

ROSANA DE ALMEIDA SANTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANGIOGÊNICO DAS CÉLULAS
ESTROMAIS MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DO
SANGUE MENSTRUAL E DA MEDULA ÓSSEA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)**

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2017

Rosana de Almeida Santos

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANGIOGÊNICO DAS
CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS HUMANAS
DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL E DA MEDULA
ÓSSEA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisitos parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientadora:

Prof. Dra. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Coorientadora:

Dra. Karina Dutra Asensi

Rio de Janeiro

2017

Santos, Rosana de Almeida

Avaliação do potencial angiogênico das células estromais mesenquimais humanas derivadas do sangue menstrual e da medula óssea / Rosana de Almeida Santos. – Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2017.

136 f. : il. ; 31 cm.

Orientadora: Regina Coeli dos Santos Goldenberg.

Coorientadora: Karina Dutra Asensi.

Dissertação (mestrado) -- UFRJ, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2017.

Referências: p. 112-126.

1. Células Mesenquimais Estromais. 2. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. 3. Sangue. 4. Sangue Fetal. 5. Medula Óssea. 6. Indutores da Angiogênese. Biofísica. - Dissertação. I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Asensi, Karina Dutra. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. IV. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. V. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). VI. Título.

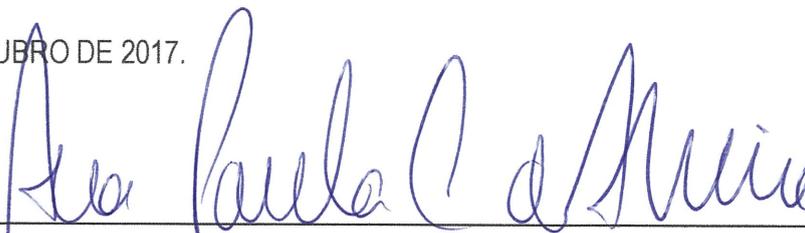
“Avaliação do Potencial Angiogênico das Células Estromais Mesenquimais Humanas derivadas do Sangue Menstrual e da medula óssea”

ROSANA DE ALMEIDA SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA POR:

RIO DE JANEIRO, 11 DE OUTUBRO DE 2017.



DRA. ANA PAULA CABRAL DE ARAUJO LIMA (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BIOFÍSICA)



DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – UFRJ) - ORIENTADOR



DRA. KARINA DUTRA ASENSI (DOUTOR – UFRJ) - COORIENTADOR



DR. PEDRO MORENO PIMENTEL COELHO (DOUTOR – UFRJ)- REVISOR



DRA. KATIA CARNEIRO DE PAULA (DOUTOR – UFRJ)



DR. MARCELO EINICKER LAMAS (DOUTOR – UFRJ)



DRA. MARIA ISABEL DORIA ROSSI (DOUTOR – UFRJ)

Ao meu querido pai (*in memoriam*),
meu maior exemplo acadêmico.

Agradecimentos

A Deus, pela minha vida, saúde, por me permitir passar por esse período de sacrifícios e vitórias e por conseguir concluir este trabalho.

A minha mãe, Solange e meu irmão Lucas, por terem sido tão pacientes comigo e terem aguentado meu mau humor e estresse, principalmente nestes últimos meses que eu estava concluindo a dissertação. Obrigada por toda a força, vocês são minha base, meu estímulo e minha inspiração!

A meu pai, que pôde me ver começar esta jornada, mas infelizmente não pôde ver terminar. Você sempre foi e sempre será meu maior exemplo acadêmico! Meu espelho, meu herói! Sou eternamente grata por ser sua filha!

Ao meu namorado, Fred, que sempre esteve ao meu lado me apoiando, me dando equilíbrio e força para continuar. Obrigada por ter me encorajado e incentivado de todas as formas! Obrigada pela sua companhia, pelo seu carinho, amor, amizade, solidariedade e por não medir esforços para me ajudar no que fosse preciso durante a confecção deste trabalho!

A minha orientadora, professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg, pelos ensinamentos, discussões, solicitude e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

A minha coorientadora, Karina Dutra Asensi, pelas dicas, ensinamentos, discussões, pelo apoio nas análises dos dados e por compartilhar comigo suas experiências de bancada no laboratório.

A Julia Helena e Marianna, pela amizade, companhia e colaboração com os experimentos. Obrigada por fazerem minhas horas de trabalho mais leves e divertidas!

A Taís, por não ter medido esforços para me ajudar com os experimentos de citometria, principalmente nas análises com aquele software horrível. Não tenho palavras para agradecer seu apoio!

A todos os colegas do LCCM, pela companhia e disponibilidade em ajudar diversas vezes em inúmeros experimentos. Obrigada por contribuírem para meu crescimento profissional!

Ao professor José Brito, pela colaboração nos experimentos com embrião de galinha. Gostaria de agradecê-lo pela oportunidade que tive de partilhar sua sabedoria e experiência na ciência.

Ao pessoal do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular, que me receberam de braços abertos permitindo uma ótima colaboração durante os experimentos com embrião de galinha. Gostaria de agradecer especialmente a Patrícia pela enorme ajuda com os experimentos de hibridização *in situ* e por compartilhar a “sofrência” de ajustar o pH do MAB comigo; ao Gustavo, pelo incentivo e pelos momentos de descontração durante as hibridizações malsucedidas; e ao Johnny, pela ajuda com as colorações das lâminas e pelo auxílio com as fotomicrografias. Obrigada de todo meu coração! Vocês foram fundamentais para este trabalho!

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram na minha trajetória para realizar esta conquista.

“The two most important days in your life are the day you are born and the day you find out why.”

Mark Twain

Resumo

SANTOS, Rosana de Almeida. Avaliação do potencial angiogênico das células estromais mesenquimais humanas derivadas do sangue menstrual e da medula óssea. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica)--Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Diversas terapias vêm sendo desenvolvidas com o propósito de aumentar a perfusão sanguínea em tecidos isquêmicos. Nesse contexto, as células estromais mesenquimais (MSC) tem demonstrado um potencial angiogênico promissor no tratamento de doenças que cursam com a redução do aporte sanguíneo. Atualmente, as MSC derivadas de medula óssea (MSC-MO) são as mais estudadas, porém seu método de obtenção é invasivo e desconfortável para os pacientes. Na busca por fontes de células-tronco menos invasivas, o sangue menstrual trouxe perspectivas atrativas para terapia celular. Além disso, há formação de novos vasos sanguíneos durante o ciclo menstrual no endométrio, sugerindo que as MSC presentes neste tecido possam participar da modulação angiogênica. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as propriedades angiogênicas das células estromais mesenquimais humanas derivadas do sangue menstrual (CeSaM) e da medula óssea *in vitro* e *in vivo*. Para tal, primeiramente as CeSaM (n=10) e MSC-MO (n=8) foram cultivadas *in vitro* nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (1% O₂) por 48 e 72 horas. Os meios condicionados dessas células foram coletados e utilizados para avaliar a indução da capacidade angiogênica nas células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC). Os resultados mostraram que os meios condicionados de ambas as MSC foram capazes de estimular a formação de redes de estruturas tubulares e migração quimiotática nas HUVEC, independentemente da disponibilidade de oxigênio no ambiente. Essa resposta foi atribuída à expressão e secreção de citocinas angiogênicas pelas células, as quais expressavam de forma semelhante às citocinas VEGF-A e bFGF. A citocina PDGF-BB, expressa exclusivamente nas CeSaM, não promoveu efeito adicional. A nível proteico, observamos que as MSC-MO secretaram concentrações maiores de VEGF-A em relação às CeSaM, porém estas últimas secretaram adicionalmente ANG-2 e PDGF-BB, citocinas que não estavam presentes nos meios condicionados

das MSC-MO. Quando avaliada a capacidade intrínseca dessas células participarem das etapas de angiogênese *in vitro*, observamos que as MSC-MO migraram mais rapidamente que as CeSaM, entretanto ambas chegam na mesma densidade celular final. Por outro lado, as CeSaM apresentaram maior potencial de invasão e formação de cordões multicelulares em cultivo tridimensional. *In vivo*, quando enxertadas em embrião de galinha, as CeSaM foram capazes de se integrar no tecido do hospedeiro, migrando para regiões perivasculares, perineurais e condrogênicas. Já as MSC-MO não foram encontradas em nenhum dos embriões avaliados. Nossos resultados mostraram que as CeSaM e MSC-MO apresentaram um potencial angiogênico promissor, verificado pela capacidade intrínseca em participar das etapas da angiogênese e pela atividade parácrina. No entanto, as CeSaM parecem ter a vantagem adicional de serem obtidas de forma não invasiva e secretarem citocinas que participam tanto da formação como do remodelamento vascular.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual, células estromais mesenquimais da medula óssea, células endoteliais de veia de cordão umbilical humano, angiogênese.

Abstract

SANTOS, Rosana de Almeida. Angiogenic potential evaluation of human mesenchymal stromal cells derived from menstrual blood and bone marrow. Rio de Janeiro, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Biofísica)--Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Several therapies are being developed intended to increase the blood perfusion in ischemic tissues. In this context, mesenchymal stromal cells (MSC) have shown a promising angiogenic potential in the treatment of the diseases which causes a reduction of blood supply. Nowadays bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (BM-MSC) are the most studied, however its obtention method is quite invasive and uncomfortable for the patients. In the search for less invasive stem-cells sources, the menstrual blood brought new attractive perspectives for cellular therapy. Moreover, there is new blood vessels formation in the endometrium during the menstrual cycle, which suggests that MSC present in this tissue can participate in the angiogenic modulation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the angiogenic properties of menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells (MenSC) *in vitro* and *in vivo*, comparing to BM-MSC. For this purpose, MenSC (n=10) and BM-MSC (n=8) were cultured *in vitro* in normoxic (21% O₂) and hypoxic (1% O₂) conditions for 48 and 72 hours. Conditioned mediums were collected and used to evaluate human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) angiogenic induction capacity. The results showed that the conditioned mediums of both MSC types were capable to stimulate the tube-like network formation and HUVEC chemotactic migration, independent of oxygen availability in the environment. This behavior was assigned to the expression and secretion of angiogenic cytokines by both types of MSC, which expressed the VEGF-A and bFGF cytokines similarly. The PDGF-BB cytokine, expressed exclusively in MenSC, did not promoted additional effect. At proteic level, it was observed that BM-MSC produced more VEGF-A than MenSC, yet the last has also produced ANG-2 and PDGF-BB, which were not found in BM-MSC conditioned medium. In regard to the intrinsic capacity of these cells to participate of the angiogenic steps, it was observed that BM-MSC migration was faster than MenSC, however both reached the same final cellular density. On the

other hand, MenSC presented higher invasion and multicellular cord formation capacity in three-dimensional culture. *In vivo*, MenSC were able to engraft in the chicken embryo and were capable to integrate in the host tissue, migrating to perivascular, perineural, and chondrogenic regions. Meanwhile, BM-MSC were not found in any of the evaluated embryos. Our results indicated that MenSC and BM-MSC presented a promising angiogenic potential, verified by their intrinsic capacity in participating of the angiogenic steps and their paracrine activity. However, the MenSC seems to have the additional advantages of being obtained non-invasively and of having the ability to secrete cytokines that participate in both vascular formation and remodeling.

Keywords: menstrual blood-derived mesenchymal stromal cells, bone marrow mesenchymal stromal cells, human umbilical vein endothelial cells, angiogenesis.

Lista de Ilustrações

Figura 1.	Regulação do fator induzido por hipóxia (HIF)	25
Figura 2.	Etapas da formação de novas ramificações (<i>sprouting</i>) durante o processo de angiogênese	27
Figura 3.	Protocolo experimental para o isolamento das células derivadas do sangue menstrual	42
Figura 4.	Protocolo experimental para o isolamento da fração de células mononucleares derivadas da medula óssea	43
Figura 5.	Ilustração da análise no software ImageJ com a extensão angiogenesis analyzer	48
Figura 6.	Fluxograma representando as etapas para formação dos esferoides para enxerto nos embriões de galinha	57
Figura 7.	Linha do tempo mostrando as etapas dos experimentos de xenoenxerto em embrião de galinha	58
Figura 8.	Microscopia óptica de contraste de fase das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual humano em cultura	61
Figura 9.	Microscopia óptica de contraste de fase das células mesenquimais derivadas da medula óssea humana em cultura	62
Figura 10.	Microscopia óptica de contraste de fase da linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical	63
Figura 11.	Dot plots representativos do perfil imunofenotípico da linhagem de HUVEC EA.hy926	64
Figura 12.	Fotomicrografias das imunofluorescências com as HUVEC EA.hy926	65
Figura 13.	Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.hy926 após 20 horas do plaqueamento	66
Figura 14.	Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.hy926 após 20 horas do plaqueamento dos meios condicionados de 48 horas	67

- Figura 15.** Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.hy926 após 20 horas do plaqueamento dos meios condicionados de 72 horas 68
- Figura 16.** Quantificação do comprimento total da rede tubular formada pelas HUVEC EA.hy926 cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO 70
- Figura 17.** Quantificação do número de ramificações da rede tubular formada pelas HUVEC EA.hy926 cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO 71
- Figura 18.** Quantificação da rede tubular formada pelas HUVEC EA.hy926 comparando os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO, nas condições de normóxia e hipóxia 72
- Figura 19.** Imagens representativas da migração celular das HUVEC EA.hy926 em meio EGM-2 nos tempos experimentais de 0, 8, 12, 24 e 48 horas em ensaio de lesão por arranhadura 73
- Figura 20.** Curvas de migração celular das HUVEC EA.hy926 em diferentes condições experimentais em ensaio de lesão por arranhadura 74
- Figura 21.** Análise da área sob a curva de migração das HUVEC EA.hy926 em todas as condições experimentais 75
- Figura 22.** Análise da área sob a curva das migrações das HUVEC EA.hy926, em ensaio de lesão por arranhadura, comparando os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO, nas condições de normóxia e hipóxia 76
- Figura 23.** RT-PCR em tempo real para quantificação da expressão dos fatores de crescimento angiogênicos VEGF-A, PDGF-BB e bFGF nos tempos de 48 e 72 horas 77
- Figura 24.** Secreção de VEGF-A, PDGF-BB e bFGF nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO analisados pelo ELISA 79
- Figura 25.** Secreção de VEGF-A, PDGF-AA, ANG-2 e HGF nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO analisados pela técnica de citometria de fluxo 81

Figura 26.	Curvas de migração das CeSaM e MSC-MO em relação ao tempo e análise da área sob a curva no ensaio de lesão por arranhadura	82
Figura 27.	Gráfico das densidades celulares relativas do ensaio de migração celular entre CeSaM e MSC-MO, nos tempos experimentais de 8, 12, 24 e 48 horas no ensaio de lesão por arranhadura	83
Figura 28.	<i>Sprouting</i> a partir dos esferoides 3D formados por CeSaM e MSC-MO	84
Figura 29.	Análise da distância alcançada durante o ensaio de <i>sprouting</i> com os esferoides de CeSaM e MSC-MO	85
Figura 30.	Imagens representativas de um esferoide de CeSaM durante o ensaio de <i>Sprouting</i>	86
Figura 31.	Imunofluorescência após ensaio de <i>sprouting</i> dos esferoides de CeSaM e MSC-MO	87
Figura 32.	Fotomicrografias representativas de um embrião de galinha em E4,5-5 após implantação das células	88
Figura 33.	CeSaM <i>Alu</i> positiva em regiões perivasculares do embrião de galinha	89
Figura 34.	CeSaM <i>Alu</i> positivas encontradas ao redor do tubo neural do embrião de galinha	90
Figura 35.	CeSaM <i>Alu</i> positivas localizadas próximas de nervos periféricos do embrião de galinha	91
Figura 36.	CeSaM <i>Alu</i> positivas migraram para regiões presuntivas condrogênicas do embrião de galinha	92
Figura 37.	Ilustração das estruturas que compõem o somito e os eventos de migração e diferenciação celular que ocorrem no embrião de galinha	105

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Sequência de <i>primers</i> que foram utilizados para detecção dos transcritos dos fatores angiogênicos	51
Tabela 2.	Distribuição das CeSaM nos embriões de galinha	93

Lista de Abreviaturas e Siglas

7-AAD	7-amino-actinomicina D
ADSC	Células estromais derivadas de tecido adiposo (do inglês <i>adipose derived stromal cells</i>)
ANG-2	Angiopietina-2
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico (do inglês <i>basic fibroblast growth factor</i>)
BMP-4	Proteína morfogenética do osso 4 (do inglês <i>bone morphogenetic protein 4</i>)
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
BSS	Solução salina balanceada (do inglês <i>balanced salt solution</i>)
cDNA	DNA complementar
CeSaM	Células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual
CEUA	Comissão ética no uso de animais
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblásticas (do inglês <i>colony forming units fibroblast</i>)
CMMO	Células mononucleares da medula óssea
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Célula-tronco hematopoiética
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>).
EGF	Fator de crescimento epidérmico (do inglês <i>epidermal growth factor</i>)
EGM-2	Meio de crescimento endotelial (do inglês <i>Endothelial Growth medium</i>)
EPC	Célula progenitora endotelial (do inglês <i>endothelial progenitor cell</i>)
EPO	Eritropietina (do inglês <i>erythropoietin</i>)
FAK	Cinase de adesão focal (do inglês <i>focal adesive kinase</i>)
FSC	do inglês <i>forward scatter</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (do inglês <i>Glyceraldehyde -3 phosphate dehydrogenase</i>)

G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito (do inglês <i>granulocyte colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócito (do inglês <i>hepatocyte growth factor</i>)
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1 (do inglês <i>hypoxia inducible factor-1</i>)
HUVEC	Células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (do inglês <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês <i>induced pluripotent stem cells</i>)
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular (do inglês <i>International Society for Cellular Therapy</i>)
KGF	Fator de crescimento de queratinócito (do inglês <i>keratinocyte growth factor</i>)
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrophage (do inglês <i>macrophage colony stimulating factor</i>)
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinases de matriz (do inglês <i>Matrix metalloproteinases</i>)
MPS	Mesoderma pré-somítico
MSC	Célula estromal mesenquimal (do inglês <i>mesenchymal stromal cell</i>)
MSC-MO	Células estromais mesenquimais derivadas da medula óssea
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>phycoerythrin</i>)
PFA	Paraformaldeído
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)

RT	Transcriptase reversa (do inglês <i>Reverse Transcriptase</i>)
SCF	Fator de célula tronco (do inglês <i>stem cell factor</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-α	Fator de crescimento de transformação alfa (do inglês <i>transforming growth factor alpha</i>)
TGF-β	Fator de crescimento de transformação beta (do inglês <i>transforming growth factor beta</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>vascular endothelial growth factor</i>)

Sumário

1. Introdução	22
1.1. Angiogênese e Vasculogênese	24
1.2. Medula óssea	29
1.2.1. Células estromais mesenquimais da medula óssea (MSC-MO)	30
1.2.2. Potencial angiogênico das células estromais mesenquimais de medula óssea (MSC-MO)	31
1.3. Sangue menstrual	33
1.3.1. Células estromais mesenquimais presentes no sangue menstrual	34
1.3.2. Potencial angiogênico das células estromais mesenquimais derivadas de sangue menstrual (CeSaM)	35
1.4. Hipótese do trabalho	38
2. Objetivos	39
2.1. Objetivo geral	39
2.2. Objetivos específicos	39
2.2.1. Parte I: Análise do efeito parácrino das CeSaM e MSC-MO em relação às HUVEC <i>in vitro</i>	39
2.2.2. Parte II: Análise da capacidade intrínseca das CeSaM e MSC-MO de participar das etapas da angiogênese <i>in vitro</i>	39
2.2.3. Parte IV: Análise das propriedades angiogênicas das CeSaM e MSC-MO <i>in vivo</i>	40
3. Materiais e Métodos	41
3.1. Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo	41
3.1.1. Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual	41
3.1.2. Isolamento e cultivo das células aderentes presentes no sangue menstrual	41
3.1.3. Isolamento das células mononucleares da medula óssea humana	42
3.1.4. Cultivo das células estromais mesenquimais	43
3.2. Cultivo e caracterização imunofenotípica da linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC) EA.hy926	44
3.2.1. Caracterização por citometria de fluxo	44
3.2.2. Caracterização por imunofluorescência	45
3.3. Avaliação da expressão gênica das CeSaM e MSC-MO e análise do meio condicionado dessas células nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (1% O₂)	46

3.4. Avaliação da capacidade angiogênica das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de formação de estruturas tubulares	46
3.5. Avaliação do potencial migratório das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO através do ensaio de lesão por arranhadura... ..	48
3.6. Avaliação dos níveis de RNA mensageiros para VEGF, bFGF e PDGF-BB por RT-PCR em tempo real	49
3.6.1. Extração do RNA total	49
3.6.2. Reação da transcrição Reversa	50
3.6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.....	50
3.7. Avaliação da secreção dos fatores angiogênicos nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO	52
3.7.1. Quantificação pelo ensaio Imunoenzimático (ELISA)	52
3.7.2. Quantificação de fatores angiogênicos por citometria de fluxo.....	53
3.8. Avaliação da Migração Celular das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de lesão por arranhadura	54
3.9. Ensaio de <i>Sprouting</i>	54
3.9.1. Técnica de gota pendente	54
3.9.2. Avaliação do <i>Sprouting</i> desenvolvido pelos esferoides celulares.....	55
3.10. Imunofluorescência após o ensaio de <i>Sprouting</i>	55
3.11. Xenoenxerto em embrião de galinha	56
3.11.1. Preparo dos esferoides das CeSaM e MSC-MO para o transplante em embrião de galinha	56
3.11.2. Manipulação do embrião de galinha	57
3.11.3. Preparo de espécimes para histologia	59
3.11.4. Hibridização <i>in situ</i> de DNA com sondas <i>Alu</i>	59
3.11.5. Tratamento das imagens da hibridização <i>in situ</i>	60
3.12. Análises estatísticas.....	60
4. Resultados	61
4.1. Cultivo das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual	61
4.2. Cultivo das células mesenquimais derivadas de medula óssea humana.....	62
4.3. Cultivo e caracterização da linhagem das HUVEC EA.Hy926	63
4.3.1. Caracterização por citometria de fluxo.....	63
4.3.2. Caracterização por Imunofluorescência.....	64

4.4. Avaliação da capacidade angiogênica das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de formação de estruturas tubulares	66
4.5. Avaliação do potencial migratório das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO através do ensaio de lesão por arranhadura...	73
4.6. Avaliação dos níveis de RNA mensageiros para os fatores angiogênicos VEGF-A, bFGF e PDGF-BB por RT-PCR em tempo real	76
4.7. Avaliação da secreção dos fatores angiogênicos nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO	78
4.7.1. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	78
4.7.2. Citometria de fluxo.....	79
4.8. Avaliação da migração celular das CeSaM e MSC-MO <i>in vitro</i> através do ensaio de lesão por arranhadura	82
4.9. Ensaio de <i>Sprouting</i>	83
4.10. Imunofluorescência após ensaio de <i>Sprouting</i>	86
4.11. Xenoenxerto em embrião de galinha	87
4.11.1. Impacto do enxerto dos esferoides de CeSaM e MSC-MO no desenvolvimento dos embriões de galinha	87
4.11.2. Localização das células estromais mesenquimais enxertadas <i>in vivo</i>	88
5. Discussão.....	94
6. Conclusões	110
Referências Bibliográficas	112
Anexo A - Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa	127
Anexo B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	132
Anexo C - Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica	135

1. Introdução

Ao longo das últimas décadas, as doenças isquêmicas têm ocupado o posto das enfermidades que mais causam óbitos no mundo. Desse grupo, as doenças isquêmicas do coração e cerebrovasculares são as que mais requerem atenção, sendo responsáveis atualmente por 17,3 milhões de mortes por ano no mundo (OMS, 2017). No Brasil, as doenças cardiovasculares, que constituem o grupo de doenças relacionadas ao coração e vasos sanguíneos, também atingiram elevados índices de morbidade e mortalidade, sendo responsáveis por cerca de 350 mil mortes em 2016, causando um grande ônus para o sistema de saúde pública (SBC, 2017).

Diante de uma carga cada vez maior de doenças relacionadas ao sistema circulatório, a medicina moderna é confrontada com a necessidade de fornecer terapias que não só atenuem os sintomas dessas doenças, mas que também possam facilitar a regeneração e função dos órgãos acometidos.

Nesse contexto, a ideia de promover aumento da perfusão sanguínea em tecidos isquêmicos via angiogênese pode ser promissora. Considerando-se que as desordens isquêmicas podem ser primariamente causadas por disfunção endotelial, a lógica por trás da angiogênese terapêutica estaria relacionada à promoção do reparo vascular via células endoteliais e/ou administração de fatores de crescimento (TAO *et al.*, 2016). Entretanto, a baixa eficiência na expansão das células endoteliais maduras bem como a reduzida disponibilidade das células progenitoras endoteliais (EPC) nos tecidos pós-natais, geram limitações para aplicações dessas células na terapia angiogênica, na maioria dos casos (BOUIS *et al.*, 2001; TAO *et al.*, 2016). Por outro lado, as células estromais mesenquimais (MSC) são células multipotentes que não esbarram em tais problemas, podem ser isoladas a partir de diversos tecidos adultos, apresentam baixa imunogenicidade e podem ser expandidas facilmente *in vitro* em intervalos de tempo relativamente curtos (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007; PAREKKADAN *et al.*, 2010). Além disso, diversos estudos apontam os efeitos benéficos das MSC em diversos modelos de doenças, principalmente devido à secreção parácrina de fatores tróficos pró-angiogênicos, anti-apoptóticos e anti-inflamatórios que podem contribuir para o reparo tecidual, ampliando assim suas abordagens terapêuticas (CHEN *et al.*, 2006; SOTIROPOULOU *et al.*, 2006).

Dentre as fontes de MSC extensamente exploradas e utilizadas na clínica, podemos citar as células estromais mesenquimais de medula óssea, primeiramente isoladas por Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). Porém, a modalidade utilizada para sua obtenção se dá por aspiração medular e este procedimento é acompanhado de gastos hospitalares, risco de infecção, além de trazer desconforto e dor para os pacientes. Por isso, encontrar novas fontes alternativas menos invasivas de MSC tornou-se essencial para a prática clínica. Além da medula óssea, MSC já foram isoladas com sucesso de diversos tecidos neonatais e adultos. Dentre esses tecidos, podemos destacar: cordão umbilical (HARRIS *et al.*, 2007), placenta (GRAHAM *et al.*, 2007), líquido amniótico (GRAHAM *et al.*, 2007), tecido adiposo (PARKER *et al.*, 2006), polpa dentária (GRONTHOS *et al.*, 2000) e sangue menstrual (MENG *et al.*, 2007).

A descoberta do sangue menstrual como fonte de MSC ofereceu uma ótima alternativa para solucionar o problema da modalidade invasiva de obtenção destas células, pois oferece importantes vantagens já que são obtidas por um procedimento simples, seguro e indolor. Assim como as MSC de outras fontes, estas apresentam habilidades clonogênicas e multipotencialidades *in vitro* (PATEL *et al.*, 2008). A capacidade parácrina de liberação de fatores tróficos, bem como a modulação da resposta imunológica são também aspectos vantajosos e tornam a aplicação clínica das células mesenquimais do sangue menstrual ainda mais interessante (MENG *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2008, SUN *et al.*, 2016). Ademais, o fato de essas células frequentemente apresentarem baixa expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC de classe II também favorece sua utilização de forma alogênica, podendo também ser uma fonte para a população masculina (PATEL *et al.*, 2008).

Apesar dos avanços da comunidade científica sobre o potencial regenerativo/terapêutico das MSC estarem crescendo progressivamente, ainda temos poucos trabalhos na literatura que comparam as propriedades angiogênicas entre as diferentes fontes de células mesenquimais. Por isso, este trabalho tem o propósito de analisar o potencial angiogênico das MSC humanas derivadas da medula óssea e sangue menstrual, para melhor entendimento da biologia dessas células, enriquecimento da literatura e análise de qual dessas células seria a mais adequada para utilização na angiogênese terapêutica.

1.1. Angiogênese e Vasculogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir da vasculatura já existente (FOLKMAN, 2003). Ocorre fisiologicamente no sistema reprodutor feminino, na cicatrização de feridas, e no desenvolvimento da circulação colateral em tecidos isquêmicos (RISAU, 1997). Entretanto, a angiogênese também é um fator importante em vários processos patológicos como no crescimento e metástase de tumores, na artrite reumatóide, na retinopatia diabética, obesidade, osteoporose e outras doenças (LI *et al.*, 2003; HANAHAN *et al.*, 1996). Porém, em qualquer desses casos, a angiogênese inicia-se com um estímulo; este pode ser: hipóxia, alterações isquêmicas ou liberação de citocinas.

O suprimento de oxigênio adequado através dos vasos sanguíneos é fundamental para manter o desenvolvimento e funcionamento normal dos tecidos do organismo. A formação de novos vasos é um processo complexo e delicado que pode ser regulado por fatores agonistas e antagonistas da angiogênese. O desequilíbrio destes fatores pode contribuir com diversas patologias. O crescimento excessivo de vasos pode agravar desordens inflamatórias e câncer (CARMELLIET, 2004). Já a formação vascular insuficiente, faz com que as células teciduais entrem em um estado de hipóxia, tornando o tecido isquêmico e impossibilitando seu funcionamento normal devido à falta de nutrientes e oxigênio.

Quando o tecido encontra-se em situação de hipóxia, mudanças moleculares importantes ocorrem nas células teciduais residentes que levam a alteração de seus comportamentos e liberação de moléculas estimuladoras da neovascularização. O elemento-chave para esta resposta é o fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) (BRAHIMI-HORN & PROUYSSEGUR., 2007).

Na presença de concentrações normais de oxigênio no microambiente, a subunidade alfa da proteína HIF-1 α é hidroxilada por enzimas proil-domínio hidroxilases (PHD) dependentes de oxigênio. Esse processo sinaliza o recrutamento da proteína Von Hippel-Lindau (VHL) e complexos ubiquitina ligase, levando então a degradação proteossômica de HIF-1 α (Figura 1) (BRAHIMI-HORN & PROUYSSEGUR., 2007). Já em condições de hipóxia, a hidroxilação de HIF-1 α pelas enzimas PHD dependentes de oxigênio não ocorre. Como consequência, há estabilização dessa proteína no citoplasma já que a mesma não sofre degradação proteossômica, complexando-se a isoforma HIF-1 β , constitutivamente expressa (BRAHIMI-HORN & PROUYSSEGUR., 2007; JÓZWIAK *et al.*, 2014). Assim, esse

complexo se transloca para o núcleo e regula não só a transcrição do principal gene regulador da angiogênese, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), mas como também de outros genes cujos produtos são necessários quando o suprimento de oxigênio está baixo (Figura 1).

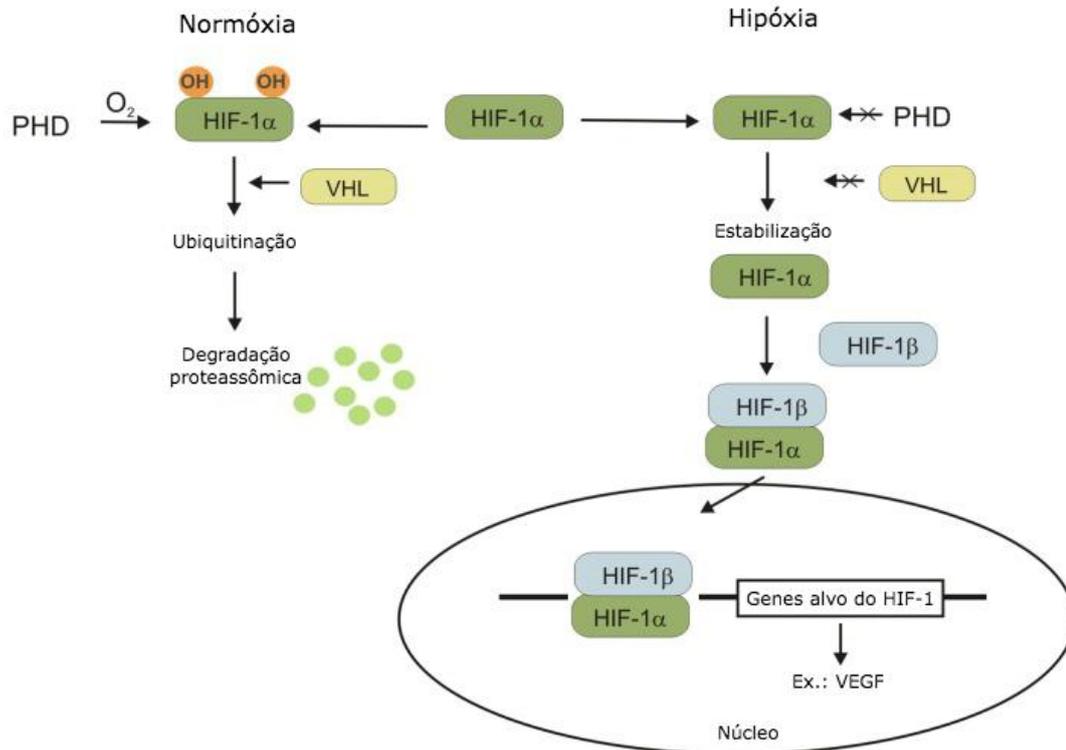


Figura 1: Regulação do fator induzido por hipóxia (HIF). Em condições normais de oxigênio, a subunidade HIF-1 α é hidroxilada por enzimas PHD. Em seguida, a ligação com a proteína VHL permite a ubiquitinação de HIF-1 α e consequentemente sua degradação proteossômica. Já a falta de oxigênio previne a hidroxilação de HIF-1 α , levando à sua estabilização. Então, HIF-1 α se associa com HIF-1 β , vai para o núcleo e induz a transcrição de genes relacionados à via de HIF, como por exemplo o VEGF. PHD: Prolil-domínio hidroxilases, VHL: Von Hippel-Lindau, HIF: Fator induzido por hipóxia, VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular. (Adaptado de JÓZWIAK *et al.*, 2014).

A próxima etapa da angiogênese, após a liberação de VEGF e outras citocinas pró-angiogênicas, é a vasodilatação dos vasos preexistentes através da produção de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais (CARMELLIET, 2000). O óxido nítrico levará ao relaxamento das células musculares lisas vasculares proporcionando um aumento do fluxo sanguíneo e facilitando também a proliferação e migração das células endoteliais a partir dos vasos (DISTLER *et al.*, 2003).

A ativação das células endoteliais induz a secreção de metaloproteinases (MMP) importantes para degradação da membrana basal vascular e matriz extracelular (MEC) do tecido circundante. Inicialmente, pensava-se que esta etapa

era importante somente para facilitar a invasão das células endoteliais no tecido adjacente, porém, hoje, já se sabe que a degradação da matriz também permite a liberação de fatores de crescimento angiogênicos, como VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), e angiopoietina-1 e 2, que se encontravam sequestrados na matriz através de ligações com proteínas integrinas (STAMENKOVIC *et al.*, 2003; RUNDHAUNG, 2005).

As células endoteliais vasculares também podem se diferenciar e adquirir características particulares de acordo com o gradiente de VEGF que recebem (POTENTE *et al.*, 2011; CARMELLIET *et al.*, 2009). Células endoteliais expostas a elevadas concentrações de VEGF tornam-se *tip cells*. Estas células são caracterizadas por liderarem o crescimento do broto endotelial, estendendo prolongamentos chamados filopódios, que as permitem migrar e invadir o tecido circundante em direção ao gradiente de VEGF (GERHART *et al.*, 2003; CARMELLIET *et al.*, 2009). Logo atrás das *tip cells* na haste endotelial, encontramos as *stalk cells*, com um elevado potencial proliferativo. Estas células da haste são responsáveis principalmente pelo alongamento e crescimento do broto que está sendo formado, bem como pela criação de um lúmen. Este processo continua até o broto encontrar outro capilar, com o qual se conecta (via fusão das *tip cells*), levando à formação do lúmen e permitindo que o sangue assim circule (CARMELLIET *et al.*, 2009). As etapas que envolvem a especialização das células endoteliais durante o processo de brotamento capilar (*sprouting*) estão ilustradas na figura 2.

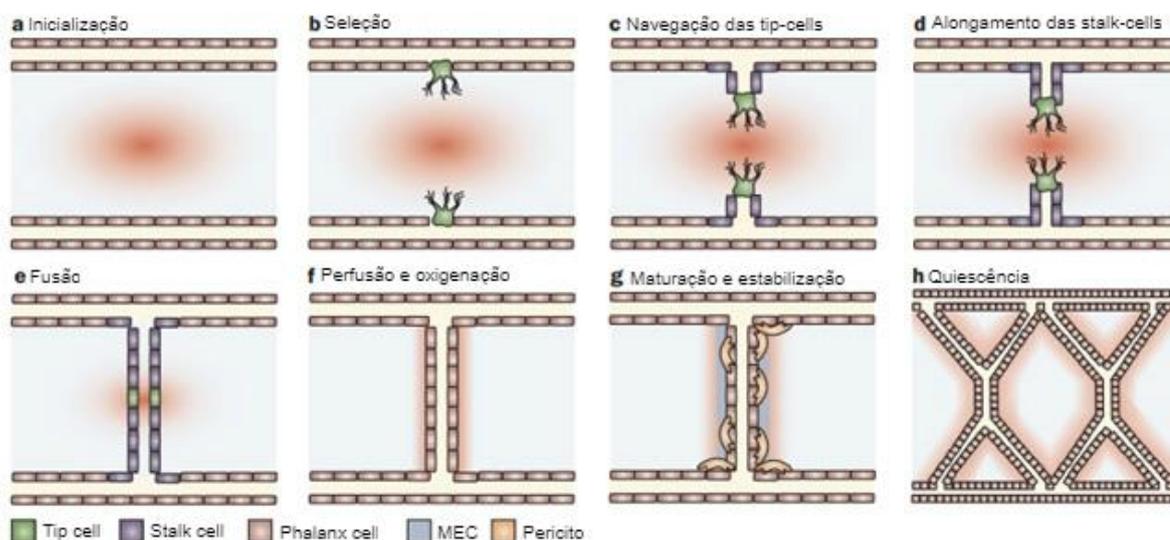


Figura 2: Etapas da formação de novas ramificações (*sprouting*) durante o processo de angiogênese. (A) Em resposta a hipóxia, células teciduais residentes secretam VEGF. (b) Células endoteliais expostas às altas concentrações de VEGF são selecionadas para se tornarem "tip cells" (verde). (c) As "tip cells" lideram o crescimento do novo broto e invadem o tecido circundante através da extensão de numerosos filopódios. (d) O broto se alonga via proliferação das endoteliais "stalk cells" (roxo) logo atrás das "tips cells". (e) O novo broto em crescimento conecta com um outro broto via fusão das tip cells. (f) Formação do lúmen vascular permite o início do fluxo sanguíneo, logo oxigenação tecidual, diminuindo os níveis de VEGF. (g) Maturação e estabilização do plexo vascular nascente permitem o recrutamento de pericitos (laranja) e deposição de MEC (azul). (h) Após estabelecimento da vasculatura, as células se adaptam novamente ao fenótipo endotelial quiescente sendo denominadas "phalanx cells" (bege). Tip cell: célula da extremidade; Stalk cell: célula da haste; Phalanx cell: Célula quiescente; MEC: Matriz extracelular. (Adaptado de CARMELLIET *et al.*, 2009).

A última etapa do processo angiogênico envolve a estabilização da vasculatura recém-formada através do recrutamento das células perivasculares, como os pericitos. Para que este evento ocorra, as células endoteliais passam a liberar fatores angiogênicos tardios, como o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF, *Platelet-derived Growth Factor*), Angiopietina-1 e TGF β (*Transforming Growth Factor – beta*) (HEINKE *et al.*, 2012). Em vasos de pequeno calibre, o PDGF é o principal fator liberado pelas células endoteliais que participa do recrutamento de células mesenquimais de tecidos adjacentes, induzindo a migração para vasos recém-formados, dando origem aos pericitos. Já em grandes vasos e artérias, além dos pericitos, também são encontradas as células musculares lisas, que são recrutadas, principalmente, através da interação entre os receptores Tie-2

presentes nas células endoteliais e angiopoietina-1. O TGF- β liberado pelas células endoteliais irá atuar principalmente no recrutamento das células mesenquimais, induzindo diferenciação em pericitos ou células musculares lisas, além de contribuir para a síntese de matriz extracelular ao redor dos vasos permitindo a maturação vascular (HEINKE *et al.*, 2012).

Diferentemente da angiogênese, a vasculogênese é a formação de vasos *de novo*, em locais onde não há vasos, através da proliferação e diferenciação dos hemangioblastos (células precursoras hemotopoéticas e endoteliais). Durante o desenvolvimento embrionário, os hemangioblastos agregam-se para formar as ilhotas sanguíneas: as células de camadas mais externas se diferenciam em células endoteliais, enquanto que as células de mais camadas internas se diferenciam nos eritrócitos, iniciando assim a rede vascular primitiva do embrião (CARMELLIET, 2004). Essa rede consiste numa teia de tubos e sacos de células endoteliais, que posteriormente sofrem remodelamento, transformando-se em uma rede vascular madura. O remodelamento envolve a formação de pequenos e grandes vasos, estabelecimento de um fluxo direcional, associações com células perivasculares, e ajuste da densidade vascular para satisfazer as exigências nutricionais do tecido. A expansão de novos vasos a partir da vasculatura pré-existente para todo o embrião continuará através de angiogênese. (RISAU, 1997; YAMASHITA *et al.*, 2000).

Inicialmente, acreditava-se que a vasculogênese só ocorresse durante o desenvolvimento embrionário para formar o plexo vascular primitivo e que somente a angiogênese participasse nos mecanismos de neovascularização na fase adulta. Entretanto, o dogma da neovasculogênese foi revolucionado em 1997, quando Asahara e colaboradores isolaram do sangue periférico adulto uma população de células com características de células endoteliais e células progenitoras. Estas células foram nomeadas células progenitoras endoteliais (EPC) (ASAHARA *et al.*, 1997) e são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície CD34, VEGFR2 (Flk-1 ou também chamado KDR) e CD133, em humanos, sendo a medula óssea o principal reservatório destas células.

Assim, foi postulado que no indivíduo adulto, a neovascularização tecidual pode acontecer por intermédio de dois mecanismos: a angiogênese e a vasculogênese pós-natal, e estes mesmos eventos podem ocorrer simultaneamente. No caso de um dano ou isquemia tecidual, por exemplo, fatores pró-angiogênicos podem estar sendo liberados e, por consequência, podem agir localmente através

de estimulação da angiogênese, como também podem estimular a mobilização de EPC da medula óssea, liberando-as na circulação periférica. Seguindo um gradiente de concentração de citocinas, as EPC migram até o sítio isquêmico, onde podem participar da formação de vasos por diferenciação em células endoteliais maduras e/ou regulando a atividade das células endoteliais preexistentes via sinalização parácrina (BALAJI *et al.*, 2013).

A vasculogênese pós-natal vem sendo extensivamente estudada como mediadora de terapias pró e anti-angiogênicas nas pesquisas de reparo tecidual e câncer, respectivamente (RONCALLI *et al.*, 2008). No caso da angiogênese terapêutica, diversas abordagens vêm sendo testadas. Já foi observado que EPC injetadas diretamente em locais de isquemia ou em lesões vasculares, incorporam-se nos vasos e produzem fatores de crescimento que promovem efeitos terapêuticos positivos, contribuindo com um melhor fluxo sanguíneo, inibindo apoptose, bem como melhorando a função tecidual. Adicionalmente, a utilização das EPC na bioengenharia de tecidos, bem como na re-endotelização de arcabouços e válvulas cardíacas, também vem sendo considerada (BALAJI *et al.*, 2012). Entretanto, apesar dos avanços pré-clínicos em diferentes modelos de doenças, a pequena porcentagem destas células no sangue periférico e na medula óssea é um fator limitante para sua aplicação clínica (TATEISHI-YUYUAMA *et al.*, 2002; HRISTOV *et al.*, 2003).

1.2. Medula óssea

A medula óssea é encontrada no canal medular dos ossos longos e nas cavidades dos ossos esponjosos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). No microambiente medular podemos encontrar diferentes tipos celulares que ali residem juntos com os capilares sinusoides. Destes, podemos destacar as células precursoras de eritrócitos, células progenitoras do sistema imunológico, células adiposas, plaquetas e as duas principais populações de células-tronco multipotentes que compõem a micro-arquitetura da medula óssea: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as MSC (GOLDENBERG & CARVALHO, 2012). As células-tronco hematopoiéticas são responsáveis pela formação de todos os tipos de células sanguíneas bem como pela manutenção e proteção do organismo (SORDI *et al.*, 2005). Já as células estromais mesenquimais são responsáveis pela formação do estroma da medula óssea. Estas garantem a homeostasia medular através da

reposição das células pelo mecanismo de autorenovação, pela diferenciação nas células de origem mesodérmica que constituem o estroma da medula e ainda através da secreção de fatores solúveis que suportam a hematopoiese (PAREKKADAN *et al.*, 2010; AQMASHEH *et al.*, 2017).

1.2.1. Células Estromais Mesenquimais da Medula Óssea (MSC-MO)

As primeiras evidências da existência de células estromais mesenquimais na medula óssea foram feitas pelo alemão Julius Cohnheim, em 1867. Em seus estudos, Cohnheim sugeriu que durante a cicatrização tecidual, era possível encontrar além de células inflamatórias, fibroblastos provenientes da circulação, e que estes fibroblastos poderiam ter sido mobilizados da medula óssea após ocorrência de lesão tecidual (COHNHEIM *et al.*, 1867). Contudo, somente em 1976, estas células foram mais bem descritas e caracterizadas por Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976).

O grupo de Friedenstein foi o primeiro a relatar a existência de uma célula-tronco no estroma da medula óssea. Neste trabalho, eles observaram que estas células eram aderentes ao frasco de cultura, e que em passagens iniciais apresentavam aparência heterogênea, porém após sucessivas passagens estas culturas se tornavam mais homogêneas, exibindo uma morfologia fibroblastóide. Além disso, foram descritas como células clonogênicas, não fagocíticas, com habilidade de gerar unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976). A partir desse momento, surgiram diversos estudos demonstrando que as células-tronco aderentes do estroma da medula óssea ou MSC eram capazes de gerar várias linhagens celulares incluindo adipócitos, osteócitos e condrócitos (ASHTON *et al.*, 1980; PITTINGER *et al.*, 1999).

As células estromais mesenquimais desempenham um papel essencial para a manutenção da homeostase do sistema medular por manterem um nicho de MSC, através dos mecanismos de auto-renovação e diferenciação nas diversas linhagens que compõem o estroma medular (CHEN *et al.*, 2006). Porém, as MSC fazem parte de uma rara população de células multipotentes. Apenas cerca de 0,001% a 0,01% de células da medula óssea são mesenquimais (MEIRELLES *et al.*, 2008). Este fato pode parecer dificultar o uso dessas células para propostas terapêuticas, porém, células mesenquimais apresentam a vantagem de ter um elevado potencial de proliferação, permitindo que sejam manipuladas e expandidas *in vitro* em tempos

relativamente viáveis de modo que sejam obtidas quantidades de células suficientes para seu uso clínico (PAREKKADAN *et al.*, 2010).

A fim de padronizar a caracterização das células estromais mesenquimais de medula óssea, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), propôs três critérios para a classificação destas células, os quais estão listados abaixo (DOMINICI *et al.*, 2006):

- 1 – Aderência ao plástico dos frascos de cultura *in vitro*, quando cultivadas em condições adequadas;
- 2 – Expressão de antígenos específicos em sua superfície, apresentando a expressão de CD105, CD73 e CD90 superior ou igual a 95%, mensurados por citometria de fluxo e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II (menor ou igual a 2%);
- 3 – Diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, quando expostas a condições indutivas *in vitro*.

A literatura sobre a biologia das MSC é bastante vasta e outras informações relevantes sobre o tema podem ser encontradas em diversas revisões previamente publicadas (PAREKKADAN *et al.*, 2010, RASTEGAR *et al.*, 2010, CHAMBERLAIN *et al.*, 2007, MA *et al.*, 2014).

1.2.2. Potencial angiogênico das células estromais mesenquimais de medula óssea (MSC-MO)

As terapias com MSC-MO para o tratamento de doenças isquêmicas têm demonstrado segurança e eficácia em diferentes modelos de doenças pré-clínicos e clínicos (DAS *et al.*, 2013). Evidências em modelos animais confirmaram a melhora da função e perfusão do miocárdio através de angiogênese, quando estas células foram administradas no modelo de infarto agudo do miocárdio (NAGAYA *et al.*, 2004).

Os fatores tróficos liberados pelas MSC-MO também podem ter efeitos biológicos significativos e exercer um importante papel cardioprotetor através da sinalização parácrina. Page e colaboradores demonstraram que estas células podem secretar fatores angiogênicos (VEGF, MCP-1), metaloproteinases (MMP-2) e fatores imunomodulatórios (MIP-1 α , MIP-1 β), principalmente na privação de soro e oxigênio, o que poderia contribuir para seu benefício em tecidos isquêmicos *in vivo* (PAGE *et al.*, 2014).

Estudos desenvolvidos por Xu *et al.* demonstraram o benefício terapêutico quando as MSC-MO foram transplantadas juntamente com a citocina bFGF (importante citocina pró-sobrevivência/pró-angiogênica) no modelo de isquemia de membros em ratos. Quando o sistema composto por hidrogel/bFGF/células foi transplantado nos membros isquêmicos, aumentou a sobrevivência celular, induziu diferenciação das células mesenquimais em células musculares e endoteliais, bem como contribuiu para os efeitos parácrinos das MSC-MO promovendo rápida vascularização e regeneração do membro (XU *et al.*, 2016).

No modelo de isquemia crítica de pele, Schweizer e colaboradores também demonstraram que a injeção das MSC-MO contribuiu positivamente para regeneração vascular. Neste caso, os autores detectaram que os efeitos regenerativos destas células foram dose-dependentes e que a terapia com as células mesenquimais apresentou melhoras significativas em relação à utilização dos meios condicionados destas células isoladamente (SCHWEIZER *et al.*, 2014).

Alguns estudos pré-clínicos também têm comparado o potencial angiogênico das MSC-MO em relação às células mononucleares da medula óssea (CMMO). Iwase *et al.* demonstraram que as MSC-MO apresentaram maior capacidade de sobrevivência e preservação da função em ambiente hipóxico, bem como foi relatada maior produção de fatores angiogênicos quando comparadas com as CMMO. Além disso, quando foram transplantadas em modelo de isquemia de membros em ratos, a terapia com MSC-MO resultou numa maior densidade de capilares e perfusão sanguínea na região acometida (IWASE *et al.*, 2005).

Células mesenquimais derivadas de medula óssea também vêm sendo amplamente utilizadas em diversos modelos clínicos de doenças isquêmicas. Lu *et al.*, conduziram um ensaio clínico comparando o efeito da administração das MSC-MO em comparação com as CMMO em 41 pacientes diabéticos com isquemia de membros. Após 24 semanas, os pacientes transplantados com as células apresentaram maior pressão transcutânea de oxigênio (TcO₂), bem como apresentaram melhorias no tempo de caminhada livre de dor em relação ao grupo placebo. Em relação ao número de vasos colaterais formados, foi observada pontuação significativamente maior no grupo que recebeu as MSC-MO em relação ao grupo das CMMO. A cicatrização das úlceras em todos os pacientes transplantados com as MSC de medula óssea também ocorreu em menor tempo do que no grupo de pacientes que receberam a fração de células mononucleares totais,

mostrando que as MSC-MO induzem uma cicatrização mais rápida e eficaz das feridas (LU *et al.*, 2011). Da mesma maneira, além deste, muitos outros estudos clínicos já comprovaram a segurança e eficácia do transplante das MSC-MO em humanos. Resultados na melhora da função cardíaca em doenças isquêmicas do coração (LEE *et al.*, 2014, KARANTALIS *et al.*, 2014; MATHIASSEN *et al.*, 2015) e revascularização na doença vascular periférica (SUSUKI *et al.*, 2013) já foram documentados previamente.

Apesar dos avanços com as células de medula óssea nas terapias de doenças vasculares, o procedimento para obtenção dessas células é doloroso, frequentemente necessitando de internações hospitalares o que torna esta fonte menos conveniente e mais custosa. Considerando que uma fonte ideal de células-tronco deve ser obtida de forma menos invasiva, resultando em um mínimo desconforto para o paciente, o sangue menstrual pode ser uma excelente fonte para aplicações na terapia celular. Células mesenquimais derivadas de sangue menstrual (CeSaM) já foram isoladas com sucesso por vários pesquisadores e, assim como as MSC de medula óssea, apresentam grande potencial de expansão *in vitro* e elevada plasticidade celular (MENG *et al.*, 2007, PATEL *et al.*, 2008; GARGETT *et al.*, 2006).

1.3. Sangue Menstrual

A mais recente fonte de células-tronco descoberta na linha do tempo da medicina regenerativa foi o sangue menstrual. Apesar das hipóteses sobre o endométrio ter populações de células-tronco existirem a várias décadas, apenas no ano de 2004 que o primeiro grupo de cientistas reportou a existência de duas populações celulares com capacidade clonogênica e de rápida proliferação no tecido endometrial. Estas populações foram classificadas como células-tronco epiteliais e células-tronco estromais do endométrio (GARGETT *et al.*, 2006).

A partir de então, outros trabalhos também confirmaram a presença destas células no endométrio (CHAN *et al.*, 2004; KATO *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2007) e algumas perguntas sobre onde estas células estariam e como participariam dos processos de regeneração, foram abrindo espaço para investigações cada vez mais detalhadas. Inicialmente, acreditava-se que estas células pudessem estar presentes no estroma da camada basal do endométrio uterino, podendo participar da reconstituição do mesmo mensalmente em todos os ciclos menstruais (PADYKULA, 1989). Entretanto, outra hipótese que surgiu mais recentemente seria que estas

células também pudessem estar localizadas em um nicho perivascular ao longo das duas camadas endometriais, exibindo características de pericitos, com capacidade de migrar para as regiões de injúria (SPITZER *et al.*, 2012; CAPLAN *et al.*, 2015). Ambas as hipóteses sugerem também a presença das células estromais mesenquimais na camada funcional do endométrio e conseqüentemente no fluido menstrual.

1.3.1. Células estromais mesenquimais presentes no sangue menstrual

Em 2007, o grupo de Meng e colaboradores detectaram e caracterizaram pela primeira vez uma população de células com características semelhantes às células mesenquimais no fluido menstrual (MENG *et al.*, 2007). A partir deste momento, diversos trabalhos seguintes confirmaram esta descoberta (PATEL *et al.*, 2008; ALLICKSON *et al.*, 2011), consolidando assim, o sangue menstrual como uma nova fonte de células-tronco.

Uma das vantagens mais importantes que garantem às CeSaM uma relevância única é a facilidade de sua coleta, podendo fazer uso de técnicas não invasivas para sua obtenção. Além disso, após o isolamento, estas células podem ser amplamente expandidas *in vitro*, criopreservadas, ou ainda induzidas à diferenciação usando técnicas rotineiras em laboratório.

Células estromais mesenquimais isoladas do sangue menstrual, são capazes de aderir ao plástico da placa de cultura exibindo morfologia fibroblastóide, bem como podem proliferar rapidamente, dobrando sua população em 19-36 horas (MENG *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2008). Essa última característica favorece principalmente sua expansão em larga escala, sendo extremamente vantajosa para uma proposta terapêutica. Além disso, foi demonstrado que as CeSaM, mesmo em passagens avançadas, não apresentam alterações no seu fenótipo e nem anormalidades cromossômicas em seu cariótipo (PATEL *et al.*, 2008, ASENSI *et al.*, 2014).

O perfil imunofenotípico das CeSaM em cultura já foi descrito por diversos pesquisadores (MENG *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2008, ALLICKSON *et al.*, 2011, ASENSI *et al.*, 2014). Essas células compartilham algumas moléculas de superfície com as células mesenquimais presentes em outros tecidos, como: CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105, as quais podem ser mensuradas por citometria de fluxo. Da mesma forma, foi demonstrada a ausência dos antígenos CD34, CD45, CD133,

CD14, que são moléculas de superfície normalmente expressas em células hematopoiéticas. Alguns autores relatam também a expressão de marcadores de pericitos, tais como: receptor beta do PDGF (PDGF-R β), CD146 e domínio 2 de sushi (SUSD2), sugerindo uma possível localização perivascular para estas células no endométrio uterino (SPITZER *et al.*, 2012; SCHWAB & GARGETT *et al.*, 2007; MASUDA *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos demonstraram ainda que as CeSaM expressam proteínas de membrana que estão comumente presentes em células-tronco embrionárias (CTE), como o SSEA-4 (antígeno específico embrionário de estágio 4), e fatores de transcrição associados a pluripotência, tais como Oct-4 e Nanog (MENG *et al.*, 2007, PATEL *et al.*, 2008; BORLONGAN *et al.*, 2010). O fato das CeSaM apresentarem expressão de moléculas relacionadas à pluripotência também pode facilitar a reprogramação dessas células para o fenótipo de célula-tronco pluripotente induzida (iPSC). Esse processo se dá pela transdução de fatores de transcrição específicos, como: Oct-4, Sox-2, Klf-4 e C-Myc (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Em alguns casos este procedimento pode ser facilitado e até mesmo melhor sucedido quando o tipo celular em questão já apresenta naturalmente em seu perfil fenotípico, algumas destas moléculas. Esse é o caso das CeSaM. Seguindo esta teoria, Park e cols. demonstraram que a reprogramação das CeSaM em iPSC não só foi bem sucedida como também ocorreu em menor tempo (12 dias) comparada com outros tipos celulares, os quais levam em torno de 4 semanas (PARK *et al.*, 2011). Semelhantemente, o grupo de Rodrigues e colaboradores também demonstrou elevada eficiência de reprogramação para um fenótipo pluripotente, ocorrendo em um período de 15-17 dias (RODRIGUES *et al.*, 2012). Logo, o sangue menstrual também pode ter um papel chave no cenário da reprogramação celular para fins de pesquisa e possivelmente futura aplicação clínica para a população.

1.3.2. Potencial angiogênico das células estromais mesenquimais derivadas de sangue menstrual (CeSaM)

Alguns trabalhos relatam o potencial angiogênico das CeSaM tanto *in vitro* como *in vivo*. Os fatores tróficos presentes nos meios condicionados das CeSaM têm despertado interesse, assim como a utilização destas células em uma proposta de terapia celular. Em cultura, estas células são capazes de secretar tanto metaloproteinases de matriz (MMP-3, MMP-10), como fatores anti-apoptóticos,

fatores de crescimento (GM-CSF, HGF, KGF) e fatores pró-angiogênicos (VEGF, ANG-2, FGF-2, PDGF-BB) (MENG *et al.*, 2007; MURPHY *et al.*, 2008; REN *et al.*, 2016).

O grupo de Murphy e colaboradores observou que as células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC) passavam a ter uma maior capacidade proliferativa quando cultivadas com o meio condicionado das CeSaM (MURPHY *et al.*, 2008). Da mesma forma, em outro estudo comparativo entre o potencial angiogênico das CeSaM e MSC-MO, o meio condicionado das CeSaM mostrou superior capacidade de formação de estruturas tubulares em matrigel, tanto na condição de normóxia quanto em hipóxia (ALCAYAGA *et al.*, 2015). Estes resultados sugerem que estas células possam contribuir para a neovascularização em tecidos isquêmicos *in vivo*.

Levando em consideração que uma das principais limitações dos transplantes de células-tronco é a sobrevivência no microambiente isquêmico, a utilização de tipos celulares com maior capacidade de lidar com o estresse oxidativo parece ser uma boa solução, visto que esse ambiente é uma grande fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nesse contexto, Asensi e colaboradores demonstraram que as CeSaM não só apresentaram maior capacidade de produção de enzimas antioxidantes na presença de ROS, mas também apresentaram maior resistência ao peróxido de hidrogênio do que células-tronco pluripotentes (embrionárias e iPSC-derivadas das CeSaM). Além disso, a adesão celular também foi mais eficiente nas CeSaM na presença de peróxido de hidrogênio, mostrando que essa célula pode ser vantajosa para aplicações na angiogênese terapêutica, já que possuem características intrínsecas que contribuem para sobrevivência celular em ambientes hostis, além do seu potencial regenerativo (ASENSI *et al.*, 2014).

A angiogênese é uma etapa fundamental no processo de reparo tecidual após uma lesão, e a administração de células com efeitos angiogênicos pode ser bastante interessante em termos de terapias para algumas doenças. Esta abordagem foi confirmada com um trabalho que utilizou o modelo murino de isquemia de membros induzida pelas ligações da artéria femoral e suas ramificações. Nesse trabalho, as CeSaM transplantadas promoveram uma melhora significativa da isquemia tecidual, deixando o membro intacto, enquanto o membro dos animais controles sofreu necrose (MURPHY *et al.*, 2008). É importante ressaltar que no caso supracitado os animais eram imunocompetentes e, mesmo assim, após receberem células

mesenquimais de sangue menstrual de origem humana, não desenvolveram nenhum tipo de reação imunológica, sugerindo também o privilégio imunológico dessas células.

No modelo de infarto do miocárdio, Jiang e colaboradores também observaram diversos benefícios funcionais após o transplante das CeSaM em ratos imunocompetentes. Os autores verificaram que a terapia com essas células não só preservou a região viável do miocárdio na zona de infarto como também promoveu a melhora da função cardíaca 28 dias após o transplante. Adicionalmente, quando injetadas na região de penumbra as CeSaM reduziram a apoptose bem como aumentaram a proliferação celular, recrutamento de células c-kit+ e densidade vascular no miocárdio *in vivo*. Ademais, a proteção e regeneração após infarto foram atribuídas aos efeitos parácrinos desencadeados pela secreção de citocinas que ativam vias de sobrevivência (aumentando fosforilação de AKT, ERK1/2, STAT3) e que recrutam células-tronco progenitoras endógenas (JIANG *et al.*, 2013).

O potencial terapêutico das células mesenquimais de sangue menstrual também vêm sendo explorado em estudos clínicos, porém os resultados ainda são modestos. Em 2010, o grupo de Zhong *et al* relatou um caso de uma paciente de 74 anos de idade com insuficiência cardíaca congestiva e fração de ejeção 25-30%, que foi submetida ao tratamento com células mesenquimais endometriais e células CD34+. Após 2 anos do tratamento, nenhum efeito adverso foi notado e os exames de ecocardiograma realizados demonstraram uma melhora de 10-15% na fração de ejeção (ZHONG *et al.*,2009).

Outro estudo promissor foi realizado pela empresa norte-americana de células-tronco chamada Medistem, onde 17 pacientes acometidos por insuficiência cardíaca congestiva também foram submetidos ao tratamento com as CeSaM em um ensaio clínico de fase II. Até o momento da publicação, nenhum efeito adverso grave havia sido detectado nos pacientes (BOCKERIA *et al.*, 2013). Logo depois, a mesma empresa iniciou também ensaios clínicos de fase I/II para o tratamento de pacientes com isquemia crítica de membros. O estudo buscou avaliar a segurança do transplante das células alogênicas, bem como avaliar os parâmetros clínicos, tais como: melhora da dor em repouso, cura da úlcera, redução dos casos de amputação e melhora na qualidade de vida. Os resultados, no entanto, ainda não foram publicados (NCT01558908). Além desses, outros ensaios clínicos com células

endometriais também estão em andamento e podem ser encontrados na base de dados *clinicaltrials.gov*.

1.4. Hipótese do trabalho

Considerando-se que o endométrio uterino é um tecido que passa por intensa isquemia tecidual seguida de angiogênese durante o ciclo menstrual, sugerimos que as células mesenquimais presentes no ambiente endometrial e fluido menstrual pudessem apresentar propriedades angiogênicas vantajosas em relação às células mesenquimais presentes na medula óssea. Além disso, se verificado seu potencial angiogênico, as células mesenquimais derivadas do sangue menstrual poderiam ser uma fonte mais viável para aplicação clínica em terapias de doenças isquêmicas.

Visto que existem poucos trabalhos na literatura que comparem o potencial angiogênico das células mesenquimais provenientes destas fontes, esta dissertação buscou analisar e comparar as propriedades angiogênicas dessas células, tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Comparar o potencial angiogênico das células estromais mesenquimais humanas derivadas do sangue menstrual (CeSaM) com o das células estromais mesenquimais humanas de medula óssea (MSC-MO) *in vitro*, bem como investigar as propriedades angiogênicas destas células, *in vivo*, enxertadas em embrião de galinha.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Parte I: Análise do efeito parácrino das CeSaM e MSC-MO em relação às HUVEC *in vitro*

2.2.1.1. Avaliar o efeito parácrino das CeSaM e MSC-MO cultivadas em normóxia e hipóxia 1%, verificando se o meio condicionado dessas células induz uma maior capacidade angiogênica e migratória nas HUVEC;

2.2.1.2. Mensurar os níveis de RNAs mensageiros para os fatores angiogênicos VEGF, bFGF e PDGF-BB, nas CeSaM e MSC-MO;

2.2.1.3. Analisar a secreção de fatores angiogênicos no meio condicionado das CeSaM e MSC-MO cultivadas em normóxia e hipóxia 1%;

2.2.2. Parte II: Análise da capacidade intrínseca das CeSaM e MSC-MO de participar das etapas da angiogênese *in vitro*

2.2.2.1. Avaliar o potencial de migração celular das CeSaM e MSC-MO *in vitro*;

2.2.2.2. Avaliar a capacidade das CeSaM e MSC-MO realizarem *Sprouting in vitro* utilizando esferoides em cultivo 3D;

2.2.2.3. Avaliar a capacidade das CeSaM e MSC-MO de se diferenciarem em um fenótipo *endothelial-like* após o ensaio de *Sprouting*, avaliando a expressão de CD31;

2.2.3. Parte III: Análise das propriedades angiogênicas das CeSaM e MSC-MO *in vivo*

2.2.3.1. Investigar as propriedades angiogênicas das CeSaM e MSC-MO enxertadas em embrião de galinha;

3. Materiais e Métodos

3.1. Isolamento e cultivo dos diferentes tipos celulares envolvidos no estudo

3.1.1. Coleta das células humanas derivadas do sangue menstrual

O protocolo abaixo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), sob registro número 056/09.

O sangue menstrual foi coletado de jovens voluntárias saudáveis (n=10 doadoras), com idade entre 18 e 32 anos, no dia de maior fluxo menstrual.

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), as voluntárias receberam instruções quanto ao procedimento de coleta. A coleta foi feita em um coletor de urina contendo 5 mL de uma solução salina e suplementada com 1% de antibióticos (penicilina e estreptomicina – Gibco) para evitar contaminação. O material permaneceu em temperatura aproximada de 4°C até o momento do processamento, não excedendo o tempo de 8 horas entre a coleta e o início do isolamento.

3.1.2. Isolamento e cultivo das células aderentes presentes no sangue menstrual

O material coletado foi diluído em solução tampão fosfato salino (Phosphate Buffered Saline-PBS), na proporção 1:1, homogeneizado e centrifugado 400 x g por 5 minutos. O sedimento de células foi ressuspenso em 5mL de PBS e novamente centrifugado a 400 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. Este processo foi repetido mais duas vezes com a finalidade de lavar apropriadamente as amostras. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer (Hausser Scientific) e a sua viabilidade foi analisada com azul de Trypan 0,4% (Trypan Blue, Sigma-Aldrich). Por fim, as células obtidas após as lavagens foram ressuspenso em DMEM-High Glicose (4,5 g/L) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich), antibióticos (1% de penicilina e estreptomicina - Gibco) e plaqueadas em placas de cultura de 35 mm. As etapas detalhadas do processamento das células derivadas do sangue menstrual podem ser encontradas no livro: Goldenberg & Carvalho, 2012. Na Figura 3, temos representadas as etapas do procedimento de isolamento da fração das células do sangue menstrual.

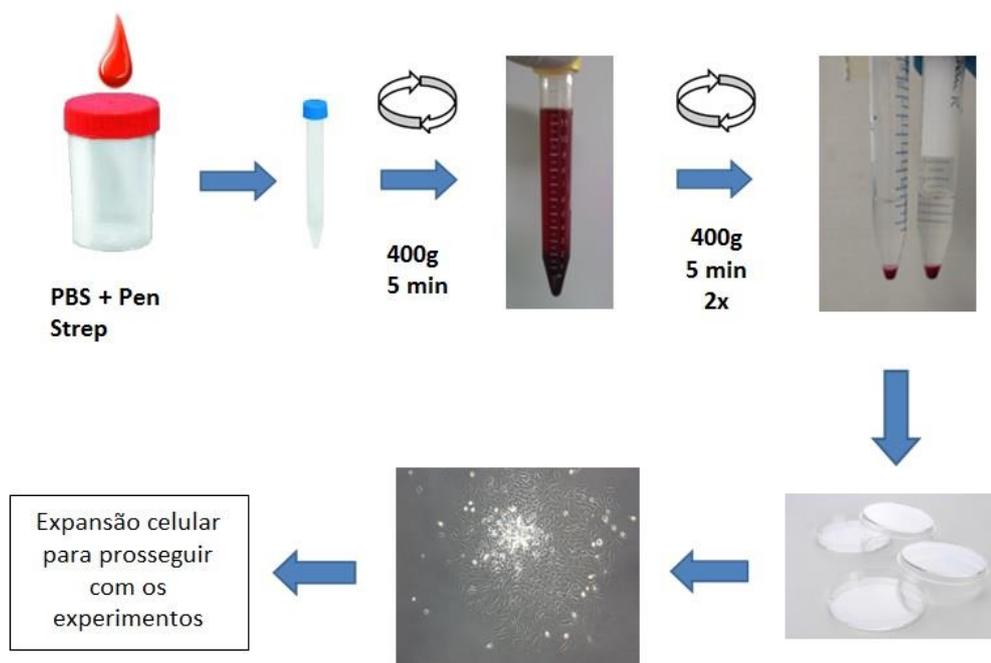


Figura 3: Protocolo experimental para o isolamento das células derivadas do sangue menstrual. O sangue coletado foi centrifugado, o sedimento ressuspensionado em solução salina e lavado num total de três vezes. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e desta vez plaqueadas em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino. Todos os experimentos foram realizados entre a terceira e sétima passagens.

3.1.3. Isolamento das células mononucleares da medula óssea humana

O protocolo abaixo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Federal de Bonsucesso (HFB), registro número 26046414.7.0000.5253.

Os aspirados medulares foram obtidos sob o consentimento de pacientes do sexo masculino e feminino com idade entre 18 e 60 anos (n=8 doadores) sem doenças hematológicas, por punção da crista ilíaca. O material coletado foi diluído em PBS na proporção 1:2 e homogeneizado. Em seguida, a amostra foi adicionada cuidadosamente sobre Ficoll-Paque™ (1.077 g/mL, GE Healthcare) centrifugada a 400 x g por 25 minutos para a obtenção da fração enriquecida com as células mononucleares derivadas da medula óssea.

Após a centrifugação, foi possível recuperar o anel de células mononucleares, localizadas na interface entre a solução e o Ficoll-Paque™. Em seguida as células obtidas foram lavadas novamente com PBS e centrifugada a 300 x g por 5 minutos para eliminar o eventual resíduo de Ficoll-Paque. Em seguida, as células foram

contadas na Câmara de Neubauer (Hausser Scientific) e sua viabilidade analisada com azul de Trypan 0,4% (Trypan Blue, SIGMA). Por fim, as células obtidas foram ressuspensas e plaqueadas conforme será descrito no próximo item. Na figura 4 temos representadas as etapas do procedimento de isolamento da fração das células mononucleares da medula óssea (CMMO).

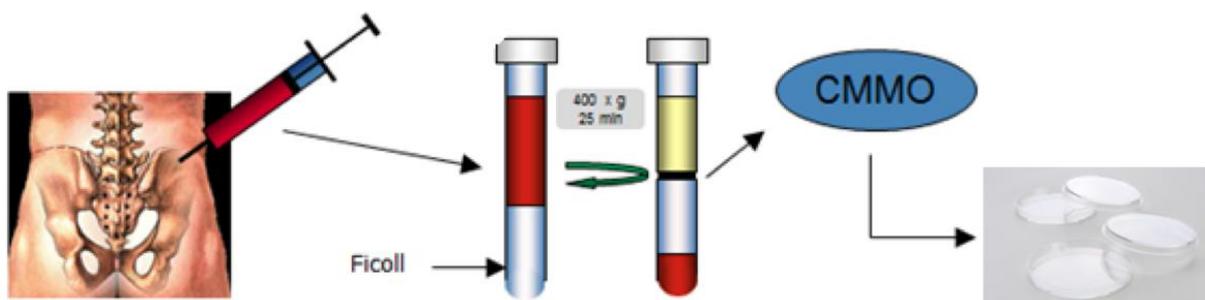


Figura 4: Protocolo experimental para o isolamento da fração de células mononucleares derivadas da medula óssea (CMMO). O material coletado por punção da crista íliaca foi diluído e adicionado sobre o Ficoll-Paque™. O anel de células mononucleares da medula óssea, recuperado após centrifugação, foi lavado e plaqueado para o cultivo celular. CMMO: Células mononucleares da medula óssea.

3.1.4. Cultivo das células estromais mesenquimais

Após o plaqueamento, as culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com atmosfera úmida, na presença de 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado para o cultivo das CeSaM foi o DMEM-High Glicose suplementado com 2 g NaHCO₃ (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293 g L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 20% soro fetal bovino (Gibco) a pH 7,4. O meio de cultura utilizado para o cultivo das MSC-MO foi o DMEM-High Glicose suplementado com 2 g NaHCO₃ (23,8 mM), 5 g HEPES (20,98 mM), 0,293 g L-glutamina (2 mM), 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco) e 15% soro fetal bovino (Hyclone) a pH 7,4.

A primeira troca do meio de cultura ocorreu dois dias após o plaqueamento. As células foram lavadas com PBS e os debris celulares que ainda estivessem no sobrenadante foram descartados.

O meio de cultura foi trocado regularmente de acordo com o consumo dos seus nutrientes pelas células, ocorrendo, geralmente duas vezes por semana. Quando as culturas atingiam a confluência de aproximadamente 80%, as células eram dissociadas com uma solução de tripsina-EDTA 0,25% e expandidas. As

culturas foram acompanhadas diariamente para observação da morfologia e confluência celular. Todos os experimentos foram realizados entre a terceira e sétima passagem.

3.2. Cultivo e caracterização imunofenotípica da linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC) EA.hy926

A linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical humano EA.hy926 (ATCC® CRL-2922™) foi gerada pelo biobanco internacional ATCC, através da fusão de células endoteliais de veia de cordão umbilical primárias com a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano (clone A549). Esta linhagem foi gentilmente cedida ao nosso laboratório pela professora Sofia Santos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) localizado na Universidade de São Paulo (USP).

A linhagem de HUVEC foi expandida utilizando meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) para seu cultivo. Para avaliar seu perfil imunofenotípico, estas células foram analisadas por dois métodos diferentes: citometria de fluxo e imunofluorescência.

3.2.1 Caracterização por citometria de fluxo

Para realizar a imunofenotipagem, uma amostra da linhagem de células endoteliais EA.hy926 aderida a placa de cultura, foi submetida a passagem celular enzimática por tripsina/EDTA 0,25% após a mesma atingir aproximadamente 90% de confluência de área. Em seguida, as células foram lavadas com 5 mL de PBS e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos.

O precipitado celular obtido após a lavagem com PBS, foi ressuspenso novamente em 200 µL de PBS com 0,5% de albumina (BSA) e dividido em dois tubos contendo aproximadamente 2×10^5 células em 100 µL. Em seguida, adicionou-se em um dos tubos, 3 µL de anticorpo monoclonal anti-CD31 conjugado a ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, catálogo 555446, clone WM59) por 20 minutos, ao abrigo da luz, à 4°C, de acordo com as instruções do fabricante. Células não marcadas foram utilizados como controle de auto-fluorescência. Em ambos os tubos, foi utilizado o marcador de viabilidade celular 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences, catálogo 559925), uma molécula intercalante de DNA que pode penetrar apenas nas células não viáveis devido à perda de seletividade da

membrana plasmática. Assim, podemos excluir estas células de nossas análises por citometria de fluxo.

Após a marcação, as amostras foram lavadas com 1mL de PBS e centrifugadas a 300 x g por 5 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 200µL de PBS/ BSA 0,5% e analisados no citômetro de fluxo Accuri C6 com o software FlowJo versão X a fim de avaliar o percentual de expressão de CD31 na amostra.

3.2.2 Caracterização por imunofluorescência

As células foram plaqueadas (2×10^4 células/poço) em poços pré-tratados com MatrigelTM e meio EGM-2 (Lonza, catálogo CC-3156) em placa de 96 poços com fundo de vidro (Greiner Bio One, catálogo 655986) e mantidas por 24 horas na estufa.

Em seguida, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados três vezes com PBS e então se adicionou uma solução de paraformaldeído 4%. As células foram mantidas com a solução fixadora por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foi retirado todo o paraformaldeído e as células fixadas foram lavadas três vezes com PBS e deixadas em geladeira com 200 µL de PBS em cada poço da placa de 96 poços até a realização da imunofluorescência.

O anticorpo primário avaliado nos procedimentos de imunofluorescência foi o CD31/PECAM-1 na diluição 1:50 (R&D Biosystems, catálogo BBA7, clone 9G11). Esta é uma molécula de adesão primariamente utilizada para demonstrar a presença de células endoteliais. Também foi utilizada Faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 na diluição 1:500 (Thermo Fisher, catálogo A12379) para marcação do citoesqueleto da célula. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse IgG H&L conjugado a Cy3 (Abcam, catálogo ab97035), para detectar imunoglobulinas de camundongo.

As células fixadas foram permeabilizados com o detergente TRITON X-100 diluído em PBS a uma concentração de 0,1% por 30 minutos. Esse procedimento abre poros na membrana celular, facilitando o acesso do anticorpo a proteínas intracelulares. Após a permeabilização, os poços foram incubados por uma hora em uma solução de PBS contendo BSA, na concentração de 2%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida, foram incubados com o anticorpo primário CD31, diluído em solução de PBS contendo BSA na concentração de 2%, overnight à temperatura de 4°C.

No dia seguinte, os poços foram lavados três vezes com Tween-20 diluído em PBS a uma concentração de 0,05% por cinco minutos cada, para depois serem incubados com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3, por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo secundário também foi diluído em uma solução de PBS contendo 2% de BSA. A próxima etapa foi novamente uma série de três lavagens de cinco minutos cada com Tween-20 diluído em PBS. Em seguida, foi utilizada Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488, diluída em PBS, para marcação de citoesqueleto. E por fim, foi realizada novamente uma série de três lavagens de cinco minutos cada com PBS, deixando a placa em geladeira com 200 µL de PBS em cada poço até a realização, no dia seguinte, das fotomicrografias no microscópio confocal LSM 510 (Zeiss), acoplado a um sistema de captura de fotomicrografias digital. O sistema estava ligado ao software Zen 2009 que processa as imagens obtidas.

3.3. Avaliação da expressão gênica das CeSaM e MSC-MO e análise do meio condicionado dessas células nas condições de normóxia (21% O₂) e hipóxia (1% O₂)

Essas células foram plaqueadas numa densidade de 4×10^5 células em placas de 60 mm e mantidas em condições de normóxia (21% O₂) e em condições de hipóxia (1% O₂) por 48 e 72 horas. Ao final do experimento, as células foram removidas das placas de cultura por digestão enzimática, centrifugadas a 300 x g por 5 minutos e seus sedimentos armazenados em -80°C para posterior análise da expressão gênica por PCR em tempo real. Já os meios condicionados das células, foram coletados, centrifugados a 300 x g por 5 minutos para eliminar eventuais debris celulares, e uma parte dos sobrenadantes (meios condicionados) foi armazenada em alíquotas a -80°C para posterior análise pelo método imunoenzimático (ELISA) e por citometria de fluxo. A outra parte foi imediatamente utilizada para avaliação do efeito parácrino desses meios condicionados nas HUVEC nos experimentos de formação de rede de estruturas tubulares e migração celular.

3.4. Avaliação da capacidade angiogênica das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de formação de estruturas tubulares

Para este ensaio, alíquotas de 50 µL de Matrigel™ (BD Biosciences) foram

distribuídas nos poços da placa de cultura (96 poços) e foram colocadas na estufa estufa a 37°C por 30 minutos, para polimerização. Após a polimerização, as HUVEC foram plaqueadas com densidade de 2×10^4 células em 200 μ L dos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO, após 48 e 72 horas do experimento descrito no item 3.3. O experimento foi realizado em duplicata para cada condição experimental.

Foram utilizados também dois tipos de controles para este experimento. No primeiro, as HUVEC foram plaqueadas em 200 μ L de meio EGM-2 (*Endothelial Growth Medium*) (Lonza), meio rico em fatores pró-angiogênicos tais como: VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF-1, dentre outros. No segundo controle, as HUVEC foram plaqueadas em 200 μ L de meio DMEM com 10% SFB que é o meio utilizado para o cultivo das células endoteliais e mesenquimais, e este não é suplementado com fatores angiogênicos. Assim, o meio EGM-2 foi considerado nosso controle positivo desse experimento, pois se espera maior indução angiogênica nas HUVEC. Já o meio DMEM foi considerado nosso controle negativo por ser um meio não suplementado com fatores pró-angiogênicos, esperando-se, portanto, menor indução angiogênica nas HUVEC. O efeito dos meios controles nas células endoteliais foram comparados com o efeito dos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO.

Após 20 horas do plaqueamento das células, as imagens foram capturadas utilizando o microscópio invertido digital Evos AMG (Fisher Scientific, BN0115109). A capacidade angiogênica das HUVEC foi analisada através da quantificação do comprimento total das estruturas tubulares formadas e do número de ramificações em cada condição experimental através do software ImageJ com a extensão *Angiogenesis Analyzer*. Foram analisados quatro campos de imagens para cada condição. Na figura 5 podemos observar uma imagem representativa de como o software quantifica tais estruturas tubulares.

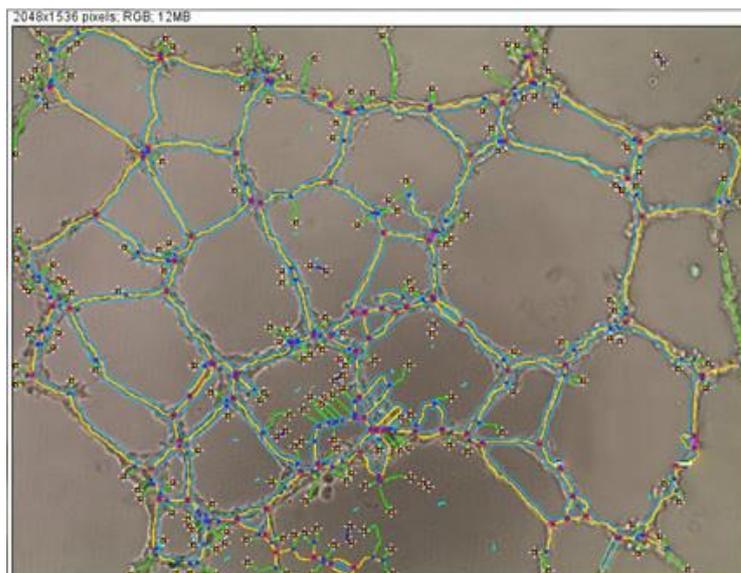


Figura 5: Ilustração da análise no software ImageJ com a extensão *angiogenesis analyzer*. Na imagem é possível observar o reconhecimento das estruturas tubulares pelo programa, que detecta o comprimento total das estruturas e o número de ramificações.

3.5. Avaliação do potencial migratório das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO através do ensaio de lesão por arranhadura (do inglês *Scratch Wound*)

Para este experimento as HUVEC foram plaqueadas numa concentração de 2×10^4 células em poços da placa de 96 poços (Essen Bioscience Image Lock). Após 20 horas, foi realizada uma arranhadura (do inglês *scratch*) na monocamada de células de forma precisa, utilizando o dispositivo *Wound Maker* (Essen Bioscience) que permite criar arranhaduras de 700-800 μm de espessura. Em seguida, todos os poços foram lavados com PBS, duas vezes para remover todos os debris celulares provocados pelo procedimento da arranhadura, e também como forma de prevenir a adesão das células que foram removidas. Após as lavagens, foram adicionados os meios condicionados dos diferentes grupos experimentais (CeSaM normóxia e hipóxia 1% e MSC-MO normóxia e hipóxia 1%, em 48 e 72 horas de cultivo). Foram utilizados também dois tipos de controles para este experimento. No primeiro, as HUVEC foram cultivadas em meio EGM-2 (Lonza) e no segundo controle, as HUVEC foram cultivadas em meio DMEM 10% SFB.

As placas foram levadas ao microscópio invertido automatizado Incucyte ZOOM (Essen Bioscience) que fica localizado dentro de uma estufa, e as imagens foram capturadas a cada 2 horas durante um período de 48 horas, permitindo o acompanhamento e o processamento das fotomicrografias realizadas em tempo real

através do software Incucyte ZOOM versão 2015.A. As análises das imagens e a quantificação das migrações celulares em cada condição experimental, foram realizadas utilizando o algoritmo *Relative Wound Density* do software Incucyte ZOOM versão 2015.A, o qual permite calcular a densidade celular na região de “lesão” (região vazia) em relação as regiões confluentes ao redor da “lesão”, em cada tempo experimental. A equação utilizada para este cálculo pode ser visualizada abaixo:

$$\%RWD(t) = 100 \cdot \frac{(w(t)-w(0))}{(c(t)-w(0))}$$

Onde:

RWD: Relative Wound Density- Densidade relativa na região da lesão em determinado tempo (t);

w(t): Wound region - Densidade celular na região da lesão em determinado tempo (t);

c(t): Cell region- Densidade celular nas regiões ao redor da lesão em determinado tempo (t).

3.6. Avaliação dos níveis de RNA mensageiros para VEGF-A, bFGF e PDGF-BB por RT-PCR em tempo real

3.6.1. Extração do RNA total

O ácido ribonucleico (RNA) total das CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia 1% foi extraído utilizando o kit RNeasy Mini Plus (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 4×10^5 células de CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia 1% foram lisadas e homogeneizadas em tampão desnaturante e o lisado foi filtrado, centrifugado e aplicado em uma microcoluna contendo uma membrana de sílica. A coluna foi lavada 3 vezes, com posterior eluição com água livre RNase. Em seguida, o RNA foi quantificado por espectrofotometria no aparelho

NanoDrop (Thermo Scientific) mensurando-se a absorvância no comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). As relações $A_{260}:A_{280}$ e $A_{260}:A_{230}$ também foram obtidas e indicaram a pureza do RNA. As relações $A_{260}:A_{280}$ entre 1,9 e 2,1 e a relação $A_{260}:A_{230}$ entre 1,9 e 2,2 foram consideradas ideiais, já que as razões abaixo desses valores podem indicar contaminações com proteínas ou fenóis. Após as quantificações, as amostras foram armazenadas a -80°C .

3.6.2. Reação da transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado a partir de 0,5 μg de RNA total por reação de transcrição reversa, utilizando o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, cada amostra tinha RT- correspondente, sem a enzima transcriptase reversa, os quais foram também analisados para verificar eventuais contaminações por DNA genômico. Ao final da reação, o cDNA foi estocado em freezer -20°C até o momento do ensaio de PCR em tempo real.

3.6.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real

A quantificação da expressão de RNAm para VEGF, bFGF e PDGF-BB nas CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia 1% foi avaliada por PCR em tempo real. Para tal, foi preparada uma solução contendo 3 μl de cDNA diluído em água livre de RNase (0,5 ng/ μl), 7,5 μl de 2x power SYBR (Applied Biosystems), 4 μl água livre de RNase e 0,5 μl do primer *senso* e *antissenso* na concentração de 10 μM . As amostras foram amplificadas utilizando-se termociclador ViiATM7 (Applied Biosystems). O programa de amplificação consistiu em um aquecimento a 50°C por 2 minutos, seguido de desnaturação e ativação da Taq polimerase a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Cada amostra de cDNA foi amplificada em duplicata.

A eficiência das amplificações foi avaliada utilizando as diluições seriadas do cDNA molde e foram utilizados apenas *primers* que apresentaram eficiência entre 90 e 110% (Tabela 1).

A quantificação relativa dos produtos de amplificação foi feita através da comparação relativa dos produtos de PCR durante a fase log do processo de amplificação. Os resultados foram corrigidos de acordo com as concentrações do GAPDH (controle endógeno) através da análise do dCt. O dCt é a subtração entre número do ciclo em que a molécula alvo atinge o limiar pelo número do ciclo em que o controle endógeno atinge o limiar. Já o Ct se refere ao número do ciclo no qual a fluorescência é detectada (threshold cycle) pelo software do termociclador (software Viia™7 versão 1.1). Em seguida, foi utilizado o método 2^{-ddCt} sendo $ddCt = [(dCt \text{ experimental} - dCt \text{ controle})]$. O dCt controle representa as médias dos dCt das amostras na condição normóxia. Os resultados foram apresentados em escala logarítmica na base 10.

As sequências dos *primers* que foram utilizados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Sequência de primers utilizados para detecção dos transcritos dos fatores angiogênicos

Gene	Sequência de <i>primer sense</i> Sequência de <i>primer anti-sense</i>	Nome e Principais funções	Eficiência do <i>primer</i>
VEGF-A	AGGGCAGAATCATCACGAAG GGATGGCTTGAAGATGTACTC	Fator de crescimento endotelial vascular. Principal fator responsável pelo crescimento de novos vasos sanguíneos.	102,02%
bFGF	ACCATGGGGAAGGTGAAGGT CATGGGTGGAATCATATTGG	Fator de crescimento de fibroblastos básico. Estimula proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência das células endoteliais.	102,30%
PDGF-BB	ATGATCTCCAACGCCTGC TCAGCAATGGTCAGGGAAC	Fator de crescimento derivado de plaqueta BB. Responsável principalmente pela estabilização da vasculatura recém-formada.	91,74%
GAPDH	ACCATGGGGAAGGTGAAGGT CATGGGTGGAATCATATTGG	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Enzima que catalisa uma etapa da glicólise.	106,97%

3.7. Avaliação da secreção dos fatores angiogênicos nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO

3.7.1. Quantificação pelo ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para o ensaio imunoenzimático (ELISA), foram utilizadas microplacas de 96 poços (R&D Systems) adsorvidas com anticorpo monoclonal específico para as citocinas VEGF-A, bFGF e PDGF-BB. O ensaio de ELISA se baseia em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas. Todos os reagentes e soluções padrões foram preparadas e reconstituídas previamente conforme descrito no kit do fabricante (Quantikine ELISA, R&D Systems).

Primeiramente, foram adicionados nos poços das microplacas 50 µL de solução diluente RD1W para ativar os anticorpos adsorvidos. Em seguida, a curva padrão e as amostras dos meios condicionados dos grupos experimentais (CeSaM normóxia e hipóxia 1% 48h e MSC-MO normóxia e hipóxia 1% 48h) foram adicionadas aos poços, em duplicata. Nesta etapa, toda citocina (VEGF-A, bFGF ou PDGF-BB) presente nas amostras pode se ligar no anticorpo específico imobilizado nas microplacas. As amostras utilizadas para a citocina VEGF-A foram utilizadas diluídas 1:5 em solução diluente RD5K para que os valores das concentrações das amostras não extrapolassem as concentrações limites da curva padrão. Após a adição da curva e das amostras, foram feitas três lavagens com solução tampão de lavagem para evitar ligações não específicas. Em seguida, anticorpo policlonal conjugado a enzima peroxidase, específico para cada uma das citocinas (VEGF-A, FGF-B ou PDGF-BB), foi adicionado aos poços e esses foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, novamente foram realizadas três lavagens com solução tampão de lavagem e, logo após, a solução cromógena contendo o substrato para a enzima (peróxido de hidrogênio) foi adicionada aos poços e incubada por 20 minutos, ao abrigo da luz. Nesta etapa é possível observar que a coloração aumenta proporcionalmente a quantidade de citocina presente na amostra. Em seguida, foi adicionada solução ácida contendo ácido sulfúrico, 50 µL por poço, para interromper a reação enzimática. A leitura da absorbância foi feita em leitor de microplaca por espectrofotometria (Spectramax), em comprimento de onda de 450 nm.

3.7.2. Quantificação de fatores angiogênicos por citometria de fluxo

Para a quantificação dos fatores angiogênicos foram seguidas as instruções descritas no kit LEGENplex Human Growth Factor Panel (Biolegend), no qual permite quantificar 13 citocinas (ANG-2, VEGF-A, EGF, EPO, b-FGF, G-CSF, GM-CSF, HGF, M-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, SCF e TGF- α) simultaneamente na mesma amostra. Este imunoenensaio segue o mesmo princípio do ELISA, porém este faz uso de *beads* de diferentes tamanhos e intensidades de fluorescência. Cada *bead* é conjugada com anticorpos específicos na sua superfície que permitem a captura de seus respectivos analitos/citocinas.

Neste ensaio, as *beads* de captura de citocinas são incubadas com as amostras de meios condicionados dos grupos experimentais (CeSaM normóxia e hipóxia 1% 48h e 72 horas e MSC-MO normóxia e hipóxia 1% 48h e 72 horas) e com anticorpo de detecção conjugado com biotina. Desta forma é possível formar o complexo *bead*-analito-anticorpo de detecção, no qual promoverá intensidades de sinais de fluorescência proporcionalmente a quantidade de analitos da amostra.

Os tubos para aquisição foram preparados com: 25 μ L de amostra, 25 μ L da mistura de *beads*, 25 μ L do reagente de detecção e 25 μ L de solução *assay buffer*. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão, porém a amostra foi substituída pela solução padrão e o *assay buffer* substituído por meio de cultura fresco. Os tubos foram mantidos em placa agitadora a 1000 rpm, por duas horas, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 25 μ L de Streptavidina-ficoeritrina (SA-PE) (substrato para enzima conjugado com fluorocromo) em cada tubo e estes foram mantidos novamente em placa agitadora a 1000 rpm, por 30 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 1000 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi então removido cuidadosamente e logo após foram adicionados 200 μ L de tampão de lavagem para lavagem. Esse procedimento foi repetido novamente duas vezes e então as amostras foram lidas no citômetro de fluxo (Accuri C6).

Os dados obtidos foram analisados com o software Biolegend's LEGENplex Data Analysis e os resultados foram gerados em gráficos.

3.8. Avaliação da Migração Celular das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de lesão por arranhadura

Para esse experimento, as CeSaM e as MSC-MO foram plaqueadas numa concentração de 2×10^4 células em poços da placa de 96 poços (Essen Bioscience Image Lock). Após 20 horas, foi realizada uma arranhadura na monocamada de células, de forma precisa, utilizando o dispositivo *Wound Maker* (Essen Bioscience), assim como foi descrito no item 3.5. Entretanto, a diferença foi que após a realização do arranhão, em vez dos meios condicionados, foram adicionados os meios de cultivo respectivos de cada tipo celular (DMEM suplementado com 20% soro (Gibco) para as CeSaM e DMEM suplementado com 15 % soro (Hyclone) para as MSC-MO).

As placas foram levadas ao microscópio invertido automatizado IncuCyte ZOOM (Essen Bioscience) e as imagens foram capturadas a cada 2 horas em por um período de 48 horas, permitindo o acompanhamento e o processamento das fotomicrografias realizadas em tempo real através do software Incucyte ZOOM versão 2015.A.

As análises das imagens e a quantificação das migrações celulares de cada tipo celular foram realizadas utilizando o algoritmo *Relative Wound Density* do software Incucyte ZOOM versão 2015A assim como já descrito no item 3.5.

3.9. Ensaio de *Sprouting*

O ensaio de *Sprouting* pode ser dividido em duas etapas, nas quais podemos destacar a geração de esferoides de células por meio da técnica de gota pendente e a transferência dos esferoides para placas de cultura contendo MatrigelTM, onde foram avaliados os perfis de invasão e *Sprouting*.

3.9.1. Técnica de gota pendente

Primeiramente, as culturas de CeSaM e MSC-MO foram submetidas a digestão enzimática, contadas e ressuspensas em meio EGM-2. Em seguida, foi realizado o método de gota pendente para geração de esferoides com as células mesenquimais. Para realização desta técnica, alíquotas de 20 μ L de suspensão celular foram depositadas em uma tampa de placa de Petri, com auxílio de uma pipeta, de modo a formar gotículas sobre a tampa. Cada gotícula continha 150.000

células/ 20 μ L. Em seguida, cuidadosamente, a tampa foi virada de cabeça para baixo e apoiada sobre sua placa de Petri contendo 7 mL de PBS. Este procedimento serve para evitar a evaporação das gotículas. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas na estufa a 37°C.

3.9.2. Avaliação do *Sprouting* desenvolvido pelos esferoides celulares

No dia posterior, os esferoides formados pela técnica de gota pendente foram transferidos para placas de 96 poços (Greiner Bio One, catálogo 655986). Para isso, alíquotas de 50 μ L de Matrigel™ (BD Biosciences) foram distribuídas nos poços da placa de cultura e foram deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos, para polimerização. Após a polimerização, foram adicionados 200 μ L de meio EGM-2 (Lonza) em cada poço, sobre o Matrigel™. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta os esferoides foram recuperados e transferidos para os poços. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C e foram fotografadas em 48 horas e 7 dias. O *sprouting* desenvolvido por cada esferoide foi quantificado através do software Image Pro Plus versão 6.0 (Media Cybernetics). A distância (μ m) alcançada pelas células foi mensurada desde a borda do esferoide até as pontas das estruturas dos brotos (*sprouts*) ao longo de todo o esferoide. Foram realizadas 20 medições para cada esferoide e, em seguida, foi feita uma média aritmética para obter o valor médio do comprimento do *Sprouting* desenvolvido.

3.10. Imunofluorescência após o ensaio de *Sprouting*

Os poços contendo Matrigel™ e esferoides formados por CeSaM e MSC-MO foram fixados com paraformaldeído 4% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi retirado e as células foram lavadas três vezes com PBS e deixadas em geladeira com 200 μ L de PBS por poço até a realização da imunofluorescência.

O anticorpo primário avaliado nos procedimentos de imunofluorescência foi o CD31/PECAM-1 na diluição 1:50 (R&D Biosystems, catálogo BBA7, clone 9G11). Também foi utilizada a faloidina conjugada ao Alexa Fluor 488 na diluição 1:500 (Thermo Fisher, catálogo A12379) para marcação do citoesqueleto da célula. O anticorpo secundário utilizado foi o anti-mouse IgG H&L conjugado a Cy3 (Abcam, catálogo ab97035), para detectar imunoglobulinas de camundongo.

Os esferoides fixados foram permeabilizados com o detergente TRITON X-100 diluído em PBS a uma concentração de 0,1% por 30 minutos. Esse procedimento abre poros na membrana celular, facilitando o acesso do anticorpo a proteínas intracelulares. Após a permeabilização, os esferoides foram incubados por uma hora em uma solução de PBS contendo BSA, na concentração de 2%, para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubados com o anticorpo primário CD31, diluído em solução de PBS contendo BSA na concentração de 2%, overnight à temperatura de 4°C.

No dia seguinte, os esferoides foram lavados três vezes com Tween-20 diluído em PBS a uma concentração de 0,05% por cinco minutos cada, para depois serem incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao Cy3, por uma hora em temperatura ambiente. O anticorpo secundário também foi diluído em uma solução de PBS contendo 2% de BSA. A próxima etapa foi novamente uma série de três lavagens de cinco minutos cada com Tween-20 diluído em PBS. Em seguida, foi utilizada faloidina conjugada com Alexa Fluor 488, diluída em PBS, para marcação de citoesqueleto. E por fim, foi realizada novamente uma série de três lavagens de cinco minutos cada com PBS, deixando a placa em geladeira com 200 µL de PBS por poço até a realização das fotomicrografias no microscópio confocal LSM 510.

No dia seguinte, as placas foram levadas ao microscópio confocal LSM 510 (Zeiss) acoplado a um sistema de captura de fotomicrografias digital. O sistema estava ligado a um software (Zen 2009) que processa as imagens obtidas.

3.11. Xenoenxerto em embrião de galinha

3.11.1. Preparo dos esferoides das CeSaM e MSC-MO para o transplante em embrião de galinha

Esferoides formados por CeSaM e MSC-MO em sétima passagem foram preparados como descrito por Brito *et al.* (2008). Resumidamente, as células foram submetidas à digestão enzimática e plaqueadas em alta densidade (5×10^5 células/mL) em placas de petri de 60 mm não tratadas para adesão celular (J prolab, 0303-8) utilizando os meios de cultura já descritos para estas células. A placa foi mantida levemente inclinada e o volume (1mL) foi mantido na menor área possível, como observado na figura 6. Grandes agregados celulares foram parcialmente dissociados mecanicamente após 24 horas do plaqueamento, e mantidos sem

perturbações até 48 horas. Essa técnica permitiu gerar esferoides de diversos tamanhos (Figura 6).

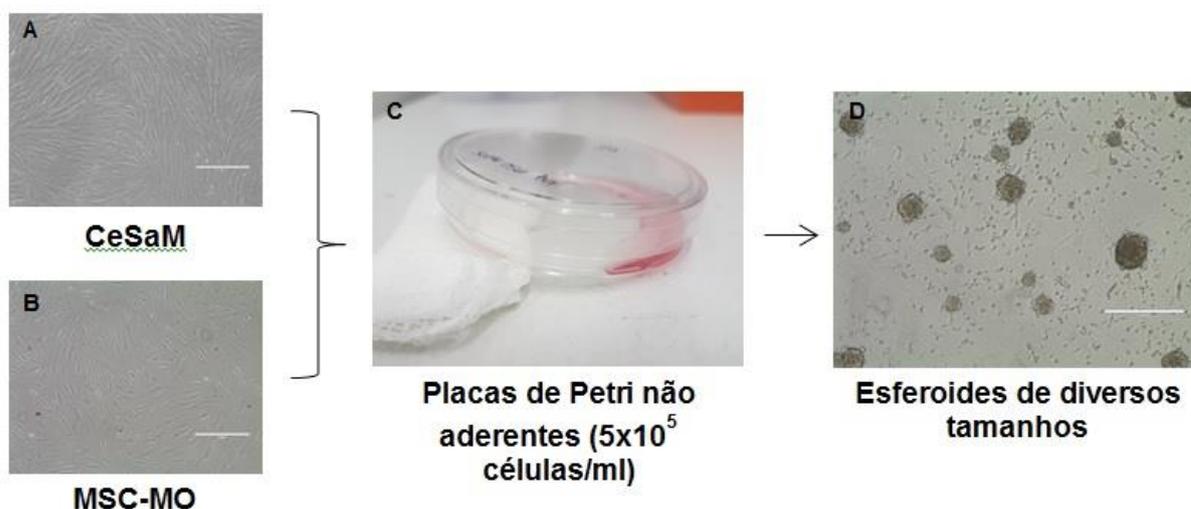


Figura 6: Fluxograma representando as etapas para formação dos esferoides para enxerto nos embriões de galinha. (A) Células mesenquimais de sangue menstrual e (B) células mesenquimais de medula óssea foram submetidas à digestão enzimática para formação dos esferoides. (C) método de plaqueamento em alta densidade em placa não aderente levemente inclinada. (D) Esferoides formados de diversos tamanhos. CeSaM: Células estromais mesenquimais de sangue menstrual; MSC-MO: Células estromais mesenquimais de medula óssea. Escala: 400 μ m.

3.11.2. Manipulação do embrião de galinha

O protocolo descrito abaixo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em experimentação científica do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, registrado no Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87.

Para esse experimento foram utilizados ovos de galinhas da raça Legorne Branco, livres de patógenos, obtidos da Granja Tolomei (Rio de Janeiro, Brasil). Esses ovos foram classificados de acordo com os estágios de desenvolvimento embrionário descritos por Hamburger e Hamilton, considerando-se o número total de somitos (HAMBURGUER e HAMILTON, 1951).

Os embriões de galinha foram incubados em estufa a 37°C até pelo menos o décimo terceiro estágio somítico (13ss), no segundo dia de desenvolvimento embrionário (E1,5-2). Nesse dia, previamente à cirurgia, o excesso de albumina foi aspirado dos ovos através da abertura de um orifício em suas cascas. Esta etapa é

fundamental para evitar que se puxe o embrião no momento que abrimos a janela na casca do ovo para a manipulação cirúrgica. Em seguida, abriu-se uma janela na parte central superior do ovo com auxílio de uma tesoura e injetou-se tinta da China (Nankin) na gema para permitir melhor visualização das estruturas do embrião e contagem do número de somitos formados até o momento.

Os esferoides de células mesenquimais foram enxertados na região do mesoderma paraxial (região que forma os somitos), pois esta é a região que dará origem ao maior número de derivados celulares (incluindo condrócitos, células musculares, dermais e endoteliais), tornando interessante o estudo do comportamento das MSC nessas regiões altamente instrutivas do embrião.

Para o enxerto dos esferoides na região do somito, um esferoide de CeSaM ou MSC-MO (do tamanho aproximado de um somito do embrião) foi enxertado no mesoderma présomítico (MPS) na região dos somitos presuntivos 15 a 21. Estes somitos representarão os somitos cervicais do tronco no nível do futuro broto da asa (Chevallier *et al.*, 1978). Embriões operados (n=8) foram reincubados a 37°C para se desenvolverem até E4,5-5.

No quinto dia de desenvolvimento embrionário, os embriões foram eutanasiados e os espécimes preparados para histologia. Na figura 7 abaixo podemos observar a linha do tempo para esses experimentos.

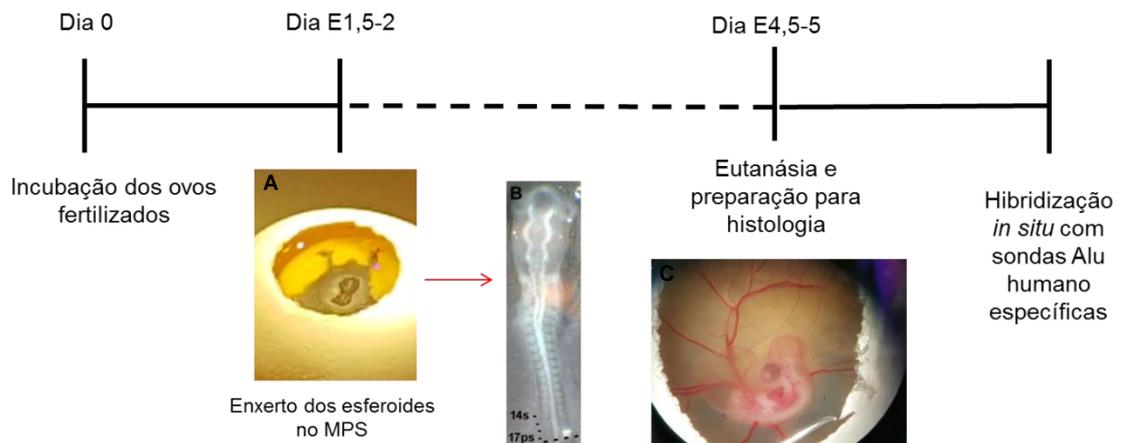


Figura 7: Linha do tempo mostrando as etapas dos experimentos de xenoenxerto em embrião de galinha (Figura B retirada do artigo Cordeiro *et al.*, 2015). MPS: Mesoderma pré-somítico.

3.11.3. Preparo de espécimes para histologia

Os embriões foram fixados utilizando uma solução de Formoy (Etanol-Formaldeído 37%-Ácido acético 6:3:1), desidratados em banhos seriados de etanol por uma hora cada, clarificados em xilol e emblocados em Paraplast (Sigma-Aldrich). Cortes seriados de 7 µm foram realizados utilizando um micrótomo (RM2125 RTS, Leica Biosystems) e montados em lâminas silanizadas (Kasvi, HDASOO3).

3.11.4. Hibridização *in situ* de DNA com sondas *Alu*

A sonda *Alu* utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida ao nosso grupo de pesquisa pelo professor e colaborador José Brito do Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular do ICB/UFRJ. Essa sonda foi previamente sintetizada por reação em cadeia de polimerase (PCR) a partir de células mesenquimais de tecido adiposo (ADSC) como descrito por Cordeiro e colaboradores (CORDEIRO *et al.*, 2015).

Para a hibridização *in situ*, cortes de 7 µm foram desparafinizados em banhos de xilol e reidratados em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico. Em seguida, os cortes foram lavados três vezes em PBT (PBS + 0.1% de Tween 20) e tratados com 2 µg/ml de proteinase K em PBT por 14 minutos, a 37°C. Posteriormente, os cortes foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, lavados em PBS 1x por 5 minutos e pré-hibridizados por uma hora, a 42°C, em câmara de formamida, com tampão de hibridização de DNA (SSC 4x, solução de Denhardt 1x, 50% formamida deionizada, 5% dextran sulfato e 100µg/ml de DNA de esperma de salmão). Para a hibridização, adicionou-se 120 µl de tampão de hibridização de DNA contendo a sonda (0,3 ng/µl), cobrindo com lamínula e desnaturando em seguida em uma chapa quente a 95°C por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram mantidos em câmara de formamida, por 16 horas, na estufa a 42°C para a hibridização do DNA.

No dia seguinte, realizamos uma série de lavagens antes de prosseguirmos com a técnica de imunohistoquímica para revelação das sondas *Alu*. As lâminas foram lavadas duas vezes por 5 minutos a temperatura ambiente em SSC 2x, duas vezes por 10 minutos a 42°C em SSC 0.1x e duas vezes por meia hora em MABT (MAB [Ácido maleico 0,1M, Cloreto de sódio 0,15M, hidróxido de sódio pH 7,5] + 0,1% de Tween 20). Para imunohistoquímica, primeiramente foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos com solução de bloqueio [MABT + 2% Blocking Solution (Roche) + 10% soro de cabra inativado (Sigma-Aldrich)] por 2 horas a temperatura

ambiente em câmara úmida. Em seguida, foram utilizados anticorpos Fab anti-DIG conjugados a fosfatase alcalina (Roche) que reconhecem as digoxigeninas presentes nas sondas *Alu* humanas. A incubação com anticorpos foi feita numa diluição 1:2000 em solução de bloqueio, a 4°C, por 16 horas.

A revelação foi feita após três lavagens com MABT por 30 minutos cada, depois uma nova lavagem com MAB por 30 minutos e em seguida duas lavagens com NTM (Tris -HCl 100mM, Cloreto de sódio 100mM, Cloreto de magnésio 50mM, pH 9,5) por 10 minutos cada. As lâminas foram mergulhadas no revelador (NTM + NBT 0,45µl/ml [Roche] com BCIP 3,5 µl/ml [Sigma]) e incubadas por 16 horas em câmara úmida a 37°C. Para montagem das lâminas, os cortes foram lavados três vezes com PBS por 10 minutos cada, corados com *nuclear fast red* ou hematoxilina, desidratados e montados com Entellan® new (Merck).

Em cortes adjacentes aos marcados com sondas *Alu* foi realizada coloração de hematoxilina-eosina, seguindo protocolo de rotina (CULLING, 1974).

3.11.5. Tratamento das imagens da hibridização *in situ*

As micrografias foram tiradas utilizando o microscópio Axioplan com o software Axiovision (Carl Zeiss Microscopy) ou com o scanner digital de lâminas Panoramic MIDI II (3DHISTECH) com o software Caseviewer (3DHISTECH). Ajustes no brilho, contraste e balanço de cores foram realizados utilizando Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated).

3.12. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando-se o programa de análise estatística GraphPad Prism (versão 5.0). Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão ($M \pm DP$). No caso da comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de student para grupos não pareados. Para comparação entre 3 grupos ou mais foi utilizado o teste Análise de Variância (ANOVA) de uma via ou duas vias e os dados foram submetidos ao pós-teste de Bonferroni. Foram consideradas significativas diferenças com $P \leq 0,05$.

4. Resultados

4.1. Cultivo das células estromais mesenquimais derivadas do sangue menstrual

De acordo com o protocolo estabelecido no LCCM as CeSaM foram isoladas (n=10 doadoras) e mantidas em cultura por um período de 49 dias, correspondente a passagem 7. Na figura 8A podemos observar cultura dessas células após primeira lavagem, 48 horas após o plaqueamento. Neste momento é possível observar a existência de subpopulações de células aderentes ao frasco de cultura, que poderiam se apresentar isoladas ou em associação com outras células, formando pequenos aglomerados celulares (setas) (Figura 8A). Observamos ainda que estas células aderentes adquiriram um formato fibroblastóide, se tornando delgadas e alongadas com o passar do tempo e passagens enzimáticas, compartilhando características morfológicas semelhantes à de células estromais mesenquimais (Figura 8B).

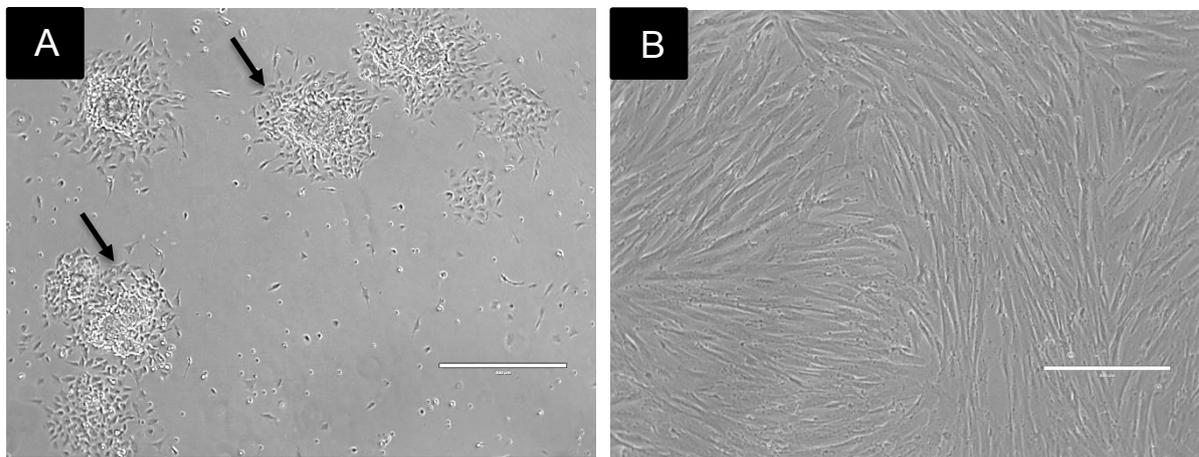


Figura 8: Microscopia óptica de contraste de fase das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual humano em cultura. Em (A) observamos grupos de células aderentes ao frasco de cultura após a primeira lavagem (48 horas após o plaqueamento). Em (B) observamos células delgadas e alongadas, morfologicamente mais homogêneas, formando morros e vales, em sexta passagem. A barra de calibração é de 400 µm.

A caracterização imunofenotípica das CeSaM já foi realizada previamente por grupos de nosso laboratório e também confirmou o fenótipo de MSC (ASENSI *et al.*, 2014).

4.2. Cultivo das células mesenquimais derivadas de medula óssea humana

As MSC-MO isoladas (n=8 doadores) pelo protocolo descrito neste trabalho foram mantidas em cultura por um período de 70 dias, correspondente a passagem 7. Na figura 9A temos representada cultura dessas células após primeira lavagem, 48 horas após plaqueamento. Observamos algumas células com formato fibroblástico começando a aderir ao frasco de cultura (setas) e também outras células com formato arredondado e brilhante provenientes da fração de enriquecimento de células mononucleares da medula óssea (Figura 9A).

Observamos que a cultura de células derivadas da medula óssea humana tem morfologia bastante heterogênea nas primeiras semanas de cultivo e que com o decorrer do tempo em cultura e com as passagens enzimáticas, essas culturas se apresentavam morfologicamente mais homogêneas. Na figura 9B temos representada uma cultura apresentando majoritariamente células fibroblásticas em sexta passagem, assemelhando-se as células estromais mesenquimais descritas por Friedenstein (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976) na medula óssea (Figura 9B).

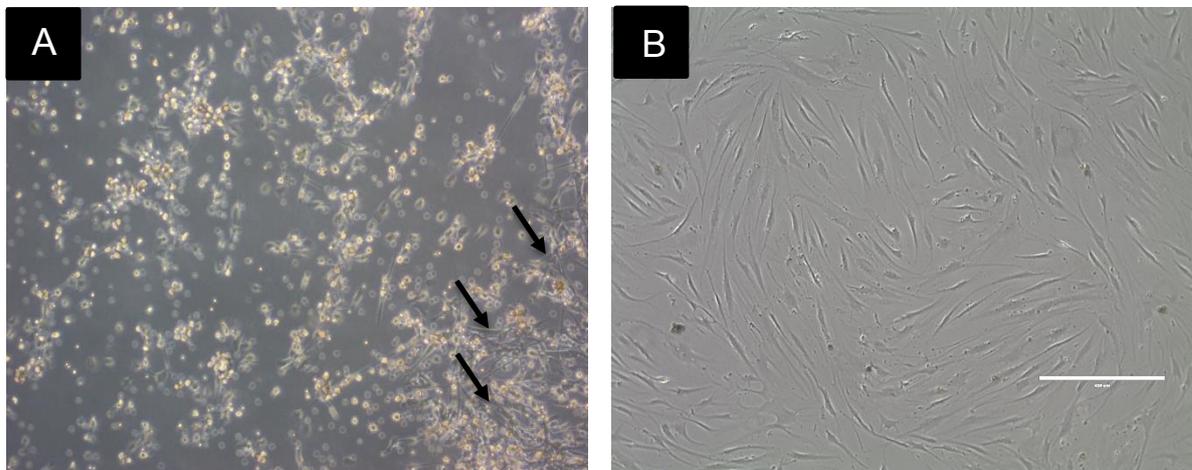


Figura 9: Microscopia óptica de contraste de fase das células mesenquimais derivadas da medula óssea humana em cultura. Em (A) observamos poucas células aderentes com formato fibroblástico (setas) e muitas células arredondadas e refringentes, após a primeira lavagem (48 horas após o plaqueamento). Em (B) observamos que as células da cultura apresentam-se mais homogêneas e com morfologia fibroblástica, possuindo raras células arredondadas e brilhantes na cultura em sexta passagem. A barra de calibração é de 400 µm.

A caracterização imunofenotípica das MSC-MO já foi realizada previamente por grupos de nosso laboratório e também confirmou o fenótipo de MSC (KASAI-BRUNSWICK, 2009).

4.3. Cultivo e caracterização da linhagem das HUVEC EA.Hy926

Primeiramente a linhagem de HUVEC foi cultivada e expandida em nosso laboratório para alcançar quantidades suficientes para os experimentos. Na figura 10 podemos observar uma cultura homogênea dessas células apresentando morfologia achatada característica de célula endotelial madura, denominada *cobblestone* (formato de paralelepípedo) (Figura 10).

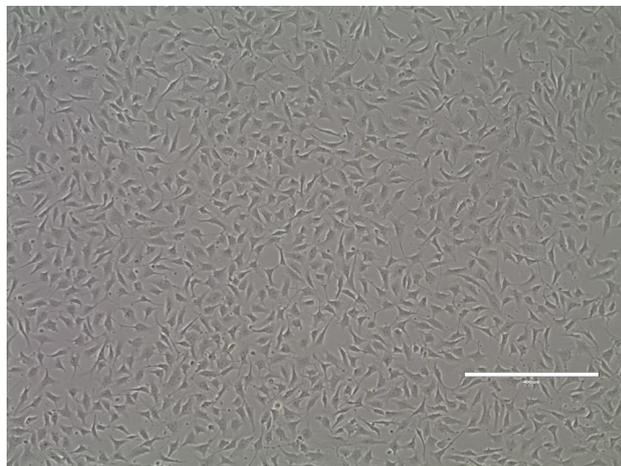


Figura 10: Microscopia óptica de contraste de fase da linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical. Células homogêneas com morfologia *cobblestone* característica. A barra de calibração é de 400 μm .

Para avaliar se as características imunofenotípicas desta linhagem de HUVEC ainda permaneciam inalteradas, mesmo após muito tempo de cultivo e, tendo passado por diversas passagens, optamos por realizar a análise da presença de CD31, através de citometria de fluxo e imunofluorescência.

4.3.1 Caracterização por citometria de fluxo

O perfil imunofenotípico da linhagem de HUVEC EA.Hy926 foi primeiramente analisado pela técnica de citometria de fluxo. Inicialmente, identificamos a população celular negativa para a molécula 7AAD, ou seja, a população de células vivas na

cultura. A viabilidade celular na amostra da linhagem de HUVEC analisada foi de 96,2%.

Em seguida, realizamos marcações com o anticorpo monoclonal CD31, para analisar o imunofenótipo das células em questão. A citometria de fluxo revelou que 79,9% das HUVEC apresentavam a molécula CD31 (Figura 11B).

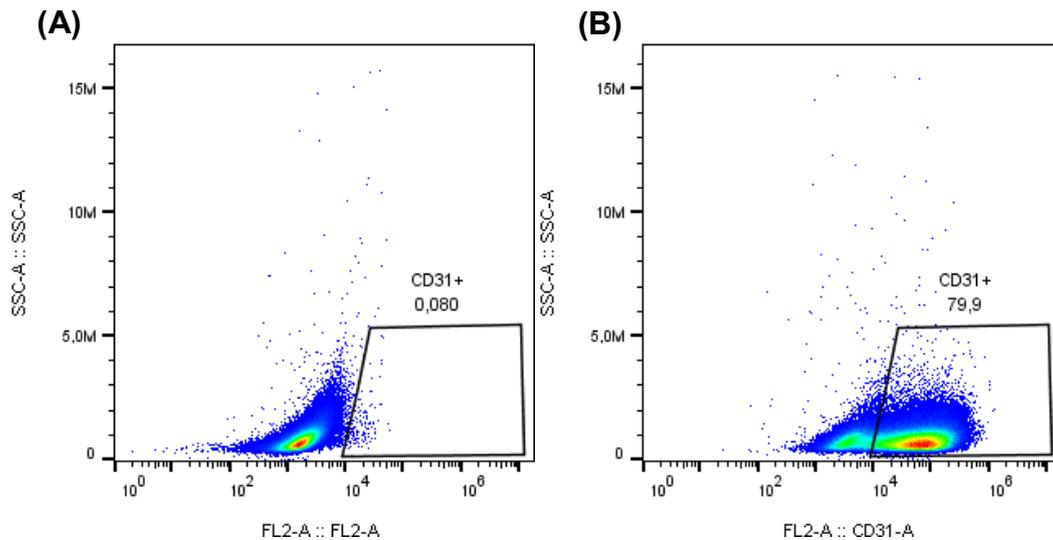


Figura 11: Dot plots representativos do perfil imunofenotípico da linhagem de HUVEC EA.Hy926 (n=1). A amostra sem marcação, usada como controle de fluorescência, está à esquerda (A) e a molécula de superfície CD31 marcada, à direita (B). As células avaliadas são majoritariamente positivas para CD31 (79,9%).

4.3.2. Caracterização por Imunofluorescência

Da mesma maneira, utilizamos a técnica de imunofluorescência para investigarmos se a linhagem de HUVEC apresentava a molécula de adesão CD31(PECAM-1).

Primeiramente, investigamos se as HUVEC apresentavam características funcionais de células endoteliais através do experimento de formação de estruturas tubulares (do inglês *tube-like assay*), onde essas células foram plaqueadas em Matrigel™ com meio de cultura EGM-2, meio com diversos fatores favoráveis a angiogênese. Observamos através da imagem de campo claro (Figura 12A) que essas células exercem suas funções angiogênicas e podem formar estruturas tubulares *in vitro*, quando em condições apropriadas.

Em seguida, o ensaio de imunofluorescência após o experimento de formação de estruturas tubulares, mostrou que as HUVEC avaliadas apresentavam a molécula CD31, indicando características de células endoteliais *in vitro* (Figura 12A, C e D). A figura 12A representa as HUVEC em contraste de fase após experimento de formação de estruturas tubulares em Matrigel™. Na figura 12B podemos observar o citoesqueleto das células (em verde) utilizando faloidina. Na figura 12C podemos observar a presença da marcação para o anticorpo CD31 (em vermelho). E por fim, na figura 12D, observamos a sobreposição das duas marcações nessas células.

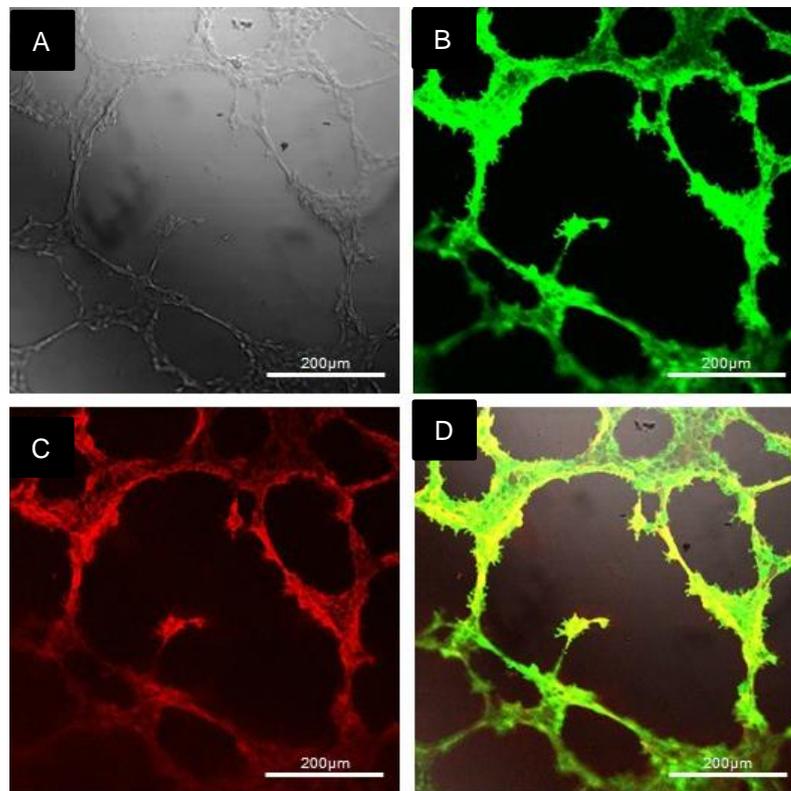


Figura 12: Fotomicrografias representativas das imunofluorescências com as HUVEC EA.Hy926 (n=1). Em (A) fotomicrografia em contraste de fase das HUVEC após experimento de formação de estruturas tubulares. Em (B) observamos marcação de faloidina, indicando citoesqueleto (verde). Em (C) observamos a marcação de CD31, indicando a presença da proteína de adesão (vermelho). Em (D), observamos a sobreposição das imagens A, B e C. A barra de calibração é de 200 μm .

4.4. Avaliação da capacidade angiogênica das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de formação de estruturas tubulares

Com o objetivo de testar nossa hipótese de que as células mesenquimais (CeSaM e MSC-MO) poderiam ter um efeito parácrino benéfico para as células endoteliais em termos de angiogênese, cultivamos as CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia 1% por 48 horas e 72 horas e utilizamos seus meios condicionados para o ensaio de formação de estruturas tubulares com as HUVEC.

Para este ensaio, utilizamos como controles: (1) meio EGM-2, no qual se espera alta formação de redes de estruturas tubulares, por ser um meio rico em fatores pró-angiogênicos e (2) meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, que é o meio no qual as células endoteliais são normalmente cultivadas e expandidas e se espera menor formação de rede de estruturas tubulares, por ser um meio com menor concentração de fatores.

Nas figuras 13A e 13B podemos observar a resposta das células endoteliais nessas duas condições controles após 20 horas do plaqueamento. Observamos que quando as HUVEC são cultivadas com o meio EGM-2, essas formam extensa rede de estruturas tubulares. Já quando essas são cultivadas em DMEM, observamos poucas conexões entre as células.

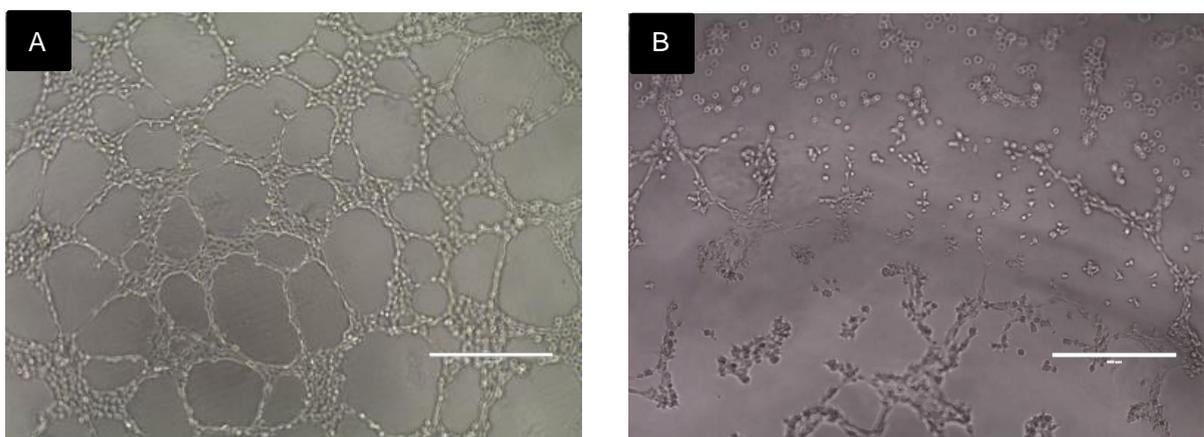


Figura 13: Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.Hy926 após 20 horas do plaqueamento. (A) imagem representativa do poço controle com matrigel, meio EGM-2 e célula endotelial, mostrando extensa formação de rede tubular. (B) imagem representativa do poço controle com matrigel, meio DMEM com 10% SFB e célula endotelial, mostrando poucas conexões entre as células. A barra de calibração é de 400 µm.

O mesmo procedimento foi feito para os meios condicionados das células mesenquimais (CeSaM e MSC-MO). A seguir, podemos observar uma série de imagens representativas do ensaio de formação de estruturas tubulares com as HUVEC cultivadas com os meios condicionados de 48 horas (figura 14 A,B,C,D) e com os meios condicionados de 72 horas (figura 15 A,B,C,D) do experimento realizado em normóxia e hipóxia 1% com as CeSaM e MSC-MO.

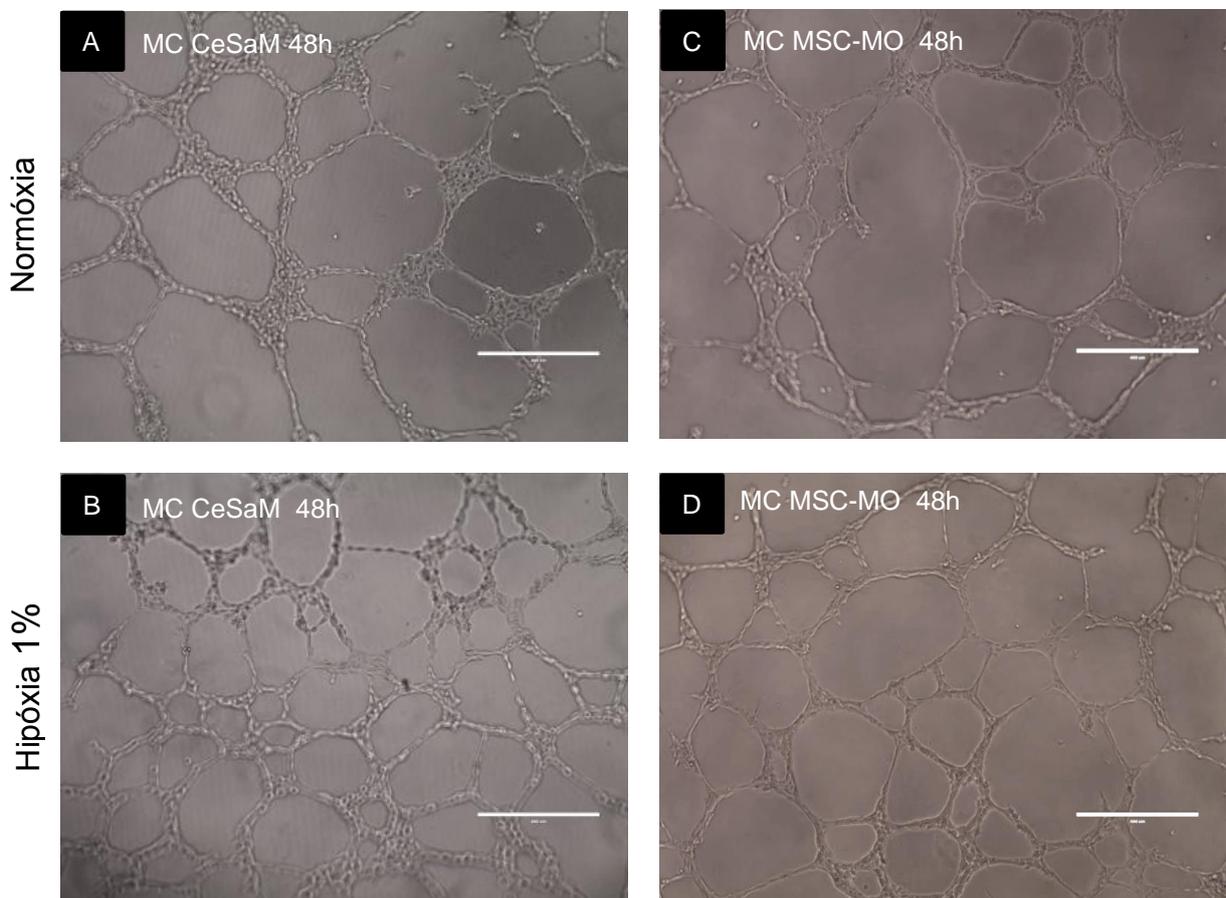


Figura 14: Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.Hy926 após 20 horas do plaqueamento dos meios condicionados de 48 horas. (A) e (B) mostram imagens representativas da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC com os meios condicionados (48 horas) das CeSaM em normóxia e hipóxia, respectivamente. (C) e (D) mostram imagens representativas da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC com os meios condicionados (48 horas) das MSC-MO em normóxia e hipóxia, respectivamente. MC: meio condicionado. A barra de calibração é de 400 μ m.

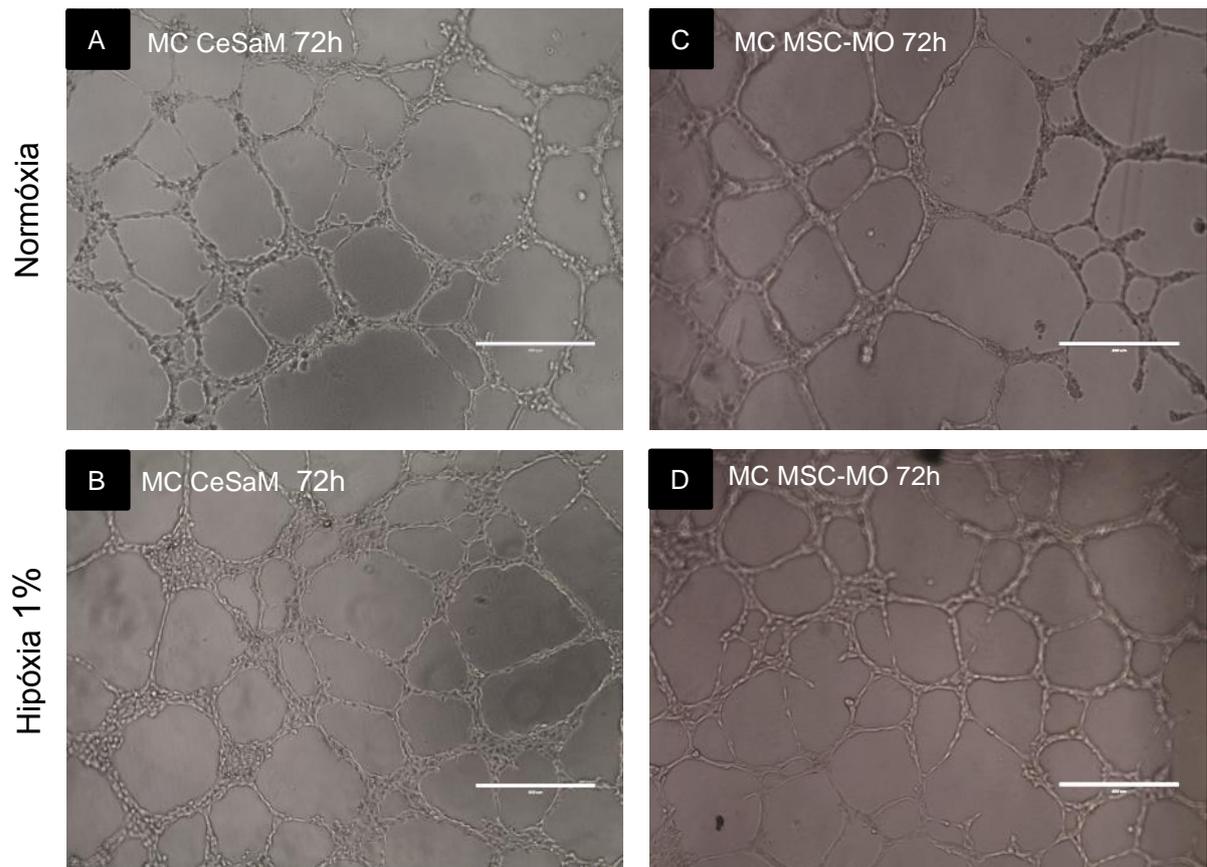


Figura 15: Microscopia de contraste de fase da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC EA.Hy926 após 20 horas do plaqueamento dos meios condicionados de 72 horas. (A) e (B) mostram imagens representativas da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC com os meios condicionados (72 horas) das CeSaM em normóxia e hipóxia, respectivamente. (C) e (D) mostram imagens representativas da rede de estruturas tubulares formada pelas HUVEC com os meios condicionados (72 horas) das MSC-MO em normóxia e hipóxia, respectivamente. MC: meio condicionado. A barra de calibração é de 400 μm .

A análise das imagens foi realizada com o programa ImageJ, no qual foi possível quantificar o comprimento total das estruturas tubulares formadas (figuras 16 A e B) e o número de ramificações da rede tubular (figura 17 A e B) em cada condição experimental avaliada.

Inicialmente, comparamos os meios condicionados de 48 horas das CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia em relação ao nosso controle negativo DMEM (meio basal). Neste caso, foi possível notar que os meios condicionados de 48 horas das células mesenquimais, tanto das CeSaM como das MSC-MO, não induziram significativamente o aumento do comprimento total dos tubos quando comparados com o meio controle DMEM (figura 16A). Entretanto,

quando comparamos todas as amostras de meios condicionados de 48 horas com o nosso controle positivo EGM-2, observamos que o meio condicionado das CeSaM em hipóxia 1% foi o único que não apresentou diferença estatística, sugerindo assim, que esse meio exerça um efeito angiogênico compatível ao EGM-2, que é o meio comercial rico em fatores pró-angiogênicos (figura 16A).

Quando as células mesenquimais (CeSaM e MSC-MO) permaneceram mais tempo em cultura e avaliamos o efeito dos seus meios condicionados de 72 horas, observamos que tanto os meios das CeSaM como das MSC-MO, em normóxia ou hipóxia, induzem um aumento significativo do comprimento total dos tubos quando comparadas com o controle DMEM (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$) (figura 16B). Além disso, os resultados mostraram que apenas os meios condicionados das células mesenquimais em hipóxia 1% tiveram um efeito semelhante ao meio EGM-2 (verificadas pela ausência de diferença estatística). Porém, acreditamos que os meios condicionados das células em normóxia também possam exercer um efeito biológico tão bom quanto os da hipóxia, já que as médias de comprimento total dos tubos atingidas nessas duas condições foram muito próximas (diferença entre normóxia e hipóxia não significativa) (Figura 18B).

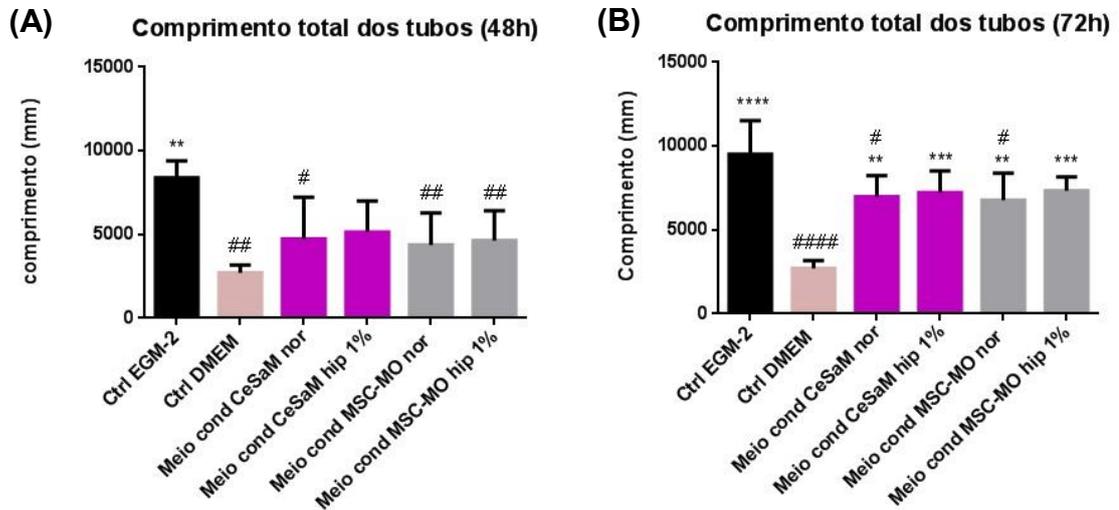


Figura 16: Quantificação do comprimento total da rede tubular formada pelas HUVEC EA.Hy926 cultivadas com os meios condicionados das CeSaM (n=6) e MSC-MO (n=6). (A) Os meios condicionados de 48 horas não induziram significativo aumento no comprimento dos tubos quando comparados ao controle DMEM, entretanto, o meio controle EGM-2 apresentou diferença significativa em relação ao DMEM (*comparam as amostras com controle DMEM; ** $P < 0,01$). Em comparação ao EGM-2, todas as condições apresentaram diferença significativa exceto o meio condicionado da CeSaM em hipóxia (# comparam as amostras com o controle EGM-2; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$). (B) Os meios condicionados de 72 horas induziram significativamente o aumento do comprimento tubular em relação ao controle DMEM (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). Em comparação ao EGM-2, somente os meios condicionados das células em hipóxia apresentaram efeitos semelhantes ao EGM-2, enquanto que as demais condições apresentaram efeitos estatisticamente diferentes (# $P < 0,05$, #### $P < 0,0001$). Ctrl: controle; Meio cond: meio condicionado; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

No entanto, quando analisamos os efeitos dos meios condicionados de 48 horas das CeSaM e MSC-MO (normóxia e hipóxia), observamos que esses não foram capazes de induzir significativamente o aumento do número de ramificações na rede tubular, quando comparamos com o controle DMEM. Além disso, nenhum deles apresentou efeito semelhante ao EGM-2 (Figura 17A).

Por outro lado, quando essas células permaneceram mais tempo em cultura e analisamos os meios condicionados de 72 horas, observamos que tanto o meio condicionado das CeSaM em normóxia como em hipóxia induziram um aumento significativo do número de ramificações na rede tubular, em relação ao controle DMEM, enquanto somente o meio das MSC-MO em hipóxia induziu tal efeito (Figura

17B) (* $P < 0,01$, ** $P < 0,01$, respectivamente). Além disso, observamos que somente os meios condicionados da CeSaM (normóxia e hipóxia) apresentaram um efeito semelhante ao EGM-2 (sem diferença estatística) (Figura 17B). Em conjunto, estes resultados nos sugerem que as células mesenquimais possam estar secretando fatores solúveis no meio que estejam contribuindo positivamente para a angiogênese.

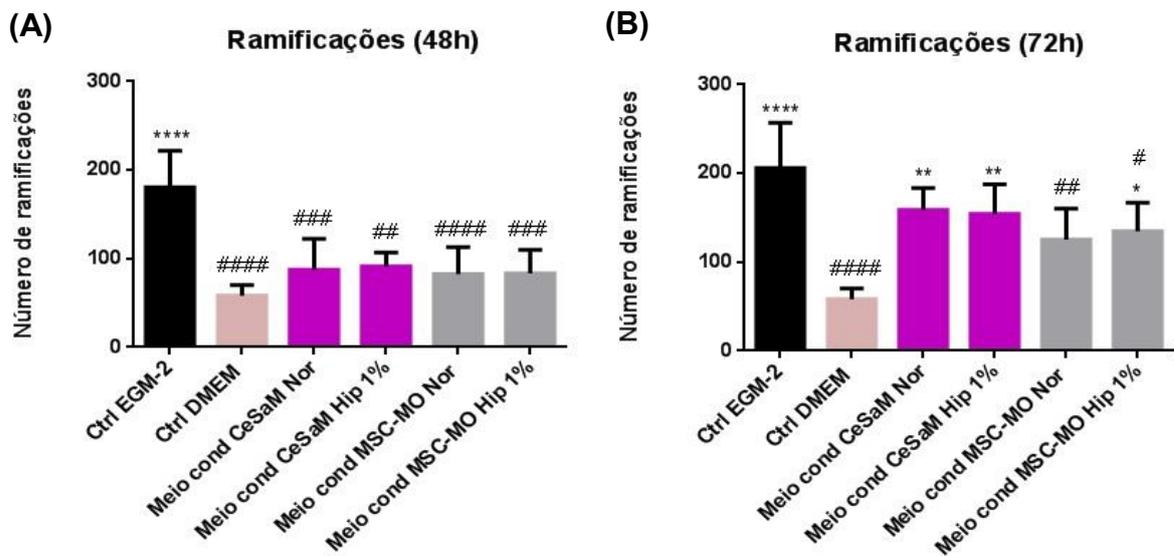


Figura 17: Quantificação do número de ramificações da rede tubular formada pelas HUVEC EA.Hy926 cultivadas com os meios condicionados das CeSaM (n=6) e MSC-MO (n=6). (A) Os meios condicionados de 48 horas não induziram significativo aumento das ramificações na rede tubular quando comparados ao controle DMEM. Meio controle EGM-2 apresentou diferença significativa em relação ao DMEM (*comparam as amostras com controle DMEM; **** $P < 0,0001$). Todas as condições apresentaram diferença significativa em comparação com EGM-2 (#comparam as amostras com controle EGM-2; ## $P < 0,01$, ### $P < 0,001$, #### $P < 0,0001$). (B) Os meios condicionados das CeSaM em 72h induziram significativamente o aumento das ramificações tubulares em relação ao controle DMEM (** $P < 0,01$), enquanto que somente o meio da MSC-MO em hipóxia apresentou diferença significativa (* $P < 0,05$). Em comparação ao EGM-2, somente os meios condicionados das CeSaM apresentaram efeitos semelhantes ao EGM-2, enquanto as demais condições apresentaram efeitos estatisticamente diferentes (# $P < 0,05$, ## $P < 0,01$, #### $P < 0,0001$). Ctrl: controle; Meio cond: meio condicionado; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

Como anteriormente foi realizada análise do efeito dos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO em relação aos controles DMEM e EGM-2, agora realizamos análise estatística para comparar os dois tipos celulares entre si e a influência da concentração de oxigênio, levando em consideração os mesmos parâmetros de

comprimento dos tubos e número de ramificações avaliados anteriormente. Neste caso, não foi detectada diferença significativa entre as células nem mesmo no próprio grupo das CeSaM ou das MSC-MO nas diferentes concentrações de oxigênio, sugerindo que as células mesenquimais de ambas as fontes influenciem positivamente e semelhantemente a capacidade angiogênica das células endoteliais, independentemente da disponibilidade de oxigênio no ambiente (Figura 18 A, B, C e D).

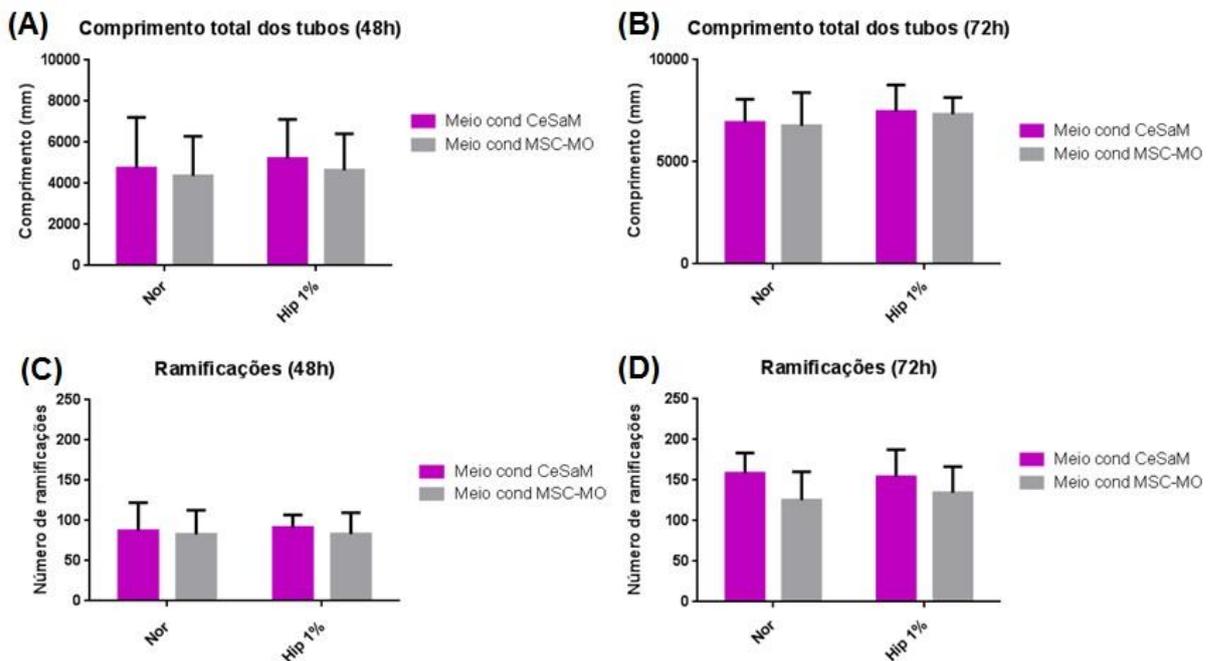


Figura 18: Quantificação da rede tubular formada pelas HUVEC EA.Hy926 comparando os meios condicionados das CeSaM (n=6) e MSC-MO (n=6), nas condições de normóxia e hipóxia. (A), (B), (C) e (D) Observamos que não há diferença significativa entre as células nem entre as condições de normóxia e hipóxia em cada grupo celular, quando são analisados os parâmetros relacionados ao comprimento total e às ramificações dos tubos. Meio cond CeSaM: meio condicionado das células estromais mesenquimais do sangue menstrual; Meio cond: meio condicionado; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

4.5. Avaliação do potencial migratório das HUVEC cultivadas com os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO por meio do ensaio de lesão por arranhadura (do inglês *scratch wound*)

A migração quimiotática das HUVEC em resposta aos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO foi avaliada por meio do experimento de lesão por arranhadura. Na figura 19 podemos observar uma série de imagens representativas dos perfis de migração das HUVEC em meio EGM-2, nos tempos experimentais de 0, 8, 12, 24 e 48 horas. A migração celular foi monitorada a cada 2 horas durante o período total de 48 horas em todas as condições experimentais, porém optamos por mostrar as imagens referentes apenas desta condição, de forma representativa. Nestas imagens foram aplicadas máscaras para facilitar a visualização das células (representadas em laranja) que migram para região da “lesão” (representada nas figuras em azul) com o passar do tempo, tendendo a ocupar toda esta região até o final do experimento.

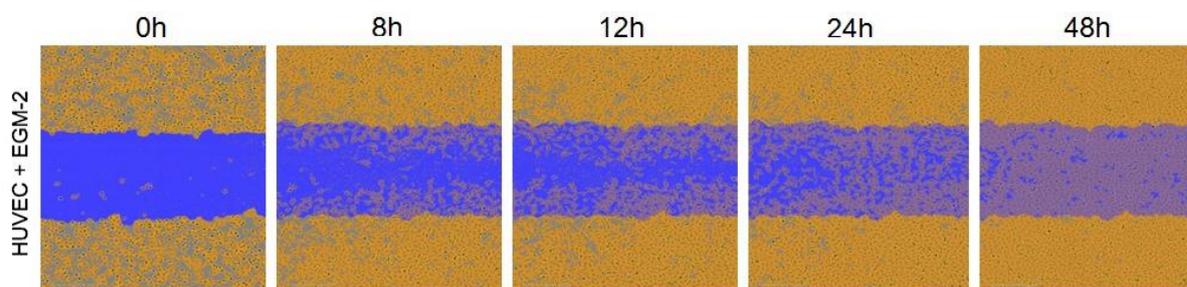


Figura 19: Imagens representativas da migração celular das HUVEC EA.Hy926 em meio EGM-2 nos tempos experimentais de 0, 8, 12, 24 e 48 horas em ensaio de lesão por arranhadura. Células ao redor da “lesão” representadas em laranja, “lesão” representada em azul e as células que migram estão representadas em cinza na região azul.

As densidades celulares relativas para cada condição experimental foram quantificadas a cada duas horas. Assim, construímos uma curva de migração celular (para os meios condicionados de 48 horas e 72 horas) em todas as condições experimentais avaliadas (figura 20 A e B) e analisamos a área sob a curva com a finalidade de comparar o perfil migratório em todas as condições (Figura 21 A e B).

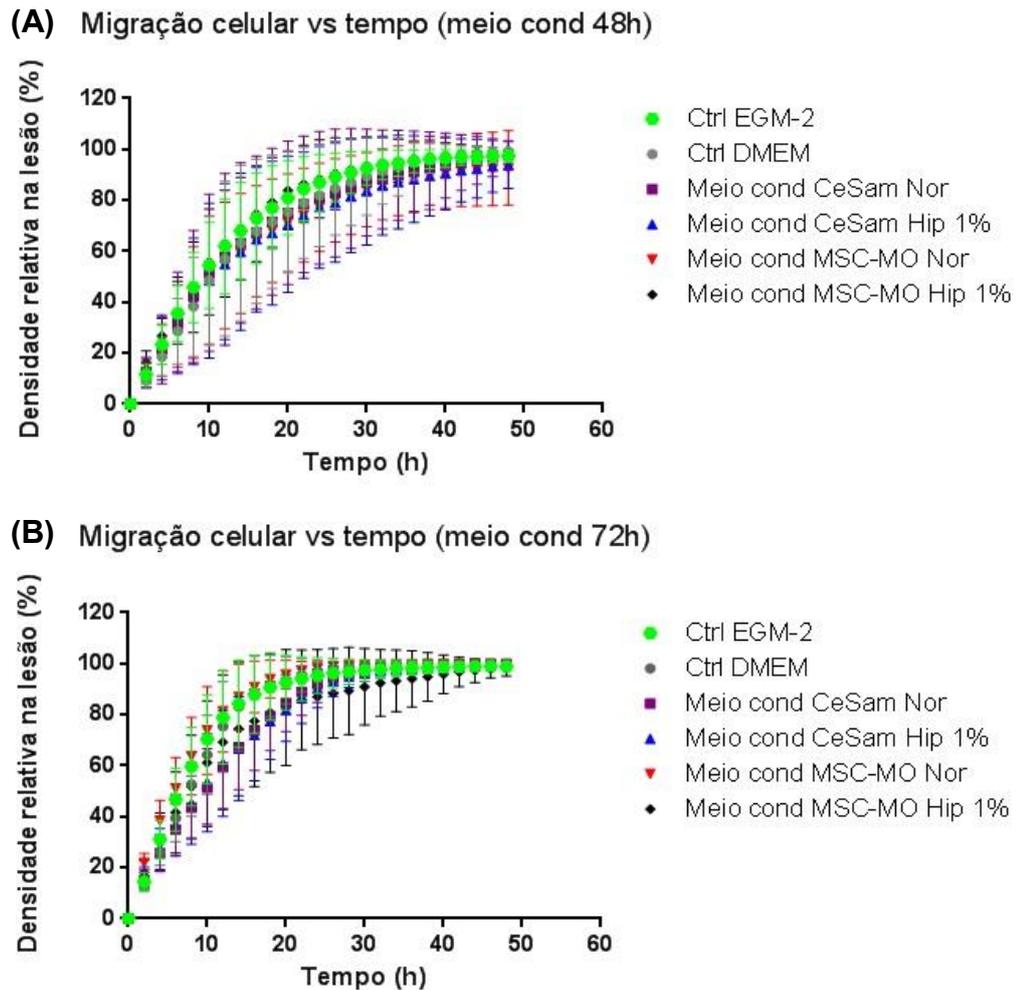


Figura 20: Curvas de migração celular das HUVEC EA.Hy926 em diferentes condições experimentais, em ensaio de lesão por arranhadura. Em (A) observamos as curvas de migração das HUVEC referentes aos meios condicionados de 48 horas e em (B) observamos as curvas de migração das HUVEC referentes aos meios condicionados de 72 horas. Ctrl: controle; Meio cond: meio condicionado; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

Nossos resultados mostraram que os meios condicionados (48h e 72h) das CeSaM e MSC-MO exerceram efeito semelhante aos meios controles EGM-2 e DMEM em relação a migração das células endoteliais (Figura 21 A e B), não havendo diferença significativa. Observamos também que o meio DMEM induziu uma resposta satisfatória na migração das células endoteliais assim como o controle positivo EGM-2 e os meios condicionados.

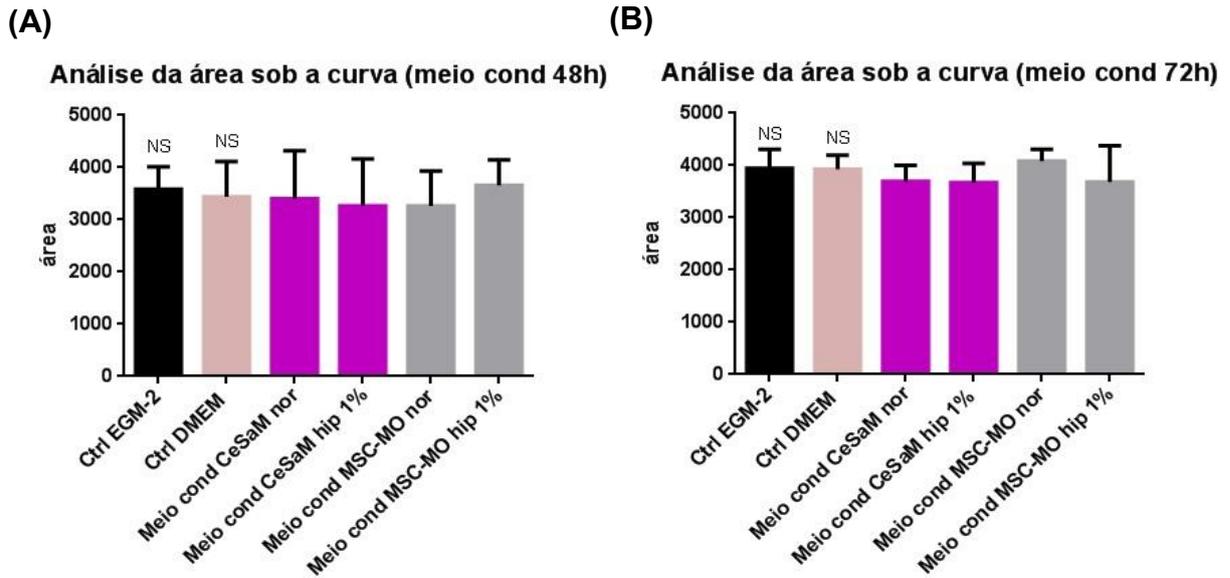


Figura 21: Análise da área sob a curva de migração das HUVEC EA.Hy926 em todas as condições experimentais (n=6). Não foi observada diferença significativa em 48 horas (A) e nem em 72 horas (B) quando comparados os meios condicionados com o controle EGM-2 ou DMEM. NS: não significativo; Ctrl: controle; Meio cond: meio condicionado; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

Buscando investigar se as condições de normóxia e hipóxia interferem no efeito migratório provocado pelos meios condicionados nas HUVEC, comparamos também os dois tipos de células mesenquimais entre si, já que previamente fizemos comparações do efeito destas células apenas com os grupos controle DMEM e EGM-2. Entretanto, analisando o efeito parácrino das CeSaM e das MSC-MO na migração das HUVEC, novamente não foi detectada diferença significativa entre estas células, nem mesmo pôde-se observar diferença significativa no grupo das CeSaM ou das MSC-MO nas diferentes condições de concentrações de oxigênio, sugerindo novamente que as células mesenquimais de ambas as fontes influenciam positivamente e semelhantemente a capacidade migratória das células endoteliais e além disso este evento foi independente da disponibilidade de oxigênio no ambiente (Figura 22).

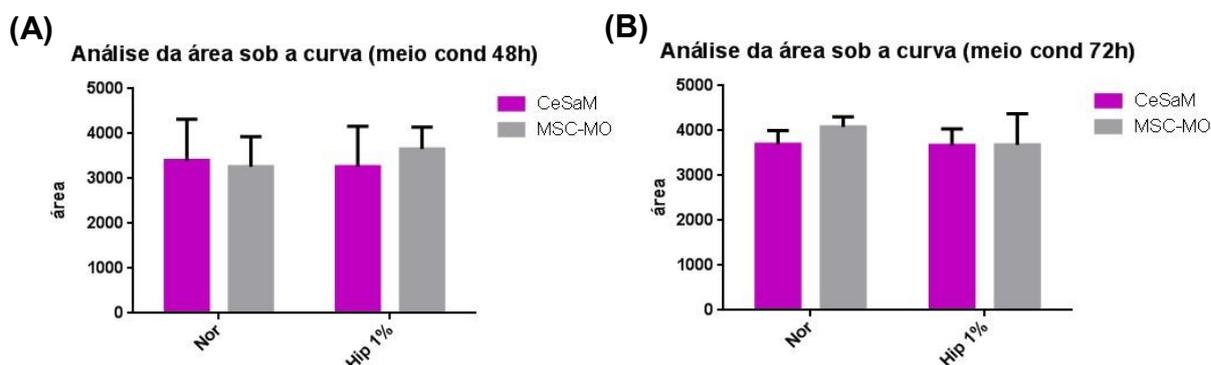


Figura 22: Análise da área sob a curva das migrações das HUVEC EA.Hy926, em ensaio de lesão por arranhadura, comparando os meios condicionados das CeSaM (n=6) e MSC-MO (n=6), nas condições de normóxia e hipóxia. (A) e (B), Observamos que não há diferença significativa entre as células e nem entre as condições de normóxia e hipóxia em cada grupo celular, tanto quando cultivados por 48 horas (A) como em 72 horas (B). Nor: normóxia; Hip 1%: hipóxia 1%.

4.6. Avaliação dos níveis de RNA mensageiros para os fatores angiogênicos VEGF-A, bFGF e PDGF-BB por RT-PCR em tempo real

A fim de explicar o efeito angiogênico promovido pelos meios condicionados das células mesenquimais nas HUVEC, analisamos a nível molecular, os níveis de expressão gênica de três fatores de crescimento importantes para a angiogênese nas amostras: VEGF-A, bFGF e PDGF-BB.

Nossos resultados mostraram que tanto as células mesenquimais de sangue menstrual como as células mesenquimais de medula óssea expressavam a molécula VEGF-A nos dois tempos experimentais avaliados (48 e 72 horas), porém não foi detectada diferença estatística entre estas células (Figura 23A e B). Além disso, observamos que as células mesenquimais de sangue menstrual expressaram níveis significativamente maiores de RNA mensageiro para a citocina VEGF-A na condição de hipóxia em relação à normóxia, em 48 horas ($P < 0,01$) (Figura 23A).

Nas figuras 23 C e D podemos notar que a expressão da citocina PDGF-BB só foi detectada nas amostras de CeSaM, tanto em 48 horas como em 72 horas. Porém, desta vez as concentrações de oxigênio no ambiente não influenciaram os níveis de RNA mensageiro dessa molécula.

Ao contrário do PDGF-BB, a citocina bFGF foi expressa em ambas as células mesenquimais, sem diferença estatística entre elas, nos dois tempos experimentais. Além disso, em 72 horas, foram observadas reduções significativas nas expressões

de bFGF em ambas as células na condição de hipóxia em relação à normóxia (Figura 23 E e F) ($P < 0,01$, $P < 0,001$).

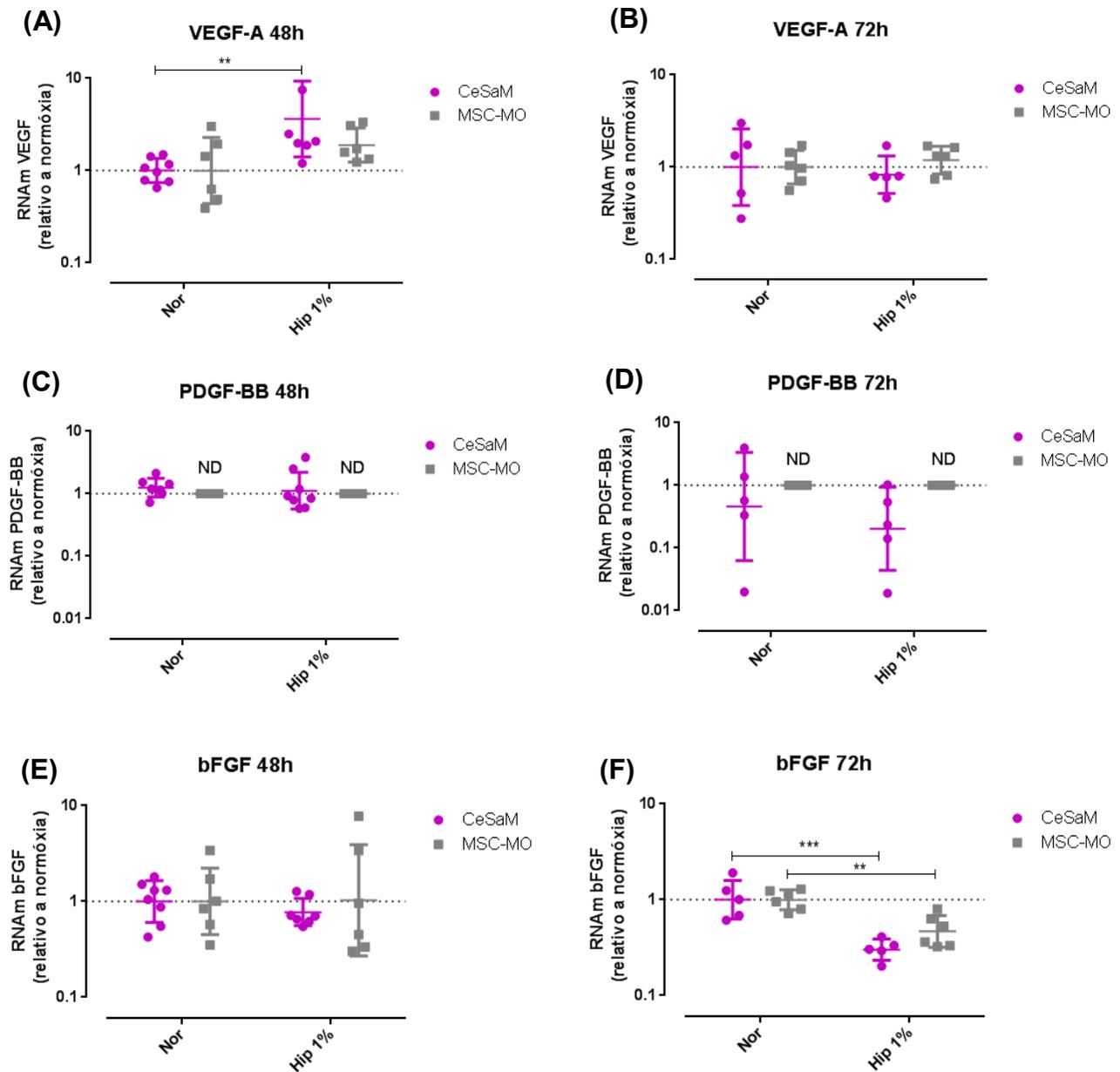


Figura 23: RT-PCR em tempo real para quantificação da expressão dos fatores de crescimento angiogênicos VEGF-A, PDGF-BB e bFGF nos tempos de 48 e 72 horas. (A) CeSaM expressaram níveis de RNAm para VEGF-A significativamente maiores na condição de hipóxia em relação à normóxia em 48 horas (** $P < 0,01$). Não foi detectada diferença significativa na expressão de VEGF-A entre os dois tipos celulares em 48 ou 72 horas (A e B). Em (C e D) apenas as amostras de CeSaM expressaram a molécula PDGF-BB em 48 e 72 horas. Em (E e F) não foi detectada diferença significativa nos níveis de bFGF expressos entre as células em 48 e 72 horas, entretanto nota-se reduzida expressão de bFGF quando ambas as células são cultivadas em hipóxia (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). CeSaM 48h n=8; MSC-MO 48h n=6; CeSaM 72h n=5; MSC-MO 72h n=6. ND: não detectável. Nor: normóxia; Hip 1%: hipóxia 1%.

4.7. Avaliação da secreção dos fatores angiogênicos nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO

4.7.1 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Após analisarmos a expressão gênica dos fatores angiogênicos VEGF-A, PDGF-BB e bFGF, avaliamos se esses fatores também estavam sendo secretados nos meios condicionados das células mesenquimais. Para isso, as amostras dos meios condicionados de 48 horas das CeSaM (n=5) e MSC-MO (n=3) nas condições de normóxia e hipóxia 1% foram analisados através do ensaio imunoenzimático ELISA.

Nas condições de hipóxia, um importante aumento no nível de secreção de VEGF-A foi notado nos meios condicionados das duas fontes de células mesenquimais avaliadas (1523,91 \pm 1366,49 pg/mL para CeSaM e 4904,42 \pm 2386,57 pg/mL para MSC-MO), em comparação com as condições de normóxia (267,60 \pm 340,0 pg/mL e 2667,46 \pm 1713,33 pg/mL, respectivamente) (Figura 24A). Além disso, foi detectado que as MSC-MO secretaram níveis de VEGF significativamente maiores do que as CeSaM na condição de hipóxia (figura 24A) (*P<0,05).

Por outro lado, o fator de crescimento PDGF-BB, muito importante nas etapas tardias da angiogênese, foi detectado em 40% das amostras de meios condicionados das CeSaM (23,54 \pm 5,79 pg/mL em normóxia e 5,89 \pm 11,66 pg/mL em hipóxia) e não foi detectada em nenhuma das amostras de MSC-MO (Figura 24B).

Já a molécula bFGF, foi detectada em ambas as amostras de meios condicionados das células mesenquimais nas duas concentrações de oxigênio, porém não foi observada diferença significativa na secreção desta citocina comparando as células entre si e, nem mesmo entre as condições de oxigênio (Figura 24C).

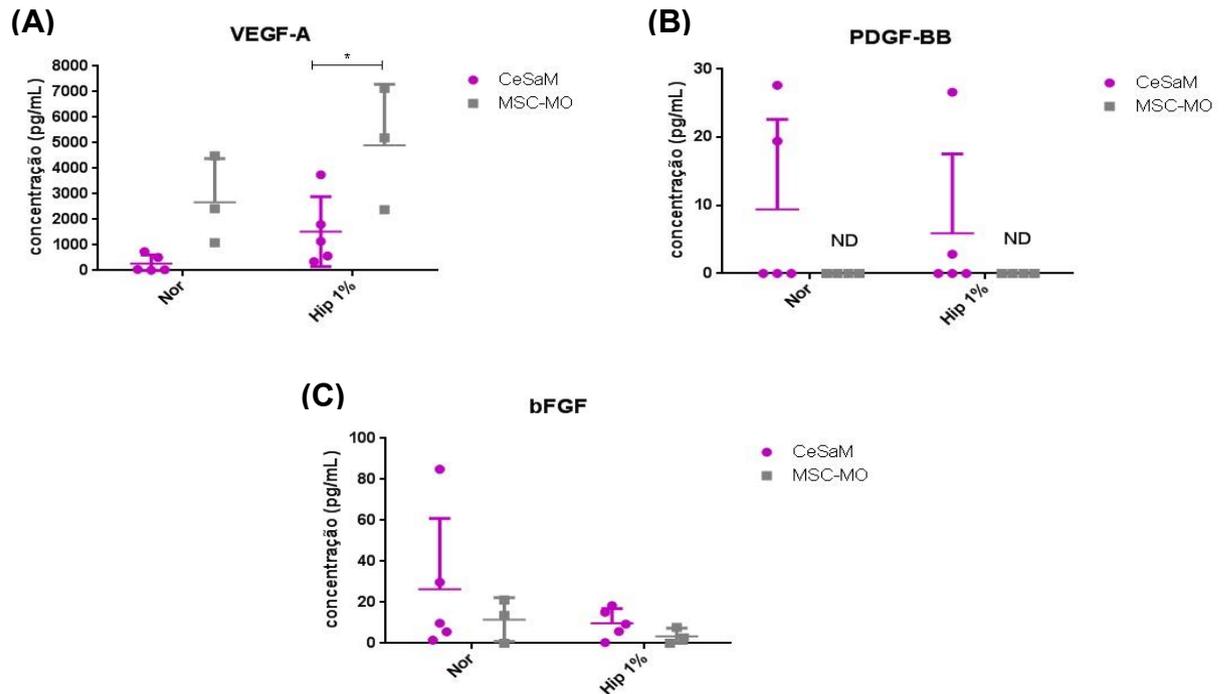


Figura 24: Secreção de VEGF-A, PDGF-BB e bFGF nos meios condicionados das CeSaM (n=5) e MSC-MO (n=3) analisados pelo ELISA. Em (A) as MSC-MO secretam significativamente maiores concentrações da citocina VEGF-A do que as CeSaM na condição de hipóxia 1%. Em (B) PDGF-BB, foi detectado apenas nas amostras dos meios condicionados das CeSaM. Em (C) bFGF foi detectada em ambas as amostras, porém sem diferença significativa entre os níveis de secreção desta citocina (* $P < 0,05$). ND: não detectável; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

4.7.2. Citometria de fluxo

De todas as treze citocinas analisadas pela técnica de citometria de fluxo, identificamos que as células mesenquimais secretaram principalmente VEGF-A, PDGF-AA, HGF e ANG-2. Por esta razão, estas citocinas foram representadas em gráficos de forma quantitativa. As citocinas EGF, EPO, G-CSF, GM-CSF, SCF e TGF- α não foram detectadas em nenhuma das nossas amostras de meios condicionados, com exceção de uma amostra de CeSaM em 48 horas que secretava altas concentrações de todas as citocinas testadas. Adicionalmente, identificamos que a citocina M-CSF estava presente em apenas uma amostra de CeSaM (n=8) e duas amostras de MSC-MO (n=7) em 48 e 72 horas e por isso optamos por não a representar de forma gráfica.

Na figura 25A, observamos que a citocina VEGF-A estava presente nos meios condicionados de ambas as células mesenquimais em 48 horas, porém observamos que as MSC-MO secretaram níveis de VEGF significativamente maiores que as CeSaM na condição de hipóxia ($3.853,53 \pm 1.754,84$ pg/mL para as MSC-MO vs

171,61 ± 342,94 pg/mL para as CeSaM) ($P < 0,0001$) (Figura 25A). Além disso, também foram verificadas diferenças significativas entre essas células tanto na condição de normóxia quanto em hipóxia em 72 horas (1.885,5 ± 768,64 pg/ml para as MSC-MO vs 472.2 ± 1.221,8 pg/ml para as CeSaM ($P < 0,05$) (Figura 25B).

A citocina PDGF-AA estava presente somente em 3 amostras de meios condicionados das CeSaM (n=8) e em uma única amostra de MSC-MO (n=7). Não foram observadas diferenças estatísticas nas concentrações desta citocina para estas células em 48 ou 72 horas (Figuras 25 C e D).

Nossos resultados mostraram também que a citocina ANG-2, muito importante na regulação da angiogênese, encontrava-se presente somente nas amostras de meios condicionados das CeSaM, não sendo detectada em nenhuma amostra de MSC-MO em 48 ou 72 horas (Figuras 25 E e F).

Por fim, a citocina HGF pôde ser detectada majoritariamente nas amostras de meios condicionados das células derivadas de medula óssea, embora também tenham sido encontradas em 35% das amostras de CeSaM. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os dois tipos celulares (Figura 25 G e H).

A comparação entre 48 e 72 horas para cada citocina não foi avaliada neste trabalho.

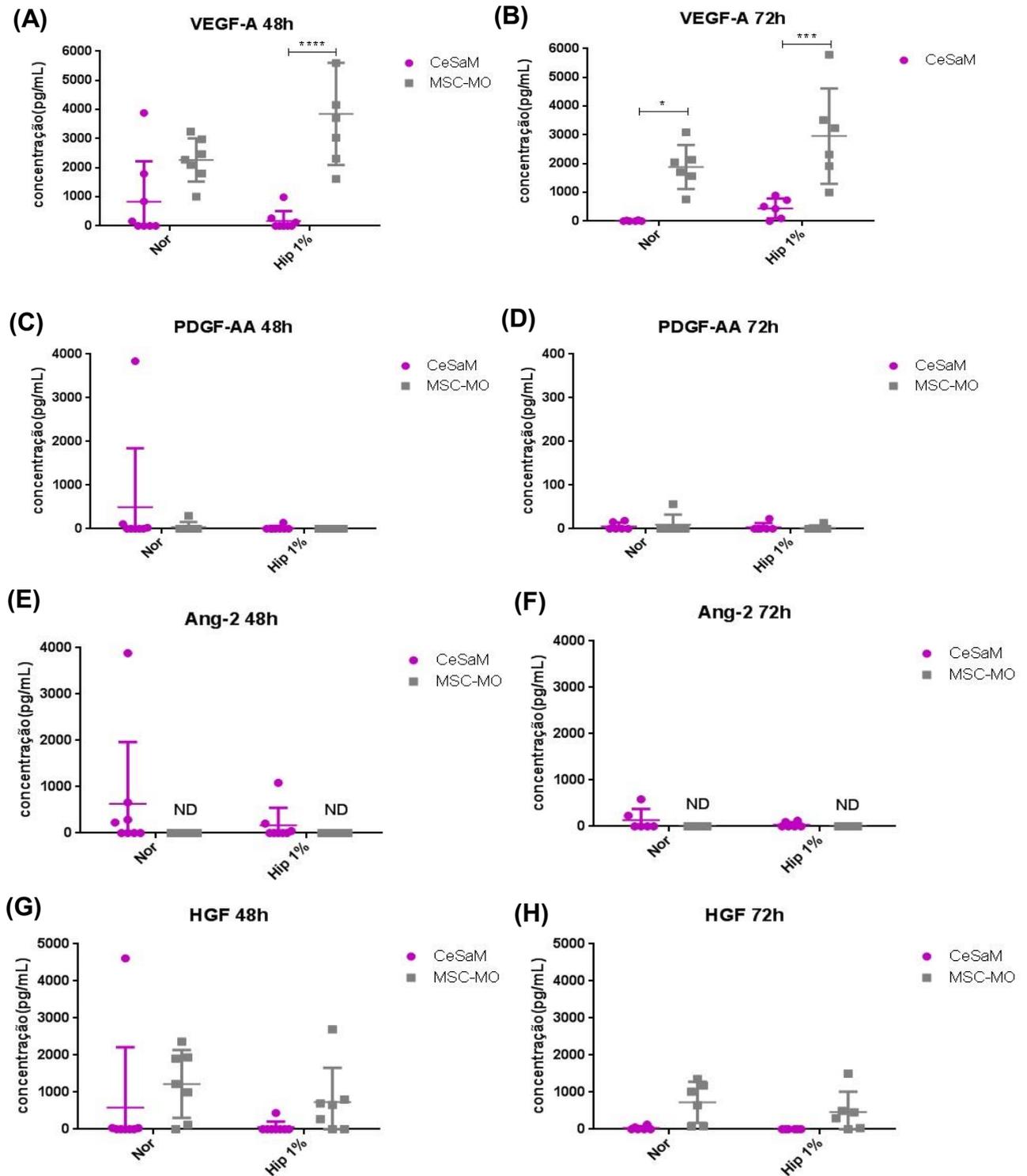


Figura 25: Secreção de VEGF-A, PDGF-AA, ANG-2 e HGF nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO analisados pela técnica de citometria de fluxo. (A) MSC-MO secretaram concentrações significativamente maiores da citocina VEGF-A em relação às CeSaM na condição de hipóxia 1%, em 48 horas (**** $P < 0,0001$). (B) Diferenças significativas nas concentrações de VEGF-A foram detectadas entre as amostras de CeSaM e MSC-MO nas condições de normóxia e hipóxia 1%, em 72h (* $P < 0,05$; *** $P < 0,001$). (C) e (D) PDGF-AA estava presente em algumas amostras de CeSaM e apenas em uma amostra de MSC-MO em 48 e 72 horas. (E) e (F) ANG-2 estava presente apenas

nas amostras de meios condicionados das CeSaM em 48 e 72 horas. (G) e (H) HGF encontrava-se presente nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO em 48 e 72 horas, sem diferença estatística entre eles. CeSaM 48h n=8; MSC-MO 48h n=7; CeSaM 72h n=6; MSC-MO 72h n=6. ND: não detectável; nor: normóxia; hip 1%: hipóxia 1%.

4.8. Avaliação da migração celular das CeSaM e MSC-MO *in vitro* por meio do ensaio de lesão por arranhadura

O ensaio de lesão por arranhadura também foi realizado com as células mesenquimais derivadas de sangue menstrual (CeSaM) e medula óssea (MSC-MO) para avaliar suas motilidades quimiotáticas em resposta a um estímulo de lesão. As densidades celulares ocupadas pelas CeSaM (n=7) e MSC-MO (n=7) na região de lesão foram quantificadas a partir das imagens capturadas em diferentes frações de tempo após a arranhadura. Assim, construímos uma curva de migração para cada tipo celular e observamos maior inclinação na curva das MSC-MO em relação às CeSaM principalmente nas 20 horas iniciais do experimento (figura 26A). Além disso, observamos que as MSC-MO apresentaram significativamente maior área sob a curva sendo um reflexo da sua migração mais acelerada no início do experimento (figura 26B).

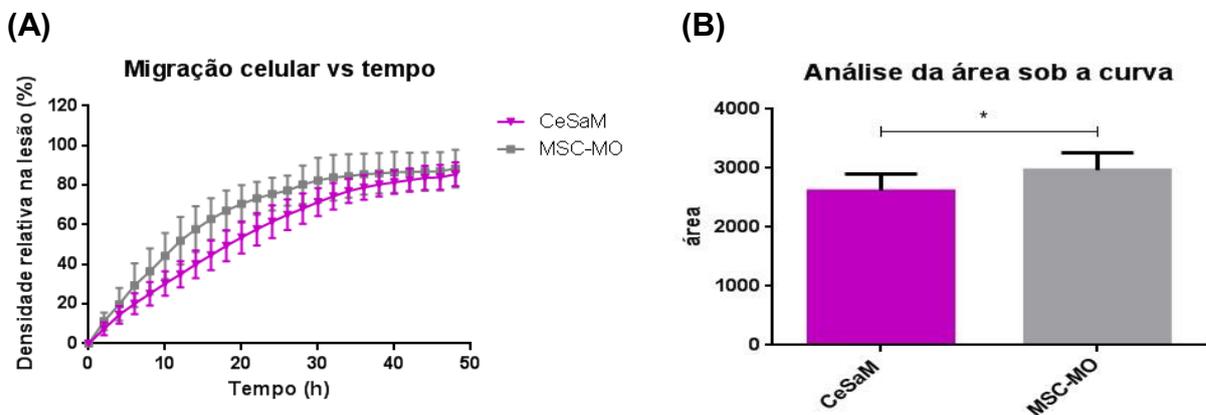


Figura 26: Curvas de migração das CeSaM (n=7) e MSC-MO (n=7) em relação ao tempo e análise da área sob a curva no ensaio de lesão por arranhadura. Em (A) Observa-se maior inclinação na curva da MSC-MO em relação à CeSaM nos tempos iniciais do experimento, indicando migração mais acelerada. Em (B) observa-se diferenças significativas na análise da área sob a curva para estas células.

Em seguida, comparamos os perfis de migração dessas células nos tempos experimentais de 8, 12, 24 e 48 horas após a arranhadura e observamos que as MSC-MO ocuparam significativamente mais rápido as regiões de lesão nos tempos

experimentais de 12 horas ($P < 0,01$) e 24 horas ($P < 0,05$). Entretanto, no tempo final do experimento, em 48 horas, é possível observar que as densidades dos dois tipos celulares se tornam bem próximas ($86,24 \pm 6,69\%$ para as CeSaM e $85,99 \pm 8,83\%$ para as MSC-MO), indicando que as células mesenquimais de ambas as fontes possam chegar no local de lesão e exercer seu efeito regenerativo (Figura 27).

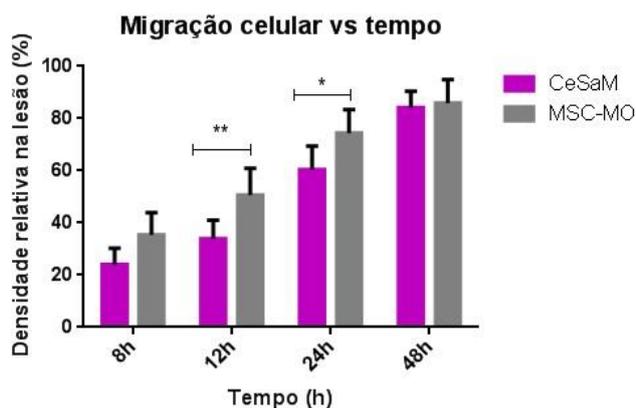


Figura 27: Gráfico das densidades celulares relativas do ensaio de migração celular entre CeSaM e MSC-MO, nos tempos experimentais de 8, 12, 24 e 48 horas no ensaio de lesão por arranhadura (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

4.9. Ensaio de *Sprouting*

O ensaio de *sprouting* avaliou a resposta das células mesenquimais de sangue menstrual e medula óssea em relação às etapas iniciais da angiogênese. Na figura 28A podemos observar que após 48 horas de cultivo em Matrigel™, algumas células invasoras começam a aparecer a partir da borda do esferoide formado pelas células mesenquimais de sangue menstrual, com uma distância média de $50 \mu\text{m}$ ($50,77 \pm 8,80 \mu\text{m}$, $n = 7$). Por outro lado, não foi observado o mesmo resultado nos esferoides formados pelas células mesenquimais de medula óssea (Figura 28B). Nesses, por sua vez, observamos que poucas células começam a invadir a matriz circundante, resultando em uma distância alcançada significativamente menor ($38,76 \pm 8,19 \mu\text{m}$, $n = 6$, $P < 0,01$) (Figura 28B). Quando prolongamos o tempo de cultura para 7 dias, observamos que as células invasoras formam diversos cordões multicelulares com numerosas ramificações para todas as direções em torno do esferoide (Figura 28 C e D). Nesse tempo experimental de 7 dias observamos mais uma vez diferença significativa no desenvolvimento do *sprouting* nos esferoides formados por células mesenquimais de sangue menstrual em relação aos esferoides

de células mesenquimais de medula óssea ($358,51 \pm 62,44 \mu\text{m}$ para as CeSaM versus $99,99 \pm 31,89 \mu\text{m}$, para as MSC-MO $P < 0,0001$) (Figura 29 B).

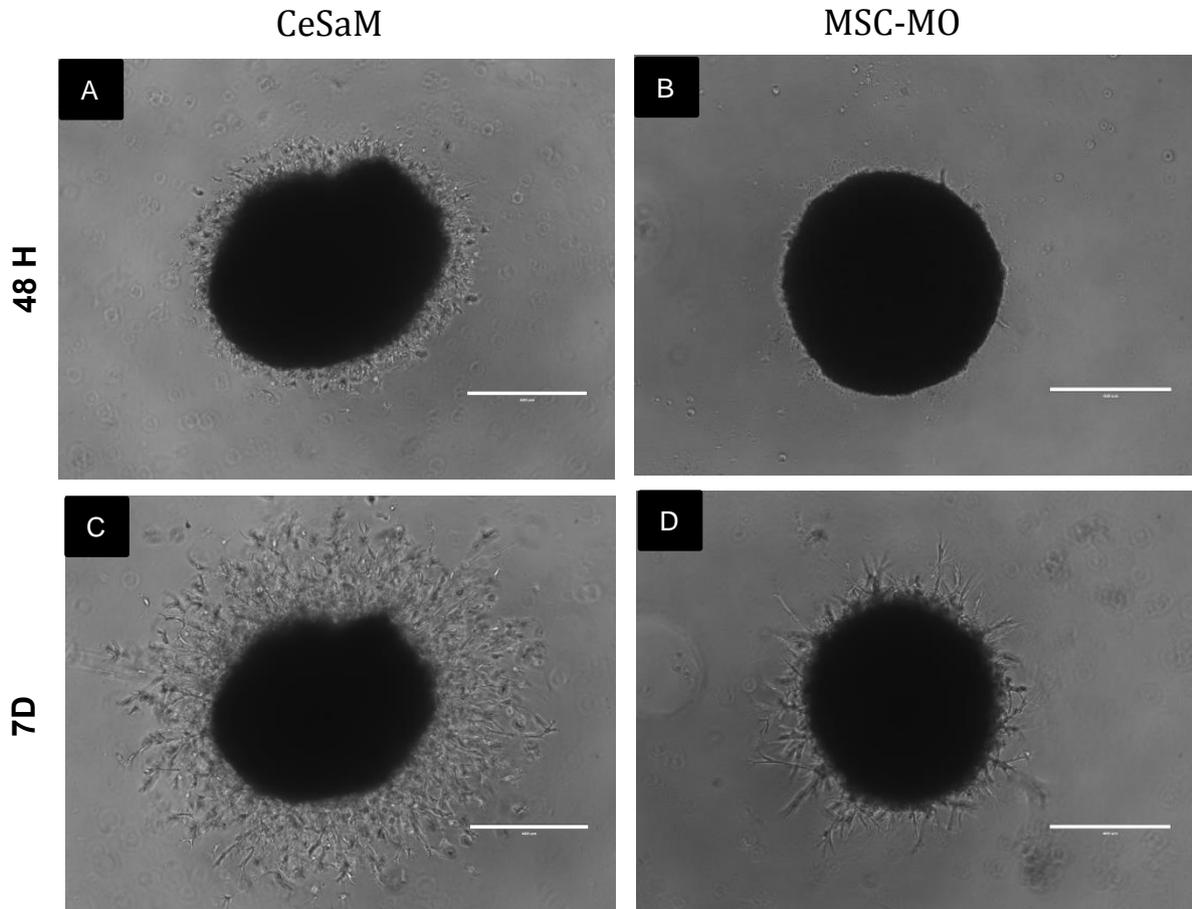


Figura 28: *Sprouting* a partir dos esferoides 3D formados por CeSaM (n=7) e MSC-MO (n=6). A frente de invasão no matrigel foi rapidamente detectada (48h) para os esferoides derivados de CeSaM (A) enquanto que os esferoides de MSC-MO mostraram formar estruturas mais compactas com distâncias menores a partir da borda ($38,76 \pm 8,19 \mu\text{m}$, $P < 0,01$) (B). Após uma semana, os esferoides de CeSaM mostraram extenso desenvolvimento, com distâncias de $358,51 \pm 62,44 \mu\text{m}$ a partir da borda (C). Já o desenvolvimento do *sprouting* dos esferoides de MSC-MO foi significativamente reduzido com poucas células detectadas a curtas distâncias da borda ($99,99 \pm 31,89 \mu\text{m}$, $P < 0,0001$) (D). A barra de calibração é de $400 \mu\text{m}$,

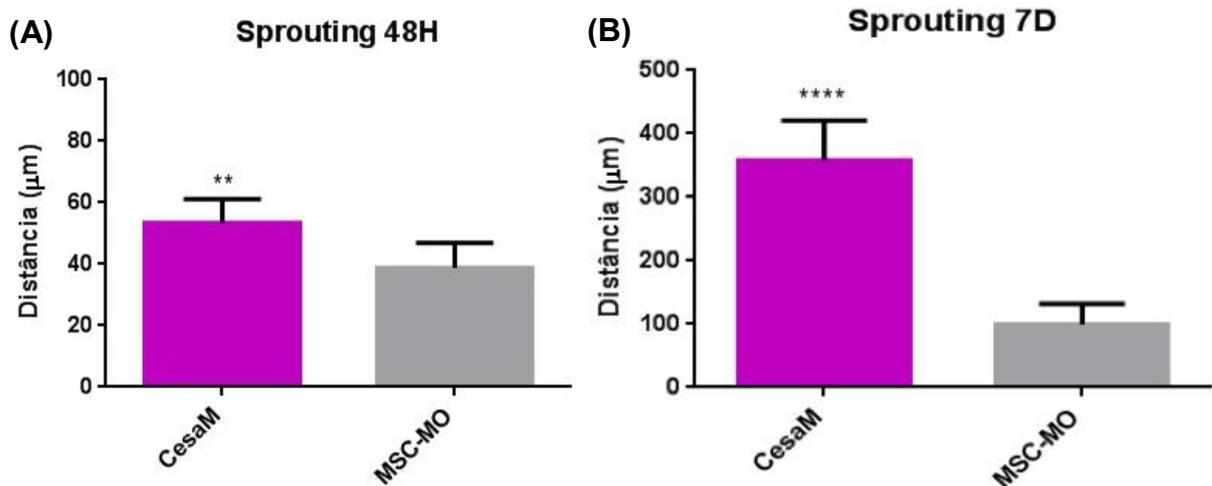


Figura 29: Análise da distância alcançada durante o ensaio de *Sprouting* com os esferoides de CeSaM (n=7) e MSC-MO (n=6). Tanto em 48 horas (A) como em 7 dias (B) a distância alcançada nos esferoides de CeSaM foi significativamente maior que nos esferoides de MSC-MO (50,77 ± 8,80 µm CeSaM vs 38,76 ± 8,19 µm MSC-MO, P<0,01, 48h e 358,51 ± 62,44 µm CeSaM vs 99,99 ± 31,89 µm, MSC-MO P<0,0001, 7 dias).

Analisando um pouco mais detalhadamente a frente de invasão dos esferoides após cultura 3D em matrigel, podemos observar que as células mesenquimais passam a adquirir características morfológicas semelhantes às células endoteliais durante o *Sprouting* angiogênico. Observamos na imagem 30 que as células invasoras se apresentam altamente ramificadas, com a presença de prolongamentos semelhantes à filopódios em suas extremidades, recapitulando morfológicamente às *tip cells*, que são células endoteliais ativadas iniciadoras do *sprouting* angiogênico (SIEKMANN *et al*, 2013; NGUYEN *et al.*, 2013). Além disso, observamos que as células da haste do broto em crescimento (as que estão localizadas logo atrás das células da extremidade) organizam-se de forma linear tornando-se também parecidas com as *stalk cells*.

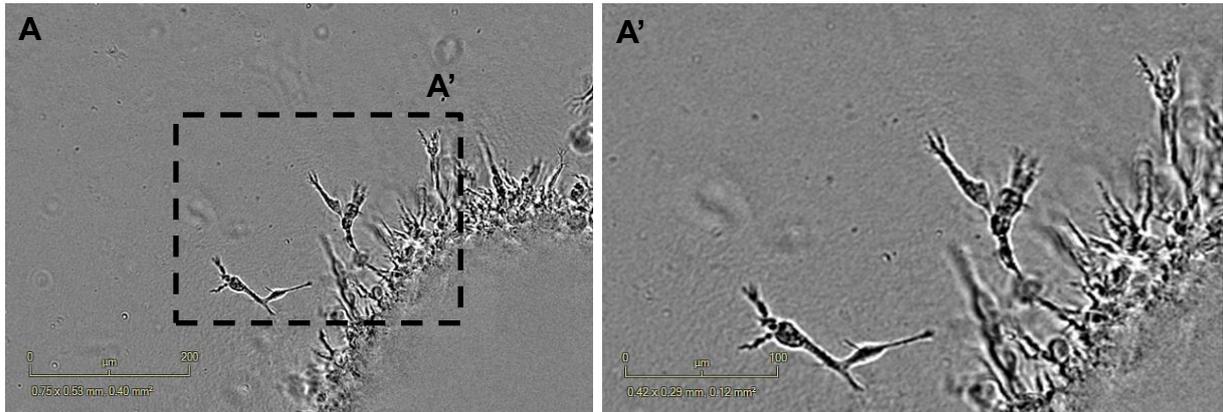


Figura 30: Imagens representativas de um esferoide de CeSaM durante o ensaio de *sprouting*.

As células mesenquimais adquirem características de células endoteliais *tip cell* e *stalk cell*. Escalas: (A) 200 μm ; (A') 100 μm .

4.10. Imunofluorescência após ensaio de *Sprouting*

Como vimos no item anterior, as células do esferoide formado por CeSaM e MSC-MO apresentaram capacidade de invadir o matrigel, migrar e formar prolongamentos e ramificações semelhantes as células endoteliais que participam das etapas precoces da angiogênese. Por isso, optamos por investigar se as células mesenquimais de sangue menstrual e medula óssea poderiam estar também se diferenciando em um fenótipo *endothelial-like*, já que foram observadas características morfológicas semelhantes às *tip cells* e *stalk cells* durante o desenvolvimento do *sprouting* angiogênico. Para isso, foi realizada imunofluorescência após 14 dias do experimento de *sprouting*, para avaliarmos se as células mesenquimais (de origem menstrual ou da medula óssea) que naturalmente não expressam a molécula de adesão celular endotelial plaquetária (PECAM-1 ou CD31) passariam a apresentar sua expressão após acondicionamento em meio enriquecido com fatores pró-angiogênicos e Matrigel™.

Abaixo podemos observar imagens representativas do experimento de imunofluorescência dos esferoides das CeSaM e MSC-MO após ensaio de *Sprouting*. As moléculas de actina do citoesqueleto celular, marcadas com faloidina conjugada com Alexa Flúor 488, podem ser visualizadas em verde nas imagens. Enquanto que a presença de CD31/PECAM-1 pode ser visualizada em vermelho, já que utilizamos o anticorpo secundário conjugado a Cy3. Assim, foi possível verificar

que algumas células de CeSaM e MSC-MO que participavam do *sprouting* expressavam também a molécula CD31, sugerindo que estas células também poderiam estar se diferenciando em um fenótipo *endothelial-like*.

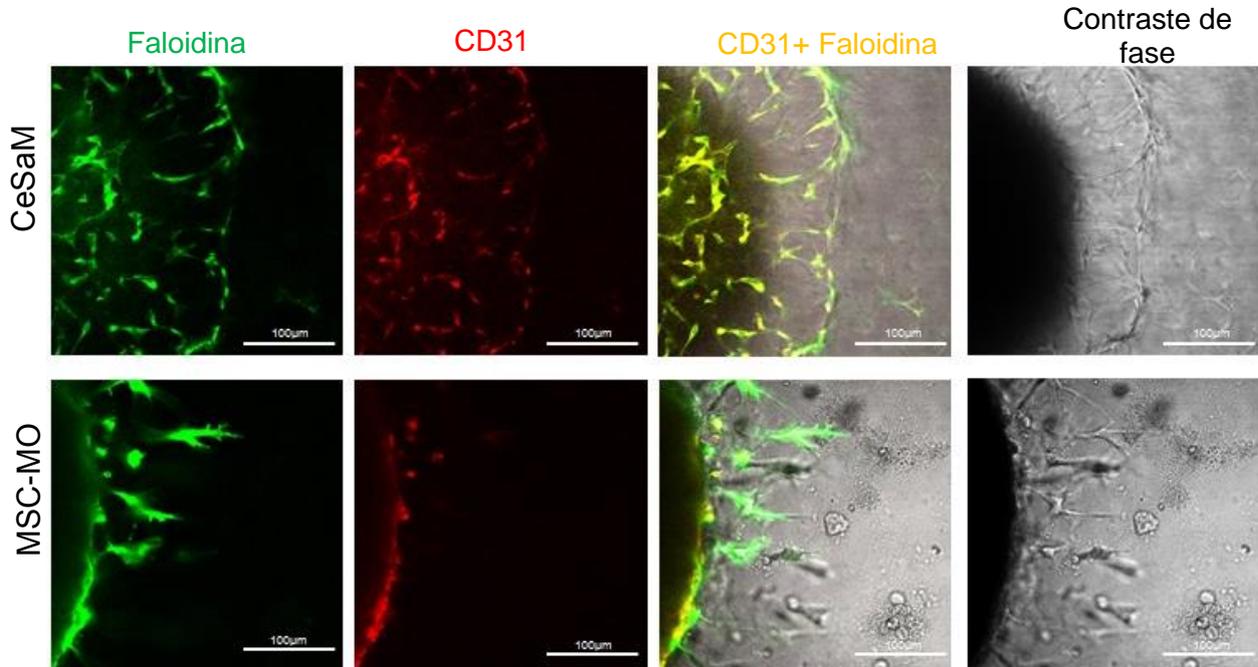


Figura 31: Imunofluorescência após ensaio de *sprouting* dos esferoides de CeSaM e MSC-MO. O citoesqueleto da célula pode ser visualizado em verde nas imagens, enquanto que a presença de PECAM-1/CD31 pode ser visualizada em vermelho. Algumas CeSaM e MSC-MO expressam CD31 após ensaio de *sprouting*. A barra de calibração é de 100 µm.

4.11. Xenoenxerto em embrião de galinha

O experimento de xenoenxerto das células mesenquimais de sangue menstrual e medula óssea em embrião de galinha foi realizado com o propósito de identificar a localização das células estudadas em um microambiente embrionário altamente instrutivo e dinâmico. Aqui, investigamos se as MSC poderiam migrar para territórios específicos em resposta aos sinais embrionários, bem como avaliamos se essas células puderam participar de processos relacionados à vasculogênese e angiogênese *in vivo*.

4.11.1. Impacto do enxerto dos esferoides de CeSaM e MSC-MO no desenvolvimento dos embriões de galinha

Neste trabalho as células mesenquimais de sangue menstrual e medula óssea humana foram enxertadas na forma de esferoides em vez de suspensão celular, para garantir melhor precisão e manuseio na hora da cirurgia, bem como

para permitir avaliar se as células migrariam do local implantado para outras regiões do embrião. Os esferoides foram implantados em embriões de 1,5-2 dias de desenvolvimento (13 a 18 pares de somitos). A região escolhida foi a do mesoderma paraxial (lateral ao tubo neural) posterior ao último par de somitos do embrião. Desta forma, o esferoide se localizava no mesoderma pré-somítico relativo aos somitos 15-20, na região do tronco que formará os somitos cervicais no nível do broto da asa (CHEVALLIER *et al.*, 1978).

Três dias após a cirurgia (E4,5-5) obtivemos uma taxa de sobrevivência de 50% dos embriões que utilizamos para o enxerto dos esferoides de CeSaM e MSC-MO (n=4 para cada tipo celular), totalizando 8 embriões para avaliação histológica. Podemos observar que a cirurgia ocasionou uma leve cicatriz verificada por uma suave depressão, na região dos somitos cervicais da coluna vertebral, no lado direito do embrião (lado da cirurgia) (setas brancas), porém verificamos que este evento não prejudicou o desenvolvimento e morfogênese do embrião após inspeção visual e microscópica (Figura 32).

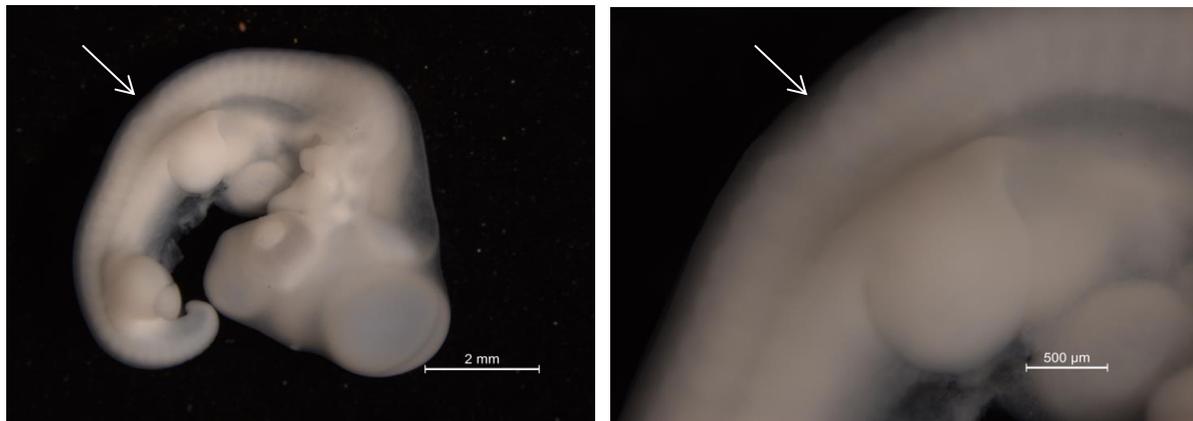


Figura 32: Fotomicrografias representativas de um embrião de galinha E4,5-5 após implantação das células. Setas indicam cicatriz na região dos somitos onde foi realizada a cirurgia. (A) Escala: 2mm. (B) escala: 500μm.

4.11.2. Localização das células estromais mesenquimais enxertadas *in vivo*

Primeiramente, avaliamos se as células mesenquimais derivadas de sangue menstrual permaneceram agregadas na forma de esferoide ou se foram capazes de migrar para regiões diversas do embrião respondendo as sinalizações variadas do ambiente embrionário. Análises dos cortes transversais hibridizados com sondas *Alu* demonstraram que as CeSaM foram capazes de migrar juntamente com as

populações celulares do embrião e se integrar nos tecidos do hospedeiro. CeSaM *Alu* positiva foi encontrada em regiões perivasculares do embrião de galinha em E4,5-5 (4,3%, n=1). Na figura 33 podemos observar CeSaM *Alu*⁺ em contato direto com o endotélio da aorta dorsal do embrião, sugerindo uma possível participação nos processos que envolvem a vasculogênese embrionária.

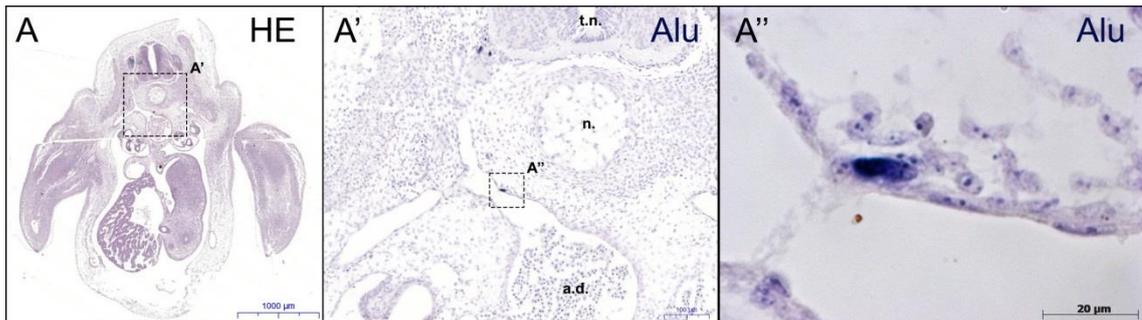


Figura 33: CeSaM *Alu* positiva em regiões perivasculares do embrião de galinha. Em (A) coloração com hematoxilina e eosina (HE). (A') Hibridização com sondas *Alu* em cortes transversais paralelos no nível do broto da asa revelaram a presença de CeSaM em contato direto com endotélio da aorta dorsal do embrião de galinha, observada em maior aumento em (A''). Em (A' e A'') os cortes foram contrainformados com hematoxilina e hibridizados com sonda *Alu*. Escalas (A): 1000 µm, (A') 500 µm, (A'') 20 µm. T.n., tubo neural; a.d., aorta dorsal; n., notocorda.

Células mesenquimais de sangue menstrual *Alu* positivas também foram encontradas ao redor do tubo neural, tanto nas suas adjacências como na raiz ventral como podemos observar na figura 34 (56,5%, n=13).

Novamente é importante ressaltar que nenhum agregado celular foi encontrado no mesênquima lateral ao tubo neural, sugerindo que as células tenham migrado, em sua maioria, para regiões diversas do embrião de galinha.

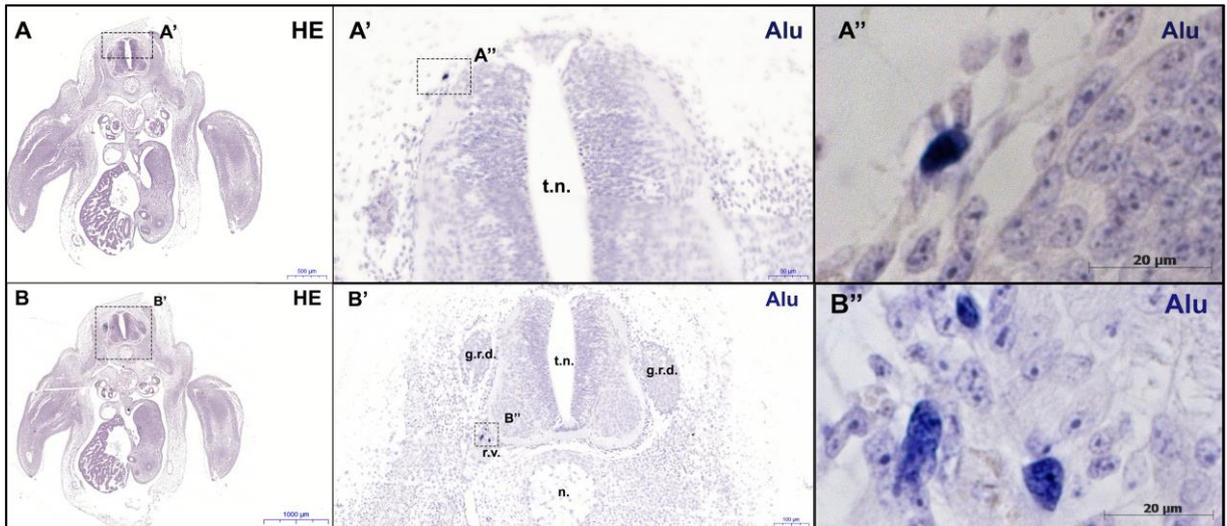


Figura 34: CeSaM *Alu* positivas encontradas ao redor do tubo neural do embrião de galinha. Em (A) e (B) coloração com hematoxilina e eosina (HE). (A') e (B') Hibridização com sonda *Alu*, em cortes transversais paralelos, mostra células humanas próximas à lâmina basal do tubo neural e raiz ventral, respectivamente. Em (A', A'', B' e B'') os cortes foram contracorados com hematoxilina e hibridizados com sonda *Alu*. Escala (A): 500 µm (B): 1000 µm, (A') e (B'): 500 µm, (A'') e (B''): 20 µm. T.n., tubo neural, g.r.d., gânglio da raiz dorsal, r.v., raiz ventral, n., notocorda.

Observamos também que 30,4% das células hibridizadas com sonda *Alu* (n=7) foram encontradas em nichos perineurais, em associação com os nervos periféricos do embrião (figura 35 A' e A''). Na imagem 35 A'' é possível observar a íntima interação das células *Alu* positivas com as condensações nervosas presentes no mesênquima inferior ao tubo neural.

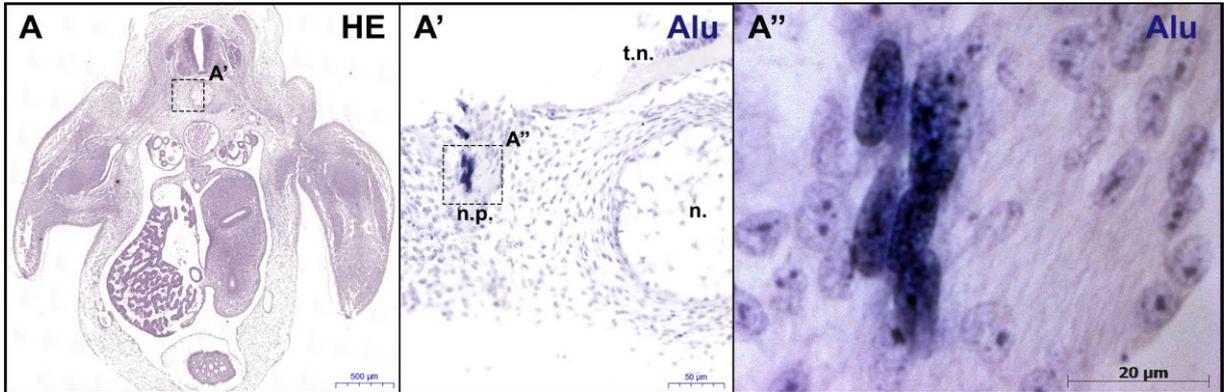


Figura 35: CeSaM *Alu* positivas localizadas próximas de nervos periféricos do embrião de galinha. Em (A) coloração com hematoxilina e eosina (HE). (A' e A'') Hibridização com sondas *Alu*, em cortes transversais paralelos, indicaram células humanas associadas aos nervos periféricos em desenvolvimento. Em (A' e A'') os cortes foram contraincolorados com hematoxilina e hibridizados com sonda *Alu*. Escala (A): 1000 µm, (A'): 500 µm, (A''): 20 µm. T.n., tubo neural; n.p: nervo periférico; n. notocorda.

Por fim, observamos também que 8,6 % das CeSaM *Alu* positivas foram encontradas em locais próximos a notocorda (8,6%; n=2) (Figura 36). Vale ressaltar que, essas são regiões nas quais as células derivadas do esclerótomo dos somitos migram para formar as futuras vértebras do esqueleto axial do embrião. Embora a ossificação endocondral não tenha se iniciado neste estágio do desenvolvimento, a notocorda e suas adjacências podem ser consideradas regiões presuntivas condrogênicas. E neste caso, nossos resultados mostraram que as CeSaM apresentaram um tropismo para regiões que formam cartilagem, corroborando com o potencial condrogênico já descrito para as células mesenquimais na literatura (DOMINICI *et al.*, 2006).

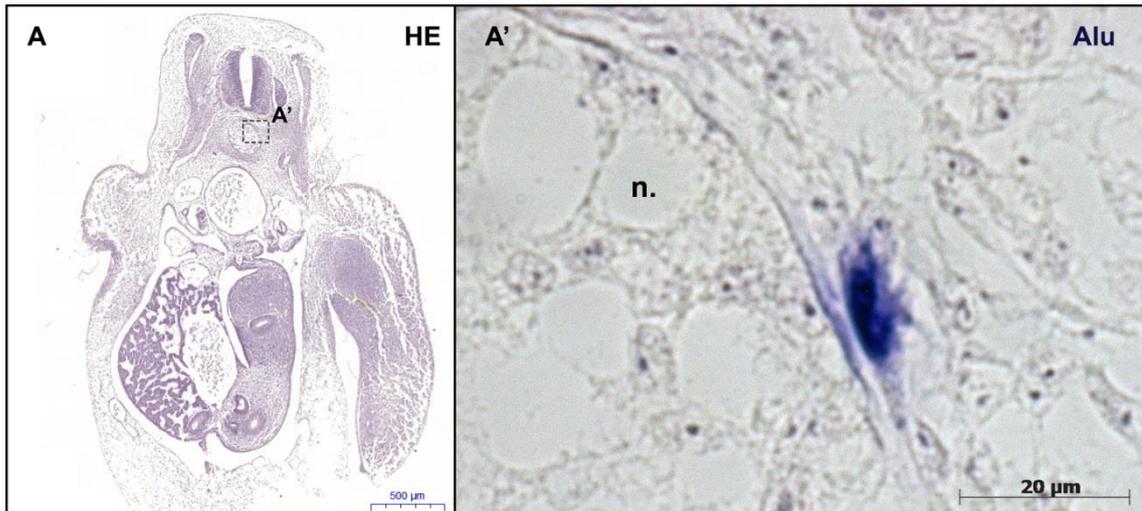


Figura 36: CeSaM *Alu* positivas migraram para regiões presuntivas condrogênicas do embrião de galinha. Em (A) coloração com hematoxilina e eosina (HE). (A') Hibridização com sondas *Alu*, em cortes transversais paralelos, mostra célula humana lateral a notocorda. Em (A') Corte contracorado com hematoxilina e hibridizado com sonda *Alu*. Escala (A): 1000 µm, (A'): 20 µm. n., notocorda.

Na tabela 2 podemos observar a quantificação das CeSaM *Alu*⁺ contadas por local e por embrião. Explicitado ao lado de cada embrião está indicado o nível em que o esferoide foi enxertado na região do mesoderma pré-somítico (MPS). Os esferoides foram enxertados com uma distância aproximada de dois pares de somitos posteriores ao último par de somitos contabilizado em cada embrião. Apesar das diferenças notadas nos estágios de desenvolvimento de cada embrião, observamos que todos os níveis citados (15^o-20^o par de somitos) correspondem aos somitos que formarão as estruturas do tronco na altura/nível do broto da asa (CHEVALLIER *et al.*, 1978).

Tabela 2: Distribuição das CeSaM nos embriões de galinha. A primeira coluna representa os embriões com seus respectivos locais de enxerto. As quatro colunas posteriores representam o número de células contadas em cada região nos respectivos embriões. As porcentagens representam o número de células em determinada localização em relação ao número total de um mesmo embrião. Na última linha encontra-se o somatório das CeSaM *Alu+* numa dada localização, e suas porcentagens em relação ao número total de células encontrados em todos os embriões. MPS: Mesoderma pré-somítico.

Embriões (local do enxerto)	Aorta dorsal (perivascular)	Regiões perineurais (Ao redor do tubo neural)	Regiões perineurais (nervos periféricos)	Mesênquima Lateral a notocorda	Total (por embriões)
Embrião 1 (15^o- 16^o MPS)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0
Embrião 2 (17^o- 18^o MPS)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)	2 (66,6%)	3
Embrião 3 (18^o- 19^o MPS)	0 (0%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6
Embrião 4 (20^o- 21^o MPS)	1 (7,1%)	6 (42,8%)	7 (50%)	0 (0%)	14
Total (por local)	1 (4,3%)	13 (56,5%)	7 (30,4%)	2 (8,6%)	23

Em conjunto, nossos resultados mostraram que as CeSaM foram capazes de sobreviver no microambiente embrionário de galinha, como também puderam se integrar nos tecidos do hospedeiro participando da morfogênese (inclusive vasculogênese) juntamente com as células do embrião. Entretanto, observamos que foram encontradas poucas células nos embriões avaliados em relação ao total de células transplantadas, já que foram enxertados esferoides com cerca de 100 células e encontramos no máximo quatorze células em um embrião (tabela 2).

Em oposição aos resultados obtidos com as células mesenquimais de sangue menstrual, as células mesenquimais de medula óssea não foram encontradas em nenhum dos embriões transplantados (n=4).

5. Discussão

A angiogênese terapêutica surgiu em meados dos 90 como uma proposta alternativa para neovascularização de tecidos isquêmicos. Desde então a terapia gênica para superexpressão de fatores de crescimento pró-angiogênicos ou administração dos mesmos nos locais de injúria tecidual foram algumas estratégias exploradas neste ramo (INSNER *et al.*, 1995; LONSORDO *et al.*, 2004). Além disso, a descoberta das células progenitoras endoteliais (EPC) no sangue periférico humano no final dos anos 90 por Asahara e colaboradores, também representou um grande avanço para medicina regenerativa, acrescentando novas perspectivas para o tratamento das desordens relacionadas ao sistema circulatório por meio da utilização dessas células para promoção de vasculogênese pós-natal (ASAHARA *et al.*, 1997). Entretanto, a limitada disponibilidade dessas células nos tecidos adultos bem como dificuldades na expansão celular, abriram as portas para o estudo de novos tipos celulares que também pudessem contribuir com a angiogênese e reparo tecidual (HRISTOV *et al.*, 2003; SIEVEKING *et al.*, 2009).

Diante desse cenário, as células mesenquimais podem ser candidatas atrativas para tais fins, visto que diversos estudos já demonstraram suas características, potencialidades e suas vantagens terapêuticas *in vitro*, *in vivo*, bem como em estudos clínicos em humanos. As células mesenquimais de medula óssea foram as primeiras a serem descritas e isoladas, em 1976 por Friedenstein e colaboradores, e desde sua descrição, têm sido amplamente utilizadas em diversos protocolos de terapia celular (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976; DAS *et al.*, 2013; TAO *et al.*, 2016). Uma vez que nesses protocolos o número de células pode ser um fator de restrição na utilização deste tipo celular, fontes alternativas menos invasivas de MSC foram identificadas e dentre elas, as isoladas do sangue menstrual, apresentaram plasticidade semelhante às da medula óssea (MENG *et al.*, 2007). No entanto, raros são os estudos que comparam diretamente o potencial das MSC de medula óssea e de sangue menstrual em relação às suas capacidades angiogênicas.

Por isso, o presente estudo analisou, *in vitro*, as propriedades angiogênicas das células estromais mesenquimais humanas derivadas da medula óssea e do sangue menstrual, bem como avaliou o potencial de migração e interação célula-tecido quando as mesmas foram transplantadas *in vivo*, em embrião de galinha,

observando suas características e potencialidades durante o desenvolvimento embrionário de forma também inédita.

Na primeira etapa do nosso estudo, visamos isolar e expandir as MSC-MO e CeSaM, até que atingissem a terceira passagem para que pudessem ser utilizadas nos experimentos. As MSC-MO foram obtidas a partir da fração mononuclear da medula óssea humana isolada por centrifugação através de um gradiente de densidade utilizando Ficoll. Já as CeSaM foram obtidas a partir do plaqueamento do sedimento celular derivado do sangue menstrual total processado por centrifugação (HIDA *et al.*, 2008). Conforme observado neste estudo, as células foram capazes de aderir aos frascos plásticos, apresentando morfologia fibroblastóide (delgadas e alongadas) após algum tempo em cultura (Figuras 8B e 9B), atendendo, assim, ao primeiro critério de classificação das MSC publicado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (DOMINICI *et al.*, 2006). Além disso, as MSC de medula óssea e sangue menstrual já foram caracterizadas sob outros aspectos por grupos de pesquisa do nosso laboratório e observamos que o perfil imunofenotípico é mantido quando utilizados protocolos estabelecidos (KASAI-BRUNSWICK., 2009; ASENSI *et al.*, 2014).

Para os experimentos de avaliação funcional das células endoteliais, optamos por utilizar a linhagem de células endoteliais de veia de cordão umbilical (HUVEC) EA.hy926, pois por serem células imortalizadas, apresentam elevada capacidade proliferativa, podem ser mantidas em cultura por tempos prolongados e não perdem viabilidade durante o curso de propagação, diferentemente das células primárias endoteliais que não podem ser mantidas por muitas passagens em cultura, dificultando sua expansão e produtividade experimental (BARANSKA *et al.*, 2005; BOUIS *et al.*, 2001).

Por estarmos trabalhando com uma linhagem celular, optamos por realizar uma breve caracterização dessas células por citometria de fluxo e imunofluorescência para avaliarmos a presença de moléculas endoteliais. Observamos que a molécula de adesão CD31/PECAM-1 foi detectada em ambas as técnicas, apresentando alta expressão (79,9%) dessa molécula nas HUVEC avaliadas por citometria de fluxo (Figura 11B). Esse resultado foi confirmado pela técnica de imunofluorescência que também detectou a presença de células CD31+ (vermelho) e sua sobreposição com o citoesqueleto (amarelo) (Figura 12 C e D), em concordância com os dados publicados por Unger *et al.* e Lindington *et al.* que

analisaram a linhagem de HUVEC EA.hy926 e observaram a expressão de moléculas particularmente presentes em células endoteliais primárias como: vWF, PECAM-1, ICAM-1, bem como Flt-1 e Flk-1 (KDR) (UNGER *et al.*, 2002; LINDINGTON *et al.*, 1999). Considerando que após sucessivas passagens essas células podem vir a perder algumas de suas moléculas e, conseqüentemente, algumas de suas funções, a caracterização, tanto imunofenotípica como funcional, se faz necessária quando se trabalha com linhagens celulares (SANZ-NOGUES *et al.*, 2016).

Após caracterização e expansão das células envolvidas no estudo, iniciamos nossos objetivos avaliando os efeitos angiogênicos das células mesenquimais humanas de medula óssea e sangue menstrual nas HUVEC. Deste modo, o meio condicionado das células mesenquimais, particularmente, foi o objeto do nosso estudo. Foi observado que os meios condicionados (72h) de ambas as células mesenquimais induziram o aumento do comprimento dos tubos e ramificações na rede de estruturas tubulares formadas pelas HUVEC. Esses resultados sugerem que as células mesenquimais estejam secretando fatores de crescimento que contribuam para angiogênese, já que os meios condicionados, majoritariamente, estimularam uma maior formação de tubos quando comparado ao meio basal (DMEM) e também apresentaram efeito semelhante ao meio conhecido angiogênico EGM-2. Diversos estudos já demonstraram o efeito benéfico dos meios condicionados das células mesenquimais na proliferação, migração e formação de tubos pelas células endoteliais e tais efeitos foram atribuídos à presença de fatores pró-angiogênicos (MURPHY *et al.*, 2008, KANG *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2013; HUNG *et al.*, 2007).

Estudos desenvolvidos por Jiang e colaboradores mostraram que os meios condicionados das CeSaM cultivadas em normóxia por 24 horas potencializaram a capacidade das HUVEC formarem tubos em matrigel quando comparada à capacidade do meio controle DMEM suplementado com 2% de SFB. Ademais, os autores também observaram alta expressão das citocinas EGF, Ang-1 e PDGF por essas células (JIANG *et al.*, 2013). Do mesmo modo, Hung e colaboradores demonstraram que os meios condicionados das MSC-MO poderiam induzir a formação de redes de estruturas tubulares nas células endoteliais aórticas humanas (HAEC). Além disso, observaram que os meios condicionados das células cultivadas em hipóxia 1% por 48 horas em meio endotelial basal (EBM-2) foram mais efetivos que o meio condicionado dessas células na condição de normóxia. Esse resultado

pode ser explicado por uma maior concentração de citocinas encontradas nos meios condicionados em hipóxia, tais como VEGF e MCP-1 (HUNG *et al.*, 2016). Além desses, outros estudos com células mesenquimais de cordão umbilical, polpa dentária, tecido adiposo e placenta também já demonstraram a capacidade de secreção de citocinas angiogênicas (REN *et al.*, 2015; REHMAN *et al.*, 2004; FRANCKI *et al.*, 2015) e promoção de efeito parácrino nas HUVEC *in vitro* (BADER *et al.*, 2015; REHMAN *et al.*, 2004, Wu *et al.*, 2007; FRANCKI *et al.*, 2015).

Quando avaliamos o efeito dos meios condicionados (48h e 72 horas) das MSC na migração das HUVEC, observamos um resultado semelhante ao da migração estimulada pelo meio EGM-2 (Figuras 21 A e B). Porém, a migração das HUVEC cultivadas com DMEM também foi muito eficiente (sem diferença estatística em relação ao EGM-2). Nesse caso, podemos atribuir esse resultado à presença de fatores de crescimento no soro fetal bovino (SFB) utilizado para suplementação do meio DMEM (DMEM com 10% SFB), já que estes também podem estar contribuindo para a migração das células endoteliais. Os fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino não são discriminados pelo fabricante, podendo também variar de lote para lote, o que torna a interpretação deste resultado ainda mais complexa. Diferentemente da nossa abordagem, Kang *et al.* demonstraram capacidade de migração celular superior nas HUVEC cultivadas com meios condicionados das MSC-MO em relação ao controle, porém o controle utilizado por este grupo foi solução salina (PBS) (KANG *et al.*, 2016). Nessa condição, as células estão em privação total de nutrientes e fatores de crescimento, sendo realmente uma condição desfavorável para migração, não sendo considerada uma boa opção para efeitos comparativos.

Outra consideração que podemos comentar sobre o nosso resultado com o meio DMEM, é que o próprio experimento em si também possa estar estimulando a migração celular, já que as células da borda da lesão possivelmente secretam mais fatores e recrutam as células ao redor. Apesar dessas considerações, o fato importante foi que em todos os casos, inclusive com os meios condicionados das células mesenquimais, a migração das HUVEC foi eficiente.

Ao compararmos os efeitos parácrinos das duas células mesenquimais entre si levando em consideração os ensaios de formação de estruturas tubulares e migração com as HUVEC (48 e 72 horas), não observamos diferenças significativas entre essas células. O efeito angiogênico que o meio condicionado das MSC

promoveu nas células endoteliais foi semelhante e independente da disponibilidade de oxigênio no ambiente (Figuras 18 e 22). Diferentemente dos nossos resultados, Alcayaga e colaboradores verificaram que as CeSaM promoveram maior formação de estruturas tubulares em relação as MSC-MO tanto na condição de normóxia quanto em hipóxia 1%. No entanto, neste trabalho os autores cultivaram as MSC na privação de nutrientes (sem SFB), condição que não foi testada no nosso trabalho. Além disso, foi verificado que o meio condicionado das CeSaM apresentava significativamente maiores concentrações da citocina bFGF em relação ao meio das MSC-MO, o que pode ter ocasionado uma vantagem para as células derivadas de sangue menstrual. Os autores também relataram um significativo aumento na formação de tubos quando as CeSaM foram cultivadas em hipóxia 1% em relação a normóxia, e neste caso os níveis de VEGF nos meios condicionados destas células estavam significativamente maiores em hipóxia. Entretanto, assim como no nosso trabalho, os autores não observaram diferença significativa na formação de tubos quando os meios condicionados das MSC-MO foram avaliados nas diferentes concentrações de oxigênio, mesmo que essas células secretassem maiores concentrações de VEGF em hipóxia 1% (ALCAYAGA *et al.*, 2015).

Considerando o efeito angiogênico positivo dos meios condicionados das MSC nas células endoteliais, resolvemos investigar quais citocinas estas células poderiam estar expressando e secretando. Em relação à expressão gênica, observamos que ambas as células expressavam as citocinas VEGF e bFGF, sem diferença estatística entre elas, nos dois tempos experimentais (48 e 72h). Entretanto, apenas as amostras de CeSaM expressavam a citocina PDGF-BB (Figura 23). Esses dados se assemelham parcialmente com estudos desenvolvidos por Jiang e colaboradores que demonstraram que as CeSaM expressavam concentrações de PDGF significativamente maiores que as MSC-MO tanto em normóxia como em hipóxia 1% após 24 horas de incubação (JIANG *et al.*, 2013).

Já quando analisamos as citocinas presentes nos meios condicionados das CeSaM e MSC-MO, observamos que ambas as células mesenquimais secretavam a citocina VEGF-A. No entanto, em concordância com os resultados relatados por Jiang *et al.* e Wang *et al.*, observamos que essa citocina encontrava-se em concentrações significativamente maiores nas amostras de meios condicionados das MSC-MO em relação as CeSaM (JIANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2012). Nesse caso, sugerimos que grande parte dos transcritos de RNA mensageiro para citocina

VEGF nas CeSaM podem estar sendo reprimidos e não sendo traduzidos em proteína, já que a nível de expressão gênica, as CeSaM apresentaram níveis relativos de RNAm para VEGF semelhantes as MSC-MO.

Ao analisarmos a citocina bFGF, observamos que essa encontrava-se presente em ambas as amostras de CeSaM e MSC-MO avaliadas pelo ELISA, porém pela análise da Citometria de Fluxo essas citocinas estavam ausentes em quase todas as amostras. Adicionalmente, observamos o mesmo fato para a citocina PDGF-BB, que foi detectada apenas nas amostras dos meios condicionados das CeSaM avaliadas pelo ELISA. A citometria de fluxo detectou apenas a citocina PDGF-AA em algumas amostras dos sobrenadantes das células mesenquimais. Essas variações podem ser ocasionadas pelas diferenças de sensibilidades inerentes de cada uma das técnicas de análise, já que as mesmas amostras analisadas pelo ELISA foram também analisadas pela citometria de fluxo. Além disso, o ensaio de ELISA foi realizado em um tempo anterior à análise das amostras por citometria, tendo assim chances maiores de detectar as citocinas que apresentam meia-vida curta, já que ao longo do tempo essas citocinas também podem sofrer degradação. O ensaio de ELISA foi realizado cerca de três meses após o ensaio de normóxia e hipóxia com as MSC, enquanto que o ensaio de citometria foi realizado cerca de nove meses após esse ensaio para as mesmas amostras.

Diversos estudos têm documentado a capacidade das MSC de diversas fontes secretarem as citocinas identificadas neste trabalho. Em um estudo comparativo entre as células mesenquimais derivadas de polpa dentária, cordão umbilical e sangue menstrual, Ren e colaboradores demonstraram que ambas as células secretavam as citocinas VEGF, bFGF, KGF e HGF, principalmente em passagens mais avançadas (P6 e P10). Além disso, enquanto as MSC de cordão umbilical e sangue menstrual secretavam concentrações significativamente maiores de VEGF, KGF e HGF em P6 e P10, somente a MSC de polpa dentária secretavam significativamente a citocina bFGF em P6. Os autores ainda sugerem que a maior secreção dessas citocinas em passagens mais avançadas em relação à segunda passagem (P2) pode ser uma resposta ao estresse para sustentar a proliferação celular em longo prazo (REN *et al.*, 2015).

A análise das amostras por citometria de fluxo permitiu investigarmos a presença de treze citocinas relacionadas com a angiogênese. Além das que já foram

citadas acima, esta técnica também mostrou que a citocina angiopoietina-2 estava presente exclusivamente nas amostras de meios condicionados das CeSaM. A ANG-2 é uma citocina muito importante na homeostase vascular, podendo levar ao crescimento ou regressão dos vasos sanguíneos dependendo do contexto biológico (HEINKE *et al.*, 2012). Na presença do VEGF, a ANG-2 pode atuar no desprendimento das células perivasculares, facilitando a migração e invasão das *tip cells*, contribuindo para as etapas iniciais da angiogênese (ALGUSTIN *et al.*, 2009). Nesse caso, a ANG-2 pode estar intensificando o efeito angiogênico das CeSaM e compensando a menor secreção da proteína VEGF nessas amostras, já que a contribuição angiogênica dessas células nas HUVEC foi semelhante à das MSC-MO (Figura 18). Semelhantemente, outros estudos já reportaram superior capacidade das CeSaM em secretarem a citocina ANG-2 quando comparada com as células mesenquimais derivadas de cordão umbilical. Além dessa, os autores também verificaram maior secreção de VEGF, PDGF-BB e HGF nos meios de cultura das CeSaM (MENG *et al.*, 2007).

Por outro lado, quando avaliamos a citocina HGF, que é importante para proliferação e motilidade das células endoteliais, observamos que essa estava presente em maior número de amostras das MSC-MO, porém sem diferença estatística nas concentrações dessa proteína entre os dois tipos de MSC. Da mesma forma, outros grupos também relataram a capacidade das MSC-MO em secretarem altas concentrações de VEGF-A e HGF (KANG *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2012), sendo este efeito ainda maior nas condições de hipóxia e privação de soro (PAGE *et al.*, 2012).

A presença desses fatores pró-angiogênicos nos meios condicionados das células mesenquimais pode explicar o efeito parácrino observado nas HUVEC. Além disso, o fato das CeSaM secretarem ANG-2 e PDGF-BB além de VEGF-A pode indicar que essas células contribuam de uma forma mais completa para formação vascular, participando das etapas precoces e tardias da angiogênese.

A terceira parte dos nossos objetivos visou avaliar as propriedades angiogênicas intrínsecas das células mesenquimais de medula óssea e sangue menstrual. Como a migração quimiotática das células é uma importante etapa no processo angiogênico, tentamos mimetizar um microambiente de injúria tecidual *in vitro* através do ensaio de lesão por arranhadura e assim avaliar a motilidade das células, em resposta a tal estímulo. Nossos resultados mostraram que as MSC-MO

migraram mais rapidamente que as CeSaM resultando em diferenças significativas, nos tempos experimentais de 12 horas ($P < 0,01$) e 24 horas ($P < 0,05$) após a arranhadura (Figura 27). Esses resultados sugerem que as MSC-MO possam responder mais rapidamente aos fatores tróficos liberados pelas células em um determinado microambiente lesado e, por isso, são prontamente mobilizadas e guiadas até a região onde há maior gradiente desses fatores. No caso do nosso experimento *in vitro* a migração é direcionada para as bordas da “lesão”. Porém, observamos que no final do experimento (48 horas) as densidades celulares de ambas encontram-se muito próximas, indicando que as duas MSC conseguiram alcançar o mesmo ápice da migração sendo estatisticamente compatíveis. Tais resultados foram diferentes dos encontrados por Alcayaga e colaboradores, que mostraram uma habilidade migratória superior nas CeSaM em comparação as MSC-MO, nos tempos experimentais de 12 horas e 24 horas neste mesmo tipo de experimento. Entretanto, os autores não avaliaram até o tempo experimental de 48 horas (ALCAYAGA *et al.*, 2015).

O próximo passo do nosso trabalho foi estudar a resposta das células mesenquimais de sangue menstrual e medula óssea em relação às etapas iniciais da angiogênese por meio do ensaio de *sprouting*. Sabemos que o processo angiogênico é composto por múltiplas etapas sequenciais, incluindo o brotamento capilar, alongamento dos brotos, anastomose e maturação dos vasos. Porém todos estes eventos ocorrem *in vivo* quando as células endoteliais respondem as mudanças no gradiente de citocinas pró-angiogênicas, comumente em resposta as baixas concentrações de oxigênio teciduais (FOLKMAN, 2003; BRENNEN *et al.*, 2016).

Dessa forma, para avaliarmos as características angiogênicas intrínsecas das MSC, as mesmas foram avaliadas quanto à capacidade de promover o *sprouting* utilizando esferoides em cultivo 3D *in vitro*, assim como descrito por Montali e colaboradores (MONTALI *et al.*, 2017). Os esferoides de CeSaM mostraram significativamente maior capacidade de invasão na matriz circundante e formação de cordões multicelulares, em relação as MSC-MO, nos dois tempos experimentais avaliados (48 horas e 7 dias) (Figura 28). Estudos desenvolvidos por Montali *et al.*, também mostraram que as MSC-MO apresentaram uma capacidade angiogênica reduzida quando comparada com a subpopulação da medula óssea denominada célula progenitora mesangiogênica (do inglês *Mesangiogenic progenitor cells*- MPC)

avaliada por meio do ensaio de *sprouting in vitro* e por meio do modelo de membrana corioalantóica de embrião de galinha *in vivo*, onde foi verificada também uma menor contribuição para formação neovascular (MONTALI *et al.*, 2017; PETRINI *et al.*, 2009).

É importante discutirmos que no ensaio de *sprouting* utilizamos o meio EGM-2, rico em VEGF, bFGF, EGF, R3-IGF-1 dentre outros fatores que contribuem para angiogênese. No entanto, para que este processo ocorra é necessário que as células sejam ativadas pela ligação desses fatores com seus respectivos receptores e que assim inicie a cascata de eventos que culmina com a migração, proliferação e formação dos cordões multicelulares. A secreção de metaloproteinases de matriz apresenta um papel fundamental nesta fase. Diversos estudos já comprovaram a capacidade das MSC de medula óssea e de sangue menstrual em liberar metaloproteinases, tais como MMP-2, MMP-3 e MMP-10, sendo esta característica muito importante para as células migrarem no tecido e desenvolverem seu papel reparador/regenerativo (MENG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012, PAGE *et al.*, 2014). Porém, nossos resultados mostraram maior capacidade de invasão celular nas amostras de células mesenquimais do fluido menstrual, possivelmente por secretarem mais MMPs que contribuam com tal efeito. Adicionalmente, o fato das CeSaM secretarem Angiopietina-2 e as MSC-MO não (Figura 25 E e F), poderia também sugerir uma vantagem para as mesenquimais de sangue menstrual durante o ensaio de *sprouting*, já que a ANG-2 pode induzir a fosforilação de quinases de adesão focal (FAK) a partir da ligação direta com proteínas integrinas de membrana, estimulando a capacidade migratória e angiogênica dessas células (LEE *et al.*, 2014; FELCHT *et al.*, 2012).

Quando nos atentamos mais detalhadamente a frente de invasão das células durante o ensaio de *Sprouting*, observamos células com características morfológicas semelhantes às endoteliais “*tip cells*” e as “*stalk cells*”. Células das extremidades dos brotos apresentaram emissão de prolongamentos semelhantes à filopódios nas porções terminais recapitulando morfolologicamente as *tip cells*, enquanto as últimas organizavam-se de forma linear contribuindo para formação da haste do broto em crescimento semelhantemente as *stalk cells* (SIEKMANN *et al.*, 2013; NGUYEN *et al.*, 2013). Essas etapas que as células mesenquimais passaram são extremamente semelhantes às etapas que ocorrem no *sprouting* angiogênico *in vivo*, sugerindo que essas células poderiam também estar se diferenciando em um fenótipo endotelial.

Em seguida, com o intuito de investigarmos se as células que participavam do processo de brotamento, morfologicamente semelhantes às endoteliais *tip cells* e *stalk cells*, também compartilhavam características fenotípicas com células endoteliais, avaliamos a presença da molécula CD31. Células estromais mesenquimais não expressam CD31. Por isso, se as células apresentassem positivas para esta proteína poderia ser um indício de diferenciação para um fenótipo endotelial. Conforme observado na figura 31, as células parecem estar passando por um estágio de diferenciação, pois é possível verificar a presença de células positivas para molécula CD31 (Figura 31).

O potencial de diferenciação endotelial das células mesenquimais parece bastante controverso na literatura. Diversos estudos já demonstraram esta transição, porém tanto os protocolos utilizados pelos autores como os tecidos nos quais as células mesenquimais são extraídas causam grande variabilidade nos resultados (CRISAN, 2013). Em artigo recente, Sheng *et al.*, demonstraram o potencial de diferenciação endotelial cultivando as MSC-MO em hipóxia por 7 dias, verificando também presença de CD31 por imunofluorescência (SHENG *et al.*, 2017). Utilizando ainda outro protocolo para indução endotelial, Oswald *et al* demonstraram que as MSC-MO poderiam adquirir um fenótipo endotelial expressando vWF, receptores para VEGF 1 e 2 (FLT-1 e KDR), VE-caderina e VCAM-1 após 7 dias de cultivo em meio suplementado com 50 ng/ml de VEGF, porém as células não foram positivas para CD31 e CD34, sugerindo que estes marcadores fossem expressos em etapas mais tardias da maturação endotelial (OSWALD *et al*, 2004). Similarmente, outros autores também já demonstraram o potencial de diferenciação endotelial das células mesenquimais derivadas do endométrio uterino cultivando-as por 21 dias em meio de indução endotelial. Após este período as células apresentaram-se positivas para as moléculas de superfície CD34 e CD62 avaliadas por imunofluorescência (MENG *et al.*, 2007).

Visto as propriedades angiogênicas das células mesenquimais de medula óssea e sangue menstrual *in vitro*, a quarta parte do estudo buscou avaliar a plasticidade e propriedade angiogênica das CeSaM e MSC-MO, enxertadas em embriões de galinha. O microambiente embrionário apresenta diversas vantagens em relação ao adulto, pois nesta fase de desenvolvimento as células são expostas a estímulos e vias de sinalizações variadas, permitindo-nos interpretar o comportamento celular em resposta aos sinais embrionários durante a morfogênese

do embrião. Além disso, o modelo de embrião de galinha foi considerado ideal para estudo das células humanas, pois são amniotas, vertebrados superiores como os mamíferos, desenvolvem-se a 37°C, não apresentam rejeição imunológica até fases tardias do desenvolvimento e permitem o transplante de células em regiões precisas do corpo, amplificando suas possibilidades de estudo. O modelo de xenoenxerto de células humanas em embriões de galinha vem sendo utilizado com diferentes abordagens por diversos grupos de pesquisa, estudando desde células-tronco embrionárias às células-tronco adultas e células tumorais (GOLDENSTEIN *et al.*, 2010; CORDEIRO *et al.*, 2015; KULESA *et al.*, 2006).

Neste trabalho propomos enxertar células mesenquimais derivadas do sangue menstrual e de medula óssea nos embriões de galinha em E1,5-2 (dia embrionário 1,5-2), buscando investigar se essas células poderiam participar dos eventos relacionados com a vasculogênese embrionária que ocorrem nesta fase de desenvolvimento. É importante que a região escolhida para avaliação da resposta celular seja apropriada e coerente com o que queremos estudar, já que as células receberão estímulos daquela região onde foram transplantadas e esses sinais instrutivos podem influenciar seu potencial de migração, plasticidade e destino celular, permitindo-as adotarem diferentes nichos no organismo do hospedeiro. Por essas razões, a região escolhida para o enxerto das MSC foi o mesoderma paraxial pré-somítico, na região do mesoderma que dará origem aos somitos cervicais no nível do broto da asa (15^a-20^a somitos) (CHEVALLIER *et al.*, 1978).

Os somitos são blocos de células mesodérmicas localizadas em ambos os lados do tubo neural (Figura 37A), responsáveis por produzir muitos tecidos conjuntivos que compõem as costas, tais como: músculo, cartilagem, osso, derme e inclusive endotélio (GILBERT, 2003). À medida que o embrião se desenvolve ocorre também maturação dos somitos e cada região do somito se comprometerá em formar somente certos tipos celulares. Sendo assim, o somito pode ser dividido em três porções principais: o esclerótomo, miótomo e o dermatomo (Figura 37).

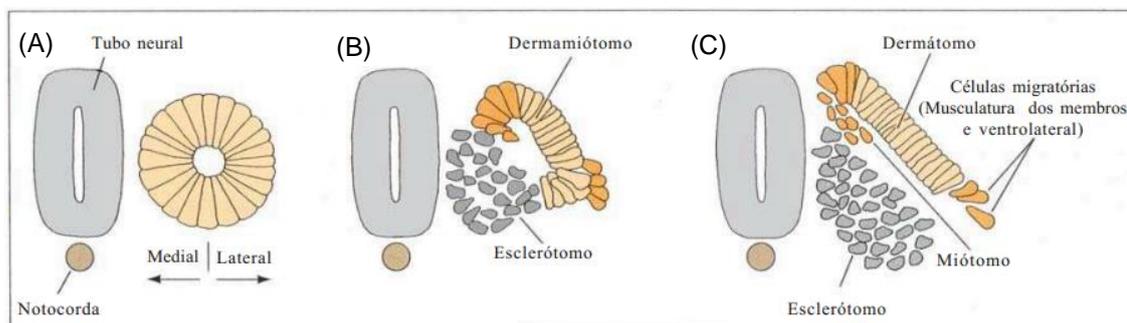


Figura 37: Ilustração das estruturas que compõem o somito e os eventos de migração e diferenciação celular que ocorrem no embrião de galinha (Adaptado de GILBERT, 2003).

As células do esclerótomo localizadas na porção mediano-ventral do somito (próximas ao tubo neural) transformam-se principalmente em condrócitos vertebrais, responsáveis pela construção do esqueleto axial (vértebras, costelas, cartilagem e ligamentos) (Figura 37B). Lateralmente ao esclerótomo (região mais distante do tubo neural) encontramos uma sólida camada epitelial dupla chamada dermamiótomo. A camada interna desta estrutura originará o miótomo, responsável por formar principalmente os precursores dos músculos, dos membros e da musculatura do corpo (músculos vertebrais que circundam as vértebras permitindo que as costas se curvem). A camada dorsal dessa estrutura é chamada de dermátomo, sendo a responsável principalmente pela geração do tecido conectivo mesenquimatoso da pele dorsal: a derme. (Figura 37C) (GILBERT, 2003). Além de todas estas especializações celulares nestas regiões, no mesoderma paraxial também podem ocorrer eventos como hematopoiese intraembrionária (DE BRUIJN *et al.*, 2000) e vasculogênese a partir de células precursoras endoteliais (angioblastos) que surgem do esclerótomo e dermamiótomo (PARDANAUD *et al.*, 1996; CHRIST *et al.*, 2009), sendo assim uma região promissora para as investigações do potencial angiogênico das células mesenquimais envolvidas no nosso estudo.

O método utilizado neste trabalho para identificação das células humanas nos tecidos dos embriões de galinha foi o da hibridização *in situ* com sondas *Alu*. Os elementos *Alu* são segmentos de DNA, também conhecidos como retrotransposons, capazes de se deslocar de um sítio a outro do genoma, estando presentes de forma exclusiva em primatas, compondo cerca de 10% do genoma humano (BATZER & DEININGER, 2002). Dessa forma, a hibridização *in situ* com sondas *Alu* representou

um ótimo método para distinção do material genético humano e vem sendo utilizada desde 1994 para identificação de células humanas transplantadas em tecidos animais adultos (JACOBSEN *et al.*, 1994; JUST *et al.*, 2003; WARNCKE *et al.*, 2004; STECK *et al.*, 2010) e mais recentemente também em tecidos embrionários (CORDEIRO *et al.*, 2015).

Neste trabalho, foi possível localizar células mesenquimais derivadas do sangue menstrual humano utilizando sondas de DNA para sequências *Alu* em embriões E4,5-5. Nossos resultados mostraram que as células, transplantadas na forma de esferoides na região dos somitos, conseguiram migrar para diferentes tecidos do hospedeiro, respondendo de forma particular aos diversos sinais embrionários. Interessantemente, observamos que as células mesenquimais de sangue menstrual migraram para regiões perivascularares, associando-se a parede do endotélio da aorta dorsal do embrião de galinha E4,5 (Figura 33 A'') (4,3%, n=1). Esse resultado sugere que as células mesenquimais possam participar de eventos relacionados à vasculogênese embrionária, contribuindo para maturação e estabilização vascular comportando-se como pericitos possivelmente derivados da porção do esclerótomo somítico (POUGET *et al.*, 2008).

O nicho perivascular das células mesenquimais humanas no indivíduo adulto já foi descrito por diversos pesquisadores e é atualmente aceito na comunidade científica (CRISAN *et al.*, 2008; MEIRELLES *et al.*, 2008; SHI & GRONTHOS, 2003; SACHETTI *et al.*, 2007). Além disso, alguns autores vêm sugerindo uma possível localização perivascular para as CeSaM *in vivo* na camada basal e funcional do endométrio humano, devido a expressão de marcadores de pericitos como CD146, PDGFR- β e SUSD-2 além dos marcadores mesenquimais (SCHWAB e GARGETT *et al.*, 2007; SCHURING *et al.* 2011; SPITZER *et al.*, 2012; MASUDA *et al.*, 2012). Isso reforça a ideia de que o microambiente embrionário de galinha também pode ser utilizado para verificar o potencial ou nicho das células humanas *in vivo* (CORDEIRO *et al.*, 2015).

Além do nicho perivascular, células mesenquimais de sangue menstrual também foram encontradas em regiões perineurais nas redondezas do tubo neural e raiz ventral (Figura 34 A'' e B'') (56,5%, n=13). Vale destacar que, esses são locais onde serão formadas as meninges que revestem o sistema nervoso central (neste caso que revestem a medula espinhal). As principais funções das meninges são proteger o sistema nervoso central e promover suprimento sanguíneo ao mesmo.

Nimmagadda e colaboradores observaram que o primeiro passo no desenvolvimento das meninges da medula espinhal é a expressão do receptor VEGFR-2 nas células derivadas do esclerótomo imediatamente adjacentes a superfície lateral do tubo neural (NIMMAGADDA *et al.*, 2004). Isso ocorre devido aos sinais que são liberados pelo tubo neural durante esta fase de desenvolvimento, incluindo VEGFA e BMP4, os quais recrutam angioblastos derivados do esclerótomo e induzem a formação dos primeiros vasos sanguíneos do plexo vascular perineural (CHRIST *et al.*, 2009; KURZ *et al.*, 1996). Curiosamente, 56,5% das CeSaM foram encontradas nessas regiões, sugerindo que essas células podem estar respondendo aos sinais secretados pelo tubo neural nesta fase de desenvolvimento, que inclusive podem ser estímulos pró-angiogênicos.

É importante ressaltar que apesar de termos enxertado esferoides de células no mesoderma paraxial, lateral ao tubo neural, não foram observados agregados celulares marcados com sonda *Alu* nessas regiões. Isso pode ser um indício de que as células tenham migrado para regiões diversas do hospedeiro respondendo aos sinais embrionários. Contudo, existe ainda a possibilidade dessas células estarem nessas regiões pelo simples fato de terem migrado pouco, já que foram transplantadas em territórios próximos ao tubo neural.

Ainda em regiões perineurais, observamos que 30,4% das CeSaM *Alu* positivas encontravam-se associadas aos nervos periféricos do sistema nervoso (n=7) (Figura 35 A' e A''). Resultados semelhantes foram encontrados por Cordeiro *et al.*, no qual observaram que cerca de 90% das células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) transplantadas também na região do tronco do embrião E1,5 encontravam-se em nichos perineurais. Nesse trabalho, os autores sugeriram algumas hipóteses para essa resposta celular. A primeira hipótese foi que as células mesenquimais poderiam estar sendo recrutadas pelos nervos em desenvolvimento, para formarem o perineuro, uma bainha de tecido conjuntivo que envolve nervos periféricos. Já na segunda hipótese, foi sugerido que as MSC poderiam estar se comportando como células gliais derivadas da crista neural, já que essas foram capazes de acompanhar a rota migratória das células derivadas de crista neural do hospedeiro (CORDEIRO *et al.*, 2015). No nosso trabalho as CeSaM responderam de forma semelhante, já que também observamos um grande tropismo para essas regiões perineurais. E acrescentamos ainda que essas células poderiam estar sendo recrutadas para regiões presumidas do epineuro, que é a camada mais externa de

tecido conjuntivo que envolve os nervos, constituída principalmente por colágeno tipo I, fibroblastos e vasos sanguíneos.

Além dessas considerações, a mobilização e recrutamento de células mesenquimais para regiões perineurais pode também sugerir que essas células participem de tais eventos *in vivo* no organismo adulto, contribuindo para processos de reparo no tecido nervoso. A diferenciação das células mesenquimais de endométrio em células com fenótipo neural também já foi testada *in vitro* por alguns pesquisadores, comprovando também essa potencialidade (MENG *et al.*, 2007; EBRAHIMI-BAROUGH *et al.*, 2013). Entretanto, o potencial de diferenciação *in vivo* das células mesenquimais de sangue menstrual nas linhagens neurais ou nas linhagens celulares derivadas do somito (cartilagem, osso, músculo, derme e endotélio) não foram testadas neste trabalho, sendo uma possibilidade para futuros estudos envolvendo essas células.

Células mesenquimais de sangue menstrual também apresentaram um tropismo para regiões presuntivas condrogênicas do embrião de galinha, já que 8,6% dessas células foram encontradas em territórios próximos a notocorda (em contato direto ou nas suas adjacências) (Figura 36 A') (8,6%; n=2). A notocorda é um tecido transitório do embrião cuja principal função inclui a indução da formação do tubo neural e estabelecimento do eixo corporal ântero-posterior, médio-lateral e da simetria bilateral. Porém, à medida que o embrião se desenvolve, as células originárias do esclerótomo migram para as regiões proximais da notocorda substituindo-a com o intuito de formar o esqueleto axial, representado pelas vértebras (GILBERT, 2003). Parte das células do esclerótomo se condensa ao redor da notocorda e tubo neural, realizando ossificação endocondral em estágios mais tardios. Por isso, o fato de encontrarmos células mesenquimais nessas regiões significa que as mesmas também podem responder aos fatores envolvidos no comprometimento das linhagens esqueléticas, tais como *sonic hedgehog (shh)* e *noggin*, secretados pela notocorda e assoalho do tubo neural neste estágio embrionário (CHRIST *et al.*, 2009). Esses resultados corroboraram mais uma vez com o potencial das células mesenquimais já descrito na literatura, que quando são expostas a fatores indutores específicos podem se diferenciar em células derivadas de cartilagem e osso (MENG *et al.*, 2007, BORLONGAN *et al.*, 2008, ASENSI *et al.*, 2014).

Apesar de esses resultados serem promissores, a quantidade total de células encontradas nos embriões foi muito pequena em relação à quantidade de células transplantadas, já que enxertamos um esferoide contendo cerca de 100 células e encontramos no máximo quatorze CeSaM *Alu* positivas em um embrião. Além disso, as células mesenquimais de medula óssea não foram encontradas em nenhum dos embriões analisados (n=4). Uma possibilidade para esse resultado é que essas células não tenham conseguido sobreviver ao transplante e por isso não conseguimos encontrá-las. Apesar disso, não consideramos que esse resultado possa ter acontecido por deficiência na marcação com as sondas *Alu*, já que as mesmas já foram testadas e funcionaram em diversos tipos de células humanas utilizadas nos estudos realizados pelo Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular/ICB, com o qual realizamos colaboração.

6. Conclusões

De acordo com os dados descritos neste trabalho, podemos concluir que:

- Ambos os meios condicionados das CeSaM e MSC-MO foram capazes de estimular a formação de redes de estruturas tubulares e migração quimiotática nas HUVEC independente da disponibilidade de oxigênio no ambiente, sugerindo que ambas as MSC possam contribuir eficientemente para a angiogênese em diversas condições do microambiente, inclusive na privação de oxigênio.
- Os efeitos parácrinos positivos nas células endoteliais foram atribuídos à expressão e secreção de fatores pró-angiogênicos pelas células mesenquimais. Das treze citocinas angiogênicas analisadas neste trabalho, observamos que principalmente seis citocinas estavam presentes nos meios de cultura das CeSaM (VEGF-A, bFGF, PDGF-AA, PDGF-BB, ANG-2, HGF) enquanto que quatro estavam presentes nas amostras de MSC-MO (VEGF-A, bFGF, PDGF-AA, HGF). Além disso, observamos que enquanto as MSC-MO secretaram concentrações significativamente maiores de VEGF, as CeSaM secretaram ainda ANG-2 e PDGF-BB, sugerindo uma contribuição angiogênica mais completa, podendo participar tanto da formação como remodelamento vascular.
- As MSC-MO migram mais rápido nos instantes iniciais após lesão tecidual *in vitro*, entretanto, ao final ambos os tipos celulares alcançam a mesma densidade de células.
- As CeSaM demonstraram maior capacidade de invasão na matriz circundante e de formação de cordões multicelulares em cultivo tridimensional em meio endotelial. Entretanto, ambas as células mesenquimais foram capazes de apresentar determinadas características semelhantes às células endoteliais durante o *sprouting* angiogênico, visto pela semelhança as *tip* e *stalk cells* e expressão de CD31.
- No modelo de xenoenxerto em embrião de galinha, as CeSaM demonstraram capacidade de migrar e se integrar nos tecidos do hospedeiro, respondendo de forma particular aos diversos sinais embrionários. O fato de termos

encontrado CeSaM *Alu* positiva em região perivascular pode sugerir também participação na vasculogênese embrionária. Além disso, essas células também apresentaram um tropismo para regiões perineurais e condrogênicas mostrando suas versatilidades *in vivo*.

Por fim, podemos sugerir que as CeSaM podem vir a ser uma boa alternativa para angiogênese terapêutica, verificada principalmente por suas propriedades angiogênicas intrínsecas e parácrinas *in vitro* e por seu método de obtenção ser menos invasivo em comparação com as MSC-MO.

Referências Bibliográficas

ALCAYAGA-MIRANDA, F., *et al.* Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 6, n. 1, 2015.

ALLICKSON, J. G. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *The Open Stem Cell Journal*, v. 3, n. 1, p. 4–10, 2011.

AQMASHEH, S., *et al.* Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Advanced pharmaceutical bulletin*, v. 7, n. 2, p. 165, 2017.

ASAHARA, T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*, v. 275, n. 5302, p. 964–966, 1997.

ASENSI, K. D., *et al.* Reprogramming to a pluripotent state modifies mesenchymal stem cell resistance to oxidative stress. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 18, n. 5, p. 824–831, 2014.

ASHTON, B. A., *et al.* Formation of Bone and Cartilage by Marrow Stromal Cells in Diffusion Chambers in Vivo. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.151, p. 294-307, 1980.

AUGUSTIN, H. G., *et al.* Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nature reviews. Molecular cell biology*, v. 10, n. 3, p. 165, 2009.

BADER, A. M., *et al.* Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *PloS one*, v. 10, n. 9, p. e0138477, 2015.

BALAJI, S., *et al.* The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 2, n. 6, p. 283–295, 2013.

BALAJI, S., *et al.* Tissue-engineered provisional matrix as a novel approach to enhance diabetic wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v. 20, n. 1, p. 15–27, 2011.

BARANSKA, P., *et al.* Expression of integrins and adhesive properties of human endothelial cell line EA. hy 926. *Cancer Genomics-Proteomics*, v. 2, n. 5, p. 265-269, 2005.

BATZER, M. A.; DEININGER, P. L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature reviews genetics*, v. 3, n. 5, p. 370-379, 2002.

BOCKERIA, L., *et al.* Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *Journal of Translational Medicine*, v. 11, n. 1, p. 56, 2013.

BORLONGAN, C. V., *et al.* Menstrual Blood Cells Display Stem Cell–Like Phenotypic Markers and Exert Neuroprotection Following Transplantation in Experimental Stroke. *Stem Cells and Development*, v. 19, n. 4, p. 439–452, 2010.

BOUÏS, D., *et al.* Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis*, v. 4, n. 2, p. 91-102, 2001.

BRAHIMI-HORN, M. C., & POUYSSÉGUR, J. Harnessing the hypoxia-inducible factor in cancer and ischemic disease. *Biochemical pharmacology*, v. 73, n. 3, p. 450-457, 2007.

BRENNEN, W. N., *et al.* Assessing angiogenic responses induced by primary human prostate stromal cells in a three-dimensional fibrin matrix assay. *Oncotarget*, v. 7, n. 44, p. 71298, 2016.

BRITO, J. M.; TEILLET, M.-A.; LE DOUARIN, N. M. Induction of mirror-image supernumerary jaws in chicken mandibular mesenchyme by Sonic Hedgehog - producing cells. *Development*, v. 135, n. 13, p. 2311–2319, 2008.

BRUIJN, M. F. D. Definitive hematopoietic stem cells first develop within the major arterial regions of the mouse embryo. *The EMBO Journal*, v. 19, n. 11, p. 2465–2474, 2000.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells and women's health. *Menopause*, v. 22, n. 2, p. 131–135, 2015.

CARMELIET, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of Internal Medicine*, v. 255, n. 5, p. 538–561, 2004.

CARMELIET, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine*, v. 6, n. 4, p. 389, 2000.

CARMELIET, P., *et al.* Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 6, n. 6, p. 315–326, 2009.

CHAMBERLAIN, G., *et al.* Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.

CHAN, R. W.; SCHWAB, K. E.; GARRETT, C. E. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells¹. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 6, p. 1738–1750, 2004.

CHEN, X. I.; ARMSTRONG, M. A.; LI, G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. *Immunology and cell biology*, v. 84, n. 5, p. 413, 2006.

CHEVALLIER, A.; KIENY, M.; MAUGER, A. Limb-somite relationship: effect of removal of somitic mesoderm on the wing musculature. *Development*, v. 43, n. 1, p. 263-278, 1978.

CHRIST, B.; SCAAL, M. Formation and Differentiation of Avian Somite Derivatives. *Advances in Experimental Medicine and Biology Somitogenesis*, v. 638, p. 1–41, 2008.

CORDEIRO, I. R., *et al.* Chick embryo xenograft model reveals a novel perineural niche for human adipose-derived stromal cells. *Biology open*, p. bio. 010256, 2015.

CRISAN, M. Transition of mesenchymal stem/stromal cells to endothelial cells. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, n. 4, p. 95, 2013.

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

CULLING, Charles Frederick Albert. *Handbook of histopathological and histochemical techniques: including museum techniques*. Butterworth-Heinemann, 1974.

DAS, M.; SUNDELL, I. B.; KOKA, P. S. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. *Journal of stem cells*, v. 8, n. 1, p. 1, 2013.

DISTLER, J. H. W., *et al.* Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, v. 47, n. 3, p. 149, 2003.

DOMINICI, M., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

EBRAHIMI-BAROUGH, S., *et al.* Differentiation of Human Endometrial Stromal Cells into Oligodendrocyte Progenitor Cells (OPCs). *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 51, n. 2, p. 265–273, 2013.

FELCHT, M., *et al.* Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 6, p. 1991–2005, 2012.

FOLKMAN, J. Fundamental Concepts of the Angiogenic Process. *Current Molecular Medicine*, v. 3, n. 7, p. 643–651, 2003.

FRANCKI, A., *et al.* Angiogenic properties of human placenta-derived adherent cells and efficacy in hindlimb ischemia. *Journal of vascular surgery*, v. 64, n. 3, p. 746-756. e1, 2016.

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

GARGETT, C. Uterine stem cells: What is the evidence? *Human Reproduction Update*, v. 13, n. 1, p. 87–101, 2006.

GERHARDT, H., *et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, v. 161, n. 6, p. 1163–1177, 2003.

GILBERT, Scott F. *Biologia do desenvolvimento - 5.ed. -* Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora. Cap. 9: 341-347, 2003.

GOLDENBERG, R. C. S.; CARVALHO, A. C. C. *Células-tronco Mesenquimais - Conceitos, Métodos De Obtenção e Aplicações.* Rio de Janeiro, RJ. Editora Atheneu. Cap 2: 10-11, 2012.

GOLDSTEIN, R. S. Transplantation of Mammalian Embryonic Stem Cells and Their Derivatives to Avian Embryos. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 6, n. 3, p. 473–483, 2010.

GRAHAM, C. D.; FAUZA, D. O. Isolation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid and placenta. *Current protocols in stem cell biology*, p. 1E. 2.1-1E. 2.14, 2007.

GRONTHOS, S., *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, v. 88, n. 1, p. 49–92, 1951.

HANAHAHAN, D; FOLKMAN, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell*, v. 86, n. 3, p. 353–364, 1996.

HARRIS, D. T., *et al.* The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert opinion on biological therapy*, v. 7, n. 9, p. 1311-1322, 2007.

HEINKE, J. Life is a pattern: vascular assembly within the embryo. *Frontiers in Bioscience*, v. E4, n. 1, p. 2269, 2012.

HIDA, N., *et al.* Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 7, p. 1695–1704, 2008.

HRISTOV, M.; ERL, W.; WEBER, P. C. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends in cardiovascular medicine*, v. 13, n. 5, p. 201-206, 2003.

HUNG, S. C., *et al.* Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem cells*, v. 25, n. 9, p. 2363-2370, 2007.

ISNER, J. M., *et al.* Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, v. 91, n. 11, p. 2687-2692, 1995.

IWASE, T., *et al.* Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovascular Research*, v. 66, n. 3, p. 543–551, 2005.

JACOBSEN, P.; DALY, J. A Method for Distinguishing Human and Mouse Cells in Solid Tumors Using in Situ Hybridization. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 61, n. 3, p. 212–220, 1994.

JIANG, Z., *et al.* Human endometrial stem cells confer enhanced myocardial salvage and regeneration by paracrine mechanisms. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 17, n. 10, p. 1247-1260, 2013.

JÓŹWIAK, P., *et al.* O-GlcNAcylation and metabolic reprogramming in cancer. *Frontiers in endocrinology*, v. 5, n. 145, 2014.

JUNQUEIRA L. C; CARNEIRO J. *Histologia Básica* [12 ed]. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan S.A. Cap 13: 234-249, 2013.

JUST, L., *et al.* Identification of human cells in brain xenografts and in neural co-cultures of rat by in situ hybridisation with Alu probe. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 126, n. 1, p. 69–77, 2003.

KANG, W. C., *et al.* Increasing injection frequency enhances the survival of injected bone marrow derived mesenchymal stem cells in a critical limb ischemia animal model. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, v. 20, n. 6, p. 657, 2016.

KARANTALIS, V., *et al.* Autologous Mesenchymal Stem Cells Produce Concordant Improvements in Regional Function, Tissue Perfusion, and Fibrotic Burden When Administered to Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients

Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) Trial. *Circulation Research*, v. 114, n. 8, p. 1302–1310, 2014.

KASAI-BRUNSWICK, H. T. Caracterização morfofuncional das células de medula óssea de pacientes submetidos à terapia celular. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia). Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, 2009.

KATO, K., *et al.* Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Human Reproduction*, v. 22, n. 5, p. 1214–1223, 2007.

KULESA, P. M., *et al.* Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 10, p. 3752–3757, 2006.

KURZ, H., *et al.* First Blood Vessels in the Avian Neural Tube Are Formed by a Combination of Dorsal Angioblast Immigration and Ventral Sprouting of Endothelial Cells. *Developmental Biology*, v. 173, n. 1, p. 133–147, 1996.

LEE, H. S. *et al.* Gln-362 of Angiopoietin-2 Mediates Migration of Tumor and Endothelial Cells through Association with $\alpha 5\beta 1$ Integrin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 45, p. 31330–31340, 2014.

LEE, J.-W., *et al.* A Randomized, Open-Labeled, Multicenter Trial For Safety And Efficacy Of Intracoronary Adult Human Mesenchymal Stem Cells After Acute Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 57, n. 14, 2011.

LI, J.; ZHANG, Y.-P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy Research and Technique*, v. 60, n. 1, p. 107–114, 2003.

LIDINGTON, E., *et al.* A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transplant Immunology*, v. 7, n. 4, p. 239–246, 1999.

LOSORDO, D. W. Therapeutic Angiogenesis and Vasculogenesis for Ischemic Disease: Part I: Angiogenic Cytokines. *Circulation*, v. 109, n. 21, p. 2487–2491, 2004.

LU, D., *et al.* Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 92, n. 1, p. 26–36, 2011.

MA, S., *et al.* Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death & Differentiation*, v. 21, n. 2, p. 216–225, 2014.

MASUDA, H., *et al.* A Novel Marker of Human Endometrial Mesenchymal Stem-Like Cells. *Cell Transplantation*, v. 21, n. 10, p. 2201–2214, 2012.

MATHIASSEN, A. B., *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *European Heart Journal*, v. 36, n. 27, p. 1744–1753, 2015.

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

MENG, X., *et al.* Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of translational medicine*, v. 5, n. 1, p. 57, 2007.

MONTALI, M., *et al.* Human adult mesangiogenic progenitor cells reveal an early angiogenic potential, which is lost after mesengenic differentiation. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 8, n. 1, p. 106, 2017.

MURPHY, M. P., *et al.* Allogeneic endometrial regenerative cells: An "Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *Journal of Translational Medicine*, v. 6, n. 1, p. 45, 2008.

NAGAYA, N. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, v. 287, n. 6, 2004.

NGUYEN, D.-H. T., *et al.* Biomimetic model to reconstitute angiogenic sprouting morphogenesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 17, p. 6712–6717, 2013.

NIMMAGADDA, S., *et al.* Expression pattern of VEGFR-2 (Quek1) during quail development. *Anatomy and embryology*, v. 208, n. 3, p. 219-224, 2004.

OSWALD, J., *et al.* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells*, v. 22, n. 3, p. 377-384, 2004.

OUMA, G. O., *et al.* Targets and delivery methods for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease. *Vascular Medicine*, v. 17, n. 3, p. 174–192, 2012.

PADYKULA, H. A. Regeneration in the Primate Uterus: The Role of Stem Cells In: *Biology of the Uterus*. Springer US. p. 279-288, 1989.

PAGE, P., *et al.* Effect of Serum and Oxygen Concentration on Gene Expression and Secretion of Paracrine Factors by Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Cell Biology*, v. 2014, p. 1–7, 2014.

PARDANAUD, L., *et al.* Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. *Development*, v. 122, n. 5, p. 1363-1371, 1996.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual review of biomedical engineering*, v. 12, p. 87-117, 2010.

PARK, J. H., *et al.* Human Endometrial Cells Express Elevated Levels of Pluripotent Factors and Are More Amenable to Reprogramming into Induced Pluripotent Stem Cells. *Endocrinology*, v. 152, n. 3, p. 1080–1089, 2011.

PARKER, A. M.; KATZ, A. J. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 6, n. 6, p. 567–578, 2006.

PATEL, A. N., *et al.* Multipotent Menstrual Blood Stromal Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation. *Cell Transplantation*, v. 17, n. 3, p. 303–311, 2008.

PATEL, A. N.; SILVA, F. Menstrual blood stromal cells: the potential for regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, v. 3, n. 4, p. 443–444, 2008.

PETRINI, M., *et al.* Identification and purification of mesodermal progenitor cells from human adult bone marrow. *Stem cells and development*, v. 18, n. 6, p. 857–866, 2009.

PITTENGER, M. F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.

POTENTE, Michael; GERHARDT, Holger; CARMELIET, Peter. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 873–887, 2011.

POUGET, C.; POTTIN, K.; JAFFREDO, T. Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo. *Developmental Biology*, v. 315, n. 2, p. 437–447, 2008.

RASTEGAR, F., *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World journal of stem cells*, v. 2, n. 4, p. 67, 2010.

REHMAN, J., *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, v. 109, n. 10, p. 1292–1298, 2004.

REN, H., *et al.* Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells International*, v. 2016, p. 1–13, 2016.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. v. 386 n. 6626, p. 671-4, 1997.

ROBEY, T. E., *et al.* Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 45, n. 4, p. 567-581, 2008.

RODRIGUES, C. D., *et al.* Human menstrual blood-derived mesenchymal cells as a cell source of rapid and efficient nuclear reprogramming. *Cell Transplant.*; v. 21, n.10, p. 2215-24, 2012.

RONCALLI, J. G., *et al.* Endothelial progenitor cells in regenerative medicine and cancer: a decade of research. *Trends in Biotechnology*, v. 26, n. 5, p. 276–283, 2008.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 9, n. 2, p. 267-285, 2005.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 9, n. 2, p. 267-285, 2005.

SACCHETTI, B., *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, v. 131, n. 2, p. 324-336, 2007.

SANZ-NOGUÉS, C.; O'BRIEN, T. In vitro models for assessing therapeutic angiogenesis. *Drug discovery today*, v. 21, n. 9, p. 1495-1503, 2016.

SCHÜRING, A. N., *et al.* Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility*, v. 95, n. 1, p. 423–426, 2011.

SCHWAB, K.; GARGETT, C. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Human Reproduction*, v. 22, n. 11, p. 2903–2911, 2007.

SCHWEIZER, R., *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improve vascular regeneration and reduce leukocyte-endothelium activation in critical ischemic murine skin in a dose-dependent manner. *Cytotherapy*, v. 16, n. 10, p. 1345–1360, 2014.

SHENG, L., *et al.* Effect of the PI3K/AKT signaling pathway on hypoxia-induced proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 13, n. 1, p. 55–62, 2016.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 18, n. 4, p. 696–704, 2003.

SIEKMANN, A. F.; AFFOLTER, M.; BELTING, H.-G. The tip cell concept 10 years after: New players tune in for a common theme. *Experimental Cell Research*, v. 319, n. 9, p. 1255–1263, 2013.

SIEVEKING, D. P.; NG, MARTIN. K. C. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vascular Medicine*, v. 14, n. 2, p. 153-166, 2009.

SITE OMS: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Acesso em: 28 de setembro 2017.

SITE SBC: <http://www.cardiometro.com.br/anteriores.asp> Acesso em: 28 de setembro de 2017.

SORDI, V. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood*, v. 106, n. 2, p. 419–427, 2005.

SOTIROPOULOU, P. A., *et al.* Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells. *Stem Cells*, v. 24, n. 1, p. 74–85, 2006.

SPITZER, T. L., *et al.* Perivascular Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells Express Pathways Relevant to Self-Renewal, Lineage Specification, and Functional Phenotype¹. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 2, 2012.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *The Journal of Pathology*, v. 200, n. 4, p. 448–464, 2003.

STECK, E., *et al.* Discrimination between cells of murine and human origin in xenotransplants by species specific genomic in situ hybridization. *Xenotransplantation*, v. 17, n. 2, p. 153–159, 2010.

SUN, P., *et al.* Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice. *Journal of translational medicine*, v. 14, n. 1, p. 28, 2016.

SUZUKI, H.; ISO, Y. Clinical Application of Vascular Regenerative Therapy for Peripheral Artery Disease. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1–6, 2013.

TAKAHASHI, K., *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells From Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 63, n. 3, p. 153, 2008.

TAO, H., *et al.* Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells International*, v. 2016, p. 1–11, 2016.

TATEISHI-YUYAMA, E., *et al.* Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *The Lancet*, v. 360, n. 9331, p. 427–435, 2002.

UNGER, R. E., *et al.* In Vitro Expression of the Endothelial Phenotype: Comparative Study of Primary Isolated Cells and Cell Lines, Including the Novel Cell Line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research*, v. 64, n. 3, p. 384–397, 2002.

VINCENT, M.; THIERY, J-P. A cell surface marker for neural crest and placodal cells: further evolution in peripheral and central nervous system. *Developmental biology*, v. 103, n. 2, p. 468-481, 1984.

WANG, T., *et al.* Mesenchymal stem cells improve outcomes of cardiopulmonary resuscitation in myocardial infarcted rats. *Journal of molecular and cellular cardiology*, v. 46, n. 3, p. 378-384, 2009.

WARNCKE, B., *et al.* Experimental rat model for therapeutic retinal pigment epithelium transplantation unequivocal microscopic identification of human donor cells by in situ hybridisation of human-specific Alu sequences. *Virchows Archiv*, v. 444, n. 1, p. 74–81, 2004.

WOLFF, E. F., *et al.* Demonstration of Multipotent Stem Cells in the Adult Human Endometrium by In Vitro Chondrogenesis. *Reproductive Sciences*, v. 14, n. 6, p. 524–533, 2007.

WU, Yaojiong *et al.* Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells*, v. 25, n. 10, p. 2648-2659, 2007.

XU, Y., *et al.* A prosurvival and proangiogenic stem cell delivery system to promote ischemic limb regeneration. *Acta biomaterialia*, v. 31, p. 99-113, 2016.

YAMASHITA, J., *et al.* Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature*, v. 408, n. 6808, p. 92, 2000.

ZHONG, Z. *et al.* Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *Journal of Translational Medicine*, v. 7, n. 1, p. 15, 2009.

Anexo A – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:

Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associado

Secretário:

Zumara Rodrigues da Silva
Professor

Membros Titulares:

- Beatriz Maria Alasia de Heredia
Antropólogo - Prof. Associado
- Carlos Henrique Fernandes Castelpoggi
Médico - Especialista
- Eliza Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
- Helena Warzynsky
Representante dos Usuários
- Luzia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
- Marco Antonio Alves Brasil
Médico - Professor Adjunto
- Mario Teveira Antonio
Farmacêutico - Especialista
- Nuzimar Conceição Fernandes
Médico - Prof. Adjunto
- Paulo Feijó Barros
Médico - Prof. Assistente
- Roberto Coury Pedrosa
Médico - Doutor

Membros Suplentes:

- Anna Paola Trindade Rocha Pierucci
Nutricionista - Professor Auxiliar
- Beatriz Moritz Trope
Médico - Doutora
- Carlos Alberto Guimarães
Médico - Prof. Associado
- Cecília de Assis Martinusso
Jornalismo
- Lucia Helena Luiza Vieira Amim
Biólogo - Mestre
- Maria da Conceição Lopes Buarque
Assistente Social
- Marangélica Oliveira da Silva
Enfermeiro
- Michel Jean-Marie Thiollet
Sociólogo - Prof. Adjunto
- Nathalia Henrique Silva Canedo
Médico - Professor Adjunto
- Renan Moritz Varner Rodrigues Almeida
Engenheiro - Professor Adjunto
- Maria Bernadete Tavares Soares
Representante dos Usuários
- Rui Haddad
Médico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO - n.º408/09

Rio de Janeiro, 01 de Junho de 2009.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Prof^a. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 043 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 056/09 - CEP

Título: "Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco."

Pesquisador (a) responsável: Prof^a. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Data de apreciação do parecer: 28/05/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 28/11/2009, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n.º 196/96 - CNS/MS).

Atenciosamente,

Prof^a. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da segurança do uso de formulações celulares humanas em terapia celular para o tratamento de infarto agudo do miocárdio em modelo pré-clínico.

Pesquisador:

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 26046414.7.0000.5253

Instituição Proponente: Hospital Federal de Bonsucesso - RJ

Patrocinador Principal:

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 643.810

Data da Relatoria: 08/05/2014

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares (DCV) representam um dos principais problemas de saúde no mundo, dada sua prevalência, incidência, mortalidade e impacto econômico.

As possibilidades atualmente disponíveis não são capazes de atender a todos os pacientes e uma das mais promissoras possibilidades de conduta terapêutica que atualmente está sob extensa investigação é a terapia celular.

O presente projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos no modelo animal de cardiopatia isquêmica em ratos infartados e poderá oferecer alternativas com formulações celulares humanas específicas a serem testadas. Os resultados deste projeto terão, portanto, implicações extremamente importantes para posterior aplicação clínica da terapia celular na cardiopatia isquêmica. Pesquisa experimental de característica laboratorial e estudo pré-clínico em modelo animal. Indivíduos de ambos os sexos, submetidos à cirurgia ortopédica, serão incluídos no estudo. Pacientes atendidos no Serviço de Ortopedia do Hospital Federal de Bonsucesso serão avaliados preliminarmente quanto aos critérios de inclusão e exclusão e terão amostras de sangue periférico coletadas anteriormente à cirurgia para a realização de testes sanguíneos.

Em caso de sorologias reagentes, os doadores serão notificados pela empresa e aconselhados a

Endereço: Av. Londres. 616

Bairro: Bonsucesso

CEP: 21.041-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3977-9833

Fax: (21)2561-2852

E-mail: cephgbrj@gmail.com



Continuação do Parecer: 643.810

procurar orientação médica. As amostras cujas sorologias sejam reagentes para HIV1/2, HCV ou HBsAg serão descartadas imediatamente após liberação do resultado sorológico.

Após a sedação do paciente para a cirurgia ortopédica principal, as células mononucleares da medula óssea (CMMO) serão obtidas por meio de aspirado de medula óssea (MO) na crista ilíaca. O aspirado será realizado em ambiente de centro cirúrgico e o volume de coleta será de 10 mL.

O estudo de segurança será conduzido em animais de laboratório, seguindo as normas padrão de experimentação animal. Trata-se de pesquisa experimental de característica laboratorial, no qual a segurança das formulações será testada por meio de injeções locais em modelos de toxicidade em ratos infartados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral: Este projeto tem como objetivo principal avaliar formulações celulares humanas de diferentes fontes e seus efeitos sobre o miocárdio infartado de ratos.

Objetivos específicos:

- Padronização das técnicas de coleta, transporte, acondicionamento, processamento e preparo das formulações celulares humanas;
- Avaliação da biodistribuição das células após a infusão em animais;
- Avaliação funcional do desempenho cardíaco nos animais com as respectivas formulações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não existe benefício imediato para os participantes e sim como um possível tratamento para a isquemia miocárdica.

Detectamos os riscos de uma punção de sangue periférico, assim como de uma punção de medula entre os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante por propiciar tratamento promissor em humanos a ser realizado em etapa posterior.

Envolve os riscos de uma punção de medula óssea.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados.

Recomendações:

Não se aplicam.

Endereço: Av. Londres, 616

Bairro: Bonsucesso

CEP: 21.041-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3977-9833

Fax: (21)2561-2852

E-mail: cephbrj@gmail.com



Continuação do Parecer: 643.810

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após avaliação, o CEP-HFB considerou o projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos a necessidade de que sejam encaminhados a este CEP relatórios semestrais com os dados parciais da pesquisa.

Solicitamos que, ao término da pesquisa, seja encaminhada a esta Comissão uma cópia do Relatório Final.

"Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final" (Item XI.2.d da Resolução 466/12)

RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2014

Assinador por:
CRISTINA CARVALHO VIANA DE ARAUJO
(Coordenador)

Endereço: Av. Londres, 616

Bairro: Bonsucesso

CEP: 21.041-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3977-9833

Fax: (21)2561-2852

E-mail: cephgbrj@gmail.com

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

CEP-HUCFF/FM
Projeto n.º 056/09
Folha n.º 35
Ass. Sec.



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Título do Projeto - Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco

Termo de esclarecimento:

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa intitulado Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco cujo objetivo é identificar células-tronco humanas derivadas do sangue menstrual (CeSaM) visando sua futura utilização em ensaios pré-clínicos.

O procedimento fundamental para o início do projeto é coleta o sangue menstrual, na qual a sua participação será única e essencial. O sangue menstrual será coletado vinte quatro horas após o início do seu fluxo menstrual. A coleta será feita em um coletor de urina que contém 5 mL de uma solução salina sem cálcio e magnésio, suplementada com penicilina, estreptomicina e EDTA para evitar contaminação e formação de coágulos. Este será o único procedimento que você participará, a partir do sangue obtido poderemos identificar e caracterizar as células-tronco derivadas do sangue menstrual. Este procedimento não acarreta nenhum desconforto e risco de vida para você.

Não há benefício direto para você. Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de células com características tronco, com algum potencial terapêutico presentes no sangue menstrual, somente após a caracterização da célula a nível celular e molecular é que poderemos passar para os ensaios pré-clínicos e clínicos.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável do estudo, a professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg, que poderá ser encontrada através do telefone (21) 2562-6559 ou pelo email rcoeli@biof.ufrj.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Sala 01D-46 - 1º andar, telefone 2562-2480 – email : ccp@hucff.ufrj.br.

É garantido a liberdade de não querer participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjuntos com as informações obtidas de outras voluntárias, não sendo divulgada a identificação de nenhuma das voluntárias.

Não há despesas pessoais para você realizar a coleta do sangue menstrual, bem como, nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento neste tudo (nexo casual comprovado), você tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

A pesquisadora responsável garante que utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Este material biológico obtido será utilizado somente para esta pesquisa, não sendo enviado ao exterior.

Termo de Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo citado acima que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a Dra Regina Coeli dos Santos Goldenberg, sobre minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a 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 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 nesta Instituição.

Nome do sujeito da pesquisa

Data: ___ / ___ / ___

Assinatura do sujeito da pesquisa

Nome do Pesquisador

Data: ___ / ___ / ___

Assinatura do pesquisador



Anexo C – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2017

Prezada Professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Avaliação do Potencial Angiogênico das Células Mesenquimais Derivadas do Sangue Menstrual(CeSaM).”**, protocolo nº 010/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **22/02/2017**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 22/05/2018
Espécie/linhagem	Gallus gallus / Legorne Branco
Nº de animais	80 animais
Peso/idade	< 1g / 2 dias de desenvolvimento embrionário
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Granja Tolomei - Campo Grande, RJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS