetais – pluripotentes ou multipotentes; células-tronco adultas – multipotentes; células progenitoras – unipotentes. Modificado: Pappa & Anagnou, 2009	13
Figura 02 - Esquema ilustrativo da evolução dos processos de predestinação das células-tronco mesenquimais, onde pode ocorrer a replicação, migração, diferenciação ou apoptose	23
Figura 03 - Esquema ilustrativo da possível dinâmica de expressão das proteínas transportadoras relacionadas à resistência; <i>Modificado: Sarkadi et al., 2006</i>	29
Figura 04 - Ilustração da possível dinâmica dos substratos de uma bomba ABC. A internalização, seguida da exclusão, que é bloqueada por substâncias capazes de inutilizar os transportadores; <i>Modificado: Colabufo et al., 2008</i>	30
Figura 05 - Esquema ilustrativo da estrutura secundária da P-glicoproteína, demonstrando a disposição dos domínios transmembrana no ambiente extracelular (Extra) e intracelular (Intra), os domínios ligados ao nucleotídeo ATP. <i>Modificado: Leslie et al., 2005</i>	31
Figura 06 - Esquema ilustrativo da estrutura secundária da MRP1 (<i>Multidrug resistance-related Protein 1</i>), demonstrando a disposição dos domínios transmembrana no ambiente extracelular (Extra) e intracelular (Intra), o grupamento amina terminal extracelular e os domínios ligados ao nucleotídeo ATP. <i>Modificado: Leslie et al., 2005</i>	34
Figura 07 - Imagens obtidas por microscopia crioeletrônica; A) <i>vaults</i> sob camada de gelo vítreo (Kong et al., 2000); B) reconstrução 3D da imagem aproximada (Kong et al., 1999)	36
Figura 08 - Esquema ilustrativo da possível dinâmica da LRP/MVP associada a P-gp e MRP1, na presença de xenobióticos no ambiente intracelular. <i>Modificado: Scheffer et al., 2000</i>	38
Figura 09 - Ilustração da técnica de amniocentese. Modificado: Mayo Foundation for Medical Education and Research	46

Figura 10 - Ilustração da coleta de amostra de medula óssea por punção da crista ilíaca. <i>Fonte: Modificado: ADAM</i>	48
Figura 11 - Ilustração do processamento de amostra líquida de medula óssea após centrifugação com reagente Ficoll-Paque™. Na visualização do produto é possível observar as frações da solução separadas por gradiente de densidade como plasma, células mononucleadas, o reagente Ficoll-Paque™ e os eritrócitos	49
Figura 12 - Ilustração que exemplifica a análise da exclusão de Rhodamina 123 (Rh123) a partir de dados obtidos por citometria de fluxo A) Histograma de amostra submetida à 0h de exclusão onde foi feito o <i>marker</i> (M1) base; B) a mesma amostra submetida a período de exclusão, onde o segmento preenchido do histograma demonstra células que promoveram efluxo do corante. <i>Modificado: Patel, 2002</i>	62
Figura 13 - Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) das colônias formadas em culturas primárias de líquido amniótico e medula óssea, ambas após 7 dias de cultivo	73
Figura 14 - Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) de células isoladas de líquido amniótico e medula óssea após 6 passagens	73
Figura 15 - Diagramas de Venn ilustrando os resultados qualitativos da expressão dos genes de indiferenciação Oct-4 e Nanog, e do gene endógeno β -actina, obtidos através do RT-PCR de 20 amostras de líquido amniótico e 5 de medula óssea até a terceira passagem	74
Figura 16 - Análise da expressão realizada por RT-PCR dos genes β -actina; Oct-4 e Nanog de 20 amostras de líquido amniótico e 6 de medula óssea até a terceira passagem, H ₂ O (controle) e marcador de peso molecular (100pb) dispostos em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz UV, seguido de diagrama de Venn ilustrando os resultados qualitativos da expressão.....	113
Figura 17 - Histogramas obtidos por citometria de fluxo das células isoladas de líquido amniótico e medula óssea marcadas com os anticorpos monoclonais: CD45 FITC, CD31 FITC, CD34 FITC e CD14 PE (hematopoiéticos); CD90 FITC, CD105 PE, CD29 PE e CD44 PE (mesenquimais); e controles isotípicos IgG FITC e IgG PE.....	114
Figura 18 - Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x): A) células de LA não tratadas e B) tratadas com meio	

para diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O; C) células isoladas da MO não tratadas e D) tratadas com meio para diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O	76
Figura 19 - Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) de A) células isoladas de LA não tratadas e B) tratadas com meio para diferenciação condrogênica e coradas com Azul de Toluidina; C) células isoladas da MO não tratadas e D) tratadas com meio para diferenciação condrogênica e coradas com Azul de Toluidina	77
Figura 20 - Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x): células sem tratamento de A) LA e B) MO; células que receberam tratamento para diferenciação osteogênica: C) LA e D) MO coradas por Vermelho de Alizarina e E) LA e F) MO coradas com von Kossa	78
Figura 21 - Análise da expressão gênica realizada por RT-PCR β -actina controle e dos genes de tecido adiposo PPAR-gama, lipoproteína lipase; tecido cartilaginoso perlecan, syndecan ósseo osteopontina, osteocalcina, de nas amostras de líquido amniótico e medula óssea tratadas para as diferenciação respectiva para cada par de genes; os resultados foram dispostos em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador UV. Utilizou-se a H ₂ O como controle da reação e marcador de peso molecular de 100pb.....	115
Figura 22 - Linhagem de sarcoma uterino MES-DX; Imunocitoquímica A) pré e B) pós tratamento com doxorubicina (1000 nM) durante 24h; C) PCR dos genes GUSB (controle endógeno) ABCB1, ABCC1 e LRP das amostras pós tratamento, dispostas em gel de agarose 2%, leitura em transluminador UV	80
Figura 23 - Visualização por microscopia óptica das colorações por imunocitoquímica para P-gp reveladas com corante AEC nas células: MES-DX: A) controle (100x), imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de B) 100x e C) 200x; células de líquido amniótico D) controle (100x), imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de E) 100X e F) 200x; células de medula óssea G) controle (100x), e imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de H) 100x e I) 200x; todas as células tiveram os núcleos contracorados com H&E	81
Figura 24 - Quantificação da área marcada (%) na imunocitoquímica para P-gp em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA), (n=3) medula óssea (MO) indiferenciadas e (n=3) MES-	82

DX, teste aplicado One-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni, *p=0,0007	
Figura 25 - Curva de viabilidade celular (%) das células de: linhagens comerciais controles de resistência a drogas MES-S (n=2) (negativo) e MES-DX (n=4) (positivo); líquido amniótico (LA) (n=4) e medula óssea (MO) (n=4); submetidas a diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de doxorrubicina por 72 horas, teste aplicado One-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni	83
Figura 26 - Concentração de doxorrubicina (nM) necessária para inviabilizar 50% da população celular de: linhagens comerciais controles de resistência à drogas MES-S (n=2) (negativo) e MES-DX (n=4) (positivo); líquido amniótico (LA) (n=4) e medula óssea (MO) (n=4); submetidas a diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de doxorrubicina por 72 horas, teste aplicado One-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni, *p<0,0002	84
Figura 27 - Efluxo de Rhodamina 123 (Rh 123) demonstrado em médias±DP das porcentagens (%) de fluorescência obtidas por citometria de fluxo de 3 amostras de cada linhagem A) MES-DX (resistentes), B) líquido amniótico (LA) e C) medula óssea (MO), internalizadas com Rh 123 a 2mM, posteriormente submetidas aos períodos de exclusão 0, 1, 2 e 4 horas, com (linha pontilhada cinza) ou sem (linha completa preta) verapamil, teste aplicado Two-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni	86
Figura 28 - Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene GUSB; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R2 e curva de dissociação.....	116
Figura 29 - Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene ABCB1; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R2 e curva de dissociação.....	117
Figura 30 - Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene ABCC1; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência	118

(Eff%), Slope, R2 e curva de dissociação.....	
Figura 31 - Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene LRP; Média $\pm$ DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R2 e curva de dissociação.....	119
Figura 32 - Médias e desvios padrões dos <i>threshold cycles</i> (C_t) das amplificações em triplicatas do gene GAPDH em diferentes amostras de líquido amniótico humano; teste aplicado One-Way ANOVA; pós-teste Bonferroni, * $p < 0,0002$	88
Figura 33 - Distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP em amostras de A) (LA) líquido amniótico (n=9); B) (MO) medula óssea (n=6) indiferenciadas. Teste ANOVA Friedman, pós-teste Dunns, A) * $p = 0,0029$	90
Figura 34 - Comparação da distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP entre as amostras de (LA) líquido amniótico (n=9) e (MO) medula óssea (n=6) indiferenciadas. Teste t Mann Whitney, * $p = 0,0008$	90
Figura 35 - Comparação da distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP entre amostras de (LA) líquido amniótico e (MO) medula óssea, antes e depois da A) diferenciação adipogênica (LA=3 e MO=4); B) diferenciação osteogênica (LA=4 e MO=4). Teste t Wilcoxon.....	91
Figura 36 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=9) líquido amniótico (LA) e (n=6) medula óssea (MO) indiferenciadas.....	120
Figura 37 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA) e (n=4) medula óssea (MO) submetidas à diferenciação adipogênica.....	121
Figura 38 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA) e (n=4) medula óssea (MO) submetidas à diferenciação osteogênica.....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Sequências de iniciadores (primers) (senso e antissenso) utilizados nas reações de PCR e PCR em tempo real.....	112
Tabela 02 - Valores de referência para a qualificação das populações avaliadas por citometria de fluxo. Populações com positividade até 5% = negativas; 5 – 50% = fraco positiva; acima de 50% positiva	53
Tabela 03 - Valores de referência dos fatores avaliados no desempenho das reações de PCR em tempo real	65
Tabela 04 - Resultados qualitativos da imunofenotipagem por citometria de fluxo, das células de LA e MO, com marcadores positivos e negativos para CTM; valores de referência: negativo < 5%, fraco positivo < 50%, positivo > 50%	75
Tabela 05 - Expressão de genes típicos de tecidos funcionais, pela técnica de RT-PCR, para os quais as amostras de líquido amniótico (LA) e medula óssea (MO) foram estimuladas a diferenciar. Foram analisados, como controle endógeno o gene da β -Actina, e para cada diferenciação (número e tipo de amostras tratadas) os respectivos pares de genes: Adipogênica (LA n=3 e MO n=5): PPAR- γ e Lipoproteína lípase (Lip Lip); Condrogênica (LA n=2 e MO n=2): Perlecan e Syndecan; Osteogênica (LA n=6 e MO n=5) Osteopontina e Osteocalcina	79
Tabela 06 - Dados estatísticos gerados pelo software BestKeep através da análise das médias dos Ct, obtidos por RT-PCR em tempo real, dos genes GUSB, GAPDH, RFPL1 e LMO2, em amostras de líquido amniótico (n=6)	88

RESUMO

Romão, CM. *Expressão da P-gp, MRP1 e LRP em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: O fenótipo de resistência a drogas é caracterizado pela superexpressão das proteínas da família ABC (*ATP-Binding Cassette*). A P-glicoproteína (P-gp), codificada pelo gene ABCB1, é uma das bombas de efluxo mais estudadas, como agente interferente no tratamento de diversos tipos de câncer, seguida pela proteína MRP1 (*Multidrug Resistance-related Protein 1*), transcrita pelo gene ABCC1. Estudos recentes relacionaram a atuação da proteína LRP (*Lung Resistance Protein*) a estas bombas, devido sua alta expressão em tumores com fenótipo resistente. Em contrapartida, estes transportadores também exercem funções fisiológicas contra metabólitos, compostos citotóxicos e teratogênicos, em diversos tecidos normais como rins, fígado, intestino e células-tronco. As proteínas ABC são consideradas marcadores específicos das células-tronco hematopoiéticas, porém, ainda são pouco descritas nas células-tronco mesenquimais (CTM). A medula óssea (MO) é a fonte mais bem descrita de CTM adultas, cujas propriedades são conhecidas e utilizadas na aplicação clínica. Entretanto, recentemente células-tronco de origem fetal têm criado expectativas e o líquido amniótico (LA) apontado como fonte promissora deste tipo celular, que por sua vez, é pouco estudada acerca da atuação das bombas ABC. Sendo assim, o presente estudo visou caracterizar a expressão da P-gp, MRP1 e LRP em células-tronco mesenquimais humanas do líquido amniótico e medula óssea. **MÉTODOS:** Foram isoladas CTM de amostras do LA e MO, caracterizadas através de citometria de fluxo, ensaios de diferenciação em tecidos mesenquimais *in vitro* e expressão dos genes de indiferenciação Oct-4 e Nanog por RT-PCR. Verificou-se também a presença da P-gp através da técnica de imunocitoquímica e a sua resistência frente a diferentes concentrações de doxorrubicina (DOX) através do ensaio de MTT, foram utilizadas como controles as células MES-SA e MES-DX (sarcoma uterino respectivamente sensível e sua variante resistente à DOX). Para avaliar o funcionamento da P-gp, foi feito ensaio de exclusão do corante Rhodamina 123 (Rh 123) por meio de citometria de fluxo, com ou sem bloqueio da P-gp utilizando verapamil. E por fim, foi verificada a expressão dos genes ABCB1/ABCC1/LRP por meio de PCR em tempo real, nas amostras pré e pós-diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica. **RESULTADOS:** As CTM, tanto da MO quanto do LA, exibiram respostas semelhantes às células resistentes MES-DX e expressam a P-gp de forma homogênea nas suas populações. O ensaio de exclusão da Rh 123 demonstrou dinâmicas de efluxo do corante semelhantes entre as células-tronco do LA e as MES-DX, com e sem a presença de verapamil. No entanto, as células da MO apresentaram efluxo crescente e não responderam ao bloqueador verapamil como as outras linhagens. A distribuição da expressão gênica, o ABCB1 se mostrou menor que a do LRP nas amostras de LA indiferenciadas. No entanto a expressão do ABCB1 nas amostras de LA foi maior em comparação às amostras de MO indiferenciadas. Não houve significância estatística na comparação da expressão gênica antes e depois das diferenciações adipogênica e osteogênica. **CONCLUSÃO:** As CTM são resistentes ao quimioterápico doxorrubicina, mas, possuem baixa expressão do ABCB1. Portanto, as CTM podem possuir outro mecanismo, como a MRP1 e LRP, atuando no mecanismo de resistência à DOX, além da P-gp.

DESCRIPTORIOS: Células-tronco mesenquimais; Líquido amniótico; Medula óssea
Resistência a medicamentos; P-glicoproteína

ABSTRACT

Romão, CM. *P-gp, MRP1 and LRP expression in human amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

BACKGROUND: The drug resistance phenotype is characterized by ABC (ATP-Binding Cassette) family proteins overexpression. The P-glycoprotein (P-gp) codified by ABCB1 gene is one of the most studied efflux pumps such as interfering agent in cancer treatment followed by MRP1 (Multidrug Resistance-related protein 1) transcribed by ABCC1 gene. Recent studies have linked the LRP (Lung Resistance Protein) to these pumps activities because of its high expression in resistant cancers. Though these transporters also have physiological functions against metabolites, cytotoxic and teratogenic compounds in normal tissues as kidneys, liver, intestine and stem cells. ABC proteins are considered hematopoietic stem cells specific markers but are poorly described in mesenchymal stem cells (MSC). Bone marrow (BM) is the best characterized adult MSC source its properties are well known and used in clinical application. However recently fetal stem cells has raised expectations and amniotic fluid (AF) is a promising source of this cell type which in turn is scarce regarding about presence and activity of the ABC pumps. The aim of this study was characterize the P-gp, MRP1 and LRP expression in human mesenchymal stem cells from amniotic fluid and bone marrow.

METHODS: Mesenchymal stem cells were isolated from AF and BM and characterized by flow cytometry, in vitro mesenchymal differentiation assays, Oct-4 and Nanog genes expression by RT-PCR. The P-gp presence were found over immunocytochemical technique and its activity against different concentrations of doxorubicin (DOX) by MTT assay which were used as control cells MES-DX and MES-SA (uterine sarcoma respectively resistant and susceptible to DOX). The P-gp was evaluated in Rhodamine 123 (Rh 123) dye exclusion through flow cytometry with or without blocking P-gp from verapamil. Finally was observed ABCB1/ABCC1/LRP genes expression by real time PCR after and before adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation. **RESULTS:** BM and AF MSC showed the same response of the DOX resistant cells MES-DX and express P-gp homogeneously though their populations. The Rh 123 dye exclusion assay demonstrated that the AF stem cells efflux dynamics are similar to the MES-DX with and without the presence of verapamil. However BM MSC showed crescent efflux and no response to verapamil as the other cells. The ABCB1 gene was less expressed than LRP in undifferentiated AF MSC. No difference was found in gene expression before osteogenic and adipogenic differentiation. **CONCLUSION:** MSC have low expression of ABCB1 although are resistant to doxorubicin so other mechanisms such as MRP1 or LRP may be acting to these cells defense in addition to P-gp.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cells; Amniotic fluid; Bone marrow; Drug resistance; P-glycoprotein

1. INTRODUÇÃO

Atualmente as células-tronco (CT) despertam grande interesse na comunidade científica devido às suas propriedades peculiares como autorrenovação, plasticidade de diferenciação em vários tecidos e a capacidade de regenerar tecidos danificados. Há variados tipos de células-tronco, dentre os quais, estão presentes as células-tronco mesenquimais (CTM), que podem ser definidas como multipotentes, capazes de dar origem a diferentes linhagens da mesoderme. Estas foram identificadas primeiramente na medula óssea (MO), quando isoladas *in vitro*, apresentam aderência à superfície de cultivo e morfologia fusiforme. Fisiologicamente integram o estroma, onde exercem a função de manter um ambiente ótimo para a hematopoiese, permanecendo com metabolismo basal ou quiescente, até o recebimento de estímulos para se multiplicar ou serem recrutadas para migrar e regenerar tecidos lesados do organismo adulto (Lanza et al., 2006; Charbord, 2010).

Com crescente interesse nas CTM, estudos demonstraram a presença de células com as mesmas características em outros tecidos como cordão umbilical, polpa dentária, tecido adiposo e o líquido amniótico (LA). O LA é um fluido aquoso que preenche o âmnio, protegendo e auxiliando no desenvolvimento do feto ao longo da gestação. Compõe-se, basicamente, de secreção e células da descamação fetal, onde estão presentes as células-tronco mesenquimais (CTM). Estudos afirmam que, estas são consideradas células fetais, ou seja, possuem características semelhantes às células-tronco embrionárias, como por exemplo, alta capacidade

replicativa, diferenciação em diversos tecidos e longa sobrevivência *in vitro* (Lanza et al., 2006; Díaz-Flores et al., 2006).

O ambiente perinatal, de onde provêm as células fetais, é privilegiado, uma vez que, os anexos embrionários como a placenta e o âmnio exercem funções protetoras, que limitam a passagem de substâncias, a fim de evitar a exposição do feto à xenobióticos, que possam levar a más formações, teratogênese e até ao aborto. Componentes de grande importância dessas barreiras são as proteínas transportadoras relacionadas à resistência às drogas (Aye et al., 2007; Leslie et al., 2005; Meyer zu Schwabedissen et al., 2005).

A resistência às drogas é um fenômeno que, entre outros fatores, deve-se às bombas que consomem ATP para expulsar substâncias tóxicas do interior das células. A primeira a ser descoberta e mais estudada é a P-glicoproteína (P-gp), pertencente à família de proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*). Esta bomba é vastamente descrita na literatura como mecanismo de escape das células cancerosas aos quimioterápicos, onde devido à seleção ou mutações genéticas, esta população celular passa a superexpressá-la, levando assim à resistência (Dean, 2001; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008).

Apesar da associação com estados patológicos, acredita-se que as funções fisiológicas da P-gp são basicamente o transporte de íons, nutrientes, compostos hidrofóbicos e metabólitos através das membranas celulares, e podem ser encontradas naturalmente em diversos tecidos do

organismo adulto, como na barreira hematoencefálica, rins, fígado, intestino, pulmões e células-tronco (Johnstone et al., 2000; Gottesman & Bates, 2002).

A P-gp, foi uma das primeiras bombas ABC descritas em células-tronco hematopoiéticas. Onde a superexpressão destes transportadores foi associada ao fenótipo conhecido como “*side population*” (SP), que consiste em uma pequena porção da população celular, cujo potencial “tronco” encontra-se mais acentuado que as demais, e são selecionadas de acordo com a sua habilidade de excluir substâncias do seu interior. Nos últimos anos, trabalhos afirmam que estas células residem em diversos órgãos não hematopoiéticos, entretanto, o principal tecido estudado é a medula óssea (MO). Isto se deve, à vasta utilização da MO na terapia celular, especialmente no tratamento de malignidades sanguíneas. Há indícios de que, a capacidade regenerativa e multipotência da SP hematopoiética, são de grande importância na regeneração de pacientes receptivos de transplantes de MO. Por outro lado, estudos comprovaram a atuação de outro tipo celular nestes casos, as células-tronco mesenquimais (CTM) (Wu & Alman, 2008; Huls et al., 2009).

Em 1999, Koc e colaboradores demonstraram que, em transplantados de MO grande parte da população de CTM não provinha dos doadores, e sim dos próprios receptores, sugerindo que há células que resistem aos danos da quimioterapia neste nicho. Em 2004, o grupo de Li concluiu que, as CTM *in vitro* mostraram-se resistentes à apoptose induzida por quimioterápicos, comumente utilizados durante o processo de transplante de MO, no entanto, demonstraram sensibilidade a outros agentes tóxicos. Os

fatores que corroboram para o mecanismo de escape destas células ainda não foram totalmente esclarecidos. Sendo assim, há a hipótese de que a P-glicoproteína possa atuar ativamente na proteção das CTM tanto adultas quanto fetais, porém, também podem atuar nas células de tecidos fetais (Koc et al. 1999; Tsuruo et al., 2003; Li et al., 2004).

Há 20 anos, van Kalken e colaboradores, fizeram a comparação entre tecidos fetais humanos, em diversos períodos da gestação, e encontraram a expressão da P-gp a partir da sétima semana no fígado, rins e pulmões. Enquanto, apenas nos períodos avançados do desenvolvimento, a P-gp se fez presente em outros órgãos como adrenal e intestino. Embora as funções deste transportador em células fetais ainda não estejam totalmente esclarecida, acredita-se que atuem no transporte de hormônios esteroidais, de nutrientes e defesa contra agentes tóxicos (van Kalken et al., 1992; Johnstone et al., 2000).

O desenvolvimento celular é um processo unidirecional, durante o qual a maioria das células perde, de maneira progressiva, sua capacidade de divisão e diferenciação, com as células-tronco isto não é diferente. Seguindo este raciocínio Roubelakis, ao comparar CTM de líquido amniótico e medula óssea demonstrou que, embora ambas demonstrassem expressão gênica e proteômica em comum, apenas as células de LA apresentam transcritos e proteínas relacionados à atividade proliferativa e fenótipo primitivo, ou seja, mesmo possuindo características mesenquimais em comum, as células-tronco possuem propriedades dependentes do tecido de origem (Wolpert, 2000; Roubelakis et al., 2007).

Nas células-tronco como um todo, estudos sugerem que a regulação da expressão dos transportadores relacionados à resistência está relacionada à diferenciação e manutenção da população de células-tronco. Uma das principais características do processo de diferenciação ou comprometimento celular é a mudança de expressão gênica que induz ou inibe a codificação de proteínas relacionadas ao metabolismo específico de cada célula. O estudo de Kim e colaboradores (2007) demonstrou que, o estímulo para diferenciação condrogênica em CTM de medula óssea, diminuiu a expressão gênica da P-gp proporcionalmente ao aumento da expressão de colágeno II, típico do tecido cartilaginoso (Kim et al., 2007; Fontana, 2009).

Apesar das expectativas da pesquisa e aplicação clínica das células-tronco ainda há muito para se aprofundar na caracterização deste tipo celular, afim de, trazer o retrato mais fidedigno possível, do seu comportamento em diversas situações naturais e artificiais, que porventura a aplicação clínica possa submetê-las. É possível que o conhecimento detalhado da fisiologia das células-tronco, possa contribuir como complemento às terapias ou experimentos já em andamento, ou para compreender melhor patologias, como o câncer.

Em 1968, Fiala et al. foram os primeiros a propor a teoria da existência de células-tronco cancerosas (CTC). Suas características seriam a incapacidade de diferenciação, alta atividade replicativa e resistência ao tratamento quimioterápico, células como estas, já foram encontradas em

leucemias, câncer de mama, tumores cerebrais, entre outros tecidos (Sell, 2004; Donnenberg & Donnenberg, 2005).

A resistência das CTC pode estar associada às bombas ATPases, é conhecido que o fenótipo de resistência em cânceres pode se agravar quando há superexpressão de mais de um tipo de transportador simultaneamente. A MRP1 (*Multidrug Resistance-related Protein 1*) semelhante à P-gp, além de também, integrar a família ABC, é conhecida por causar resistência à diversos quimioterápicos. Recentemente a LRP (*Lung Resistance Protein*), ribonucleoproteína pertencente à família de transportadores MVP (*Major Vault Proteins*), está associada às proteínas causadoras de resistência, podendo atuar como adjuvante neste fenômeno. Esta estrutura compõe o citoesqueleto de eucariotos, no entanto, sua função fisiológica ainda não foi totalmente esclarecida (De Figueiredo-Pontes et al., 2008; Fedasenka et al., 2008).

Avanços recentes na biologia regenerativa têm permitido a compreensão do crescimento tumoral, a partir do contexto da disfunção dos tecidos normais. Sendo assim, o entendimento do papel central exercido pelas proteínas transportadoras relacionadas ao fenótipo de resistência às drogas nas células-tronco, pode auxiliar na explicação da ineficiência do tratamento quimioterápico, recorrência da doença, metástase e diferenças tecido-específicas na incidência de determinados tipos de cânceres (Ho et al., 2008).

Tendo suscitado estas informações, o presente estudo visou elucidar as hipóteses que: a atividade da P-gp nas CTM seria diferente entre tecidos

fetais e adultos; as CTM expressam outros transportadores relacionados à resistência além da P-gp; e o grau de diferenciação teria influência direta na expressão destas bombas.

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

- Comprovar a presença de células-tronco mesenquimais nas populações isoladas de amostras de líquido amniótico humano, coletadas no segundo trimestre de gestação, bem como de amostras de medula óssea humana de pacientes adultos, baseando-se em pré-requisitos sugeridos na literatura;
- Comparar a presença, resistência e função da P-glicoproteína entre as células-tronco mesenquimais provenientes do líquido amniótico e medula óssea e células MES-DX, controle positivo de resistência às drogas;
- Comparar a expressão dos genes que codificam as proteínas transportadoras relacionadas à resistência a drogas P-gp, MRP1 e LRP, nas células-tronco antes e depois da diferenciação *in vitro* em tecidos mesenquimais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Biologia das células-tronco

Por definição, as células-tronco (CT) são indiferenciadas e apresentam a propriedade de autorrenovação, além de serem capazes de gerar células funcionais de diferentes tecidos, através da divisão assimétrica, mais especificamente, é o potencial de gerar clones, com todas as propriedades da célula-mãe, fato primordial para a manutenção da população celular; e gerar também células-filhas com plasticidade restrita, ou seja, já comprometidas com o processo de diferenciação (Sell, 2004; Lanza et al., 2006).

As células-tronco são comumente hierarquizadas quanto à plasticidade que apresentam durante o desenvolvimento natural de um organismo como: totipotente, pluripotente, multipotente e onipotente. As totipotentes podem originar todos os tecidos de um organismo, incluindo os anexos embrionários e extra-embrionários, propriedade atribuída apenas ao zigoto. As células pluripotentes não tem a capacidade de desenvolver os anexos embrionários, no entanto, podem originar todas as células que compõe um organismo adulto, exemplos de pluripotência são as células-tronco embrionárias (CTE) e as células pluripotentes induzidas (iPS). As multipotentes, por sua vez, são comprometidas com determinadas linhagens ou folheto embrionário, podendo originar determinados tipos de células, como exemplo, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM). Por fim, há também as células onipotentes, conhecidas como células progenitoras ou amplificadoras transitórias, sendo

encontradas em quase todos os tecidos do organismo adulto, possuem grande capacidade replicativa, mas podem originar apenas um tipo de tecido, sendo assim, são responsáveis por boa parte da regeneração tecidual (Hochedlinger et al., 2009; Takahashi & Yamanaka, 2006; Lanza et al., 2006).

As células-tronco também podem ser classificadas quanto ao seu estado específico da ontogênese, ou seja, onde se ordenam as células-tronco embrionárias, fetais e adultas, que serão descritas a seguir (Figura - 01) (Verfaillie, 2002; Jackson et al., 2007).

Figura 01 – Esquema ilustrativo da evolução das células-tronco nos diferentes estágios do desenvolvimento e as respectivas classificações quanto ao potencial de diferenciação: células-tronco embrionária – pluripotentes; células-tronco fetais – pluripotentes ou multipotentes; células-tronco adultas – multipotentes; células progenitoras – unipotentes. Modificado: Pappa & Anagnou, 2009

3.2. Células-tronco embrionárias

Em um primeiro momento, as células do oócito fertilizado ou zigoto, descendentes das duas primeiras divisões, são totipotentes. Após 4 dias, tais células dão início ao processo de especialização e formam o blastocisto, uma formação celular circular oca que apresenta aglomerado de células no seu interior denominada massa interna do blastocisto, deste local se obtém as células-tronco embrionárias (CTE) (Alison et al., 2002; Slack, 2008).

Apenas quando isoladas *in vitro* as células da massa interna do blastocisto podem ser classificadas como células-tronco embrionárias (CTE), pois, enquanto constituintes do embrião, mesmo sendo pluripotentes, as mesmas não promovem a divisão assimétrica, característica importante na definição de uma célula-tronco. Ao invés disso, apresentam expansão celular logarítmica. Em contrapartida, em ambiente de cultivo, apresentam alta taxa replicativa, indiferenciação por tempo prolongado e formação de agregados de células, conhecidos como corpos embrioides, que podem teoricamente, se diferenciar, espontaneamente ou, quando induzidos por fatores de crescimento, em todos os tecidos de um organismo adulto. Embora sejam pluripotentes, não possuem a capacidade de sozinhas darem origem a um embrião, já que não geram os tecidos de sustentação extra-embrionários (Dvash et al., 2004; Slack, 2008).

A pluripotência das CTE também pode ser comprovada com experimentos *in vivo* como: a aplicação das CTE em um blastocisto de origem diferente, pode gerar um animal quimerizado, ou seja, que apresenta

contribuição celular de vários tipos de ambas as origens; ou quando enxertadas em animais imunodeficientes, tendem a formar tumores, que incluem células envolvidas na formação dos três folhetos embrionários. Esta última formação é designada teratoma (Dvash et al., 2004).

Há muitas expectativas acerca da utilização das CTE no tratamento de certas patologias. No entanto, dado o seu potencial teratogênico, a aplicação em humanos torna-se limitada. São ainda necessários novos estudos que elucidem o comportamento biológico e possibilitem o cultivo destas células, sem a consequente formação de tumores. Outros pontos negativos envolvidos no estudo e na aplicação prática das CTE, são os entraves éticos, religiosos e legais que permeiam a obtenção destas células obtidas de embriões humanos. No Brasil, em 2007, aprovou-se a Lei de Biossegurança a qual viabiliza o uso de embriões humanos, que estejam armazenados em clínicas de fertilização, para fins de pesquisa. Para esta prática, há necessidade de consentimento dos doadores, inviabilidade dos embriões além destes estarem congelados há mais de 5 anos. Em contrapartida, há outros tipos de células-tronco, das quais, as células-tronco adultas são as mais bem descritas, além de, já serem utilizadas na aplicação clínica com sucesso (Verfaillie, 2002; Jackson et al., 2007; WWW.anvisa.gov).

3.3. Células-Tronco Adultas

Entende-se por células-tronco adultas (CTA), pequenas populações de células indiferenciadas e quiescentes, que encontram-se distribuídas numa gama de tecidos funcionais do organismo. Estas, quando estimuladas, se autorrenovam rapidamente ou originam células maduras funcionais, capazes de regenerar todos os tecidos onde residem (Díaz-Flores et al., 2006).

As CTA localizam-se fisicamente em regiões especializadas denominadas nichos. Estes são constituídos de um microambiente tridimensional, formado de células diferenciadas e matriz extracelular. O conceito surgiu a partir da observação de vários tipos de CTA, que perderam o potencial de autorrenovação, quando retiradas do seu destino original. A quiescência, ou progressão lenta do ciclo celular (predominantemente nas fases G0 e G1) é uma propriedade comum das CTA *in vivo*. Esta característica é importante na manutenção da indiferenciação por períodos prolongados para protegê-la do esgotamento prematuro em condições de estresse e restringir a divisão celular devido à propensão a erros na síntese de DNA. Acredita-se que há sinais presentes, apenas no microambiente nativo de cada tipo de célula-tronco, atuando como sistema regulatório do ciclo celular, modulando a divisão assimétrica ou simétrica, adesão, retenção, “*homing*” (recrutamento), mobilização e manutenção da indiferenciação ou diferenciação celular (Hirao & Arai, 2004; Díaz-Flores et al., 2006; Lanza et al., 2006; Arai et al., 2008).

A indiferenciação, atribuída às CT, pode ser definida como um fenômeno associado a sinais extracelulares e regulação do controle transcricional nuclear. Os mecanismos moleculares que governam estes fenômenos foram alvo de diversos estudos, que culminaram na determinação dos principais marcadores de indiferenciação: os genes Oct-4 e Nanog. (Kastrinaki et al., 2008).

Em 1990, diferentes grupos de pesquisa, descreveram o mesmo gene, devido ao seu potencial de expressão específico em células indiferenciadas, seguida da sua diminuição em células diferenciadas, assim tomou destaque o gene Oct-4. Este codifica um fator de transcrição da família POU, chamado Oct-4 (*octamer-binding protein 4* ou POU5F1), cuja expressão, foi fortemente relacionada às populações de células-tronco totipotentes e pluripotentes ao longo do desenvolvimento, como óvulos fertilizados, blastômeros da mórula, células da massa interna do blastocisto, epiblasto, ectoderme primitiva. A função do Oct-4 ainda permanece no foco das investigações. No entanto, já está bem estabelecido que a perda da sua funcionalidade leva terminantemente à diferenciação celular (Lanza et al., 2006; Alison et al., 2009).

O Nanog é um dos genes essenciais para a manutenção da indiferenciação de CTE. A função exata deste gene ainda não foi totalmente elucidada, entretanto sabe-se que, a perda da sua expressão leva à diferenciação celular. Muito além de apenas funções em comum, já está claro que Oct-4 e Nanog formam uma colaboração transcricional interdependente, onde regulam a expressão um do outro, e juntos a de

outros genes. Baseando-se nisto, que Yamanaka, introduziu via retroviral, a combinação dos genes Oct-4, Nanog, Sox2 e Lin28, em células somáticas, e com isto reprogramou estas à pluripotência. Embora tenham sido descritos na manutenção da pluripotência, há evidências da expressão desses genes, embora em menor proporção, em uma variedade de CTA. Em contrapartida, há uma fonte de células-tronco intermediária às embrionárias e adultas e que tem se destacado devidos às suas propriedades promissoras, as células-tronco fetais (CTF) (Takahashi & Yamanaka, 2006; Kashyap et al., 2009).

3.4. Células-tronco fetais

Após o início da organogênese, as células começam a mudar sua função, fenótipo e grau de plasticidade, conforme comprometimento com as diferentes camadas germinativas formadas nesta etapa. As células-tronco presentes no organismo em desenvolvimento e nos tecidos que promovem suporte para a gestação, podem ser consideradas células-tronco fetais (CTF) (Slack, 2008; Lanza et al., 2006).

Estudadas há mais de 10 anos, em tecidos como cordão umbilical ou sangue do cordão, as CTF também já foram encontradas no líquido amniótico, geléia de Wharton, âmnio e placenta. Estas células têm sido alvo de estudos para medicina regenerativa, pois, possuem propriedades que

conferem vantagens em relação às demais células-tronco (Pappa & Anagnou, 2009)

Quando isolada em cultura, as CTF são em sua maioria do tipo mesenquimal e possuem potencial de expansão superior ao de células-tronco adultas (CTA), são menos imunogênicas, pois, não expressam HLA tipo II, além de possuírem as mesmas propriedades imunomoduladoras que as células-tronco mesenquimais adultas (Gucciardo et al., 2008).

Quando comparadas às CTE, as fetais não são teratogênicas, mas, expressam genes de indiferenciação, como Oct-4 e Nanog, em 90% de sua população ao longo de mais de 30 passagens durante o cultivo. As CTF, não possuem os mesmos dilemas éticos que circundam as embrionárias, podendo ser extraídas de tecidos descartados após o nascimento, ou de amostras fetais para fins diagnósticos. Com relação à plasticidade destas células, ainda não há um consenso, pois, além de capazes de diferenciar em tecidos mesenquimais como cartilagem, osso, tecido adiposo, como células multipotentes, há estudos que afirmam sua diferenciação em miócitos, tecido endotelial e células com fenótipo neural, característica de pluripotência. Portanto, os atributos citados classificam as CTF como um tipo de células-tronco intermediário às embrionárias e adultas (Bossolasco et al., 2006; Kim et al., 2007; Gucciardo et al., 2008; Pappa & Anagnou, 2009).

Os efeitos quantitativos e qualitativos da idade de um organismo nas células-tronco, ainda não foram bem elucidados, no entanto, acredita-se que quanto mais jovem o organismo maior o potencial de suas células-tronco. Estas, não são imortais, sendo assim estão sujeitas a apoptose natural com

o ganho de idade ou a altos níveis de estresse. Harrison em 1983 demonstrou que, células fetais exercem migração mais eficiente quando comparadas às CTA. A prevalência de células-tronco mesenquimais (CTM) no organismo fetal é significativamente maior do que em um organismo adulto, como exemplo, o fígado, sangue e medula óssea do primeiro trimestre de gestação, são compostos de aproximadamente 0,4% de CTM dentre as células nucleadas, enquanto a medula óssea adulta possui apenas 0,001 – 0,0001%. A idade do organismo já mostra seus efeitos mesmo durante a gravidez, como foi demonstrado em CTF do líquido amniótico (LA) do segundo trimestre de gestação, expressam altos níveis de marcadores endodermis e mesodermis, quando comparadas às células do LA em idade gestacional avançada (Campagnoli et al., 2002; O'Donoghue & Fisk, 2004).

As células-tronco fetais podem representar uma fonte alternativa de células para uso terapêutico, entretanto ainda exigem maiores estudos, principalmente relacionados às suas bases moleculares, semelhanças e diferenças comparadas a outras fontes de células-tronco, sobretudo do organismo adulto (Donoghue & Fisk, 2004).

3.5. Células-tronco mesenquimais: Medula óssea vs. Líquido amniótico

Há aproximadamente 130 anos, o patologista alemão Cohnheim apud Mafi (2011), sugeriu pela primeira vez, a existência de células não

hematopoiéticas na medula óssea, definindo-as como, “fibroblastos” que auxiliavam na regeneração de tecidos. Nos anos 70, Friedenstein e colaboradores, foram os pioneiros no isolamento destas células em cultura. Em seus estudos, amostras de medula óssea eram mantidas em placas de cultivo. Ao remover as células não aderentes, ou seja de origem hematopoiética, era obtida uma população heterogênea, aderente à superfície de cultivo, com crescimento em colônias e aparência fusiforme. Estas foram diferenciadas *in vitro*, em tecidos de linhagens mesodermas, e através de transplantes *in vivo*, observaram a capacidade de reconstituir o microambiente medular e o tecido ósseo, fornecendo evidências do potencial de reparo e autorrenovação destas células. Foram Caplan e colaboradores, apud Lanza (2006), os responsáveis por nomear tais células, tornando-as conhecidas como “células-tronco mesenquimais” (CTM). Desde então, as CTM são definidas como células multipotentes com capacidade de autorrenovação e de originar diferentes tecidos derivados do mesenquima embrionário (Friedenstein et al., 1970; Lanza et al., 2006; Jackson et al., 2007; Chamberlain et al., 2007; Schipani et al., 2008; Mafi et al., 2011).

A simples seleção, por aderência à superfície de cultivo, traz consigo grande probabilidade de mesclagem da população mesenquimal com outras linhagens de células. Sendo assim, são necessárias estratégias para definir a consistência da população estudada. Há estudos, que reportam diferentes metodologias e marcadores característicos das CTM. No entanto, ainda não foi descrito um marcador molecular específico desta linhagem. Foi visando diminuir tais diferenças metodológicas, que a Sociedade Internacional de

Terapia Celular (SITC) propôs três critérios mínimos de classificação para as CTM. Primeiro, devem ter capacidade de aderência às superfícies (geralmente plásticas) de cultivo; segundo, devem expressar as moléculas de superfície [(CD105 (MAb SH2), CD73 (MAb SH3 e SH4) e CD90 (THY-1)], típicas de células da mesoderme e não expressar CD45 (marcador pan-leucocitário), CD34 (marcador de progenitores hematopoéticos e endoteliais), CD14 ou CD11b (marcadores de monócitos e macrófagos), CD79 α ou CD19 (marcadores de células B) e HLA-DR; terceiro, devem diferenciar-se, *in vitro*, em tecidos de origem mesenquimal, a saber: tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso (Dominici et al., 2006).

Como descrito acima, as CTM foram inicialmente descobertas na medula óssea, sendo assim, tornou-se o tecido mais bem descrito com relação a esta linhagem. Na MO as células-tronco mesenquimais se encontram no estroma, que pode ser definido como, tecido que conecta e provê suporte ao parênquima de um órgão. Neste caso, o estroma sustenta a hematopoiese, ou seja, suporta a proliferação, diferenciação e maturação das CTH em cada uma das suas distintas linhagens, por meio da interação com a matriz extracelular. O estroma medular possui uma composição complexa e heterogênea, incluindo células reticulares, adipócito, células osteogênicas, próximas à superfície óssea, células endoteliais, musculatura lisa da parede dos vasos e macrófagos (Short et al., 2003).

As células-tronco mesenquimais representam pequena fração da população nucleada da medula óssea, aproximadamente uma para cada 5×10^3 de células mononucleadas. Embora em baixo número, estas células

podem ser mobilizadas por diversos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, para a regeneração tecidual, não somente na medula óssea, mas também em tecidos de todo o organismo, este potencial migratório também é conhecido como *homing* (Figura - 02). Há indícios de que, sinais de inflamação atraíam as CTM. Somado a isto, também exercem efeitos imunomodulatórios, inibindo a proliferação e função de linfócitos T, B e *natural killer* (Deans et al., 2000; Short et al., 2003; Kastrinaki et al., 2008; Ding et al., 2011).

Figura 02 – Esquema ilustrativo da evolução dos processos de predestinação das células-tronco mesenquimais, onde pode ocorrer a replicação, migração, diferenciação ou apoptose

Devido aos avanços da biologia regenerativa, células com características mesenquimais, foram encontradas em outros tecidos, tanto adultos: polpa dentária, tendões, membrana sinovial, músculo, endométrio, tecido adiposo; quanto fetais: cordão umbilical, geléia de Wharton, placenta, membrana amniótica e líquido amniótico (Schipani et al., 2008; Pappa & Anagnou, 2009; Ding et al., 2011).

O LA tem sido usado no diagnóstico pré-natal há aproximadamente 70 anos, sendo obtido através da amniocentese (procedimento de punção transabdominal materna), e tornou-se um método diagnóstico válido e seguro, quando concomitante à realização do ultrassom. Durante a primeira metade da gestação, a maior parte do LA é resultado do transporte ativo de sódio e passivo de cloreto e água por meio da membrana amniótica ou pele fetal. Na segunda metade da gestação, grande parte do líquido provém da micção do feto, secreção do trato respiratório e, em menor quantidade, excreção do trato gastrointestinal (Kim et al., 2007).

Devido à dinâmica na sua produção, o LA possui população celular heterogênea, derivada das três camadas germinativas do feto em desenvolvimento, com variadas morfologias e estágios de diferenciação. Estas células podem ser isoladas e utilizadas na cariotipagem, além de outros exames, para averiguar anormalidades cromossômicas no feto. Sua maioria é de natureza epitelióide, provavelmente células da pele, tratos respiratórios e gastrointestinal fetal ou da membrana amniótica, e uma pequena porcentagem é de células-tronco mesenquimais, que podem

proceder dos tecidos fibroconectivos fetais (Slack, 2008; Dobрева et al., 2010; Pappa & Anagnou, 2011).

Em cultura, tais células compartilham de características mesenquimais, como o potencial de diferenciação em multilinhagens e morfologia fusiforme, similar às CTM isoladas da medula óssea. No entanto, possuem propriedades mais acentuadas, como: alta taxa replicativa, manutenção da indiferenciação e cariótipo normal por mais de 250 dobramentos, expressam os genes de indiferenciação em maior quantidade e presença da atividade da telomerase; ou seja, as CTM de origem fetal possuem diferenças fenotípicas e genotípicas, em relação às adultas. Alguns autores afirmam que estas sejam pluripotentes, entre outras propriedades, muito próximas das células-tronco embrionárias. No entanto, há indícios de que essas características diminuam, já ao longo da gestação. As células do LA coletadas nos primórdios da gravidez expressam maiores quantidades de marcadores da mesoderme, quando comparadas às dos estágios finais. No entanto, este fenômeno também pode ser visto nas células da medula óssea, pois, o número, e potencial de proliferação e diferenciação decaem com o aumento da idade do doador da amostra (Fauza, 2004; Dobрева et al., 2010; Pappa & Anagnou, 2011).

Apesar do caráter mesenquimal, as células do líquido amniótico e medula óssea diferem-se quanto às suas funções fisiológicas. Tsai e colaboradores avaliaram as possíveis cadeias funcionais onde estas células podem atuar, em seus respectivos tecidos de origem. Seus achados sugerem que, na MO as CTM participam do desenvolvimento do esqueleto,

integrando vias de sinalização para a ossificação e mineralização óssea; além de envolvidas na maturação mielo-linfo-hematopoiética, via MHC classe II ou receptores de células B e T. Este estudo também sugeriu que, a das CTM no líquido amniótico, podem estar associadas diretamente ou à vias relacionadas com a contração uterina, devido à superexpressão de receptores de ocitocina (Tsai et al., 2007; Roubelakis et al., 2007).

3.6. Resistência a drogas

A resistência a drogas é vastamente conhecida como, a maior causa da ineficiência do tratamento quimioterápico em cânceres, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, podendo ser causada por variados mecanismos. Dentre estes, a diminuição da chegada da droga ao tecido alvo, devido aos fatores do hospedeiro, tais como: intolerância aos efeitos da droga, baixos níveis de droga no sangue decorrente da baixa absorção, rápida metabolização ou excreção da droga. No entanto o mecanismo de deficiência no acúmulo de medicamentos é o que mais colabora para a resistência. Este fenômeno se deve a fatores exclusivos das células alvo, como a diminuição do influxo e/ou aumento do efluxo da droga, devido à superexpressão de proteínas transportadoras relacionados à resistência como, os componentes da família ABC (Gottesman et al., 2002; Ambudkar et al., 2003; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008).

A super-família de proteínas transportadoras ABC (do inglês: *ATP Binding Cassette*), apresenta como característica os seus domínios transmembrânicos, relacionados ao transporte de substâncias, para dentro ou fora das células, contra o gradiente de concentração, movidas a partir da hidrólise de ATP. Em mamíferos, as proteínas ABC são divididas e nomeadas em sete sub-famílias, de acordo com a quantidade e combinações dos seus domínios, transmembrana e relacionados ao consumo de ATP, ou seja, ligados a este nucleotídeo (Stavrovskaya & Stromskaya, 2008; Dean et al., 2001).

Normalmente, os transportadores ABC são formados por quatro domínios, sendo dois citoplasmáticos, ligados ao nucleotídeo, e dois compostos por seis α -hélices transmembranas. Tais transportadores ABC, apresentam-se na forma de apenas uma cadeia polipeptídica ou na forma de duas proteínas separadas, que necessitam formar homo ou heterodímeros para promover um transporte funcional (Dean et al., 2001; Glavinas et al., 2004).

Em circunstâncias fisiológicas, as bombas ATPases são muito importantes na defesa tecidual, excretando compostos tóxicos e metabólitos, e também, transportam diversos substratos como íons, peptídeos, aminoácidos, açúcares, lipídios, fosfolipídeos, colesterol e outros compostos hidrofóbicos, através das membranas plasmática e intracelulares. Estes transportadores são vastamente estudados por estarem associados à resistência a drogas. (Ambudkar et al., 2003; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008).

A expressão dos transportadores ABC pode ser ativada em vários níveis da transcrição à tradução, por diferentes fatores, como: drogas antitumorais, antidepressivos herbais; hipóxia; estresse físico como radiação ultravioleta, radiação-X, choques de calor; substâncias carcinogênicas, ésteres de forbol (composto orgânico derivado de plantas-carcinogênicas); substâncias indutoras de diferenciação celular, entre outros. Estes eventos também podem levar, além da indução da expressão das bombas ABC, à seleção de células já privilegiadas, ou seja, que já expressam transportadores ATPases; ou levar à mutações que transformem as células, do estado basal, para o resistente. Enquanto as células sem proteção são induzidas à morte, os transportadores excluem os agentes tóxicos impedindo este efeito. Sendo assim as células remanescentes repovoam o tecido com suas características, dando origem a um tecido resistente aos medicamentos (Figura - 03) (Sarkadi et al., 2006; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008;).

As drogas frequentemente envolvidas na resistência, reconhecidas como substratos das bombas ABC, são as de origens fúngicas ou de plantas, incluindo as antraciclina (daunorrubicinas primárias e doxorrubicina) e alcaloides da vinca. Fora destes grupos, alguns compostos não relacionados podem causar resistência, como colchicina, texanos, epipodofilotoxinas, actinomicina D e derivados de antracenodiona, todas hidrofóbicas e a maioria bases fracas (Gottesman et al., 2002).

Grande parte dos estudos, que focam a modulação da resistência ou que avaliam a resposta das ATPases a determinado medicamento, fazem utilização de certas drogas com potencial de inibição da função destas

proteínas. A co-administração destas, juntamente ao tratamento quimioterápico, já vem sendo utilizada e pode auxiliar na eficiência da terapia contra o câncer. As propriedades ativas destes compostos podem variar entre a competição pelo transporte com o substrato das bombas, ou como eficiente inibidor da hidrólise do ATP (Figura - 04) (Zhou, 2008; Hsiao et al., 2006).

Figura 03 - Esquema ilustrativo da possvel dinmica de expresso das protenas transportadoras relacionadas resistncia; Modificado: Sarkadi et al., 2006

Figura 04 - Ilustração da possível dinâmica dos substratos de uma bomba ABC. A internalização, seguida da exclusão, que é bloqueada por substâncias capazes de inutilizar os transportadores; *Modificado: Colabufo et al., 2008*

3.6.1. P-glicoproteína

A P-glicoproteína (P-gp) foi descrita primeiramente por Juliano e Ling 1976, como glicoproteína de alto peso molecular componente da membrana plasmática de células ovarianas de *hamsters* chineses, selecionadas por drogas. A princípio, conferiu-se à P-gp, um papel importante na modulação da permeabilidade celular ("P" representa permeabilidade). Estudos moleculares posteriores revelaram, a existência de várias outras proteínas transportadoras semelhantes a P-gp, pertencentes à super-família ABC (Germann et al., 1998).

A P-gp é uma bomba ATPase, constituída de 1276-1280 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 170kDa, codificada pelo gene ABCB1/MDR1 (*ATP-binding cassette, sub-family B, member 1 / Multidrug Resistance protein 1*), localizado no cromossomo 7q21.1. Este transportador ABC, foi o melhor caracterizado e o primeiro a ser clonado, devido ao seu papel no fenótipo de resistência às múltiplas drogas. A P-gp possui conformação de estrutura dupla, onde cada metade da molécula contém um domínio ligado a um nucleotídeo. É composta de seis domínios transmembrana altamente hidrofóbicos, que são considerados os caminhos por onde as moléculas atravessam a membrana (Figura – 05). A hidrólise do ATP gera várias mudanças conformacionais nestes caminhos, permitindo a abertura do poro em toda a profundidade da bicamada lipídica, por onde ocorre o trânsito de substratos (Dean et al., 2001; Zhou et al., 2006).

Figura 05 – Esquema ilustrativo da estrutura secundária da P-glicoproteína, demonstrando a disposição dos domínios transmembrana no ambiente extracelular (Extra) e intracelular (Intra), os domínios ligados ao nucleotídeo ATP. *Modificado: Leslie et al., 2005*

P-gp pode ser expressa nas membranas apicais do epitélio intestinal, células hepáticas, túbulos renais e barreira hematoencefálica. No entanto, a P-gp também é expressa nas glândulas adrenais, células natural killer (NK), células dendríticas apresentadoras de antígenos (DC), linfócitos T e B, células-tronco hematopoéticas e trofoblastos da placenta. Entretanto, são poucas as funções naturais bem estabelecidas da P-gp nos mamíferos (Johnstone et al., 2000).

Sugere-se que, nos rins, a P-gp seja responsável por translocar o fator de ativação plaquetário (FAP) através da membrana. Encontrado em diversos tecidos, no plasma e em fluidos extracelulares, como na saliva e urina, o FAP possui diversos efeitos biológicos, dentre os quais, a ativação de células inflamatórias, diminuição da função renal e participação em várias condições patológicas, como angiogênese tumoral e metástases. Estudos também conferem à P-gp, a habilidade de regular a esterificação do colesterol, que possivelmente se encontra interligada a outra atividade desta bomba, a regulação da translocação de cadeias curtas de fosfolipídios análogos e endógenos, como a esfingomielina. Na superexpressão, a P-gp pode causar o esgotamento da esfingomielina na membrana plasmática, processo que induz a esterificação compensatória do colesterol. A partir disto, há hipótese de que as células com metabolismo acelerado ou submetidas a um ambiente sem nutrientes apresentem quantidades aumentadas da P-gp (Johnstone et al., 2000; Mizutani et al., 2008).

A P-gp também pode atuar na regulação da morte celular programada, conferindo resistência a apoptose induzida por Fas ligante,

TNF- α , radiação UV e uma variedade de quimioterápicos. Estes estímulos induzem a ativação da cascata de morte celular mediada pela família das proteases cisteínas, denominadas caspases. Além disso, podem modular a atividade citolítica de células NK e linfócitos T CD8+. Sendo assim, a superexpressão deste transportador pode desencadear resistência à morte e diminuição de mecanismos inibidores da formação de células cancerígenas, favorecendo a tumorigênese (Johnstone et al., 2000; Zhou et al., 2008).

3.6.2. MRP1 (*Multidrug resistance-related Protein 1*)

A ramificação “C”, da super-família de transportadores ABC, contém o maior número de proteínas que conferem resistência aos quimioterápicos, sendo assim, de importância nos estudos para o tratamento do câncer. A MRP1 (*Multidrug resistance-related Protein 1*), codificada pelo gene ABCC1 (*ATP-binding cassette, sub-family C, member 1*), foi o primeiro membro desta família a ser clonada, em 1992, a partir da linhagem celular humana de câncer de pulmão H69AR, selecionada por exposições repetidas a antraciclina doxorrubicina. Inicialmente, foi confundida com a P-gp, por possuírem características em comum. No entanto, estudos mais aprofundados, estabeleceram que a MRP1, confere resistência a diferentes produtos naturais e drogas, além de possuir estrutura incomum, formada por cinco domínios adicionais ligados a formação amina terminal extracelular, além de dois domínios ligados aos nucleotídeos ATP, e quatro

transmembrana, típicos da família ABC (Figura – 06) (Borst et al., 2000; Borst et al., 2001; Deeley et al., 2006).

Figura 06 – Esquema ilustrativo da estrutura secundária da MRP1 (*Multidrug resistance-related Protein 1*), demonstrando a disposição dos domínios transmembrana no ambiente extracelular (Extra) e intracelular (Intra), o grupamento amina terminal extracelular e os domínios ligados ao nucleotídeo ATP. Modificado: Leslie et al., 2005

O primeiro substrato fisiológico confirmado da MRP1 foi o mediador pró-inflamatório LTC₄ (Leucotrieno C₄) produzido por mastócitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, plaquetas, rins, cérebro, fígado e em células endoteliais. A MRP1 também transporta outros substratos tais como folato, glutathione (GSH) e variantes, conjugados com endo e xenobióticos, esteróides e prostaglandina. Estudos *in vitro* comprovaram este transporte de conjugados orgânicos, como é o caso de compostos tóxicos, que ao entrarem no organismo podem ser modificados pela oxidação, ou através da conjugação com glutathione (GSH), sulfato, ou

glucuronato, tornando-se mais solúveis em água, ou seja, compostos hidrofílicos, impossibilitados de sair do interior das células por difusão, a MRP1 faz este transporte de forma ativa. Aparentemente, o GSH sem conjugado, é um substrato pobre para a MRP1, mas na presença do segundo substrato, há co-estimulação recíproca. (Deeley et al., 2006; Borst et al., 2001).

A MRP1 é normalmente expressa em altos níveis no pulmão, testículos, rins, musculatura esquelética e cardíaca, placenta, células cancerígenas e hepatócitos em proliferação, embora, raramente detectável em células quiescentes do fígado. Este transportador está localizado predominantemente na membrana plasmática como componente basolateral em células polarizadas, em contraste com a localização apical das bombas P-gp/MDR1. No entanto, alguns tipos celulares como em trofoblastos da placenta e endotélio de microvasos cerebrais, encontra-se expressa na região apical da membrana. O mecanismo que determina esta expressão em diferentes compartimentos da membrana ainda permanece desconhecido (Deeley et al., 2006).

3.6.3. LRP (*Lung resistance-related protein*)

Embora não integre a família ABC, a LRP (*Lung resistance-related protein*) é uma das proteínas relacionadas à resistência a drogas. Foi descoberta por Scheper (1993), em células de câncer de pulmão. Anos mais

tarde, Scheffer e colaboradores, demonstraram sua analogia às MVP (*Major Vault Proteins*), e identificaram ambas, LRP/MVP, como a mesma proteína (Scheper et al., 1993; Scheffer et al., 2000; Sunnaram et al., 2003).

A MVP foi observada eventualmente por Kedersha e Rome, em 1986, e referidas como contaminantes na técnica de preparação de vesículas revestidas de claritina, provenientes do fígado de ratos. Desde então, foi encontrada em diversas espécies de anfíbios, aves e mamíferos, conservando a sua estrutura, que parece ser de vital importância na sua função. A morfologia da MVP é ovóide e incomum, com formato de barril, semelhantes aos arcos que formam as abóbadas das catedrais góticas. Baseando-se nesta simetria foram denominadas “*vault proteins*”, ou proteínas abóbadas. Kong e colaboradores demonstraram o arranjo peculiar da MVP, a partir da reconstrução de imagem 3D, onde é possível observar que seu interior é oco e suas paredes sólidas (Figura – 07). Desde então outros transportadores com as mesmas características vem sendo descobertos, e integrando a família de proteínas *Vault*. (Kong et al., 1999; Kong et al., 2000; Scheffer et al., 2000).

Figura 07 – Imagens obtidas por microscopia crioeletrônica; A) *vaults* sob camada de gelo vítreo (Kong et al., 2000); B) reconstrução 3D da imagem aproximada (Kong et al., 1999)

Em mamíferos, a família *vault* é composta por três proteínas: *vault poly (ADP-ribose) polymerase* (vPARP, 193 kDa), proteína associada à telomerase (TEP1, 240 kDa) e a *Major Vault Protein* (MVP, 100 kDa). Estas foram caracterizadas como as maiores partículas de ribonucleoproteínas já descritas, ou seja, proteínas associadas a pequenas moléculas de RNA não traduzidos denominados *vault* RNA (vRNA). Cada complexo contém de 8 a 16 vRNA de 88 -141 bases, que podem interagir tanto com o interior, quanto exterior da molécula. Parson e colaboradores sugerem, que estes RNA não codificados podem possuir função similar aos miRNA, e regular a expressão de enzimas como CYP3A4 (Cytochrome P450 3A4), intimamente envolvida no metabolismo de xenobióticos (Mossink et al., 2003; Berger et al., 2009; Persson et al., 2009).

A LRP é uma proteína abundante com níveis de expressão aproximadamente de 105 vaults por célula madura de um mamífero. Apesar desses níveis generalizados, a expressão pode ser estritamente regulada por condições como transformação maligna da célula, senescência ou idade avançada, hipertermia, tratamento com estradiol, resistência a quimioterápicos ou até mesmo exposição em curto prazo aos antineoplásicos ou drogas indutoras de diferenciação celular e durante o desenvolvimento (Berger et al., 2009; Mossink et al., 2003).

Há indícios que a localização celular das *vaults* pode variar, dependendo do tipo e espécie celular além do estímulo externo. A maioria dos relatos corrobora que, nos mamíferos mais de 90% das LRPs estão localizadas no citoplasma, embora alguns subgrupos tenham sido

encontrados na membrana nuclear de células cancerígenas humanas. A superexpressão em tumores, não responsivos aos quimioterápicos, indica que a LRP está associada e envolvida ao fenótipo de resistência. Por estes motivos, as Vaults e LRP são relacionados, na literatura atual, com a oncologia clínica e às proteínas da família ABC (Berger et al., 2009; Mossink et al., 2003).

As funções atribuídas a LRP/MVP ainda necessitam ser melhor definidas. Ao que se conhece, baseiam-se, principalmente, na sua estrutura única, tipo barril, implicando no transporte de substâncias. Há a hipótese que, podem atuar na resistência a drogas, levando-as para longe do seu alvo intracelular, através da internalização ou promovendo a retirada do citoplasma ou núcleo, por meio de vesícula de exocitose ou bombas como a P-gp e MRP1 (Figura – 08) (Scheffer et al., 2000; Berger et al., 2009).

Figura 08 – Esquema ilustrativo da possível dinâmica da LRP/MVP associada a P-gp e MRP1, na presença de xenobióticos no ambiente intracelular. *Modificado: Scheffer et al., 2000*

Notavelmente, diversos trabalhos associam a LRP à maturação celular, em diversos tipos de cânceres. Embora haja controvérsias, estudos demonstraram alta expressão em células de diversos tipos de cânceres submetidos à diferenciação artificial. O trabalho de Schroeijers evidenciou que, o bloqueio da LRP causou distúrbios na maturação de células dendríticas humanas, e sugere que esta proteína exerça papel fundamental na proteção celular contra o estresse (Izquierdo et al., 1996; Schroeijers et al., 2002; Klunder et al., 2003).

3.7. Células-tronco mesenquimais e resistência às drogas

Células normais assemelham-se em sua resposta a uma determinada droga, em contrapartida, células tumorais respondem, cada uma, a sua maneira. Células cancerígenas possuem uma composição genética diferente, dependendo não somente do tecido de origem, mas também, do padrão de ativação dos oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais, bem como das alterações aleatórias na expressão gênica, conferindo a cada tipo de câncer um arranjo genético diferente. Mesmo quando o tumor não é intrinsecamente resistente, frente a um tratamento com potentes antineoplásicos, ocorre uma seleção de células variantes resistentes a estes medicamentos, que podem produzir um novo tumor, a partir disto surgiu conjectura das células-tronco cancerosas (CTC) (Gottesman et al., 2002).

A teoria das CTC propõe que, um tumor se arranja de forma hierárquica, onde somente uma pequena porção celular é capaz de iniciar e promover o avanço do câncer. Acompanhando esta teoria, há a hipótese de que estas células podem ser identificadas, devido às propriedades peculiares, como a superexpressão das proteínas ABC. Este fenótipo foi intitulado “*side population*” (SP), ou seja, porção de células-tronco com potencial acentuado. A caracterização da SP, parte da capacidade destas células de excluírem substratos do seu interior, devido à intensa atividade de bombas ABC, que por sua vez, atribuem resistência aos quimioterápicos a estas células, facilitando sua sobrevivência frente ao tratamento (Croker & Allan, 2007; Stavrovskaya & Stromskaya, 2008).

As CTC e as células-tronco normais possuem diversas características semelhantes, e a expressão de proteínas ABC é uma delas. A BCRP (*Breast Cancer Protein* / ABCG2), bomba típica em diversos tipos de cânceres, é considerada como marcador específico das células-tronco hematopoiéticas, confirmado pela exclusão do corante fluorescente Hoechst 33342, substrato específico desta bomba. A existência de SP na medula óssea já foi confirmada, a partir da exclusão dos corantes Hoechst 33342 e Rhodamina 123, específicos para BCRP (*Breast Cancer Protein* / ABCG2), e P-glicoproteína (ABCB1), respectivamente (Zhou et al., 2002).

No trabalho de Bunting, células-tronco hematopoiéticas induzidas à hiperexpressão da P-glicoproteína demonstraram, expansão progressiva seguida de síndrome mieloproliferativa. Estes dados indicam que, nas células-tronco, a P-gp pode influenciar nas decisões de autorrenovação e

repovoamento tecidual. Embora ainda seja obscuro o mecanismo desta modulação, há a hipótese que a P-gp previna a diferenciação celular, o que manteria as células em expansão (Bunting et al., 1998; Johnstone et al., 2000).

De forma simplificada, a diferenciação celular consiste num processo gradual, que origina diferenças entre as células de um indivíduo, ou seja, as células adquirem uma identidade distinta em termos funcionais e estruturais. No decorrer do desenvolvimento, a característica central da diferenciação celular, é a mudança de expressão gênica que acarreta na produção de proteínas célula-específicas. Trabalhos demonstraram a diminuição da expressão da P-gp durante a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas. Fenômeno similar foi observado na SP do tecido cardíaco, nos primórdios do desenvolvimento, que perderam suas propriedades como a expressão de BCRP durante o processo de diferenciação. (Johnstone et al., 2000; Wolpert, 2000; Reik, 2007; Huls et al., 2009).

Agentes externos podem influenciar o padrão da expressão gênica, ao entrar nas células e ativar a expressão por meio da ligação com as proteínas receptoras, permitindo a atuação direta no núcleo. Quando se trata de células-tronco adultas, estes sinais podem causar estresse suficiente para inviabilizá-las para futuros processos regenerativos ou causar tumorigênese, no entanto, nas células-tronco de um organismo nos primórdios do desenvolvimento, pode levar à teratogênese, má formação e até aborto. Por isto, o ambiente perinatal se encontra protegido por barreiras que impedem ao máximo a interação de substâncias tóxicas com o feto ou embrião. Sendo

assim, a compreensão da relação entre as proteínas causadoras de resistência, conhecidas como poderosas armas contra xenobióticos, e as células-tronco mesenquimais (CTM) é de grande valia, uma vez que, a atuação destas células em processos como no suporte da hematopoiese e na recuperação de pacientes submetidos à quimioterapia e transplante de medula óssea, é de grande importância em organismos adultos, bem como, em um organismo desenvolvimento, onde podem atuar como componentes da homeostase e organogênese (Wolpert L, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Este foi um estudo experimental desenvolvido no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM31, previamente aprovado pelo: Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da FMUSP; Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da FMUSP; e finalmente pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq - protocolo de pesquisa nº 620/11).

Para o presente estudo foram coletadas e processadas 37 amostras no total, sendo 25 de líquido amniótico humano e 12 de medula óssea humana. Previamente às coletas, todos os pacientes envolvidos autorizaram o uso das amostras, através do protocolo de consentimento livre e esclarecido, em conformidade com as normas da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP.

As amostras de líquido amniótico (LA) humano utilizadas eram volumes excedentes que seriam descartados após exames de cariotipagem e vitalidade fetal, realizados no segundo trimestre de gestação (entre a 15° e 18° semanas) no ambulatório do Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Foram excluídas as amostras que apresentaram cariótipo anormal do feto ou a presença de sangue, para evitar contaminações com células progenitoras de origem hematopoética e/ou sangue materno.

As amostras de medula óssea (MO) humana foram obtidas de pacientes submetidos à cirurgias, para correções ortopédicas devido a traumas, executadas no Instituto de Ortopedia e Traumatologia (IOT) do Hospital das Clínicas da FMUSP. Destas, foram excluídas amostras de pacientes com doenças genéticas previamente diagnosticadas.

Ao decorrer do estudo foram excluídas amostras que, não cresceram em ambiente de cultivo ou foram inviabilizadas devido contaminações. Por fim, foram avaliadas 20 amostras de líquido amniótico e 6 amostras de medula óssea.

4.2. Pré-cultivo

4.2.1. Líquido amniótico

4.2.1.1. Coleta

As amostras de líquido amniótico foram obtidas pela técnica de amniocentese, onde primeiramente por meio de uma ultrassonografia foram confirmadas a idade gestacional, localização da placenta, volume de líquido amniótico, morfologia e vitalidade fetal. Após estes exames iniciais foi feita a punção através da parede abdominal e da parede uterina, atingindo a cavidade amniótica, sempre com o trajeto da agulha monitorado por ultrassonografia, na procura de um grande bolsão de líquido, distante do

feto, de modo a preservá-lo. O volume inicial foi desprezado a fim de evitar a contaminação com sangue materno (Figura - 09).

Todas as amostras foram mantidas em ambiente refrigerado a 4°C até o momento do processamento.

As pacientes foram orientadas a respeito dos possíveis sintomas pós-procedimento, tais como: dor, febre, perda de líquido ou sangramento e permaneceram em repouso antes de serem liberadas.

Figura 09 - Ilustração da técnica de amniocentese. *Modificado: Mayo Foundation for Medical Education and Research*

4.2.1.2. Processamento

O volume médio do excedente de cada amniocentese variou de 2 a 5 ml. Inicialmente este volume foi transferido, em ambiente estéril, para um tubo cônico e centrifugado a 450 X g por 10 minutos. Em seguida o sobrenadante foi desprezado, obtendo assim um botão celular que foi lavado

com tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) e centrifugado novamente a 450 X g por 10 minutos. O sedimento celular resultante foi utilizado para o cultivo.

4.2.2. Medula óssea

4.2.2.1. Coleta

As amostras de medula óssea (MO) humana foram obtidas por meio de uma única punção e aspirado da crista ilíaca de pacientes submetidos à cirurgias ortopédicas próximas da região lombar, executada no centro cirúrgico pelo Grupo de Coluna do IOT HC-FMUSP, portanto os pacientes foram mantidos sedados durante todo o procedimento. A punção foi feita com agulha de biópsia, não necessitando de incisão, reduzindo assim a perda de sangue (Figura – 10). As amostras foram coletada em tubos com anticoagulante, citrato trissódico 3mg/ml (Merck Chemicals, Brazil), para evitar a formação de coágulos, e consequente perda do material, e processada logo após a extração.

Após a coleta os pacientes foram mantidos em observação em UTI pós-operatória pelo tempo necessário para cada caso.

Figura 10 - Ilustração da coleta de amostra de medula óssea por punção da crista ilíaca. *Modificado: ADAM*

4.2.2.2. *Processamento*

Em média o volume dos aspirados esteve entre 1 e 3 mL. Cada amostra foi diluída em tampão PBS (*Phosphate Buffer Saline*) na concentração 1:2 (v:v), e em seguida, adicionada lentamente em um tubo cônico contendo 5ml de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, EUA), de maneira que as duas fases se mantiveram separadas. A solução foi centrifugada a 450 x g por 30 minutos à temperatura ambiente com parada lenta (centrífuga sem freio), e o produto resultante foi uma solução com 4 fases sedimentadas de acordo com a densidade de cada componente da amostra (Figura - 11).

Figura 11- Ilustração do processamento de amostra líquida de medula óssea após centrifugação com reagente Ficoll-Paque™. Na visualização do produto é possível observar as frações da solução separadas por gradiente de densidade como plasma, células mononucleadas, o reagente Ficoll-Paque™ e os eritrócitos.

A camada contendo o concentrado das células mononucleadas foi retirado e transferido para um novo tubo, onde foram adicionados 10 ml de tampão PBS seguido de centrifugação a 450 X g por 10 minutos, afim de eliminar qualquer vestígio de Ficoll, afim de, evitar toxicidade. Esta etapa foi repetida 3 ou mais vezes se necessário. Por fim, o sedimento celular foi ressuspenso em meio de cultura e plaqueado para o cultivo.

4.3. Cultivo

Seguindo protocolo previamente padronizado em nosso laboratório para o cultivo primário, o sedimento celular resultante do processamento de cada amostra foi inoculado em garrafa de cultivo pequena de 75cm² em meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20% de

soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich®, EUA) e acondicionadas em incubadora a 37°C com 85% de umidade e atmosfera de CO₂ a 5% (Thermo Forma, EUA).

As culturas primárias foram mantidas apenas com adição de meio suplementado, por aproximadamente 10 dias. A primeira troca de meio, selecionou somente as células aderentes à superfície de cultivo, uma das características das células mesenquimais. Após o aparecimento de quatro ou mais unidades formadoras de colônias (UFC), foi efetuada a primeira dissociação das células em cultivo (também conhecida como passagem). O meio de cultura foi removido, as células lavadas com PBS e incubadas com ATV (solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil) a 37°C por aproximadamente 4 minutos ou até se soltarem. Após o destacamento, as células foram lavadas com meio de cultura suplementado com SFB, para inativar da ação do ATV, e centrifugadas a 450 X g por 5 minutos. O botão celular resultante, foi ressuspenso em meio suplementado e as células contadas.

As contagens foram feitas em hemocitômetro (câmara de Neubauer; Optik Labor, Alemanha), com o corante de exclusão Azul de Tripan (Sigma-Aldrich®, EUA), que é internalizado pelas células com membranas lisadas, tingindo-as de azul (células inviáveis ou mortas) e, mantendo as células viáveis refringentes.

Em seguida, as células foram semeadas em uma densidade de inóculo de 5.000 céls/cm². A partir de então, o meio passou a ser trocado três vezes

por semana até as culturas atingirem 80% de confluência, quando foram novamente dissociadas.

As amostras foram observadas durante diversas passagens para determinar o período ideal da utilização da população isolada nos experimentos posteriores.

Para determinar a presença de células-tronco mesenquimais nas populações, isoladas das amostras de líquido amniótico e medula óssea, foram seguidos os pré-requisitos sugeridos na literatura, bem como, os determinados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominicci et. al., 2006).

4.4. Caracterização das células-tronco mesenquimais

4.4.1. Expressão dos genes de indiferenciação

Para comprovar a presença de células nos estágios iniciais de desenvolvimento nas populações isoladas, a expressão dos genes de indiferenciação Oct-4, Nanog e o gene endógeno β -Actina foi determinada, por meio da técnica de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Os resultados deste teste foram tomados como critério de seleção das amostras que seguiriam no estudo. Onde foram mantidas apenas as amostras que expressaram ambos os genes de indiferenciação juntamente com o gene endógeno (iniciadores em Anexo A, Tabela – 01).

4.4.2. Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi determinada pela técnica de citometria de fluxo para a confirmação da presença de antígenos na membrana plasmática característicos de células da linhagem mesenquimal e a ausência de proteínas específicas de outros tecidos, sobretudo da linhagem hematopoética.

Inicialmente, as células foram lavadas com tampão PBS e dissociadas da superfície de cultivo com a utilização da solução de ATV. Em seguida, foram centrifugadas a 450 X g e o botão celular resultante ressuspenso em PBS. As células viáveis foram contadas e inoculadas, aproximadamente 1×10^5 em cada tubo próprio para citometria de fluxo (Becton Dickinson, EUA), onde foram adicionados anticorpos monoclonais conjugados com os fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritina (PE). Controles isotípicos (IgG1) foram utilizados para a calibração adequada do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. O painel de anticorpos utilizado foi: CD105, CD29, CD44, CD90, CD45, CD31, CD34 e CD14 (todos da Caltag, Invitrogen, Brasil). Em seguida, as amostras foram incubadas em campo escuro a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente lavadas com PBS e novamente centrifugadas. O botão celular, de cada amostra, foi ressuspenso em 500µl de paraformaldeído 1% (Sigma-Aldrich®, EUA). A aquisição foi feita em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur, EUA) e os dados analisados pelo programa BD CellQuest Pro® (BD, EUA).

As amostras foram classificadas de forma qualitativa, de acordo com a porcentagem de positividade da população (Tabela - 02).

Tabela 02 – Valores de referência para a qualificação das populações avaliadas por citometria de fluxo. Populações com positividade até 5% = negativas; 5 – 50% = fraco positiva; acima de 50% positiva

Positividade	Qualificação
< 5 %	Negativa
5 – 50%	Fraco positiva
> 50%	Positiva

4.4.3. Ensaios de Diferenciações

Cerca de 5×10^3 células foram semeadas em placas de 6 poços para realização de cada ensaio de diferenciação celular. O protocolo teve início no momento em que as culturas atingiam aproximadamente 70-80% de confluência. Neste momento, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para cada diferenciação ou somente pelo meio de cultura (α -MEM suplementado com 20% de SFB) para o controle indiferenciado. Os respectivos meios foram trocados duas a três vezes por semana durante aproximadamente 21 dias. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Após a indução completa, a diferenciação foi confirmada por meio de colorações e análise da expressão gênica (sequência de iniciadores em Anexo A, Tabela - 01).

4.4.3.1. Diferenciação Osteogênica

Foi utilizado meio α -MEM contendo 20% de SFB e 1% de antibióticos suplementado com dexametasona 100nM, ascorbato-fosfatase 50 μ g/ml e β -glicerofosfato 10 mM (todos da Sigma-Aldrich[®], EUA). Para visualizar a produção de íons cálcio pelas células tratadas e confirmar o protocolo de diferenciação óssea foram realizadas as colorações com Vermelho de Alizarina e von Kossa (todos da Sigma-Aldrich[®], EUA) .

Para caracterizar a diferenciação osteogênica das CTM, foi feito, além das colorações, a análise da expressão de genes chaves envolvidos neste processo, como osteopontina e osteocalcina, pela técnica da reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (RT-PCR). Como controle endógeno foi utilizado o gene da β -actina (Anexo A, Tabela - 01).

4.4.3.2. Diferenciação Adipogênica

Foi utilizado meio α -MEM com 20% SFB contendo dexametasona 1 μ M, isobutilmetilxantina 0,5 mM, indometacina 100mM e insulina 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich[®], EUA). A diferenciação adipogênica foi confirmada pela visualização do acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos através da coloração de Oil Red O (Sigma-Aldrich[®], EUA) e pela análise da expressão de genes típicos do tecido adiposo, como PPAR-gama e lipoproteína lipase, pela técnica de RT-PCR. Como controle endógeno foi utilizado o gene da β -actina. (Anexo A, Tabela - 01).

4.4.3.3. Diferenciação condrogênica

Foi utilizado meio α -MEM contendo dexametasona 100 nm (Sigma-Aldrich®, EUA) e TGF- β 1 10 ng/ml (Calbiochem, EUA). As células foram semeadas e tratadas em tubos cônicos de 15 ml (densidade de inóculo: 2×10^6 células) que foram centrifugados a 400 X g por 10 minutos para a formação de um sedimento celular compacto. Após 21 dias em cultura, a diferenciação condrogênica foi confirmada através da coloração específica de proteoglicanas com o corante Azul de Toluidina (Sigma-Aldrich®, EUA) em cortes histológicos dos botões celulares obtidos. Estes cortes foram realizados no Laboratório de Anatomia e Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Também foi realizada a reação de RT-PCR para pesquisa de genes associados ao processo de diferenciação condrogênica: perlecan e syndecan. Como controle endógeno de todas as reações foi utilizado o gene da β -actina. (Anexo - 01).

4.5. Condições das reações de RT-PCR

Foram realizadas PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) para avaliar a expressão dos genes de indiferenciação e genes específicos para cada tecido de origem mesenquimal em que as amostras de LA e MO foram diferenciadas. As reações foram realizadas com os reagentes do kit

Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™, EUA), e o equipamento utilizado foi o termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

Cada reação foi feita com 1,5 mM de MgCl₂, aproximadamente 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 10 mM de Tris HCl, 60 mM de KCl, 200 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP). Concentração mínima de 1 µg de cDNA foi utilizado para cada reação. Todos os *primers* senso e antissenso foram ressuspensos em água tratada com DEPC.

As condições ideais para a reação de PCR foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação, em seguida a amplificação por 35 ciclos consistindo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos primers de 55°C a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 8 minutos. Os produtos da PCR foram analisados através de um gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) (ambos da Sigma-Aldrich®, EUA) visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

4.6. Caracterização da P-glicoproteína nas CTM

4.6.1. Caracterização do controle positivo de resistência

Para os experimentos de caracterização do fenótipo de resistência às drogas, fez-se necessária a escolha de um controle positivo e negativo. Baseando-se na literatura, foram selecionadas as linhagens MES-SA e MES-SA/DX5 (sarcoma uterino ATCC-CRL-1976; ATCC-CRL-1977).

A MES-SA (MES-S) é uma linhagem comercial de sarcoma uterino pouco diferenciada e sensível a vários agentes quimioterápicos. Estas células foram tratadas com doxorrubicina (DOX), pertence à família das antraciclinas, é um intercalante de DNA, e está entre os quimioterápicos mais utilizados no tratamento do câncer. O tratamento selecionou as células resistentes a esta droga, que foram intituladas MES-SA/DX5 (MES-DX). Além da DOX, apresentam resistência cruzada a outros quimioterápicos como vincristina, vimblastina, etoposídeo entre outros, e expressam altas concentrações de mRNA do gene ABCB1, que codifica a P-gp.

As células foram mantidas de acordo com as instruções do fornecedor, ATCCTM, em meio McCoy's 5A (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 10% de SFB, incubadas em incubadora úmida com 5% de CO₂.

Para garantir a resistência de forma homogênea, a linhagem MES-DX foi submetida ao tratamento com alta dose de DOX (1000 nM) durante 24h,

a fim de selecionar as células mais resistentes. Após este período, foi feita a verificação da presença da P-gp por imunocitoquímica das células tratadas e não tratadas, bem como, a expressão dos genes ABCB1, ABCC1, LRP e do gene GUSB como controle endógeno, através da técnica de RT-PCR. Os produtos da reação foram dispostos em gel de agarose 2%, com adição de brometo de etídio, e posteriormente visualizados em transluminador UV.

4.6.2. Imunocitoquímica da P-gp

Foram realizados ensaios de imunocitoquímica para a visualização da distribuição da P-gp na população de células. Para isto, foi utilizado anticorpo de camundongo anti-humano para P-gp (Zymed, EUA) e kit de revelação Novo LinkTM Polymer Detection System (NovocastraTM, UK). Como controle positivo foram utilizadas as células MES-DX resistentes.

As células foram cultivadas por 2 a 4 dias em lâminas específicas para este propósito (*Chamber Slide System*; Lab-Tek Brand Products, EUA). Após esse período o meio de cultura foi removido e as lâminas lavadas com PBS durante 5 minutos, em seguida, foram incubadas com acetona gelada por 7 minutos para fixação e secadas em temperatura ambiente. As amostras que não foram utilizadas imediatamente ficaram armazenadas em freezer -20°C.

As incubações foram realizadas em câmara úmida e escura, sendo que antes e depois de cada uma, as lâminas foram submersas por 5 minutos em tampão TBS (*Tris Buffer Saline*), por duas vezes, para hidratação e lavagem.

As lâminas foram incubadas com bloqueador da enzima peroxidase e bloqueador de ligações inespecíficas por 5 minutos cada e, logo após, foram incubadas com o anticorpo primário por no mínimo 90 minutos. Em seguida, foram incubadas com solução pós-anticorpo primário e de polímero secundário durante 30 minutos cada, respectivamente. A revelação foi baseada no consumo do substrato AEC (3-Amino 9-Ethyl Carbazole) (Sigma-Aldrich®, EUA) por até 30 minutos. Para coloração do núcleo e citoplasma, as lâminas foram contra-coradas com H&E (hematoxilina-eosina) (Sigma-Aldrich®, EUA) e finalmente visualizadas por microscopia óptica.

As imagens das colorações foram obtidas por microscopia óptica e a partir destas, foi feita a quantificação da marcação, por meio do *software* Image-Pro Plus 7.0. Para isto, foram fotografados 25 campos por lâmina e de forma individual, selecionadas as áreas ocupadas por células, e nestas feitas a valoração em pixels da coloração correspondente ao substrato AEC (tons de vermelho). Foi feita a razão entre área corada/ área total X 100, estimando assim a porcentagem de marcação em cada tipo celular.

4.6.3. Ensaio de viabilidade celular

As células-tronco de líquido amniótico e medula óssea foram avaliadas quanto à sua resistência ao quimioterápico doxorrubicina por meio

do método colorimétrico de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

Conforme método de Carmichael (1987) modificado, foram inoculadas 1×10^3 células/poço em placa de 96 poços (*TPP Flat 96 Well Plate for cell culture work*). Após a aderência destas células à superfície, foram feitas 6 réplicas de 8 concentrações diferentes da diluição seriada do quimioterápico doxorrubicina (Doxil[®]), que variaram de 0,0625 a 1000 nM. Em seguida, cada placa foi incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Ao final deste período, foram adicionados a cada poço 10 µl de MTT (Sigma-Aldrich[®], EUA) a 5mg/ml. Em seguida, foram incubadas, nas mesmas condições acima citadas, por um período de 4 horas, até a completa absorção do sal de MTT pelas células e sua redução pelas mitocôndrias das células viáveis. O produto resultante desta metabolização é a formazana, que se mantém acumulado em forma de cristais no interior das células. Estes cristais foram diluídos com álcool isopropílico (Merck, Alemanha), dando origem a uma coloração azul, que varia de acordo com a concentração da formazana em cada poço (Mosmann, 1983). A leitura das concentrações finais foi obtida por espectrofotometria em leitor de placas (BioTek ELx 800) em 570 e 620nm, sendo que foram utilizadas as diferenças entre as absorbâncias dos respectivos comprimentos de onda. Os dados obtidos foram analisados no GraphPad Prism 5 software (GraphPad, Inc.), obtendo-se a curva de viabilidade celular e o IC₅₀, que consiste na concentração de fármaco necessária para promover 50% de inibição da população alvo de cada amostra.

4.6.4. Exclusão de Rhodamina 123

Para avaliar a atividade da P-gp, foi realizado o teste de exclusão do corante Rhodamina 123 (Rh123) (Sigma-Aldrich®, EUA) conhecido como um dos substratos da P-glicoproteína (Pétriz & García-López, 1997; Warrington et al., 2004; Vilas-Boas et al., 2011).

As células foram mantidas em ambiente de cultivo, a 37°C com 5% de CO₂ em incubadora úmida e escura, durante 1 hora com meio α -MEM suplementado com 20% de SFB e Rh 123 a 2mM. Após este período, as células foram lavadas com PBS e destacadas da superfície de cultivo com ATV, ambos acrescidos com Rh 123 a 2mM. Em seguida, as células foram centrifugadas a 450 X g, durante 5 minutos, o botão celular resultante foi ressuspensão em PBS normal. Aproximadamente 1×10^5 células foram inoculadas em tubos próprios para citometria e incubadas em gelo, durante 10 minutos. Logo após, foi adicionado nos tubos determinados, o bloqueador verapamil (200 μ M; Sigma-Aldrich®, EUA) que inibe a atividade de proteínas transportadoras. Os tubos, com e sem verapamil, foram retirados do gelo e incubados em ambiente de cultivo durante os períodos de 1, 2 e 4 horas, para a exclusão do corante previamente internalizado. Após este período, as células foram avaliadas pelo método de citometria de fluxo (FacsCalibur, BD, EUA) e os resultados obtidos foram analisados pelo *software* BD CellQuest Pro (BD, EUA).

A análise dos dados foi feita segundo Patel e colaboradores em 2002, que observaram a exclusão do corante a partir do aumento da porcentagem

da população com baixa fluorescência e a internalização na diminuição da mesma população. A dinâmica da fluorescência das células internalizadas com Rh123, após os períodos de exclusão de 1, 2 e 4 horas, foi baseada em *markers* que englobaram as baixas fluorescências no momento 0h de incubação, elaborados individualmente para cada tipo celular, como o exemplo da Figura – 12 (Patel et al.b, 2002).

Figura 12 - Ilustração que exemplifica a análise da exclusão de Rhodamina 123 (Rh123) a partir de dados obtidos por citometria de fluxo A) Histograma de amostra submetida à 0h de exclusão onde foi feito o *marker* (M1) base; B) a mesma amostra submetida a período de exclusão, onde o segmento preenchido do histograma demonstra células que promoveram efluxo do corante. *Modificado: Patel, 2002*

4.7. Expressão dos genes de resistência às drogas

A quantificação relativa da expressão dos genes que codificam proteínas causadoras de resistência às drogas: ABCB1, ABCC1 e LRP (iniciadores Anexo A, Tabela - 01) foi realizada pela técnica de RT-PCR em tempo real a partir das células-tronco mesenquimais isoladas de líquido

amniótico e medula óssea indiferenciadas e diferenciadas em tecidos adiposo e ósseo. Como controle positivo da expressão dos genes alvo foi utilizada a linhagem celular MES-DX. A padronização da técnica, que precedeu a sua aplicação, será descrita a seguir.

4.7.1. Gene normalizador

Para efetuar uma quantificação relativa faz-se necessária a presença de um gene normalizador. Para isso, é comum a utilização de um gene endógeno, ou seja, cuja expressão não apresente variação estatisticamente significativa entre as amostras analisadas. No entanto, diversos estudos comprovam que variações desses genes podem ser observadas, tanto em amostras de diferentes tecidos, quanto nas mesmas em diferentes condições de tratamento (Barber et al, 2005; Kagedal et al., 2007; Schmittgen & Zakrajsek, 2000; Nishimura et al., 2008).

Sendo assim, é de grande importância a escolha do gene ideal para cada tipo de amostra. Para este fim, foram testados 4 genes considerados constitutivos: GAPDH, que transcreve a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, importante no metabolismo energético dos carboidratos; LMO2 (*LIM domain only 2*), que possui papel crucial na regulação da hematopoiese desde o início do desenvolvimento humano; GUSB, cujo produto é a enzima glucuronidase beta, que hidrolisa glicosaminoglicanas, localizada no lisossomo; e o gene RFPL1, (*ret finger protein-like 1*), cujo transcrito é abundantemente presente nos rins e fígado do feto e, em menor

escala, no cérebro de humanos adultos (Hansson, 2007; www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/gene).

Foram avaliadas 6 amostras de líquido amniótico. Destas, foi utilizado 1µl do cDNA diluído 10 vezes (1:10), em água tratada com DEPC, submetidos às condições ideais para reação de PCR em tempo real, com iniciadores específicos para cada gene endógeno selecionado.

A variação entre as triplicatas foi demonstrada através de média ($\pm$ DP) na forma de gráficos. A estabilidade dos genes avaliados foi determinada por meio do *software BestKeeper* baseado em planilha do aplicativo Microsoft Excel. A partir das médias dos valores de C_t , o *software* calcula o coeficiente de variação (CV [% C_t]), desvio padrão (DP) e o valor de p , cujos menores valores demonstram maior estabilidade gênica. De maneira inversa, o coeficiente de correlação (r) se mostra ideal quando elevado (Pfaffl et al., 2004).

O software se encontra disponível para *download* em: <http://gene-quantification.com/bestkeeper.html#download>.

4.7.2. Curva padrão de eficiência

Para avaliar de maneira apropriada a reação de amplificação dos genes-alvo ABCB1, ABCC1, LRP, e do gene endógeno selecionado previamente (GUSB) foram feitas curvas padrões utilizando triplicatas, de 5 diluições seriadas com (500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng) cDNA da linhagem comercial MES-DX (controle positivo de resistência às drogas), em

seguida submetidas às condições ideais para PCR em tempo real descritas acima, com a adição de iniciadores específicos para os respectivos genes-alvo. Os dados de cada curva padrão foram analisados pelo *Sequence Detection Software (SDS)* v 1.3 (Applied Biosystems) calculando o coeficiente angular (*Slope*), que reflete proporcionalmente a eficiência da reação; o valor do coeficiente de correlação (R^2), consiste na medida da proximidade de ajuste entre a linha de regressão e os dados individuais dos *threshold cycle* (C_t) das reações; o desvio padrão (DP) das réplicas para certificar a precisão do experimento; os valores de C_t , que correspondem ao número de ciclos onde os níveis de fluorescência atingem o threshold. Os valores obtidos foram comparados aos valores de referência sugeridos pelo fabricante do equipamento utilizado demonstrados a seguir (Tabela – 03) (www3.appliedbiosystems.com).

Tabela 03 – Valores de referência dos fatores avaliados no desempenho das reações de PCR em tempo real

Fatores	Valores de referência
Slope	~ - 3,3
Eficiência	100% ± 10%
R^2	~ 0,99
Desvio Padrão	< 0,167
Valor de C_t	>8 e <35

4.7.3. Condições das reações de RT-PCR em tempo real

As amplificações foram realizadas em duplicatas e as reações preparadas com os reagentes do kit SuperScript® III Platinum SYBER Green® qRT-PCR (Invitrogen™, EUA). Foi utilizado o equipamento *ABI Prism 7500* Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA). As condições de programação dos ciclos foram de 95°C - 5 minutos; 40 ciclos: 95°C - 15 segundos; 60°C - 30 segundos. A leitura de fluorescência emitida foi detectada ao final de cada ciclo, entre 520 e 670 nm, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado. Os dados foram analisados pelo *Sequence Detection Software* (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems, EUA).

4.7.4. Análise dos resultados

Para a quantificação relativa da expressão gênica, os dados de cada amostra foram relacionados à curva padrão, na qual foram utilizadas triplicatas de 6 diluições seriadas com (1000 ng, 500 ng, 250 ng, 125 ng, 62,5 ng, 31,25 ng) cDNA (*complementary* DNA) da linhagem comercial MES-DX, na análise de cada gene. Com este método, o *Sequence Detection Software* (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems), utilizou-se a curva padrão para interpolar a quantidade da expressão do gene alvo.

Os dados de quantidade da expressão obtidos foram corrigidos pelas quantidades do gene normalizador na mesma amostra, afim de, eliminar

variações causadas durante o preparo das reações. Sendo assim, a razão entre a quantidade do gene alvo/GUSB foi considerada a quantidade relativa em cada amostra. Foram feitas média $\pm$ DP das réplicas e das populações avaliadas, nestas foram aplicados testes estatísticos para a observação da distribuição da expressão dos genes, os resultados foram dispostos em gráficos.

4.8. Preparo das amostras para biologia molecular

4.8.1. Extração de RNA pelo método Trizol

As amostras diferenciadas e indiferenciadas tiveram o seu RNA extraído pelo método de Trizol[®] (InvitrogenTM, EUA). Após a retirada do meio de cultivo, foi adicionado 1ml de Trizol[®] para cada 1×10^6 de células. A mistura foi homogeneizada, coletada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um tubo de 1ml. Logo após, foram adicionados às amostras, 200 μ l de clorofórmio (Merck Chemicals, Brazil) seguido de agitação por 15 segundos em vórtex. Na sequência, esta mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada por 10.000 X g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa da mistura foi transferida para um novo tubo estéril previamente tratado com água DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich[®], EUA) para inativação de nucleases.

Na próxima etapa da extração foi realizada a precipitação do RNA, utilizando-se para cada tubo 500 μ l de álcool isopropílico (Merck Chemicals,

Brazil) gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após esse período, centrifugadas por 12.000 X g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se ao RNA precipitado, 1 ml de etanol 75%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10.000 X g por 15 minutos a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e 50ul de água DEPC foram utilizados para ressuspender o RNA total extraído. Todas as amostras foram analisadas quanto a sua integridade através de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. A quantificação foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop®, Corbett, EUA) e o armazenamento em freezer -80°C até o momento do uso.

4.8.2. Síntese do DNA complementar

Os RNAs de todas as amostras foram tratados com os reagentes do kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA) para a remoção de possíveis resíduos de DNA genômico. Posteriormente, foram confeccionados os respectivos DNAs complementares (cDNA - inglês, *complementary desoxiribonucleic acid*)).

Cada amostra de RNA foi diluída em água previamente tratada com DEPC, de forma que o volume final fosse de 8µl contendo no máximo 1µg de RNA. Este material foi incubado, com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1U/µl e com *Reaction Buffer* 1X, a 37°C durante 30 minutos para a digestão

do DNA genômico, após este período foi adicionado o tampão *Stop* (Promega, Madison, WI, USA) para a inativação da enzima, seguido de incubação a 85°C por 10 minutos. A partir do RNA tratado, foi feita a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), no qual as condições ideais para as reações foram de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. Para as incubações utilizou-se termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

4.9. Análise estatística

Para a análises estatísticas utilizou-se o *software GraphPad Prism 5* (GraphPad, Inc.), onde foram calculadas médias ($\pm$ DP) e comparadas pelos testes exigidos em cada situação: ANOVA Two-Way, Kruskal-Wallis ou Friedman; t Teste Mann-Whitney ou Wilcoxon; os pós-testes aplicados foram Bonferroni ou Dunns (comparando todas as colunas). As diferenças entre os valores das médias foram consideradas significantes quando o valor de $p < 0.05$.

Com o *software BestKeeper* associado a planilha do Microsoft Excel, foram calculados: coeficiente de variação (CV [% C_t]), desvio padrão (DP) das triplicatas e das , o valor de p , coeficiente de correlação (r) e média geométrica (Média Geo) dos valores de C_t obtidos dos ensaios para padronização do gene normalizador.

Os dados obtidos durante a validação e aplicação da técnica de PCR em tempo real foram analisados pelo *Sequence Detection Software (SDS)* v 1.3 (Applied Biosystems), que calculou o coeficiente angular das curvas padrões (*Slope*), coeficiente de correlação (R^2), médias ($\pm$ DP) das réplicas e, a partir destas, a eficiência da curva padrão (% Eff).

5. RESULTADOS

5.1. Cultivo

A partir das amostras de líquido amniótico (LA) e medula óssea (MO) humanas, foram obtidas colônias de células aderentes à superfície de cultivo (Figura - 13).

Quanto à morfologia, as células da medula óssea mostraram-se grandes (alongadas) e fibroblastoides, durante todo o período que permaneceram em cultivo. Enquanto as amostras de líquido amniótico exibiram grande heterogeneidade, com o aparecimento de 3 tipos de colônias diferentes no cultivo primário, sendo uma formada por células pequenas (aspecto epitelioide), outra por células grandes e arredondadas ou células alongadas (morfologia fibroblastoide). A partir da segunda passagem, permaneceram apenas as células fibroblastoides.

As células isoladas de ambas as fontes demonstraram modificação no seu comportamento em cultivo, após números avançados de passagens, com a ocorrência de diminuição na viabilidade celular e estagnação do crescimento (Figura – 14). Sendo assim, foi estabelecido que os experimentos posteriores fossem efetuados com células entre a 3ª e 4ª passagem, suficientes para selecionar populações com morfologia homogênea, obtenção de números consideráveis de células, e evitar riscos de diferenciação celular espontânea devido ao cultivo prolongado.

Figura 13 – Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) das colônias formadas em culturas primárias de líquido amniótico e medula óssea, ambas após 7 dias de cultivo

Figura 14 – Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) de células isoladas de líquido amniótico e medula óssea após 6 passagens

5.2. Caracterização em células-tronco mesenquimais

5.2.1. Expressão dos genes de indiferenciação

Das amostras de líquido amniótico, 9 expressaram ambos os genes (Oct-4 e Nanog), 6 expressaram apenas Oct-4, 1 expressou somente o Nanog e 2 não expressaram controle endógeno e nenhum dos genes de indiferenciação. Enquanto nas amostras de medula óssea, 5 expressaram ambos Oct-4 e Nanog e 1 expressou somente o gene controle (Figura – 15 ou imagem dos produtos do RT-PCR em Anexo B [Figura – 16]). Foram selecionadas para os experimentos posteriores, apenas as amostras que expressaram ambos os genes de indiferenciação concomitantemente com o gene endógeno. Portanto, seguiram no estudo 9 amostras de LA e 4 de MO.

Figura 15 – Diagramas de Venn ilustrando os resultados qualitativos da expressão dos genes de indiferenciação Oct-4, Nanog e do gene endógeno β -actina, obtidos através do RT-PCR das 20 amostras de líquido amniótico e 6 de medula óssea até a terceira passagem

5.2.2. Imunofenotipagem

Todas as populações de células, tanto de líquido amniótico quanto de medula óssea, foram consideradas positivas para os marcadores mesenquimais CD29, CD44, e fraco positivas para CD90 e CD105, com média variando entre 10-50% de positividade. As mesmas exibiram expressão negativa, com média de positividade menor que 5% para proteínas de superfície características da linhagem não mesenquimal: CD14, CD45, CD34 e CD31 (Tabela – 04 ou histogramas em Anexo C, Figura – 17).

Tabela 04 – Resultados qualitativos da imunofenotipagem por citometria de fluxo, das células de LA e MO, com marcadores positivos e negativos para CTM; valores de referência: negativo < 5%, fraco positivo < 50%, positivo > 50%

Marcadores	LA	MO
CD45 FITC	-	-
CD31 FITC	-	-
CD34 FITC	-	-
CD14 PE	-	-
CD90 FITC	Fraco +	Fraco +
CD105 PE	Fraco +	+
CD29 PE	+	+
CD44 PE	+	+

5.2.3. Ensaios de Diferenciação

Após 21 dias de indução específica para a diferenciação adipogênica, parte da população de células isolada do líquido amniótico e medula óssea, demonstrou características de células adiposas, como a formação de reservas lipídicas citoplasmáticas, visualizadas por meio da coloração específica Oil Red O (Figura - 18).

Figura 18 – Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x): **A)** células de LA não tratadas e **B)** tratadas com meio para diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O; **C)** células isoladas da MO não tratadas e **D)** tratadas com meio para diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O

Após a indução específica para a diferenciação condrogênica, as células isoladas do LA e MO demonstraram características sugestivas de cartilagem, como a mudança de morfologia e a presença de glicosaminoglicanas, substâncias extracelulares típicas do tecido cartilaginoso, visualizadas após coloração com Azul de Toluidina (Figura - 19).

Figura 19 – Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x) de **A)** células isoladas de LA não tratadas e **B)** tratadas com meio para diferenciação condrogênica e coradas com Azul de Toluidina; **C)** células isoladas da MO não tratadas e **D)** tratadas com meio para diferenciação condrogênica e coradas com Azul de Toluidina

Após indução específica para a diferenciação osteogênica, as amostras de MO demonstraram características de tecido ósseo, como a formação de cristais de cálcio na superfície de toda a população de células,

visualizados por meio da coloração com Vermelho de Alizarina e von Kossa. O mesmo resultado foi obtido nas amostras de LA, no entanto, com menor produção de cálcio, evidenciado apenas em pontos isolados da população de células (Figura - 20).

Figura 20 – Visualização por microscopia óptica (aumento de 40x): células sem tratamento de **A)** LA e **B)** MO; células que receberam tratamento para diferenciação osteogênica: **C)** LA e **D)** MO coradas por Vermelho de Alizarina e **E)** LA e **F)** MO coradas com von Kossa

Quanto à avaliação da expressão dos genes específicos de cada tecido, apenas 1 amostra de cada origem expressou ambos os genes típicos de tecido adiposo, enquanto 1 LA e 4 MO apresentaram distribuição não uniforme, expressando apenas um dos genes. Dos genes referentes ao tecido ósseo 4 amostras de LA e 2 de MO expressaram juntamente osteopontina e osteocalcina, enquanto 1 amostra de MO expressou apenas osteocalcina. As amostras de LA induzidas à condrogênese expressaram ambos os genes, enquanto as amostras de MO expressaram apenas Perlecan. No total 6 amostras expressaram apenas o gene endógeno β -Actina (Tabela –04 ou imagens dos produtos do RT-PCR em Anexo D, Figura – 21).

Tabela 05 – Resultados qualitativos da expressão por RT-PCR, em amostras de líquido amniótico (LA) e medula óssea (MO), de genes específicos das diferenciações: Adipogênica (LA n=3 e MO n=5), PPAR- γ e Lipoproteína lípase (Lip Lip); Condrogênica (LA n=2 e MO n=2), Perlecan e Syndecan; Osteogênica (LA n=6 e MO n=5), Osteopontina e Osteocalcina; controle endógeno o gene da β -Actina

Adipogênica						
Genes	LA n= 3			MO n=5		
β -Actina	+	+	+	+	+	+
PPAR- γ	-	+	-	-	+	+
Lip Lip	-	+	+	+	-	-
Condrogênica						
Genes	LA n=2			MO n=2		
β -Actina	+		+	+		+
Perlecan	+		+	+		+
Syndecan	+		+	-		-
Osteogênica						
Genes	LA n= 6			MO n= 5		
β -Actina	+	+	+	+	+	+
Osteopontina	+	+	+	-	+	-
Osteocalcina	+	+	+	-	+	-

5.3. Caracterização da P-glicoproteína

5.3.1. Caracterização do controle positivo de resistência

A fim de obter uma população com expressão homogênea da P-gp, a linhagem de sarcoma uterino MES-DX, foi tratada com alta concentração de doxorrubicina (1000 nM) durante 24 horas e as células remanescentes foram expandidas. A imunocitoquímica desta população demonstrou o aumento da expressão da P-gp após a incubação com o quimioterápico. Por meio da técnica de RT-PCR foi comprovada a expressão dos genes alvo do presente estudo ABCB1, ABCC1 e LRP, bem como, o gene endógeno GUSB (Figura – 22). Sendo assim, a linhagem MES-DX, previamente tratada com DOX, foi mantida como controle positivo de resistência às drogas.

Figura 22 – Linhagem de sarcoma uterino MES-DX; Imunocitoquímica A) pré e B) pós tratamento com doxorrubicina (1000 nM) durante 24h; C) PCR dos genes GUSB (controle endógeno) ABCB1, ABCC1 e LRP das amostras pós tratamento, dispostas em gel de agarose 2%, leitura em transluminador UV

5.3.2. Imunocitoquímica da P-gp

As células tumorais resistentes MES-DX, assim como as células-tronco mesenquimais do líquido amniótico e medula óssea, exibiram a P-gp ao longo de toda a superfície e na maior parte da população de células avaliada (Figura - 23).

Figura 23 - Visualização por microscopia óptica das colorações por imunocitoquímica para P-gp reveladas com corante AEC nas células: MES-DX: **A)** controle (100x), imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de **B)** 100x e **C)** 200x; células de líquido amniótico **D)** controle (100x), imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de **E)** 100x e **F)** 200x; células de medula óssea **G)** controle (100x), e imunocitoquímica para P-gp nos aumentos de **H)** 100x e **I)** 200x; todas as células tiveram os núcleos contra-corados com H&E

A estimativa da área corada de cada amostra demonstrou maior porcentagem na linhagem MES-DX ($41,97 \pm 5,59$) quando comparada às CTM do LA ($18,86 \pm 3,37$) e MO ($20,27 \pm 3,58$) (Figura – 24), que por sua vez demonstraram porcentagens de coloração equivalentes.

Figura 24 – Quantificação da área marcada (%) na imunocitoquímica para P-gp em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA), (n=3) medula óssea (MO) indiferenciadas e (n=3) MES-DX, teste aplicado ANOVA Kruskal-Wallis , pós-teste Dunns, * $p=0,0052$

5.3.3. Ensaio de viabilidade celular

Após a incubação com diferentes concentrações de DOX, as porcentagens das células viáveis foram dispostas em curvas cuja análise estatística demonstrou que as viabilidades da linhagem MES-S (sensível) foram menores em comparação às células MES-DX, LA e MO quando

submetidas às cinco maiores concentrações de DOX (62,50 – 1000 nM) utilizadas neste experimento.

As viabilidades das células de LA foram maiores (de $95,78 \pm 1,24$ a $79,41 \pm 5,84$) em concentrações intermediárias (62,5 – 250 nM) do quimioterápico. Em contrapartida com 1000nM de droga, sua viabilidade foi significativamente menor ($31,12 \pm 5,09$), em comparação às células MES-DX ($47,81 \pm 2,94$) e MO ($44,83 \pm 3,51$), que por sua vez mantiveram-se equilaventes (Figura - 25).

Figura 25 - Curva de viabilidade celular (%) das células de: linhagens comerciais controles de resistência às drogas MES-S (n=4) (negativo) e MES-DX (n=4) (positivo); líquido amniótico (LA) (n=4) e medula óssea (MO) (n=4); submetidas a diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de doxorubicina por 72 horas, teste aplicado Two-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni

A partir das curvas de viabilidade celular foi determinado o IC₅₀ de cada linhagem avaliada, e não foi encontrada diferença estatística quando comparados os valores das células MES-DX ($800,4 \pm 48,51$), LA ($639,3 \pm 84,87$) e MO ($664,4 \pm 180,30$). Todavia, estas foram significativamente maiores em comparação à concentração inibitória da MES-S sensível à DOX ($36,06 \pm 6,91$) (Figura - 26).

Figura 26 - Concentração de doxorubicina (nM) necessária para inviabilizar 50% da população celular de: linhagens controles de resistência às drogas MES-S (n=4) (negativo) e MES-DX (n=4) (positivo); líquido amniótico (LA) (n=4) e medula óssea (MO) (n=4); submetidas a diferentes concentrações (0.01 – 10000 nM, 6 réplicas cada) de doxorubicina por 72 horas, teste aplicado ANOVA Kruskal-Wallis , pós-teste Dunns, * $p=0,0302$

5.3.4. Exclusão de Rhodamina 123

Embora a comparação dos valores de efluxo da Rh 123 não tenham demonstrado diferença estatística, foi possível observar que o verapamil bloqueou a exclusão da Rh 123 nas linhagem MES-DX (mínimo $11,49 \pm 0,36$; máximo $13,68 \pm 1,89$) e LA (mínimo $8,75 \pm 2,48$; máximo $11,02 \pm 3,39$), pois, demonstraram baixa variação de exclusão durante todo o período de incubação. Por outro lado, as mesmas linhagens quando incubadas sem o bloqueador exibiram dinâmicas semelhantes, com pico de efluxo após 1h (MES-DX= $19,68 \pm 0,89$; LA= $20,60 \pm 2,12$), seguida de interiorização do corante após 2h, que se manteve após 4h de incubação (Figura – 24 [A; B]).

Em contrapartida, as amostras de MO não responderam ao verapamil aumentando progressivamente a exclusão durante todo o período de incubação (mínimo $11,10 \pm 2,28$; máximo $24,25 \pm 11,29$), dinâmica semelhante foi encontrada nas incubações sem o bloqueador (mínimo $4,88 \pm 0,04$; máximo $27,06 \pm 7,28$) (Figura– 27 [C]).

Figura 27 – Efluxo de Rhodamina 123 (Rh 123) demonstrado em médias $\pm$ DP das porcentagens (%) de fluorescência obtidas por citometria de fluxo de 3 amostras de cada linhagem **A)** MES-DX (resistentes), **B)** líquido amniótico (LA) e **C)** medula óssea (MO), internalizadas com Rh 123 a 2mM, posteriormente submetidas aos períodos de exclusão 0, 1, 2 e 4 horas, com (linha pontilhada cinza) ou sem (linha completa preta) verapamil, teste aplicado Two-Way ANOVA, pós-teste Bonferroni

5.3.5. Curva padrão de eficiência

As curvas elaboradas para a padronização do RT-PCR em tempo real demonstraram eficiências próximas a 100% (96,59 – 106,80 %), com variação de 10%, valores que são aceitáveis, por não apresentar interferência significativa nos resultados finais. Os valores de R^2 foram próximos ao valor desejado (Tabela – 02), o que indica baixa variação na correlação entre os valores de C_t e quantidade de amostras da curva padrão. As curvas de dissociação apresentaram picos bastante definidos, demonstrando especificidade do produto amplificado. Os dados detalhados desta padronização se encontram no Anexo E (Figuras 28, 29, 30, 31).

5.3.6. Padronização do gene normalizador

Quando comparadas as expressões de cada gene endógeno avaliado entre as diferentes amostras, não foi encontrada diferença estatística (Figura – 24). De acordo com a análise do *software BestKeeper*, a partir das médias dos valores de C_t de todas as amostras, os genes analisados exibiram valores de coeficiente de variação (CV) e desvio padrão (DP) elevados para a expressão de um gene estável. No entanto, de acordo com o *software*, quanto maior o coeficiente de correlação (r) e menor o desvio padrão, menos variável é a expressão gênica. Sendo assim, o GUSB foi considerado o menos variável dos genes analisados ($r=0,835$; $p=0,039$) (Tabela – 06) (Figura – 32).

Figura 32 – Médias e desvios padrões dos *threshold cycles* (C_t) das amplificações em triplicatas dos genes endógenos GAPDH, GUSB, RFPL1, LMO2 em diferentes amostras de líquido amniótico humano; teste aplicado ANOVA Kruskal-Wallis, pós-teste Dunns

Tabela 06 – Dados estatísticos gerados pelo *software BestKeep* através da análise das médias dos C_t , obtidos por RT-PCR em tempo real, dos genes GUSB, GAPDH, RFPL1 e LMO2, em amostras de líquido amniótico (n=6)

Líquido amniótico n=6				
Genes	GUSB	GAPDH	RFPL1	LMO2
Média (C_t)	32,43	27,34	27,25	33,73
DP ($\pm C_t$)	2,29	4,89	4,67	3,25
CV (% C_t)	7,05	17,89	17,13	9,62
<i>p</i>	0,039	0,045	0,113	0,414
<i>r</i>	0,835	0,822	0,711	-0,415

5.3.7. Expressão dos genes de resistência às drogas

As quantidades de expressão relativa dos genes de resistência às drogas foram obtidas por meio da técnica de RT-PCR em tempo real. Os dados das amostras individuais constam no ANEXO F (Figuras 36, 37 e 38), todavia, foi analisada a distribuição da expressão de cada gene nas populações avaliadas.

Quando comparadas as expressões gênicas das amostras indiferenciadas foi possível observar que, enquanto não houve significância entre a variação da expressão do ABCB1, ABCC1 e LRP nas células de MO (Figura – 33, B), houve a prevalência da expressão do gene LRP ($187,50 \pm 43,77$; $p=0,0029$), em relação ao ABCB1 ($11,53 \pm 5,178$) nas células de LA, no entanto, não foi diferente em relação ao ABCC1 ($49,73 \pm 13,75$) (Figura – 26, A).

Na comparação entre as diferentes fontes de CTM, as populações de células do LA ($11,53 \pm 5,178$; $p=0,008$) expressaram maior quantidade do gene ABCB1 do que as amostras de MO ($0,1946 \pm 0,1851$). Entretanto, não houve diferença entre as expressões dos demais genes avaliados (Figura – 34).

Não foi identificada significância estatística na relação entre as populações de células antes e depois do processo *in vitro* de diferenciação, tanto adipogênica quanto osteogênica (Figura – 35).

Figura 33 – Distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP em amostras de **A)** (LA) líquido amniótico (n=9); **B)** (MO) medula óssea (n=6) indiferenciadas. Teste ANOVA Friedman, pós-teste Dunns, **A)** * $p=0,0029$.

Figura 34 – Comparação da distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP entre as amostras de (LA) líquido amniótico (n=9) e (MO) medula óssea (n=6) indiferenciadas. Teste t Mann Whitney, * $p=0,0008$.

Figura 35 – Comparação da distribuição da quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP entre amostras de (LA) líquido amniótico e (MO) medula óssea, antes e depois da **A)** diferenciação adipogênica (LA=3 e MO=4); **B)** diferenciação osteogênica (LA=4 e MO=4). Teste t Wilcoxon.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo visou caracterizar as células-tronco mesenquimais com relação à P-glicoproteína, para isto foram isoladas e caracterizadas células de duas fontes: adulta da medula óssea (MO) e fetal do líquido amniótico (LA) do segundo trimestre de gestação. Foi também avaliada a expressão gênica dos transportadores P-gp, MRP1 e LRP antes e depois da diferenciação. Os resultados obtidos demonstraram contrastes e paridades entre as populações avaliadas, e serão discutidos a seguir.

No primeiro momento deste estudo, a observação da cultura primária tanto do LA quanto da MO, foi de grande importância na padronização das condições ideais para utilização das populações isoladas. A principal observação neste período foi a heterogeneidade da população do líquido amniótico. Já descrita na literatura, esta característica típica deste fluido deve-se à presença de células oriundas dos três folhetos embrionários. Em decorrência à fisiologia fetal, as células em maior quantidade são da pele, trato digestivo, respiratório e urinário, além de células da membrana amniótica. Em cultura, baseando-se nas características morfológicas e de crescimento, é comum a presença de três tipos de células: epitelióide, específicas do líquido amniótico e fibroblástoides. As células do tipo fibroblastoide são as de maior duração *in vitro*, e exibem todas as características mesenquimais. No presente estudo estes pressupostos foram encontrados, no entanto, após a segunda passagem houve a permanência apenas das células fibroblásticas. Sendo assim, para evitar a presença de células de outros folhetos embrionários, foi estipulado o uso das células entre a terceira e quarta passagens. Além de, evitar o cultivo prolongado que

pode causar modificações na população celular, porventura causadas por mutações, diferenciação celular, e outras possíveis influências (Fauza, 2004; Kim et al., 2007).

Os fatores transcricionais mais importantes na manutenção da plasticidade das células-tronco são os genes Oct-4 e Nanog. Expressos em células-tronco embrionárias, estes genes também podem ser encontrados nas células-tronco adultas e fetais, regulam positivamente genes responsáveis pelo fenótipo indiferenciado, e suprimem a transcrição de genes indutores de diferenciação. Rodda e colaboradores sugeriram que, o Nanog é intimamente regulado pela expressão do Oct-4. Interessantemente, a distribuição da expressão destes genes nas células de LA seguiram este pressuposto, uma vez que, a maior parte das amostras (n=9) expressaram ambos os genes, 4 expressaram apenas o Oct-4 e 1 apenas o Nanog (Figura – 15 ou Anexo B, Figura - 16), sendo assim, há possível dependência do Oct-4 na expressão do gene Nanog, em células do líquido amniótico. Levando em conta este fenômeno, consta na literatura que, alterações na expressão de um destes fatores de transcrição desencadeiam o direcionamento das células à diferenciação, por isto, foram mantidas no estudo apenas as amostras que expressaram ambos Oct-4 e Nanog concomitantemente (Rodda et al., 2005; Jung et al., 2010).

Um dos indicadores das CTM é a diferenciação em tecidos funcionais da mesoderme. Para isto, a literatura descreve a utilização de métodos de diferenciação induzida, no entanto, há a necessidade de comprovar a eficiência destes ensaios. Sendo assim, além das colorações específicas, foi

observada a expressão de um par de genes específicos para cada tecido. Nos resultados, algumas amostras expressaram apenas um destes genes, isto pode ser explicado, pela presença de células em diferentes estágios da diferenciação. Nos primórdios do comprometimento celular, as diferenças não são facilmente detectadas e, provavelmente, consistem apenas em alterações sutis causadas por mudanças na atividade de alguns genes. Em um estágio inicial da diferenciação, as células se tornam comprometidas a uma linhagem. Uma vez determinadas, dão início às mudanças de expressão. Estudo de Song e colaboradores demonstrou que, mesmo uma população de células-tronco mesenquimais, que em sua maioria compartilhem a expressão dos mesmos epítomos de superfície, pode conter subpopulações distintas, funcionalmente heterogêneas, formadas por células-tronco e/ou progenitoras indiferenciadas, e células precursoras tecido-específicas (Wolpert L, 2000; Song et al., 2008; Barzilay et al., 2009).

Partindo então, das CTM, foi dada sequência aos ensaios relacionados à P-glicoproteína (P-gp). Inicialmente, por meio do ensaio de coloração de imunocitoquímica, foi demonstrada a presença da P-gp em todas as amostras avaliadas distribuídas de forma homogênea ao longo da membrana das células e em suas populações. A porcentagem de população corada foi estimada, e dentre as linhagens avaliadas, a MES-DX ($41,97 \pm 5,59$ * $p=0,0052$) mostrou-se superior quando comparadas às células do LA ($18,86 \pm 3,37$) e MO ($20,27 \pm 3,58$), entretanto, não houve diferença estatística entre as CTM. Esta paridade foi ratificada quando relacionada ao IC50, onde a concentração inibitória das células de LA ($639,3 \pm 84,87$) e MO

(664,4 $\pm$ 180,30), também não diferiram estatisticamente, evidenciando equivalência entre as diferentes fontes de CTM, com relação à presença e atuação da P-gp frente à DOX.

A partir da curva de citotoxicidade, foi possível observar que, enquanto a linhagem MES-S atingiu morte total da população, as células MES-DX (47,81%), LA (33,12%) e MO (44,83%) mantiveram porcentagens consideráveis de viabilidade, demonstrando resistência à DOX e/ou recuperação da população celular após 72h de incubação. Em 2004, Li e colaboradores, demonstraram que, ao expor CTM de medula óssea humana a diferentes quimioterápicos, estas se mostraram resistentes às drogas comumente utilizadas antes de transplante medular como: busulfan, ciclofosfamida e metrotexato. Entretanto, mostraram-se sensíveis a agentes citotóxicos como etoposide, vincristina, entre outros. Por outro lado, mesmo demonstrando sensibilidade houve recuperação parcial ou total da população celular e manutenção do potencial de diferenciação. Portanto, a partir dos dados obtidos no presente estudo, é possível sugerir que, ao menos uma porção da população de CTM, tanto de LA quanto de MO, possuem fenótipo de resistência ao quimioterápico DOX (Li et al., 2004).

Embora a técnica de imunocitoquímica tenha demonstrado maior porcentagem de P-gp nas MES-DX, não foi encontrada diferença no IC50 (800,4 $\pm$ 48,51) destas células quando comparadas às CTM do LA (639,3 $\pm$ 84,87) e MO (664,4 $\pm$ 180,30). A partir destes dados, foi conjecturado que a P-gp pode não ser o único fator contribuinte para a resistência das CTM. A MRP1 possui diversas similaridades à P-gp, e há significativa sobreposição

dos substratos específicos destas bombas dentre os quais se encontra a doxorubicina. Portanto a MRP1 pode estar atuando juntamente com a P-gp na resistência das CTM à DOX. Para comprovar esta suposição, são necessários maiores estudos, para avaliar a fundo a presença e função da MRP1, de forma mais específica nas CTM (He et al., 2011).

A atividade das bombas ABC nas CTM, também podem estar sob influência de moléculas complementares ou associadas, que contribuam para sua função. Trabalho de Van Phuc e colaboradores relacionou, a presença do CD44 à resistência à DOX. Esta molécula de adesão é uma glicoproteína transmembrana, envolvida na ativação linfocitária, *homing* e migração, adesão na matriz extracelular, proliferação e diferenciação celular, além de ser considerado um marcador específico das células-tronco mesenquimais. Utilizando células de câncer de mama, que expressam naturalmente bombas da família ABC, a expressão do CD44 foi reduzida, por meio de inserção de siRNA, resultando à maior sensibilidade destas células ao quimioterápico DOX. Outro estudo, elaborado por Calcagno em 2010, avaliou as consequências da exposição prolongada a DOX, também em linhagem de câncer de mama (MCF-7), e observou que as células resistentes ao tratamento possuíam fenótipo CD44+, superexpressão de genes relacionados à resistência e expressão de genes relacionados ao metabolismo de células-tronco. Baseados nestes resultados os autores propõe que, a expressão de CD44 está correlacionada à resistência a drogas, possivelmente envolvida na função das bombas ABC nas CTM (Calcagno et al., 2010; Van Phuc et al., 2011).

Entretanto, o mecanismo pelo qual a P-gp confere proteção às CTM, talvez seja mais complexo do que simplesmente excluir substratos citotóxicos, podem também dispor de outros artifícios para protegê-las. Trabalhos já comprovaram que a P-gp possui papel fundamental na regulação da morte celular, conferindo resistência não somente aos quimioterápicos, mas também à hipóxia, radiação UV, Fas ligante ou a atuação do TNF- α em seu receptor. Análises bioquímicas demonstraram que a inibição do Fas ligante, pela P-gp, suspende a ativação da cascata via caspase 3 e 8, efeito que pode ser revertido pela atuação do verapamil ao bloquear a função da bomba ABC. Além disto, pode conferir proteção contra lise celular induzida pela ativação do sistema complemento. Todas as evidências anti-apoptóticas da P-gp, implicam grande importância destas proteínas na manutenção da sobrevivência celular a longo prazo (Challen & Little, 2006).

Durante o longo prazo de vida, a preservação da integridade do genoma, é uma das missões críticas das células-tronco. Acredita-se que, as proteínas ABC protegem as células-tronco de uma variedade de genotoxinas e se encontram em máxima atividade nas células com alta taxa replicativa. Estudos já relacionaram a alta expressão dos transportadores ABC em células com metabolismo acelerado, como células cancerosas, ou possivelmente células-tronco em processo de autorrenovação, devido ao seu envolvimento no transporte de colesterol e nutrientes. Entretanto, a sua atividade também pode estar relacionada ao grau de diferenciação das células. Em 2007, Kim e colaboradores demonstraram que, células-tronco

mesenquimais provenientes da medula óssea, submetidas à diferenciação condrogênica *in vitro*, diminuíram a expressão da P-gp, de forma proporcional ao aumento dos genes típicos deste tecido, como colágeno tipo II (Garrigues et al., 2002; Kim et al., 2007; Darzynkiewicz & Balazs, 2012).

Seguindo esta linha de raciocínio, o esperado seria a diminuição da expressão dos genes de resistência, com o desenvolvimento do processo de diferenciação. Todavia, no presente estudo, a distribuição da expressão dos genes relacionados à resistência, nas CTM submetidas aos ensaios de diferenciação adipogênica ou osteogênica, não demonstrou variação significativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP, nas amostras de LA e MO. Os protocolos utilizados na indução das diferenciações adipogênica e osteogênica, continham dentre seus fatores bioativos, o glicocorticoide sintético dexametasona (Dex). Trabalhos já demonstraram a influência desta droga na expressão do ABCC1 e ABCB1, por ser um dos substratos dos seus respectivos transportadores (Schinkel & Jonker, 2003; Nieuwenhuis et al., 2009).

No ensaio de diferenciação adipogênica há adição do anti-inflamatório não esteroidal indometacina, bem descrito por inibir a função e até mesmo diminuir a expressão da MRP1. Experimentos com a indometacina e linhagens celulares resistentes, foram capazes de induzir a sensibilidade a quimioterápicos como a DOX, possivelmente por inibição da glutathione-S-transferase. Entretanto, neste estudo, esta droga não causou diminuição na expressão gênica da MRP1, provavelmente devido à concentração utilizada

deste medicamento ou aos outros componentes do protocolo utilizado para diferenciação (de Groot et al., 2007).

Embora no presente estudo, a utilização dos medicamentos no processo de diferenciação, não tenham demonstrado variação significativa na expressão gênica, a função das proteínas pode ter sofrido influências deste procedimento. No entanto, para comprovar esta hipótese, são necessários experimentos que avaliem a funcionabilidade destas bombas após a diferenciação em um número maior de amostras. No entanto, *in vitro*, a diferenciação celular é um sistema submetido a variações experimentais entre réplicas e amostras independentes, pois não é um processo totalmente controlável, mesmo com a adição de fatores de crescimento específicos. Portanto, contrastes entre amostras biológicas da mesma natureza podem ocorrer, devido a diferenças no manuseio, diferenciação espontânea, tendência para uma diferenciação em particular ou propriedades individuais de cada paciente (Willems et al., 2008).

Para avaliar o funcionamento da P-gp foi realizada a análise da exclusão da Rhodamina123 (Rh 123), que é um corante lipofílico, catiônico e fluorescente, capaz de internalizar de maneira universal nas células de forma passiva, sendo o seu efluxo menos permissivo, para isto, é necessária a atuação da P-gp, considerada transportador específico deste corante. Neste ensaio, as amostras de LA demonstraram a mesma dinâmica que as células resistentes MES-DX (Figura – 27), com pico de efluxo após 1h de incubação. No entanto, houve o aumento da fluorescência das células após 2 e 4h. A exclusão do corante na primeira hora de incubação, já foi

encontrada em outros trabalhos, como o de Wakuda (2010), onde foi demonstrado que a exclusão de Rh 123 é um processo rápido e crescente, durante aproximadamente 30 min, após este período, o efluxo pode se estender lentamente por até 90 min. Em contrapartida a internalização do corante após o período de 2 e 4h pode estar associada ao estágio do ciclo celular da população avaliada. Pois, o corante Rh 123 possui afinidade por material genético e principalmente por mitocôndrias ativas, sendo assim, independentemente do transporte ativo, pode ocorrer retenção intracelular de corante por estas estruturas, em todas as células avaliadas, todavia, as células em estágio de divisão celular, ou com metabolismo acelerado, podem porventura, reter maiores quantidades de corante em seu interior. Diversos autores afirmam que as células com habilidade de excluir o corante Rh 123, podem ser consideradas *side population* (SP). Estas células, possuem sobre-expressão dos genes relacionados ao metabolismo das células-tronco, alta capacidade replicativa, plasticidade multipotente ou pluripotente. No entanto, a confirmação da existência deste fenótipo nas CTM do LA e MO necessita de um estudo mais abrangente e detalhado (Colabufo et al., 2008; Wakuda et al., 2010).

Em contraste com as outras linhagens avaliadas, as CTM da MO, com e sem o bloqueador verapamil, demonstraram exclusão progressiva do corante Rh123, durante todo período de incubação. Este resultado pode ser fundamentado em estudos como os de Pessina e colaboradores. Em 1999, demonstraram que a linhagem de células estromais da medula óssea de camundongo (SR4987) quando cultivada na presença do quimioterápico

doxorubicina (DOX), foi capaz de internalizar quantidades importantes da droga sem sofrer toxicidade significativa, enquanto outras linhagens submetidas às mesmas condições se mostraram sensíveis. E mais, estas células abastadas com DOX, quando co-cultivadas com outras linhagens, promoveram inibição do crescimento destas, ou seja, atuaram como reservatórios do quimioterápico, e subsequentemente, liberaram metabólitos ou o próprio medicamento, de forma tardia. O mesmo grupo, em 2011, utilizou a mesma linhagem estromal do estudo anterior em comparação à CTM de medula óssea humana, que demonstraram também possuir as mesmas propriedades. Avaliaram a internalização de paclitaxel, droga altamente lipofílica, anti-tumoral e anti-angiogênica, conjugada com marcador fluorescente (FITC). Após a inclusão, estas células foram capazes de liberar lentamente esses compostos (Pessina et al., 1999; Pessina et al., 2011).

Neste mesmo trabalho, foi comprovada a expressão considerável de P-gp nas CTM da medula óssea humana, bem como na linhagem estromal de camundongo. Frente ao quimioterápico, ambas foram tratadas com o bloqueador verapamil, afim de, conferir permanência do medicamento no interior destas células, no entanto, enquanto a linhagem de camundongo se mostrou sensível, as células mesenquimais humanas mantiveram a exclusão da droga e consequente resistência aos seus efeitos. Com isto, há suporte que as CTM da MO humana, possuem outro artifício contra agentes tóxicos, além da P-glicoproteína (Pessina et al., 2011).

O mecanismo de escape destas células pode estar relacionado à redução ou bloqueio da ação de compostos tóxicos, devido à capacidade de adsorvê-los e liberá-los posteriormente. Há estudos que, associam esta habilidade à atuação de microtúbulos, ou seja, ao entrar nas células o composto é internalizado em vesículas derivadas do aparelho de Golgi. Entretanto, ainda são necessários maiores estudos para comprovar esta hipótese. Há também, a possibilidade da atuação da LRP (*Lung resistance proteins*), que é capaz de promover o transporte vesicular de compostos de maneira bidirecional núcleo-citoplasma, uma vez que, sua morfologia peculiar e sua localização, citoplasmática e nuclear, favorecem esta função. Estes pressupostos trazem novas perspectivas às CTM, como o transporte de medicamentos, que associado à capacidade de migração destas células dentro do organismo e tropismo por fatores inflamatórios, poderá se tornar uma aplicação clínica muito importante futuramente (Polioudaki et al., 2009; Possina et al., 2011).

A função exata da LRP ainda não foi definida, primeiramente foi associada à resistência a drogas, seguida de diversas outras funções já propostas, incluindo a atuação na plasticidade celular. Trabalhos utilizando células dendríticas, demonstraram que ao promover o bloqueio da expressão da LRP, ocorre diminuição da viabilidade celular, e problemas na maturação das células jovens. Há trabalhos que associam a LRP ao desenvolvimento embrionário, como Kolli e colaboradores (2004), que avaliou fibroblastos de embriões de camundongos deficientes da LRP. Uma vez submetidas ao ambiente ótimo para cultivo, estas células não

apresentaram atividade proliferativa, e na ausência de soro fetal aumentaram significativamente a apoptose, quando comparadas aos fibroblastos controle. Estes dados sugerem relação entre a capacidade de autorrenovação e a expressão da LRP. Esta possível associação poderia, explicar a prevalência da expressão do gene da LRP nas células-tronco mesenquimais do LA indiferenciadas, além das amostras de MO, que exibiram quantidades consideráveis deste gene, no entanto não houve significância estatística (Schroeijers et al., 2002; Kolli et al., 2004; Sutovsky et al., 2005).

Neste trabalho, foi observada menor expressão do gene ABCB1 ($11,53 \pm 5,178$; $p=0,0029$) nas populações de células do LA, em relação ao gene LRP ($187,50 \pm 43,77$). Baixas quantidades do ABCB1 também foram observadas, nas células de MO ($MO= 0,1946 \pm 0,185$), embora sem diferença significativa. Diversos estudos tem relacionado à expressão dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP em amostras ou linhagens de células cancerosas, submetidas ou não a medicamentos, que embora não associados às células mesenquimais, se assemelham aos achados do presente estudo. Hodorová e colaboradores avaliaram a P-gp, MRP1 e LRP em 47 amostras de carcinoma renal, e observaram que 21% das amostras foram positivas para a P-gp, enquanto 62% e 76,6% foram positivas para MRP1 e LRP, respectivamente. Em câncer de pulmão, Paredes-Lario também obteve maior frequência da LRP, em 64% dos pacientes avaliados, seguida da P-gp (49%) e da MRP1 (38%). Assim como o grupo de Leith observou, em leucemia mieloide aguda, a P-gp menos frequente que a

MRP1 e LRP na população avaliada. No estudo de Ogretmen et al., que investigou a relevância da P-gp, MRP1 e LRP em leucemia linfóide aguda, e demonstrou altos níveis de mRNA da LRP e ABCC1, mas não de ABCB1. Taipalensuu em 2001 avaliou, 10 proteínas relacionadas a resistência em amostras de jejuno humano e na linhagem de epitélio intestinal Caco-2, e surpreendentemente observou que, 6 das proteínas avaliadas demonstraram níveis de expressão comparáveis ou maiores à P-gp. E sugeriu que outras proteínas têm sido subestimadas com relação à resistência a drogas, em comparação à P-gp. Tendo em vista estes pressupostos da literatura, há grandes perspectivas para os estudos envolvendo a MRP1 e LRP, pois a relação entre estas, bem como suas propriedades juntas, ainda são pouco esclarecidas, sendo este um vasto campo para exploração científica (Leith et al., 1999; Ogretmen et al., 2000; Taipalensuu et al., 2001; Paredes-Lario et al., 2006; Hodorová et al., 2008; Polioudaki et al., 2009).

No presente estudo, a expressão gênica dos transportadores avaliados, quando visualizada de maneira individual (Anexo F) apresenta variação da expressão gênica tanto entre as amostras biológicas do mesmo gênero, quanto na comparação entre LA e MO. Estudos de diversas áreas científicas revelaram que, mesmo em populações estritamente clonais, os padrões de expressão gênica são estocásticos, resultando em variabilidade, que em certos momentos podem ser manifestadas a nível celular. Em geral, a natureza aleatória da expressão gênica, pode ser explicada devido à oscilação da expressão de fatores transcricionais, que leva à consequente flutuação da rede transcricional, possivelmente causando propensão das

células a certos destinos, sendo assim, considerada vital para adaptação a diversos eventos. Outra hipótese são as mudanças epigenéticas, por meio da metilação ou acetilação, resultando na superexpressão dos genes relacionados à resistência. Sendo assim, cada amostra poderia ter um fenótipo independente com relação à resistência (Song et al., 2008; Barzilay et al., 2009).

O presente estudo apresentou algumas limitações, como o pequeno número de amostras e a impossibilidade de executar todos os experimentos com todas as amostras obtidas. No entanto, os achados contribuíram para o avanço do conhecimento, sobre os danos causados pela quimioterapia nas CTM, que é um tema de grande importância na prática clínica. Tendo em vista a comum utilização da combinação de agentes quimioterápicos e radiação, há grande dificuldade em definir as influências individuais destes fatores nos pacientes, sendo assim, de grande valia estudos que abordem cada um separadamente. Caso as CTM sofram danos irreversíveis frente aos tratamentos usuais, porventura os pacientes podem desenvolver doenças relacionadas aos tecidos mesenquimais, como por exemplo, osteopenia. Por outro lado, há situações como no tratamento da osteogênese imperfeita, que é necessária a erradicação das CTM do paciente receptor do transplante de medula óssea. Sendo assim, os processos envolvidos na preservação ou eliminação das CTM, e seu comportamento frente aos tratamentos usuais, pode ser de grande importância, para a elaboração de protocolos que promovam a manutenção

da população destas células, bem como o inverso, quando necessário (Horwitz et al., 1999; Banfi et al., 2001; Li et al., 2004).

7. CONCLUSÕES

Conclui-se que:

- Foi possível isolar populações de células-tronco mesenquimais, tanto das amostras de líquido amniótico humano do segundo trimestre de gestação, quanto das amostras de medula óssea humana de pacientes adultos;
- As células-tronco mesenquimais da medula óssea e do líquido amniótico possuem menores porcentagens de P-glicoproteína quando comparadas à linhagem MES-DX resistente. No entanto, exibiram fenótipo de resistência ao quimioterápico doxorrubicina, semelhante à linhagem resistente MES-DX. Portanto, não pode ser descartada a hipótese da atuação de outros fatores neste fenótipo, como a MRP1. A atividade da P-gp, entre as células MES-DX e células-tronco do líquido amniótico foram equivalentes. No entanto, a dinâmica das células da medula óssea foi distinta das demais, o que também sugere a atuação de outro mecanismo de exclusão nesta linhagem de células, dentre as possibilidades está a atividade da LRP.
- A baixa expressão do gene ABCB1 nas células-tronco mesenquimais indiferenciadas sugere que as outras proteínas relacionadas à resistência avaliadas MRP1 e LRP podem ter maior importância na resistência destas células. O processo de diferenciação *in vitro* não interferiu na distribuição da expressão dos genes de resistência às

drogas nas populações de células-tronco mesenquimais avaliadas, no entanto, pode ter influenciado na função das proteínas.

Tendo em vista estes achados, o presente trabalho poderá servir de base para próximos experimentos focando comprovar as suposições levantadas ou esclarecer o papel exato da resistência às drogas nas células-tronco mesenquimais.

Anexo A - Sequências de iniciadores**Tabela 01** – Sequências de iniciadores (*primers*) (senso e antissenso) utilizados nas reações de PCR e PCR em tempo real

Genes	Primers	Produto (pb)
Genes de indiferenciação		
Oct-4	5' - aag cga tca agc agc gac tat -3' 5' - gga aag gga ccg agg agt aca - 3'	163
Nanog	5' - caa agg caa aca acc cac tt - 3' 5' - tct gct gga ggc tga ggt at - 3'	158
Genes tecido específicos		
Tecido ósseo		
Osteocalcina	5' - atg aga gcc ctc aca ctc ct - 3' 5' - caa ggg gaa gag gaa aga ag - 3'	359
Osteopontina	5' - cat ggc atc acc tgt gcc ata cc - 3' 5' - cag tga cca gtt cat cag att cat c - 3'	331
Tecido cartilagenoso		
Perlecan	5' - cat aga gac cgt cac agc aag - 3' 5' - atg aac acc aca ctg aca acc - 3'	300
Syndecan	5' - cct tca cac tcc cca cac - 3' 5' - ggc ata gaa ttc ctc ctg ttg - 3'	410
Tecido adiposo		
PPAr-gamma2	5' - gct gtt atg ggt gaa act ctg - 3' 5' - ata agg tgg aga tgc agg ctc - 3'	351
Lipoproteína Lipase	5' - ctt ctg ttc tag gga gaa agt g - 3' 5' - tgc tgt gta gat gag tct gat t - 3'	578
Genes relacionados a resistência à drogas		
ABCB1	5' - gtt caa act tct gct cct ga - 3' 5' - ccc atc att gca ata gca gg - 3'	157
ABCC1	5' - agg gga tca tcg aag agg taa at - 3' 5' - gag gaa cca tat tac agg tcc gt - 3'	188
LRP	5' - ggg ttg tgc cca tca cca cc - 3' 5' - ggt ccg cgg atg agc cag tgg - 3'	280
Genes endógenos		
β-actina	5' - tgg cac cac acc ttc tac aat gag c -3' 5' - gca cag ctt ctc ctt aat gtc acg c -3'	396
GUSB	5' - gaa aat acg tgg ttg gag agc tca tt - 3' 5' - ccg agt gaa gat ccc ctt ttt a - 3'	101
GAPDH	5' - gga agg tga agg tcg gag tca - 3' 5' - ctg gaa gat ggt gat ggg att tc - 3'	230
LMO2	5' - cgg atc ctg gcc tat gag at - 3' 5' - agg cgg cgc att tga a - 3'	76

Anexo B – Expressão dos genes de indiferenciação

Figura 16 – Análise da expressão realizada por RT-PCR dos genes β -actina; Oct-4 e Nanog de 20 amostras de líquido amniótico e 6 de medula óssea até a terceira passagem, H₂O (controle) e marcador de peso molecular (100pb) dispostos em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz UV, seguido de diagrama de Venn ilustrando os resultados qualitativos da expressão.

Anexo C – Imunofenotipagem de células-tronco mesenquimais

Figura 17 - Histogramas obtidos por citometria de fluxo das células isoladas de líquido amniótico e medula óssea marcadas com os anticorpos monoclonais: CD45 FITC, CD31 FITC, CD34 FITC e CD14 PE (hematopoiéticos); CD90 FITC, CD105 PE, CD29 PE e CD44 PE (mesenquimais); e controles isotípicos IgG FITC e IgG PE.

Anexo D – Expressão gênica das CTM diferenciadas

Figura 21 – Análise da expressão gênica realizada por RT-PCR β -actina controle e dos genes de tecido adiposo PPAR-gama, lipoproteína liapase; tecido cartilaginoso perlecan, syndecan, ósseo osteopontina, osteocalcina, de nas amostras de líquido amniótico e medula óssea tratadas para as diferenciação respectiva para cada par de genes; os resultados foram dispostos em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizados em transiluminador UV. Utilizou-se a H₂O como controle da reação e marcador de peso molecular de 100pb.

Anexo E – Padronização da reação de RT-PCR em tempo real

Figura 28 – Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene GUSB; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R² e curva de dissociação.

Anexo E – Padronização da reação de RT-PCR em tempo real

Figura 29 – Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene ABCB1; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R² e curva de dissociação.

Anexo E – Padronização da reação de RT-PCR em tempo real

Figura 30 – Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene ABCC1; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R² e curva de dissociação.

Anexo E – Padronização da reação de RT-PCR em tempo real

Figura 31 – Dados da padronização da reação de RT-PCR em tempo real utilizando iniciadores para o gene LRP; Média ± DP do Ct de cada triplicata, das respectivas concentrações da diluição (ng) do cDNA das células MES-DX; Curva padrão e suas respectivas: eficiência (Eff%), Slope, R² e curva de dissociação.

Anexo F – Expressão dos genes de resistência a drogas

Figura 36 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=9) líquido amniótico (LA) e (n=6) medula óssea (MO) indiferenciadas

Anexo F – Expressão dos genes de resistência a drogas

Figura 37 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA) e (n=4) medula óssea (MO) submetidas à diferenciação adipogênica

Anexo F – Expressão dos genes de resistência a drogas

Figura 38 - Quantidade de expressão relativa dos genes ABCB1, ABCC1 e LRP (razão entre as quantidades dos genes alvo/GUSB gene endógeno) em amostras de (n=3) líquido amniótico (LA) e (n=4) medula óssea (MO) submetidas à diferenciação osteogênica.

Anexo G – Termo de consentimento livre e esclarecido para doação de líquido amniótico

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE
AMOSTRAS DE LÍQUIDO AMNIÓTICO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo de genes associados à resistência a múltiplas drogas em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea pré e pós-diferenciação

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sérgio Paulo Bydlowski

CARGO/FUNÇÃO: Médico
Nº.: 28342

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Genética e Hematologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Por indicação médica, a Sra. será submetida à coleta de uma amostra de líquido amniótico chamada amniocentese. A amostra coletada será utilizada para o exame genético do seu bebê. O restante desse líquido será descartado. No entanto, líquido amniótico é um material biológico raro e pouco estudado. Há estudos que afirmam que há células-tronco no líquido amniótico humano. Estudar essas células-tronco é muito importante para sua utilização em futuros tratamentos de doenças que ainda não tem cura. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa reaproveitar o líquido amniótico que seria jogado no lixo para estudar as características das células-tronco do fora do corpo humano.

2 – O líquido coletado será enviado ao laboratório para analisar seu conteúdo e confirmar se seu bebê tem problemas nos cromossomos ou não. O restante que seria jogado no lixo poderá ser utilizado na nossa pesquisa, cujo objetivo é cultivar as células-tronco fora do corpo humano e estudar sua resposta a medicamentos;

3 – A coleta do líquido amniótico será realizada através da introdução de uma agulha, guiada por ultrassonografia, no seu abdômen, sem atingir o bebê.

4 – Na maioria das vezes essa coleta não apresenta complicações. No entanto, raramente, pode acontecer sangramento vaginal, rompimento da bolsa d'água, infecção, enjôos ou até mesmo acontecer aborto ou não se conseguir realizar a coleta.

5 – Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de que há células-tronco no líquido amniótico humano. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício e uso para estas células.

6 – Haverá disponibilidade de assistência para o tratamento pré-natal e pós-natal no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia do HCFMUSP e na dependência de disponibilidade tanto do sujeito quanto do serviço, o atendimento obstétrico.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, que pode ser

encontrado no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM-31. Endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 10º andar, São Paulo, SP. Fone: (11) 30696209.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o "Estudo de genes associados à resistência a múltiplas drogas em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico pré e pós-diferenciação"

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo G – Termo de consentimento livre e esclarecido para doação de medula óssea

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

**MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE
AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA**

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

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Estudo de genes associados à resistência a múltiplas drogas em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea pré e pós-diferenciação

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sérgio Paulo Bydlowski

CARGO/FUNÇÃO: Médico
Nº.: 28342

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Genética e Hematologia Molecular

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☐

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☒

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Por indicação médica o Sr. (a), deverá ser submetido a uma cirurgia ortopédica para fins paliativos ou corretivos. Alguns ossos contêm no seu interior um tecido chamado medula óssea, que é considerado uma fonte rica em células-tronco. As células-tronco possuem propriedades únicas que podem beneficiar muitas pessoas no tratamento de doenças consideradas incuráveis. No entanto para conhecer a fundo as características dessas células, ainda são necessários muitos estudos científicos antes de serem aplicadas na terapia de doenças em humanos. Essas informações estão sendo fornecidas para Sr. (a) visando a sua participação voluntária nesta pesquisa, doando uma pequena amostra de medula óssea, para estudos no nosso laboratório. A coleta é considerada de baixo risco e poderá ser realizada durante a operação, sem aumentar o risco da cirurgia e não deverá apresentar maiores efeitos colaterais, já que o (a) Sr. (a) estará sob tratamento pós-operatório. A coleta será feita por uma punção no osso da bacia (crista ilíaca) e não será necessário corte ou pontos após a coleta.

2 – O objetivo do estudo é isolar células-tronco da amostra de medula óssea, que serão cultivadas fora do corpo humano para estudar sua resposta a alguns medicamentos;

3 – A coleta será realizada durante a cirurgia através da introdução de uma agulha na parte posterior da sua cintura (osso da bacia).

4 – A coleta será realizada durante a cirurgia, quando o Sr.(a) deverá estar sedado. A coleta não deverá apresentar maiores complicações, já que o Sr.(a) estará recebendo o tratamento pré e pós-operatório com todos os cuidados e precauções para evitar dores e infecções.

5 – Não há benefício direto para o participante, pois trata-se de um estudo experimental seguindo a hipótese de que há células-tronco na medula óssea humano. Somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício e uso para estas células.

6 – Haverá disponibilidade de assistência para o tratamento pré-operatório e pós-operatório no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do HCFMUSP e na dependência de disponibilidade tanto do sujeito quanto do serviço.

7 – Garantia de acesso: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, que pode ser encontrado no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM-31. Endereço: Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 10º andar, São Paulo, SP. Fone: (11) 30696209.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

11 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o “Estudo de genes associados à resistência a múltiplas drogas em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico pré e pós-diferenciação”

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Eu discuti com o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante
legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

Anexo H – Aprovação do comitê de ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia do HC-FMUSP

**FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na 178ª reunião no dia 01 de Fevereiro de 2011, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de pesquisa intitulado: **"ESTUDO DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A MULTIPLAS DROGAS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E MEDULA ÓSSEA PRÉ E PÓS-DIFERENCIAÇÃO"**, dos seguintes pesquisadores: Juliana Pereira, Carolina Martinez Romão, Sérgio Paulo Bydlowski, Marco Antonio Borges Lopes, Sérgio Duarte e Marcelo Zugaib, devendo ser encaminhado ao presidente da Comissão de Ética CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 07 de Fevereiro de 2011.

Prof. Dra. ANGELA MAGGIO DA FONSECA
Presidente do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

Prof. Dr. SEIZO MIYADAHIRA
Secretário do Comitê de Ética do DOG-FMUSP

**APROVADO PELO CONSELHO
DO DOG EM 16/02/2011**

PROF. DR. EDMUND CHADA BARACAT
Chefe do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Anexo I – Aprovação do comitê de ética do Departamento de Ortopedia e Traumatologia do HC-FMUSP

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Prof. Dr. Tarcisio E.P. Barros Filho
Prof. Dr. Olavo Pires de Camargo
Prof. Dr. Gilberto Luis Camanho

Memo/CC-DOT/127/2011

São Paulo, 03 de agosto de 2011.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski
Orientador

Ref: Protocolo de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica – Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP, intitulado “Estudo de genes associados à resistência a múltiplas drogas em células-tronco mesenquimais humanas derivadas do líquido amniótico e medula óssea pré e pós-diferenciação”.

Pesquisadora Executante: Carolina Martinez Romão

Grau da Pesquisa: Mestrado

A Comissão Científica do Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo **analisou e aprovou** nesta data, a solicitação para desenvolver o protocolo de pesquisa acima citado, junto ao Grupo de Coluna do IOT HC FMUSP.

Atenciosamente,

Prof. Alberto Tesconi Croci
Presidente
Comissão Científica – DOT

Anexo J – Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa CAPPesq

Nº Protocolo: 0620/11

Título: ESTUDO DE GENES ASSOCIADOS À RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DO LÍQUIDO AMNIÓTICO E MEDULA ÓSSEA PRÉ E PÓS-DIFERENCIAÇÃO

Pesquisador Responsável: Sergio Paulo Bydlowski

Pesquisador Executante: Carolina Martinez Romão

Ce-autores: Alexandre Fogaça Cristante; Tarcisio E. P. Borges Filho; Marco Antonio Borges; Marcelo Zugala

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

O Coordenador da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA ad-referendum** na data de 30/09/2011 o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 30 de Setembro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8. REFERÊNCIAS

- Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*. 2009; 217(2):144-60.
- Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. *J Pathol*. 2002; 197(4):419-23.
- Aye IL, Paxton JW, Evseenko DA, Keelan JA. Expression, localisation and activity of ATP binding cassette (ABC) family of drug transporters in human amnion membranes. *Placenta*. 2007 Aug-Sep;28(8-9):868-77. Epub 2007 May 7.
- Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003; 22(47):7468-85.
- Arai F, Suda T. Quiescent stem cells in the niche in Stem Book. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.
- Banfi A, Podestà M, Fazzuoli L, Sertoli MR, Venturini M, Santini G, Cancedda R, Quarto R. High-dose chemotherapy shows a dose-dependent toxicity to bone marrow osteoprogenitors: a mechanism for post-bone marrow transplantation osteopenia. *Cancer*. 2001 Nov 1;92(9):2419-28.
- Barzilay R, Melamed E, Offen D. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: making transdifferentiation possible. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2509-15.
- Bapat SA. Evolution of cancer stem cells. *Semin Cancer Biol*. 2007; 17(3):204-13. Epub 2006 May 20.
- Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005 May 11;21(3):389-95. Epub 2005 Mar 15.
- Berger W, Steiner E, Grusch M, Elbling L, Micksche M. Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(1):43-61.
- Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:537-92.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(16):1295-302.
- Borst P, Jonkers J, Rottenberg S. What makes tumors multidrug resistant? *Cell Cycle*. 2007; 6(22):2782-7.

Bossolasco P, Montemurro T, Cova L, Zangrossi S, Calzarossa C, Buiatoti S, Soligo D, Bosari S, Silani V, Deliliers GL, Rebutta P, Lazzari L. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res.* 2006 Apr;16(4):329-36.

Bunting KD, Galipeau J, Topham D, Benaim E, Sorrentino BP. Transduction of murine bone marrow cells with an MDR1 vector enables ex vivo stem cell expansion, but these expanded grafts cause a myeloproliferative syndrome in transplanted mice. *Blood.* 1998 Oct 1;92(7):2269-79.

Calcagno AM, Salcido CD, Gillet JP, Wu CP, Fostel JM, Mumau MD, Gottesman MM, Varticovski L, Ambudkar SV. Prolonged drug selection of breast cancer cells and enrichment of cancer stem cell characteristics. *J Natl Cancer Inst.* 2010 Nov 3;102(21):1637-52. Epub 2010 Oct 8.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Choolani M, Bennett PR, Letsky E, Fisk NM. Expandability of haemopoietic progenitors in first trimester fetal and maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Prenat Diagn.* 2002 Jun;22(6):463-9.

Carmichael J, Degraff WG, Gazdar AF, Minna JD & Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47, 936.

Caplan, Al (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9(5), 641-50.

Challen GA, Little MH. A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells.* 2006 Jan;24(1):3-12.

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; 25:2739-49.

Chandler JM, Lagasse E. Cancerous stem cells: deviant stem cells with cancer-causing misbehavior. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1(2):13.

Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther.* 2010 Sep;21(9):1045-56.

Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 1991 Jul 12;66(1):85-94.

Chen KG, Wang YC, Schaner ME, Francisco B, Durán GE, Juric D, Huff LM, Padilla-Nash H, Ried T, Fojo T, Sikic BI. Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9388-97.

Colabufo NA, Berardi F, Contino M, Inglese C, Niso M, Perrone R. Effect of some P-glycoprotein modulators on Rhodamine-123 absorption in guinea-pig ileum. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008 Jul 1;18(13):3741-4. Epub 2008 May 20.

Crocker AK, Allan AL. Cancer stem cells: implications for the progression and treatment of metastatic disease. *J Cell Mol Med*. 2008 Apr;12(2):374-90. Epub 2007 Dec 20.

Darzynkiewicz Z, Balazs EA. Genome integrity, stem cells and hyaluronan. *Aging* (Albany NY). 2012 Feb 26. [Epub ahead of print]

De Crespigny L, Robinson HP, Ngu A. Pain with amniocentesis and transabdominal CVS. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 1990; 30(4):308-9.

De Figueiredo-Pontes LL, Pintão MC, Oliveira LC, Dalmazzo LF, Jácomo RH, Garcia AB, Falcão RP, Rego EM. Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 May;74(3):163-8.

De Groot DJ, van der Deen M, Le TK, Regeling A, de Jong S, de Vries EG. Indomethacin induces apoptosis via a MRP1-dependent mechanism in doxorubicin-resistant small-cell lung cancer cells overexpressing MRP1. *Br J Cancer*. 2007 Oct 22;97(8):1077-83. Epub 2007 Oct 16.

Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*. 2001; 42(7):1007-17.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000; 28(8):875-84.

Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*. 2006; 86(3):849-99.

Descrição dos genes avaliados. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Acesso em outubro de 2011

Díaz-Flores L Jr, Madrid JF, Gutiérrez R, Varela H, Valladares F, Alvarez-Argüelles H, Díaz-Flores L. Adult stem and transit-amplifying cell location. *Histol Histopathol*. 2006; 21(9):995-1027

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20(1):5-14.

Dobreva MP, Pereira PN, Deprest J, Zwijsen A. On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *Int J Dev Biol*. 2010;54(5):761-77.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.

Donnenberg VS, Donnenberg AD. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*. 2005 Aug;45(8):872-7.

Dushnik-Levinson M, Benvenisty N. Embryogenesis in vitro: study of differentiation of embryonic stem cells. *Biol Neonate*. 1995;67(2):77-83.

Dvash T, Benvenisty N. Human embryonic stem cells as a model for early human development. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004;18(6):929-40.

Fábián A, Barok M, Vereb G, Szöllosi J. Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? *Cytometry A*. 2009; 75(1):67-74.

Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004 Dec;18(6):877-91.

Fedasenka UU, Shman TV, Savitski VP, Belevcev MV. Expression of MDR1, LRP, BCRP and Bcl-2 genes at diagnosis of childhood all: comparison with MRD status after induction therapy. *Exp Oncol*. 2008 Sep;30(3):248-52.

Fève B. Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;19(4):483-99.

Fontana V. Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais da medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica. 2009. [Dissertação]. Faculdade Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393-403.

Garrigues A, Escargueil AE, Orlowski S. The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10347-52. Epub 2002 Jul 26.

Germann UA, Chambers TC. Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glycoprotein. *Cytotechnology*. 1998; 27(1-3):31-60.

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr Drug Deliv*. 2004; 1(1):27-42.

Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):48-58.

Gottesman MM. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu Rev Med*. 2002; 53:615-27.

Gucciardo L, Lories R, Ochsenbein-Kölble N, Done' E, Zwijsen A, Deprest J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potential use in perinatology and regenerative medicine. *BJOG*. 2009; 116(2):166-72.

Hadnagy A, Gaboury L, Beaulieu R, Balicki D. SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Exp Cell Res*. 2006; 312(19):3701-10.

Harrison DE. Long-term erythropoietic repopulating ability of old, young, and fetal stem cells. *J Exp Med*. 1983 May 1;157(5):1496-504.

He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr Med Chem*. 2011;18(3):439-81.

Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 2004 Dec;3(12):1481-3. Epub 2004 Dec 4.

Ho MM, Hogge DE, Ling V. MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2008 Apr;36(4):433-42. Epub 2008 Jan 30.

Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 2009;136(4):509-23.

Hodorová I, Rybářová S, Solár P, Vecanová J, Mihalik J, Bohus P, Mellová Y, Kluchová D. Multidrug resistance proteins in renal cell carcinoma. *Folia Biol (Praha)*. 2008;54(6):187-92.

Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999 Mar;5(3):309-13.

Hsiao P, Sasongko L, Link JM, Mankoff DA, Muzi M, Collier AC, Unadkat JD. Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 May;317(2):704-10. Epub 2006 Jan 13.

Huls M, Russel FG, Masereeuw R. The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 Jan;328(1):3-9. Epub 2008 Sep 12.

Hwang NS, Zhang C, Hwang YS, Varghese S. Mesenchymal stem cell differentiation and roles in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 Jul-Aug;1(1):97-106.

Ikuta K, Takemura K, Sasaki K, Kihara M, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Lee E, Shimizu E, Yamauchi A. Expression of multidrug resistance proteins and accumulation of cisplatin in human non-small cell lung cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 2005 Apr;28(4):707-12.

Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, van der Valk P, Scheper RJ. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol*. 1996 Mar;148(3):877-87.

Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med*. 2007; 53(2):121-7.

Johnstone RW, Ruefli AA, Smyth MJ. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci*. 2000 Jan;25(1):1-6.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Nov 11;455(1):152-62.

Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, Adjaye J. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS One*. 2010 May 21;5(5):e10709.

Kagedal B, Farnebäck M, Hakansson A, Gustafsson B, Hakansson L. How useful are housekeeping genes? Variable expression in melanoma metastases. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(11):1481-7.

Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev*. 2009 Sep;18(7):1093-108.

Kastrinaki MC, Andreakou I, Charbord P, Papadaki HA. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers:

comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Eng Part C Methods*. 2008; 14(4):333-9.

Kim J, Lee Y, Kim H, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*. 2007; 40(1):75-90.

Kim SG, Jeon CH, Suh HS, Choe JY, Shin IH. P-glycoprotein expression in extracellular matrix formation of chondrogenic differentiation of human adult stem cells. *Cell Biol Int*. 2007 Sep;31(9):1042-8. Epub 2007 Mar 20.

Klunder JW, Komdeur R, Van Der Graaf WT, De Bont EJ, Hoekstra HJ, Van Den Berg E, Molenaar WM. Expression of multidrug resistance-associated proteins in rhabdomyosarcomas before and after chemotherapy: the relationship between lung resistance-related protein (LRP) and differentiation. *Hum Pathol*. 2003 Feb;34(2):150-5.

Koç ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, DeGasperi R, Kolodny EH, Yoseph YB, Gerson SL, Lazarus HM, Caplan AI, Watkins PA, Krivit W. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol*. 1999 Nov;27(11):1675-81.

Kolli S, Zito CI, Mossink MH, Wiemer EA, Bennett AM. The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling. *J Biol Chem*. 2004 Jul 9;279(28):29374-85. Epub 2004 May 7.

Kong LB, Siva AC, Rome LH, Stewart PL. Structure of the vault, a ubiquitous cellular component. *Structure*. 1999 Apr 15;7(4):371-9.

Kong LB, Siva AC, Kickhoefer VA, Rome LH, Stewart PL. RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault. *RNA*. 2000 Jun;6(6):890-900.

Lanza R, Gearhart J, Hogan B. Essentials of stem cell biology. *Elsevier*. 2006

Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdens L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999 Aug 1;94(3):1086-99.

Leslie EM, Deeley RG, Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005; 204(3):216-37.

Li B, Gao R, Zhang H, Li LQ, Gao F, Ren RJ. Studies on multidrug resistance associated protein in retinoblastoma. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*. 2009 Apr;45(4):314-7.

Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*. 2004 Nov;127(3):326-34.

Mafi P, Hindocha S, Mafi R, Griffin M, Khan WS. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*. 2011;5(Suppl 2):253-60. Epub 2011 Jul 28.

Meyer zu Schwabedissen H, Jedlitschky G, Gratz M, Haenisch S, Linnemann K, Fusch C, et al. Variable expression of MRP2 (ABCC2) in human placenta: Influence of gestational age and cellular differentiation. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33: 896 e 904.

Mizutani T, Masuda M, Nakai E, Furumiya K, Togawa H, Nakamura Y, Kawai Y, Nakahira K, Shinkai S, Takahashi K. Genuine functions of P-glycoprotein (ABCB1). *Curr Drug Metab*. 2008; 9(2):167-74.

Modica-Napolitano JS, Weiss MJ, Chen LB, Aprille JR. Rhodamine 123 inhibits bioenergetic function in isolated rat liver mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Feb 14;118(3):717-23.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*. 1983.65, p.55-63.

Mossink MH, van Zon A, Scheper RJ, Sonneveld P, Wiemer EA. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? *Oncogene*. 2003; 22(47):7458-67.

Munoz M, Henderson M, Haber M, Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*. 2007; 59(12):752-7.

Nieuwenhuis B, Lüth A, Chun J, Huwiler A, Pfeilschifter J, Schäfer-Korting M, Kleuser B. Involvement of the ABC-transporter ABCC1 and the sphingosine 1-phosphate receptor subtype S1P(3) in the cytoprotection of human fibroblasts by the glucocorticoid dexamethasone. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Jun;87(6):645-57. Epub 2009 Apr 17.

Nishimura M, Nikawa T, Kawano Y, Nakayama M, Ikeda M. Effects of dimethyl sulfoxide and dexamethasone on mRNA expression of housekeeping genes in cultures of C2C12 myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Mar 14;367(3):603-8. Epub 2008 Jan 10.

Ogretmen B, Barredo JC, Safa AR. Increased expression of lung resistance-related protein and multidrug resistance-associated protein messenger RNA

in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2000 Jan-Feb;22(1):45-9.

Pappa KI, Anagnou NP. Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum? *Regen Med*. 2009 May;4(3):423-33.

Paredes-Lario A, Blanco-García C, Echenique-Elizondo M. Expression of multiple-drug resistant proteins in lung cancer. *Cir Esp*. 2006 Jan;79(1):46-56.

Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38915-20. Epub 2002 Jul 22.

Pessina A, Piccirillo M, Mineo E, Catalani P, Gribaldo L, Marafante E, Neri MG, Raimondi A. Role of SR-4987 stromal cells in the modulation of doxorubicin toxicity to in vitro granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM). *Life Sci*. 1999;65(5):513-23.

Pessina A, Bonomi A, Coccè V, Invernici G, Navone S, Cavicchini L, Sisto F, Ferrari M, Viganò L, Locatelli A, Ciusani E, Cappelletti G, Cartelli D, Arnaldo C, Parati E, Marfia G, Pallini R, Falchetti ML, Alessandri G. Mesenchymal stromal cells primed with paclitaxel provide a new approach for cancer therapy. *PLoS One*. 2011;6(12):e28321. Epub 2011 Dec 20.

Pétriz J, García-López J. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein function using rhodamine 123. *Leukemia*. 1997 Jul;11(7):1124-30.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004 Mar;26(6):509-15.

Persson H, Kvist A, Vallon-Christersson J, Medstrand P, Borg A, Rovira C. The non-coding RNA of the multidrug resistance-linked vault particle encodes multiple regulatory small RNAs. *Nat Cell Biol*. 2009 Oct;11(10):1268-71. Epub 2009 Sep 13.

Polioudaki H, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Theodoropoulos PA Microtubule-interacting drugs induce moderate and reversible damage to human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Prolif*. 2009 Aug;42(4):434-47. Epub 2009 May 22.

Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):425-32.

Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24731-7. Epub 2005 Apr 27.

Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007 Dec;16(6):931-52.

Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev*. 2006 Oct;86(4):1179-236.

Scheffer GL, Schroeijers AB, Izquierdo MA, Wiemer EA, Scheper RJ. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Curr Opin Oncol*. 2000; 12(6):550-6.

Scheper RJ, Broxterman HJ, Scheffer GL, Kaaijk P, Dalton WS, van Heijningen TH, van Kalken CK, Slovak ML, de Vries EG, van der Valk P, et al. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Res*. 1993; 53(7):1475-9.

Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003 Jan 21;55(1):3-29.

Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells in Stem Book. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.

Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2000 Nov 20;46(1-2):69-81.

Schroeijers AB, Reurs AW, Scheffer GL, Stam AG, de Jong MC, Rustemeyer T, Wiemer EA, de Gruijl TD, Scheper RJ. Up-regulation of drug resistance-related vaults during dendritic cell development. *J Immunol*. 2002 Feb 15;168(4):1572-8.

Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004; 51(1):1-28.

Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003; 34(6):565-71.

Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science*. 2008; 322(5907):1498-501.

- Song SU, Kim CS, Yoon SP, Kim SK, Lee MH, Kang JS, Choi GS, Moon SH, Choi MS, Cho YK, Son BK. Variations of clonal marrow stem cell lines established from human bone marrow in surface epitopes, differentiation potential, gene expression, and cytokine secretion. *Stem Cells Dev.* 2008 Jun;17(3):451-61.
- Stavrovskaya AA, Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* 2008; 73(5):592-604.
- Sunnaram BL, Gandemer V, Sebillot M, Grandgirard N, Amiot L, Leray E, Goasguen JE. LRP overexpression in monocytic lineage. *Leuk Res.* 2003 Aug;27(8):755-9.
- Sutovsky P, Manandhar G, Laurincik J, Letko J, Caamaño JN, Day BN, Lai L, Prather RS, Sharpe-Timms KL, Zimmer R, Sutovsky M. Expression and proteasomal degradation of the major vault protein (MVP) in mammalian oocytes and zygotes. *Reproduction.* 2005 Mar;129(3):269-82.
- Taipalensuu J, Törnblom H, Lindberg G, Einarsson C, Sjöqvist F, Melhus H, Garberg P, Sjöström B, Lundgren B, Artursson P. Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001 Oct;299(1):164-70.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.
- Tsai MS, Hwang SM, Chen KD, Lee YS, Hsu LW, Chang YJ, Wang CN, Peng HH, Chang YL, Chao AS, Chang SD, Lee KD, Wang TH, Wang HS, Soong YK. Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. *Stem Cells.* 2007 Oct;25(10):2511-23. Epub 2007 Jun 7.
- Tsuruo T, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H, Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* 2003 Jan;94(1):15-21.
- Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends in Cell Biology.* 2002; 12(11):502-8.
- Van Kalken CK, Giaccone G, van der Valk P, Kuiper CM, Hadisaputro MM, Bosma SA, Scheper RJ, Meijer CJ, Pinedo HM. Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus. *Am J Pathol.* 1992 Nov;141(5):1063-72.

Van Phuc P, Nhan PL, Nhung TH, Tam NT, Hoang NM, Tue VG, Thuy DT, Ngoc PK. Downregulation of CD44 reduces doxorubicin resistance of CD44CD24 breast cancer cells. *Onco Targets Ther.* 2011;4:71-8. Epub 2011 Jun 21.

Vilas-Boas V, Silva R, Gaio AR, Martins AM, Lima SC, Cordeiro-da-Silva A, de Lourdes Bastos M, Remião F. P-glycoprotein activity in human Caucasian male lymphocytes does not follow its increased expression during aging. *Cytometry A.* 2011 Nov;79(11):912-9. doi: 10.1002/cyto.a.21135. Epub 2011 Sep 8.

Zetterblad J, van Duren C, Axelson H, Jönsson JI. The Lim-only protein LMO2 acts as a positive regulator of erythroid differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Dec 21;364(3):675-81. Epub 2007 Oct 22.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1028-34.

Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12339-44. Epub 2002 Sep 6.

Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica.* 2008; 38(7-8):802-32. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.

Wakuda H, Nejime N, Tada Y, Kagota S, Umegaki K, Yamada S, Shinozuka K. Highly sensitive measurement of P-glycoprotein-mediated transport activity in Caco-2 cells. *Biol Pharm Bull.* 2010;33(7):1238-41.

Warrington JS, Greenblatt DJ, von Moltke LL. The effect of age on P-glycoprotein expression and function in the Fischer-344 rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004 May;309(2):730-6. Epub 2004 Feb 2.

Weissman I.L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science.* 2000; 287, 1442–1446.

Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. *Anal Biochem.* 2008 Aug 1;379(1):127-9. Epub 2008 Apr 26.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. Princípios de Biologia do Desenvolvimento. *Artmed Ed. Porto Alegre.* 2000

Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res*. 2002; 69(6):908-17.

Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*. 2008 Sep 8;268(1):1-9. Epub 2008 May 19.