



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF *IN VIVO* NA
CINÉTICA DE MOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS E HEMATOPOÉTICAS DA MEDULA
ÓSSEA PARA O SANGUE PERIFÉRICO E PRODUÇÃO DE
CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

NADJA PINTO GARCIA

MANAUS, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NADJA PINTO GARCIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF *IN VIVO* NA
CINÉTICA DE MOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS E HEMATOPOÉTICAS DA MEDULA
ÓSSEA PARA O SANGUE PERIFÉRICO E PRODUÇÃO DE
CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “PROMOÇÃO DA SAÚDE NA AMAZÔNIA”.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriana Malheiro

MANAUS, 2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

G216e Garcia, Nadja Pinto.
Efeito da administração do G-CSF in vitro na cinética de mobilização das células tronco mesequimais e hematopoéticas da medula óssea para o sangue periférico e produção de citocinas em cultura primária / Nadja Pinto Garcia. - 2011.
106 f. : il. color..
Orientador: Profª Drª Adriana Malheiro
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Federal do Amazonas.

1. Células tronco 2. Medula óssea 3. Sangue – exame I. Malheiro, Adriana orientador II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997): 611.018.46 (043.3)

NADJA PINTO GARCIA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO G-CSF *IN VIVO* NA
CINÉTICA DE MOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS E HEMATOPOÉTICAS DA MEDULA
ÓSSEA PARA O SANGUE PERIFÉRICO E PRODUÇÃO DE
CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “PROMOÇÃO DA SAÚDE NA AMAZÔNIA”.

Aprovada em 24 de Novembro de 2011

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Adriana Malheiro, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Aya Sadahiro, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Fernanda Freire Campos Nunes, Membro Externo
Centro de Pesquisa René Rachou, FIOCRUZ

Dedicatória

Aos meus amados pais, Antônio e Nadyanara, pela minha vida, apoio e amor incondicional sempre!

A minha querida irmã Izabella, grande amiga e companheira em todos os momentos!

Aos meus maravilhosos amigos!

Agradecimentos

A Deus, por me dar saúde, perseverança e força para resistir às dificuldades encontradas ao longo do caminho.

Aos meus pais, por todo o amor, paciência, dedicação, educação e por serem os responsáveis por grande parte da minha vitória.

A minha irmã pela amizade, paciência, instrução e força em todos os momentos.

Aos meus tios e primos pelo carinho.

Aos camundongos, pois sem eles não seria possível a realização dessa pesquisa.

A minha orientadora, Dra. Adriana Malheiro, pela confiança, investimento, amor a pesquisa, conhecimentos transmitidos e valiosa orientação.

As minhas amigas Juliana, Aline, Melissa e Ana Karla por toda a amizade, risadas e apoio ao longo desses 9 anos.

Aos maravilhosos amigos Allyson, Elisa, Lizy e João Paulo, pelo incentivo, apoio, solidariedade, amizade, conversas, risadas e pela valiosa e fundamental ajuda em todas as etapas desse trabalho.

Aos amigos e companheiros de trabalho, pelo apoio e auxílio durante os experimentos no laboratório: Andréa, Adélia, Carol e Gleicy.

A todos os amigos da NAEF, pelos momentos de descontração e apoio.

Ao prof. Dr. Olindo Martins Assis Filho pela instrução e maravilhosa análise estatística do meu trabalho.

A Fundação HEMOAM e ao Biotério da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade e espaço cedido pra execução desse trabalho.

A CAPES e a FAPPEAM pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde e seu corpo docente pela oportunidade de ser mestre.

*A mente que se abre
a novas idéias
jamais retorna ao seu tamanho original.*

Albert Einstein.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam potencial regenerativo não somente pela sua plasticidade, mas também pela sua capacidade de modular a resposta imunológica com efeitos imunossupressores e secreção de um largo espectro de citocinas. O G-CSF é um potente fator de crescimento celular e tem a capacidade de mobilizar as CTs para o sangue periférico permitindo fácil obtenção destas células. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de diferentes doses de G-CSF na cinética de mobilização das CTHs e CTMs para o sangue periférico e no perfil de citocinas produzidas *in vitro* por essas células. Foram utilizados 6 grupos com 12 camundongos fêmeas Swiss, grupo controle e 5 grupos de doses 1, 2, 3, 4 e 5 de G-CSF. As CTHs e CTMs mobilizadas foram identificadas por meio de marcadores celulares específicos por citometria de fluxo. As amostras de CTHs e CTMs, de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) foram cultivadas *in vitro* e as citocinas foram dosadas nos sobrenadantes destas culturas pela técnica de Cytometric Bead Array (CBA). O pico de CTMs mobilizadas ocorreu com 4 doses na MO e com 5 doses de G-CSF no SP. As CTHs atingiram o pico com 2 doses de G-CSF na MO e com 4 doses no SP. Houve uma maior mobilização de CTMs do que CTHs, porém essa razão CTM/CTH ainda foi maior na MO. As culturas de MO das doses 3, 4 e 5 de G-CSF apresentaram células aderentes fibroblastóides, enquanto que foram observadas nas culturas de sangue de 2 e 3 doses de G-CSF. Houve uma maior produção das citocinas IL-6, TNF- α na fase inicial do cultivo das CTs, tanto MO quanto SP. O IFN- γ apresentou-se elevado na fase inicial, porém atingiu um pico no final do cultivo. As citocinas IL-2, IL-4, IL-17A e IL-10 tiveram um comportamento semelhante atingindo pico de concentração na fase tardia do cultivo. Na análise da frequência de altos produtores de citocinas para cada dose administrada de G-CSF *in vivo*, observou-se um comportamento semelhante das citocinas das culturas de MO e SP. A maioria das citocinas produzidas nas culturas de 5 doses tanto de MO quanto de SP apresentaram diferença significativa com relação a doses inferiores de G-CSF. Esse estudo sugeriu uma possível influência do G-CSF não somente na mobilização, como já é conhecido, mas também na produção de várias citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, podendo possivelmente atuar no estímulo da diferenciação e modulação das CTMs.

Palavras-chave: célula tronco mesenquimal, célula tronco hematopoética, G-CSF, mobilização, citocinas.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) have regenerative potential by its plasticity and ability to modulate the immune response with immunosuppressive effects and secretion of a broad-spectrum cytokines. The G-CSF is a potent cell growth factor and has the ability to mobilize SCs into peripheral blood. The aim of this study was to evaluate the influence of different doses of G-CSF on the kinetics of HSC and MSCs mobilization into peripheral blood and the G-CSF effect on the cytokine profile produced by these cells *in vitro*. We used six groups of 12 female Swiss mice, control group and five doses groups 1, 2, 3, 4 and 5 of G-CSF. The HSCs and MSCs mobilized were identified using cell markers performed by flow cytometry. The peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were used of each group to obtain the HSCs and MSCs, which were cultivated *in vitro*. Cytokines were measured in supernatants of PB and BM cultures by Cytometric Bead Array (CBA). The MSCs mobilized peak occurred with 4 doses of G-CSF in BM and 5 doses in PB. The HSC peaked occurred with 2 doses of G-CSF in BM and 4 doses in PB. There was a greater mobilization of MSCs than HSC, but that reason MSC/HSC was even greater in BM. The BM Cultures doses 3, 4 and 5 of G-CSF showed fibroblastoid adherent cells while in the PB cultures it was in cultures doses 2 and 3 doses of G-CSF. There was an increased production of IL-6, TNF- α in early cultivation of the SCs both BM and PB. The IFN- γ was increased in the initial phase, but peaked at the end of cultivation. The IL-2, IL-4, IL-17A and IL-10 cytokines had similar behavior reaching peak concentration in the late stage of cultivation. In the analysis of high frequency of cytokine producers for each dose of G-CSF *in vivo*, we observed same behavior cytokine in BM and PB cultures. Most of the cytokines produced in both BM and PB cultures of five doses showed significant differences about lower doses of G-CSF. This study suggested a possible influence of G-CSF to mobilize cells, as is known, but also in the production of several inflammatory and anti-inflammatory cytokines and possibly stimulate and modulate the differentiation of MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells, hematopoietic stem cells, G-CSF, mobilization and cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Células tronco embrionárias. | 21 |
| Figura 2 | Células tronco adultas. | 21 |
| Figura 3 | Células tronco de cordão umbilical. | 22 |
| Figura 4 | Identificação de marcadores de superfície celular. | 24 |
| Figura 5 | Classificação funcional das células tronco hematopoéticas. | 27 |
| Figura 6 | Nicho das células tronco hematopoéticas na medula óssea. | 29 |
| Figura 7 | Origem das células tronco mesenquimais e hematopoéticas. | 31 |
| Figura 8 | Multipotencialidade das células tronco mesenquimais. | 32 |
| Figura 9 | Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais. | 34 |
| Figura 10 | Imunomodulação das CTHs durante a infecção. | 39 |
| Figura 11 | Modelo de interação entre as CTHs e o sistema imunológico. | 39 |
| Figura 12 | Efeitos parácrinos das CTMs. | 41 |
| Figura 13 | Ação do G-CSF para mobilização das CTHs. | 45 |
| Figura 14 | Fluxograma de procedimentos. | 53 |
| Figura 15 | Procedimento de separação celular em gradiente de ficoll. | 55 |
| Figura 16 | Identificação da população de células tronco mesenquimais no programa FlowJo (versão 9.4) | 58 |
| Figura 17 | Identificação da população de células tronco hematopoéticas no programa FlowJo (versão 9.4) | 59 |
| Figura 18 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 2 doses de G-CSF. | 65 |
| Figura 19 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 3 doses de G-CSF. | 65 |
| Figura 20 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 4 doses de G-CSF. | 66 |

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 21 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 5 doses de G-CSF. | 66 |
| Figura 22 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 2 doses de G-CSF. | 67 |
| Figura 23 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 3 doses de G-CSF. | 68 |
| Figura 24 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 4 doses de G-CSF. | 68 |
| Figura 25 | Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 5 doses de G-CSF. | 69 |
| Figura 26 | Percentual de altos produtores de citocinas ao longo do tempo de cultura de medula óssea e sangue periférico frente as diferentes doses de G-CSF. | 74 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Gráfico 01 | Influência do número de doses aplicadas de G-CSF na mobilização de CTMs e CTHs na medula óssea e sangue periférico. | 63 |
| Gráfico 02 | Razão de CTM/CTH mobilizadas na medula óssea e no sangue periférico em relação as doses de G-CSF. | 63 |
| Gráfico 03 | Cinética de síntese de citocinas pelas CTMs e CTHs durante os dias de cultura <i>in vitro</i> . | 71 |
| Gráfico 04 | Ponto de corte para segregação da síntese de citocinas em altos e baixos produtores a partir da mediana global da intensidade médias de fluorescência (MIF). | 73 |
| Gráfico 05 | Influência do número de doses administradas de G-CSF no perfil panorâmico de citocinas. | 76 |
| Gráfico 06 | Correlação entre a percentagem de CTM e CTH e o perfil panorâmico de citocinas. | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| APC | Aloficocianina |
| APCs | Células Apresentadoras de Antígenos |
| BME | Meio Basal de Eagle |
| µg | Microgramas |
| CBA | Citometric Bead Array |
| CD | Cluster Differentiation |
| CEDEME | Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia |
| CEEA | Comissão de Ética em Experimentação Animal |
| CFU-Fs | Unidade Formadoras de Colônias de Fibroblastos |
| CT | Célula Tronco |
| CT-CTH | Célula Tronco Hematopoética a Curto Termo |
| CTH | Célula Tronco Hematopoética |
| CTM | Célula Tronco Mesenquimal |
| DC | Células Dendríticas |
| DMEM | Dulbecco`s Modified Eagle Medium |
| FACS | Fluorescence Absorbing Cell Sorting |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| G-CSF | Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos |
| G-CSFRs | Receptores de G-CSF |

| | |
|---------------|--|
| GM-CSF | Fator de Estimulação de Colônias de Granulócitos e Monócitos |
| HEMOAM | Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas |
| HGF | Fator de Crescimento de Hepatócitos |
| HSPC | Células Tronco e Progenitoras Hematopoéticas |
| IDO | Idolamina 2,3-dioxigenase |
| IFN | Interferon |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IGF-1 | Fator de Crescimento Tipo Insulina 1 |
| IL | Interleucina |
| IMDM | Meio de Dulbecco modificado por Iscove`s |
| IMPDH | Inosina-Monofosfato Desidrogenase |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| LT-CTH | Células Tronco Hematopoéticas a Longo Termo |
| M-CSF | Fator de Estimulação de Colônias de Macrófagos |
| MHC | Complexo Principal de Histocompatibilidade |
| mL | Mililitro |
| MO | Microscópio óptico |
| MPP | Progenitores Multilinhagem |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PE | Ficoeritrina |
| NK | Natural killer |
| NO | Óxido Nítrico |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PBS | Solução Tamponada com Fosfato |

| | |
|--------------|--|
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| PerCP | Clorofilpiridina |
| RPM | Rotações por minuto |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SCF | Fator de Crescimento de Célula-tronco |
| SDF-1 | Fator Derivado de Células Estromal 1 |
| TGF | Fator de Crescimento Transformador |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TNF-R | Receptor de Fator de Necrose Tumoral |
| TRL | Receptor Toll-like |
| UFAM | Universidade Federal do Amazonas |
| VEGF | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 20 |
| | 2.1 Células Tronco..... | 20 |
| | 2.2 Células Tronco Hematopoéticas..... | 26 |
| | 2.3 Células Tronco Mesenquimais..... | 29 |
| | 2.4 Citocinas..... | 34 |
| | 2.5 Propriedade Imunes das Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais..... | 38 |
| | 2.6 Mobilização de Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais..... | 43 |
| | 2.7 Cultivo de Células Tronco Mesenquimais..... | 47 |
| 3. | OBJETIVOS..... | 51 |
| | 3.1 Geral..... | 51 |
| | 3.2 Específicos..... | 51 |
| 4. | METODOLOGIA..... | 52 |
| | 4.1 Modelo de Estudo..... | 52 |
| | 4.2 Informações Éticas | 52 |
| | 4.3 População de Estudo..... | 52 |
| | 4.4 Procedimentos..... | 53 |
| | 4.4.1 Preparo e Isolamento das Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais.. | 54 |
| | 4.4.2 Imunofenotipagem <i>ex vivo</i> das CTHs e CTMs..... | 56 |
| | 4.4.3 Cultura <i>in vitro</i> das Células Tronco Mesenquimais..... | 59 |
| | 4.4.4 Dosagem de Citocinas no Sobrenadante da Cultura Primária das Células-tronco Mesenquimais (Cytometric Bead Array-CBA)..... | 60 |
| | 4.4.5 Análise Estatística..... | 61 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 5. RESULTADOS..... | 62 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 79 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 86 |
| REFERÊNCIAS..... | 87 |

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma nova área chamada Medicina Regenerativa, vem revelando perspectivas inovadoras para o tratamento de doenças crônico-degenerativas através da utilização de células, fatores de proliferação e diferenciação celulares e biomateriais (SANTOS et al., 2004; BOROJEVIC, 2008). No fim do século XX, a aplicação das células tronco (CTs) representou uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (BIANCO; ROBEY, 2001; SCHWINDT et al., 2005; PRENTICE, 2006), incluindo os órgãos considerados como incapazes de desenvolver quaisquer processos de regeneração, como o cérebro e o coração (SANTOS et al., 2004).

As CTs podem ser de origem embrionária, fetal ou do adulto e possuem três características que as distinguem dos outros tipos celulares: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) são capazes de se dividir e se auto-renovar indefinidamente; c) são capazes de se diferenciar em diversos tipos de células especializadas quando submetidas a certas condições fisiológicas ou experimentais (SILVA JUNIOR et al., 2009).

Há relatos que os tecidos adultos possuem células tronco pluripotentes próprias servindo como fonte endógena para regenerar danos teciduais e cicatrizar feridas (NELSON et al., 2009). Contudo, esta regeneração natural pode não ser eficiente para levar à cura dependendo do grau da lesão (SANTOS et al., 2004).

Atualmente, a aplicação clínica das células tronco adultas humanas representa a mais promissora abordagem para regeneração celular orgânica no tratamento de diversas doenças. As vantagens da fonte adulta é que as células são facilmente obtidas, não têm objeções éticas, permite transplante autólogo sem necessidade de imunossupressão (GUTENSOHN et al., 2000; MYLOTTE et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009).

Além das células tronco hematopoiéticas (CTHs), a medula óssea provê uma fonte de CTs não-hematopoiéticas, denominadas células tronco mesenquimais (CTM). Alguns estudos demonstram que a utilização de CTHs de sangue periférico em transplantes de medula óssea tanto autólogos quanto alogênicos, foram capazes de reconstituir a hematopoese em curto e em longo prazo (HAAS et al., 1995; SCHMITZ et al., 2006 apud MENDRONE JÚNIOR, 2009). As CTMs são extremamente raras na medula óssea, mas existem também no tecido adiposo, sangue periférico e cordão umbilical (BREHM; STRAUER, 2002). Estas células têm-se revelado muito eficazes, pois apresentam potencial regenerativo não somente pela sua capacidade de diferenciação celular (plasticidade), mas também pela sua capacidade de modular a resposta imunológica inata e adaptativa com efeitos imunossupressores e secreção de um largo espectro de substâncias bioativas como citocinas e fatores de crescimento (CAPLAN, 2007; REBELATTO, 2008; HOOGDUIJN et al., 2010). Porém, todo o mecanismo básico de sua ação ainda não está completamente estabelecido (NOVOTNY et al., 2008; XIANG et al., 2009).

O isolamento de um elevado número de CTs estabelece a base de novos métodos para regeneração de tecidos e terapia celular. No entanto, o procedimento de extração de medula óssea é muito invasivo e a quantidade de material extraído é limitado. Portanto, explorar novas fontes e técnicas de isolamento para obter tais células é de grande interesse (KASSIS et al., 2006).

Recentes estudos feitos em um centro de pesquisa americano demonstram que a utilização do Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos (G-CSF) estimula potencialmente a mobilização de CT para o sangue periférico, o que permite uma fácil obtenção das CTHs e CTMs e evita um procedimento tão invasivo como a punção de medula óssea (HILL et al., 2005). Contudo estes isolamentos frequentemente resultam em poucas células e o cultivo para seleção e a expansão *ex vivo* devem ocorrer antes de quantidades

terapêuticas serem disponíveis (NOVOTNY et al., 2008). Além disso, reconhecer os marcadores de superfície específicos dessas células contribui para um isolamento mais preciso.

As pesquisas com CTs são bastante amplas, mas ainda existem questões a serem esclarecidas. Para contribuir no avanço desta área, este estudo teve por objetivos avaliar a cinética de mobilização de CTHs e CTMs para o sangue periférico e o efeito do G-CSF sobre o perfil de citocinas produzidas *in vitro* por essas células obtidas de camundongos e ainda relacionar essas citocinas com a diferenciação de CTMs. Tal pesquisa acrescentou um válido conhecimento sobre células tronco, pois sugeriu o melhor momento de coleta de CTHs e CTMs mobilizadas e as possíveis citocinas produzidas sob influência do G-CSF, uma vez que, são poucos os dados na literatura que mostram essa relação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células tronco (CTs)

As CTs podem ser de origem embrionária, fetal ou do adulto e possuem três características que as distinguem dos outros tipos celulares: a) são células indiferenciadas e não especializadas; b) são capazes de se dividir e se auto-renovar indefinidamente; c) são capazes de se diferenciar em diversos tipos de células especializadas quando submetidas a certas condições fisiológicas ou experimentais (SILVA JUNIOR et al., 2009). Essa última característica, denominada de plasticidade ou transdiferenciação, destaca a importância das CTs em estudos que buscam a cura de doenças crônico-degenerativas (ORLIC et al., 2006; GOMES; PRANKE, 2008).

As células tronco podem ser classificadas: 1) em função de sua origem, em embrionárias e não-embrionárias (células tronco de cordão umbilical e células tronco adultas) ou 2) potencialidade, isto é, capacidade que a célula tem de gerar diferentes linhagens celulares, em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As células totipotentes resultam da divisão celular do óvulo fertilizado (zigoto) e podem dar origem a qualquer tipo de célula ou de tecido que compõe o embrião, isto é, um organismo totalmente funcional, e célula ou tecido que o sustenta durante seu desenvolvimento uterino (folhetos extra-embrionários como a placenta e anexos). Correspondem as células do embrião na fase de mórula (ROBEY, 2000). A divisão das células totipotentes resulta na formação das células pluripotentes (células tronco embrionárias), que se originam da massa interna do blastocisto (SCHWINDT et al., 2005; SILVA JUNIOR et al., 2009) e são um pouco limitadas na sua diferenciação quando comparadas às células totipotentes (figura 1), no entanto, são capazes de se diferenciar em todos os tecidos do corpo humano, exceto nos anexos embrionários .

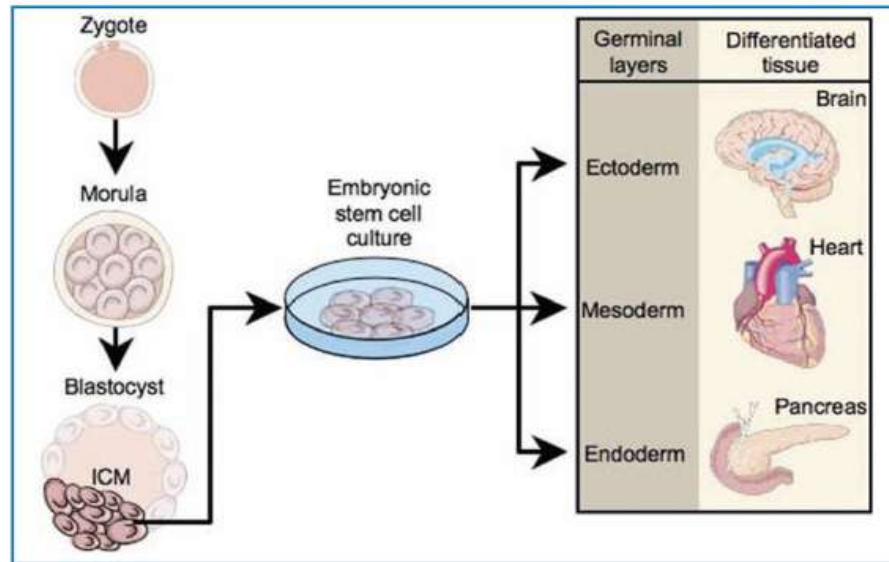


Figura 1. Células Tronco Embrionárias Pluripotentes
 FONTE: NELSON et al. (2009).

À medida que as células pluripotentes se especializam, passam a constituir tecidos específicos e o seu potencial passa a ser mais restrito, limitado apenas a alguns tipos celulares, dizendo-se então multipotentes ou células tronco adultas (células tronco hematopoéticas e mesenquimais) (figura 2), cuja função é a reparação e manutenção tecidual (SILVA JUNIOR et al., 2009).

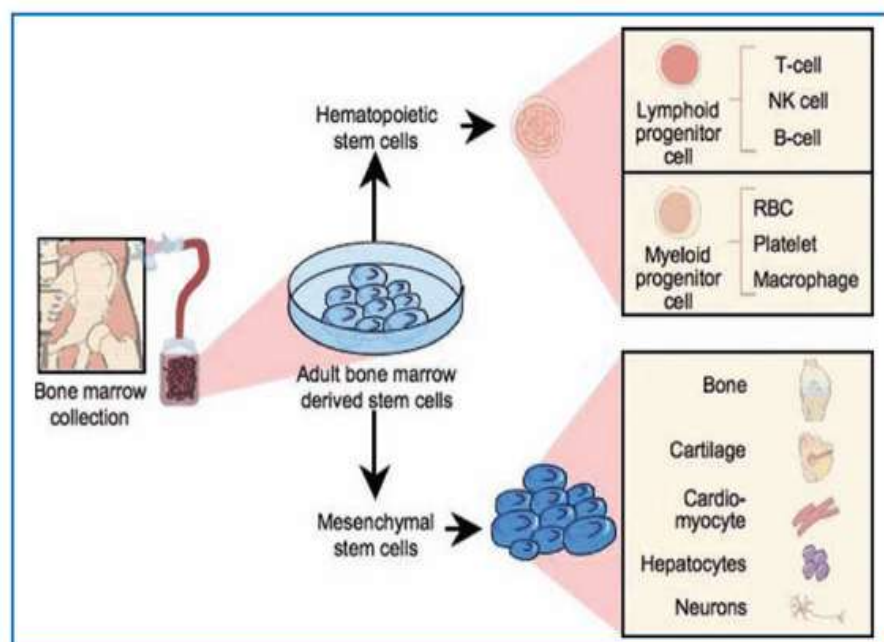


Figura 2 – Células Tronco Adultas Multipotentes
 FONTE: NELSON et al. (2009).

As células tronco de cordão umbilical compreendem um conjunto de células tronco tipo-embrionárias e tipo-adultas, isto é, pluripotentes e multipotentes respectivamente (figura 3) (NELSON et al., 2009).

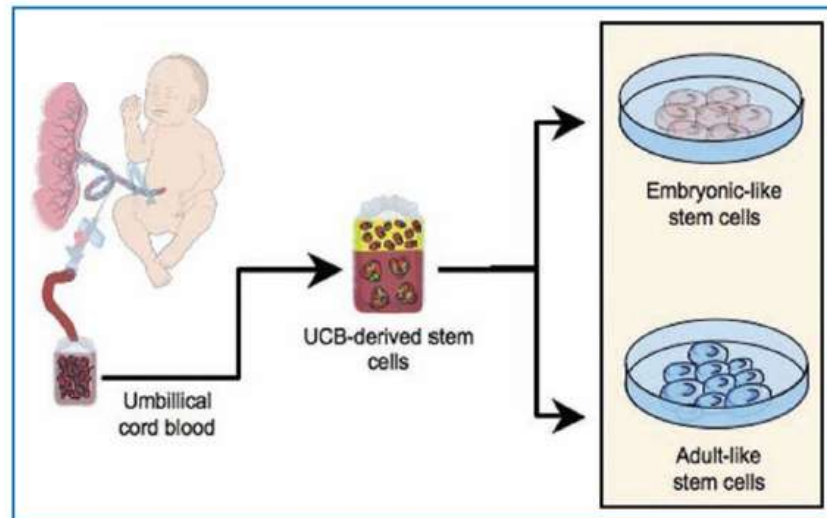


Figura 3. Células Tronco de Cordão Umbilical.
 FONTE: NELSON et al. (2009).

As células tronco embrionárias, devido a sua pluripotencialidade, apresentam risco aumentado de induzir teratomas (GERSH et al., 2009). Esse fato limita seu uso em aplicações da Medicina Regenerativa (NELSON et al., 2009), tal como a questão ética que envolve o uso de embriões para isolar essas células tronco (DEL CARLLO, 2005). As células tronco adultas já possuem um potencial proliferativo mais favorável por ser mais limitado (NELSON et al., 2009) e ainda podem ser obtidas diretamente do próprio paciente (transplante autólogo) e consequentemente sem complicações imunogênicas, e não envolvem questionamentos éticos (PLACZEK et al., 2009).

O estado “indiferenciado” das células tronco está intimamente associado à expressão do fator de transcrição Oct-4. Essa proteína é codificada pelo gene *POU5F1*, localizado no braço curto do cromossomo 6 humano, e está somente presente durante a oogênese nas células da massa interna do blastocisto (de onde derivam as linhagens de células tronco

embrionárias) e no epiblasto. À medida que começa a diferenciação das diversas linhagens de células que vão constituir os tecidos adultos, a expressão de Oct-4 vai se restringindo às células germinais. Outro gene relacionado com o estado indiferenciado e a pluripotência é o *Nanog*, localizado no cromossomo 12 humano (cromossomo 6 no camundongo) (ZAGO, 2006-a).

A capacidade que as células tronco possuem de se diferenciar em células especializadas e originar células que permanecem indiferenciadas, repondo a população de células tronco e permitindo que essa população de células permaneça estável, é proporcionada por “divisões assimétricas”. Essas divisões parecem ser reguladas por dois genes, o *p53* e o *IMPDH* (inosina-monofosfato desidrogenase), e por substâncias como hipoxantina, xantossina ou xantina, as quais produzem supressão da cinética celular assimétrica, fazendo com que as células tronco dividam-se predominantemente de modo simétrico, originando apenas outras células tronco (ZAGO, 2006-a). Logo, a divisão poderá ser simétrica ou assimétrica dependendo do estímulo de diversos fatores ambientais: estresse, fatores de microambiente, contato celular e entre outros (CAI et al., 2004).

Para que ocorra estímulo ou supressão da diferenciação, os mecanismos de sinalização celular são transduzidos inicialmente por moléculas, expressas na superfície das células tronco (SCHWINDT et al., 2005). Esses marcadores de superfície são moléculas biológicas embebidas ou apostas à superfície externa de todas as células, que funcionam como receptores celulares, permitindo que as células se comuniquem umas com as outras ou que se liguem especificamente a determinadas estruturas biológicas ou celulares. Estas moléculas, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais das células de forma geral e permitem, por outro lado, a individualização de um determinado tipo celular, podendo ser utilizadas para efeito de marcação e identificação de tipos celulares particulares, incluindo as células tronco por meio da técnica de citometria de fluxo (figura 4).

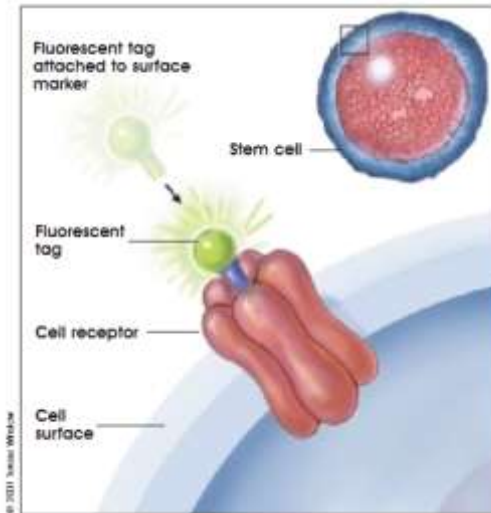


Figura 4. Identificação de marcadores de superfície celular.
 FONTE: WINSLOW (2001).

Esse tipo de identificação através de marcadores específicos é mais apropriada e precisa, visto que as células tronco não apresentam características morfológicas distintas de outras células e são extremamente raras nos tecidos que ocorrem, com frequência variando de 0,01% a 0,0001% (COVAS, 2006-a).

As células tronco adultas ou somáticas são encontradas em todo o organismo adulto, residindo em nichos específicos nos diferentes órgãos, substituindo células mortas, regenerando o tecido danificado e com isso proporcionando o remodelamento tecidual, ou seja, mantendo a homeostasia do organismo (PLACZEK et al., 2009). As principais fontes dessas células para fins terapêuticos além da medula óssea constituem sangue periférico, sangue de placenta ou de cordão umbilical, sendo ainda a medula óssea a forma mais tradicional pela qual se obtém essas células (ZAGO, 2006-a). Porém, tem-se relatado recentemente a administração do G-CSF para mobilizar células tronco e progenitoras da medula óssea para o sangue periférico e assim facilitar a obtenção dessas células (MASET et al., 2009).

A célula-tronco hematopoiética (CTH) promove a manutenção e a reconstituição do sistema hematopoiético, ao passo que, a célula tronco mesenquimal (CTM) derivada do estroma da medula óssea, origina células não-hematopoiéticas.

Inicialmente acreditava-se que as CTs mesenquimais da medula óssea atuavam apenas na regeneração das células da medula óssea ou das células hematopoéticas em circulação. Entretanto, as investigações realizadas na última década, demonstraram que essas células são capazes de gerar fibras de músculo esquelético, hepatócitos, células endoteliais, células neuronais e células do músculo cardíaco (KAWASAKY-OYAMA et al., 2004). Com esses fatos, a possibilidade de utilização das células tronco adultas para terapias celulares transformou-se em uma área muito ativa de investigação (DEL CARLO, 2005).

Recentemente tem surgido evidências de que as CTHs também tem a capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares não-hematopoiéticas (MENDRONE JUNIOR, 2009). A literatura mostra que essas células tronco foram responsáveis pela transdiferenciação de células da medula óssea em cardiomiócitos maduros, células musculares lisas e células endoteliais em modelos murinos de infarto (KARRA, WU, 2009). Embora isso tenha sido demonstrado, a única aplicação clínica bem estabelecida para as CTHs até o momento é a recomposição do tecido hematopoiético medular após terapia mieloablativa no transplante de medula óssea (MENDRONE JUNIOR, 2009). As células tronco adultas mesenquimais tornaram-se foco de inúmeras pesquisas em todo o mundo e são de grande interesse para clínicos e pesquisadores, pois fornecem perspectivas clínicas promissoras para a terapia celular, uma vez que derivam de fontes diversas e ao mesmo tempo têm a mais ampla capacidade de diferenciação (CHEN et al., 2008; ROSENBAUM et al., 2008).

2.2 Células Tronco Hematopoéticas (CTHs)

A célula tronco hematopoética é a mais bem caracterizada entre as células tronco adultas, sendo conhecida há mais de 50 anos (CARVALHO, 2008). A CTH pode ser obtida além da medula óssea, onde residem como raras (tipicamente de 0,01% a 0,05%), do cordão umbilical e do sangue periférico (SILVA JÚNIOR et al., 2009, ABDELHAY et al., 2009).

De acordo com sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em células do tecido sanguíneo e sistema imune (WILSON; TRUMPP, 2006), as células tronco hematopoéticas podem ser divididas funcionalmente em três tipos: células tronco hematopoéticas com capacidade de auto-renovação a longo termo (LT-CTHs), células tronco hematopoéticas com capacidade a curto termo (CT-CTHs) e progenitores multilinhagem (MPP) que, aparentemente, são incapazes de se autorrenovar (ABDELHAY et al., 2009). Enquanto as LT-CTHs são consideradas capazes de se renovar indefinidamente, sendo responsáveis por repopular todo o sistema hematopoético, as CT-CTHs e os progenitores multilinhagem têm curta duração, sendo capazes de manter uma hematopoese por um período curto (Figura 5) (REYA et al., 2001; CHUTE et al., 2010).

As células tronco hematopoéticas são morfologicamente indiferenciadas e são identificadas através de antígenos de superfície específicos (CHAN; WATT, 2001; GANGENAHALLI et al., 2006; WILSON; TRUMPP, 2006; METCALF, 2007). As CTHs não expressam marcadores de superfície celular, normalmente expressos em células hematopoéticas comprometidas com linhagens (Lin⁻), porém expressam altos níveis de antígeno de célula-tronco 1 (Sca1) e c-Kit. Portanto, essas células são Lin⁻Sca1⁺c-Kit⁺, as quais abrangem as LT-CTHs que não expressam CD34 e tirosina-quinase-fms 3 (FLT3), as CT-CTHs as quais expressam CD34 e não expressam FLT3 e as progenitoras multipotentes que expressam CD34 e FLT3 (CHRISTENSEN; WEISSMAN, 2001; KIEL et al., 2005; YANG et al., 2005; CHUTE et al., 2010).

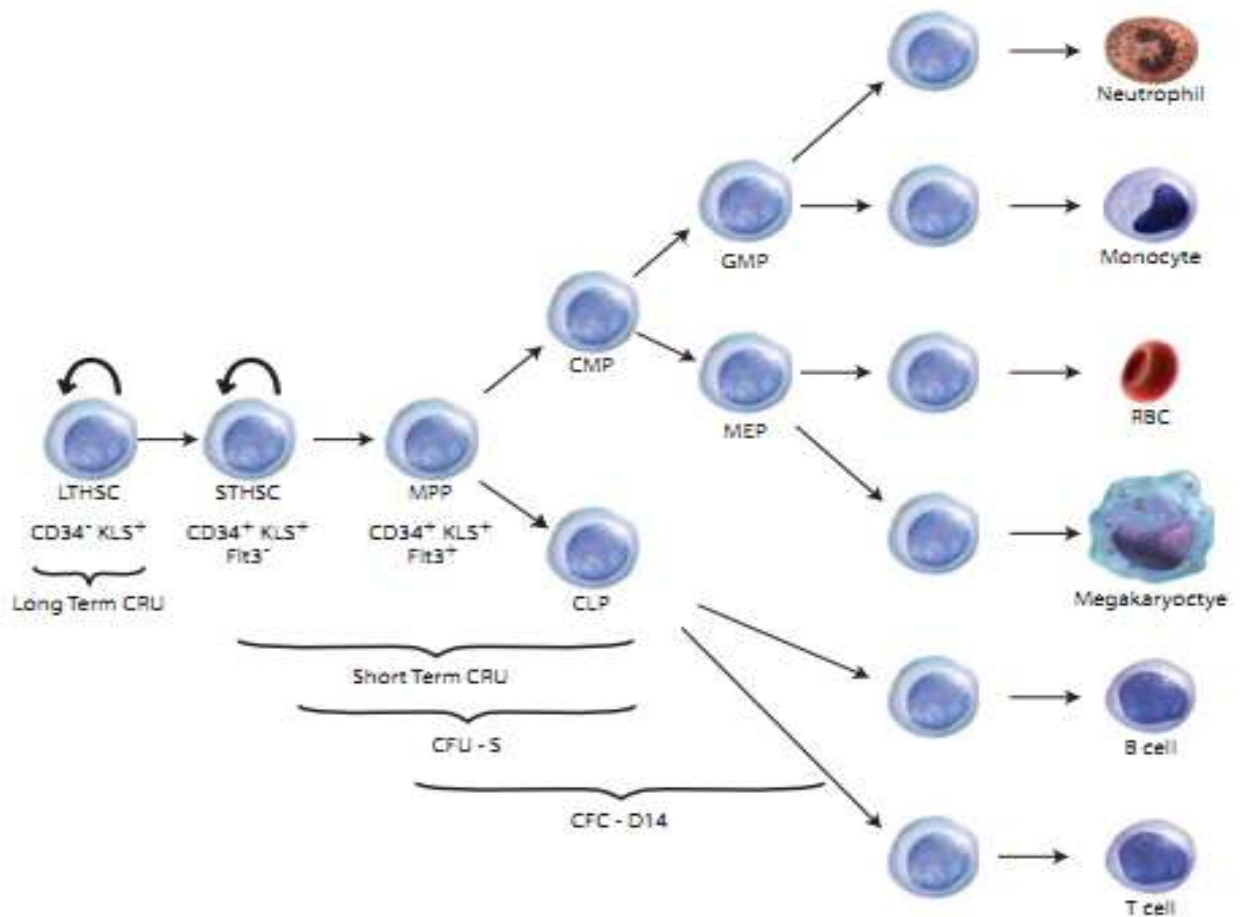


Figura 5. Classificação funcional das células tronco hematopoéticas.
 FONTE: CHUTE et al. (2010).

As CTHs são definidas fundamentalmente não pelo fenótipo, mas pela sua função na reconstituição hematopoética nos transplantes de medula óssea (CHALLEN et al., 2010). Em termos clínicos, as CTHs são utilizadas no tratamento de leucemias, linfomas, anemia aplástica e doenças hereditárias do sangue, tais como talassemia e anemia falciforme, por meio de transplantes de medula óssea autólogos ou alogênicos (LOCATELLI et al., 2003; SILVA JÚNIOR et al., 2009). A localização, sobrevivência, proliferação e diferenciação das CTHs na medula óssea são dependentes da interação com o microambiente medular. Essas células ficam em estado quiescente, isto é, não estão em processo de divisão celular, mas mantêm interação dinâmica com o microambiente que permite expansão e migração da medula óssea, dependendo da demanda fisiológica (CARVALHO, 2008). O tráfico das

células tronco e progenitoras hematopoiéticas (HSPCs) entre a medula óssea e sangue periférico contribui para a manutenção da hematopoese. A proliferação e diferenciação dessas células, no microambiente medular, ocorrem em locais especializados denominados nichos (figura 6) (JANOWSKA-WIECZOREK et al. 2001; WILSON;TRUMPP, 2006), os quais estão localizados na região endosteal e associadas ao endotélio sinusoidal e permitem uma comunicação adequada entre as células hematopoiéticas e seu microambiente (MÉNDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007; EHNINGER; TRUMPP, 2011). Essa comunicação é mediada via fatores solúveis e moléculas de adesão. Junções comunicantes, as quais são formadas por uma família de moléculas complexas de membrana, ocorrem nas células medulares e transferem mediadores solúveis entre as células adjacentes, participando assim da manutenção de um microambiente adequado para a hematopoese (ABUD, 2010). Após o desenvolvimento, as células são capazes de deixar o microambiente medular, mas, uma pequena porção de células indiferenciadas acaba migrando da medula óssea durante a vida do organismo. Para que as células migrem e retornem ao microambiente medular (*homing*) é necessária uma interação entre citocinas/quimiocinas, proteases e moléculas de adesão (PAPAYANNOPOULOU, 2004; PAPAYANNOPOULOU; SCADDEN, 2008).

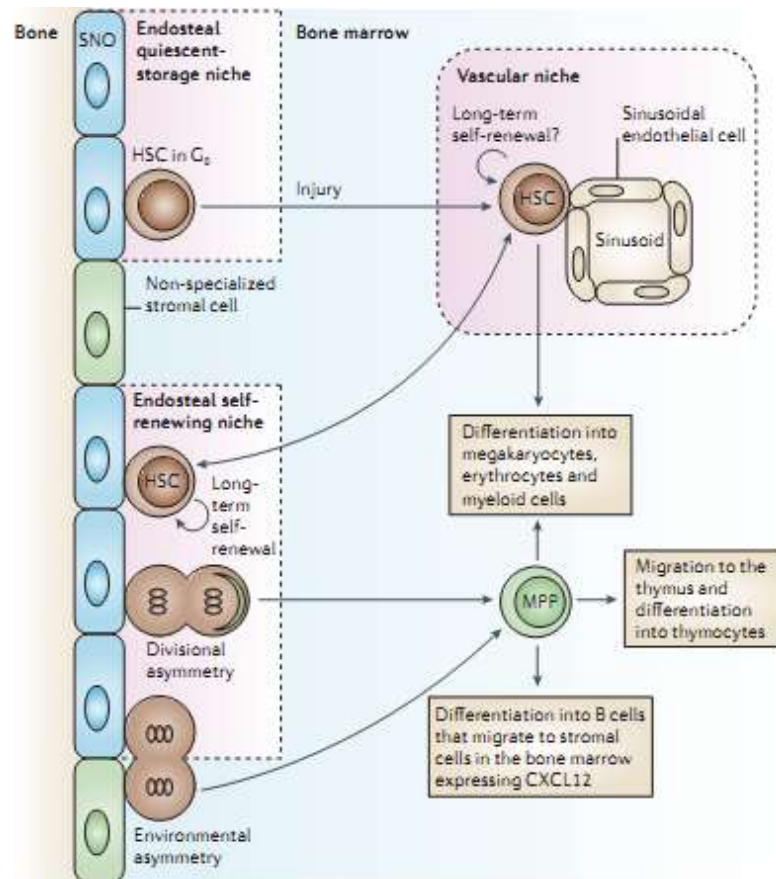


Figura 6. Nicho das células tronco hematopoéticas na medula óssea. As CTHs em estado quiescente, dependendo da demanda fisiológica, interagem com o microambiente medular, proliferam e se diferenciam em locais especializados denominados nichos.
 FONTE: WILSON;TRUMPP (2006).

2.3 Células Tronco Mesenquimais (CTMs)

Pesquisas envolvendo células tronco mesenquimais puderam ser rastreadas desde 1970, quando Friedenstein e colaboradores descreveram a aderência em culturas de um tipo de célula não-hematopoiética presente na medula óssea de diferentes espécies que poderia formar colônias de fibroblastos *in vitro*. Portanto, essas células foram denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs) (MEIRELLES et al., 2009). Em seus experimentos, Friedenstein dispensava amostras de medula óssea suspensa em meio de cultura em frascos de cultura de tecidos, e a fração aderente era cultivada. Por volta do terceiro ao quinto dia, focos discretos de dois a quatro fibroblastos surgiram na cultura, entre

histiócitos e células mononucleares (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Experimentos clássicos demonstram que o transplante de medula óssea para sítios anatômicos heterotrópicos resultam em nova geração de osso ectópico e medula. Considerando que os exemplos de tais estudos datam do século XIX, o trabalho de Tavassoli e Crosby (1968) estabeleceu claramente prova de um potencial osteogênico inerente associado à medula óssea. Devido a esses experimentos terem sido realizados com fragmentos inteiros de medula óssea, a identificação precisa de qualquer célula funcionando como uma progenitora de células ósseas diferenciadas não pôde ser delineado (BIANCO et al., 2008). A observação original de Friedenstein foi com base nesses estudos mostrando que células estromais derivadas da medula óssea eram os antecessores comuns de tecidos mesenquimais (UCCELLI et al., 2008). A progênie *in vitro* da CFU-Fs foi mais tarde detectada por ter a capacidade de se diferenciar em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas *in vitro* e quando implantadas *in vivo* (MEIRELLES et al., 2009). Como resultado dessa suposta capacidade de auto-renovação e diferenciação, Maureen Owen, em 1985, propôs que as CFU-F seriam as células tronco que originariam o estroma da medula óssea. Essas células estromais, apresentariam uma hierarquia organizacional, possuindo vários compartimentos proliferativos, como o compartimento das células tronco propriamente dito, o compartimento das células progenitoras comprometidas e o compartimento de maturação onde se acumulariam as células diferenciadas (COVAS, 2006-b). Friedenstein e Owen em 1988 chamaram essa célula de célula-tronco osteogênica ou célula-tronco estromal (BIANCO et al., 2008). Em 1991, Caplan denominou essas células como célula tronco mesenquimal (CTM) (UCCELLI et al., 2008) e propôs também que essas células poderiam ser utilizadas terapêuticamente em doenças ósseas e articulares numa modalidade que foi denominada Terapia Celular Autóloga (CAPLAN, 1991 apud COVAS, 2006-b). Recentemente foi sugerido pela International Society for Cytotherapy que as células tronco mesenquimais sejam denominadas de células

estromais mesenquimais multipotentes (BYDLOWSKI et al.; 2009). O termo mesênquima descreve tecidos de origem mesodérmica embrionária que originam o sistema músculo-esquelético, sanguíneo, vascular, urogenital e tecido conjuntivo (figura 7) (PROCKOP, 1997; NARDI; MEIRELLES, 2006).

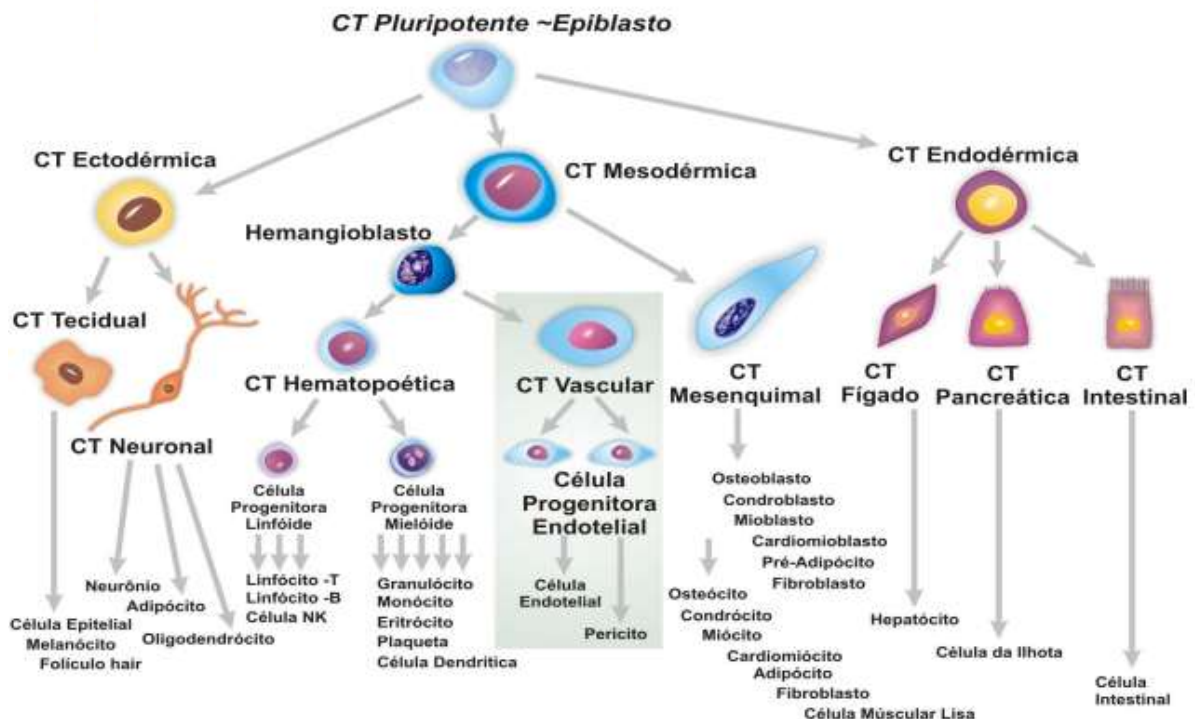


Figura 7. Origem das células tronco mesenquimais e hematopoéticas. As células tronco mesenquimais originam-se diretamente da célula tronco mesodérmica, ao contrário das células tronco hematopoéticas e progenitores endoteliais que se originam do hemangioblasto proveniente da célula tronco mesodérmica.

FONTE: VOLTARELLI. (2010).

Ao contrário das CTs hematopoéticas e endoteliais, as CTs mesenquimais se originam diretamente da mesoderme somática (figura 7), e demonstram seu potencial em diferenciar-se em tecidos funcionais mesodérmicos: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos esqueléticos (figura 8) (COVAS, 2006-b). Tem sido demonstrado recentemente que essas células também são capazes de gerar hepatócitos, células endoteliais, células neuronais e células do músculo cardíaco (KAWASAKY-OYAMA et al., 2004). Tais características de

plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo *turnover* e manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009).

As CTMs estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos (MEIRELLES et al., 2008; MAMBELLI et al., 2009; ZUCCONI et al., 2009).

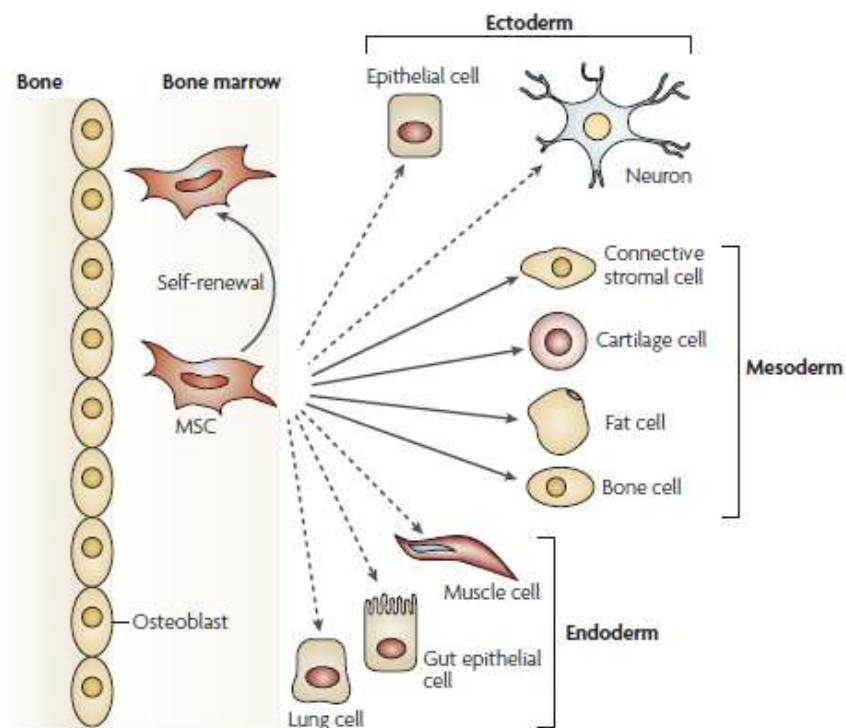


Figura 8. Multipotencialidade das células tronco mesenquimais. As CTMs possuem a propriedade de se diferenciar em tecidos mesodérmicos: osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos esqueléticos e possivelmente em tecidos ectodérmicos e endodérmicos.

FONTE: UCCELLI et al. (2008).

Na medula, as CTMs estão imersas no estroma e representam apenas uma pequena porcentagem do número total de células, correspondendo cerca de 0,001% a 0,01% (COVAS, 2006-b; MENDRONE JÚNIOR, 2009). Wexler et al. (2003) estimaram que há uma CTM em cada 34.000 células nucleadas da medula óssea humana por meio de ensaios de unidade

formadora de colônias de fibroblastos (CFU-F). Em um estudo preliminar, a frequência dessas células na medula óssea murina foi estimada ser 1 em uma faixa de 11.300-27.000 células nucleadas (MEIRELLES;NARDI, 2003). Tem sido de grande interesse, estimular a medula óssea a produzir e liberar essas células para o sangue periférico, através de fatores de crescimento, como o G-CSF, para facilitar a sua obtenção (HILL et al., 2005). Tondreau et al. (2005) também testaram o potencial do sangue periférico mobilizado com fator de crescimento como fonte de CTMs e observaram que essas CTs circulantes apresentam grande potencial proliferativo e capacidade de diferenciação igualmente às CTMs da medula óssea e que expressam Oct-4, marcador presente em células indiferenciadas com alta capacidade proliferativa. Segundo Zwaifler et al. (2000), as CTMs do sangue periférico, da mesma maneira como as CTMs da medula óssea, quando colocadas em cultura, se aderem ao plástico ou vidro da superfície de crescimento, sofrem proliferação logarítmica na presença de soro fetal bovino e formam células com morfologia fibroblástica. Contudo, estes isolamentos frequentemente resultam em poucas células e o cultivo para seleção e a expansão *ex vivo* devem ser realizados para se obter quantidades terapêuticas (NOVOTNY et al., 2008; ZEIDÁN-CHULIÁ; NODA, 2009).

Para as CTMs serem ainda mais facilmente isoladas, é necessário conhecer os marcadores de superfície específicos dessas células (figura 9). Atualmente não existe um marcador ou marcadores definitivos que identifiquem exclusivamente as CTMs, o que sugere que as populações dessas células isoladas por métodos atuais ainda sejam heterogêneas (BYDLOWSKI et al.; 2009). Morfologicamente, as CTMs se assemelham a células tipo fibroblastos e são caracterizadas pela sua superfície expressar moléculas (marcar positivamente) para CD105 (SH2 receptor endoglina), CD73 (SH3 e SH4 ou 5`-ecto-nucleotidase ligada a membrana), CD44 (receptor de hialurona) (BATTEN et al., 2007) e CD90 (Thy-1). Estas células são destituídas (negativas) de marcadores de células tronco

hematopoéticas CD34 (célula-tronco hematopoiética), CD133 (célula-tronco e progenitora endotelial), CD45 (antígeno leucocitário comum) (MEIRELLES et al., 2009), CD14 (monócitos e macrófagos), CD31 (endoteliais, linfócitos T, macrófagos) (BATTEN et al., 2007). Similarmente, os marcadores das CTMs dos camundongos não apresentam marcadores hematopoiéticos e são caracterizados ainda por Sca-1⁺ e CD44⁺ (UCCELLI et al., 2006). Esses marcadores de superfície constituem o segundo critério pela Sociedade Internacional de Terapia Celular que padroniza a identificação da CTM juntamente com o primeiro critério de ser aderente ao plástico quando mantida em cultura e o último critério de ter o potencial de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (ROSENBAUM et al., 2008). Portanto, a caracterização das células tronco mesenquimais tem sido baseada em um conjunto de características morfológicas, fenotípicas e funcionais, devido a falta de marcadores específicos para essas células (REBELATTO, 2008).

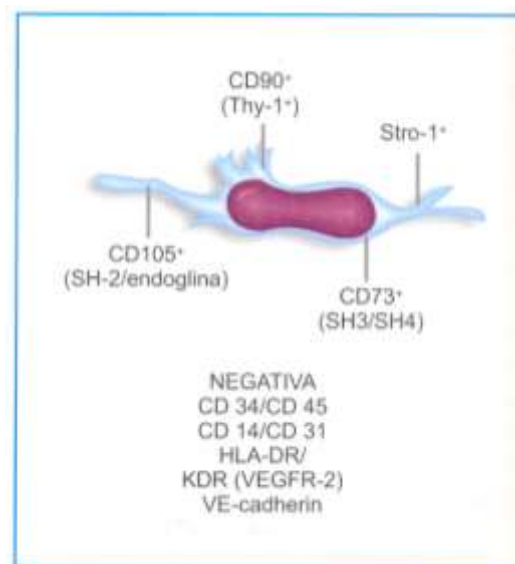


Figura 9. Caracterização Fenotípica das Células Tronco Mesenquimais.
 FONTE: ZAGO; COVAS (2006).

2.4 Citocinas

As citocinas são glicoproteínas que medeiam a resposta imune, inflamação e hematopoese. São produzidas em resposta a estímulos imunológicos e se ligam à receptores

de membrana específicos os quais apresentam domínios citoplasmáticos com regiões especializadas que são capazes de iniciar várias respostas como, sobrevivência, proliferação, diferenciação, comprometimento, maturação, ativação funcional e secreção de moléculas efetoras. Esses fatores podem ser linhagem-específicos ou atuar na regulação de múltiplas linhagens ao mesmo tempo, podem regular apenas células tronco ou células tronco e células padronizadas comprometidas. A proliferação celular geralmente requer a ação de múltiplas citocinas (LICHTMAN et al., 2006; SCHIMIEGUEL, 2009 apud NERVI et al., 2006; METCALF, 2008).

As citocinas podem atuar de forma autócrina, agindo na própria célula produtora, parácrina, atuando em células próximas e endócrina quando sua ação é à distância (VARELLA; FORTE, 2001).

As interleucinas (IL) são polipeptídeos envolvidos na comunicação entre linfócitos. Algumas interleucinas são produzidas por várias células não leucocitárias. As atividades das interleucinas podem ser resumidas em reconhecimento de antígenos estranhos pelas células T; amplificação da proliferação das células T ativadas; atração de macrófagos e identificação de mecanismos efetivos para fagocitose de microrganismos e promoção da eritropoese (NAOUM, 2009).

A IL-2 é uma glicoproteína produzida pelas células TCD4⁺. Entre suas várias ações, é um potente fator de crescimento e sobrevivência de células T, estimula a diferenciação de células T antígeno-ativadas, pois aumenta a produção de citocinas efetoras tal como IFN- γ e IL-4 pelas células T. A IL-2 ainda desempenha um papel importante na regulação das células T em virtude do seu papel crucial na manutenção das células T regulatórias. Alguns estudos demonstraram que a IL-2 estimula a diferenciação de células NK e células B *in vitro* (ABBAS et al., 2011; LIAO et al., 2011).

A IL-4 é uma citocina produzida por células T helper ativadas, células natural killer, eosinófilos, basófilos e mastócitos (CROXFORD; BUCH, 2010). Consiste em uma citocina chave para diferenciação das células Th2, estimulação de linfócitos B para produção de IgE, recrutamento de eosinófilos e estimula a expressão de certas moléculas de adesão (VARELLA; FORTE, 2001; BRANDT; NAOUM, 2009; SIVAPRASAD, 2010).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que influencia respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação (VARELLA; FORTE, 2001). Tem sido relatada também atividade anti-inflamatória e regenerativa (SCHELLER et al., 2011). A IL-6 atua no estímulo da unidade formadora de colônias de granulócitos-macrófagos (CSF-GM) e células tronco (NAOUM, 2009). A IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo os linfócitos T e monócitos as principais fontes. Os estímulos para a sua síntese são IL-1, LPS e TNF- α (VARELLA; FORTE, 2001).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunossupressora, produzida por numerosos tipos celulares, como células T regulatórias (Treg) e linfócitos B (BRANDT; SIVAPRASAD, 2010; CROXFORD; BUCH, 2010). Esta citocina exerce efeitos em quase todas as células hematopoéticas, mas seu papel mais importante parece ser na regulação direta de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T. Nas APCs, a IL-10 inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1- β e reduz a expressão de moléculas MHC II e moléculas co-estimulatórias e de adesão. A IL-10 afeta diretamente a diferenciação de células TCD4⁺ nos tipos Th1 e Th2. Tem sido relatado que tanto as células Th17 e TCD8⁺ são relativamente pouco influenciadas pela IL-10, o que sugere que outros mediadores anti-inflamatórios são necessários para regular esses subtipos de células T (KLINKER; LUNDY, 2011).

A IL-17A é uma citocina pró-inflamatória sintetizada pelas células Th17 (HUANG et al., 2006; DUFFY et al., 2011). Sua expressão parece ser induzida por peptídeos bacterianos estimulando células da defesa inata e está envolvida na regulação de doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, psoríase e glomerulonefrite. A IL-17A ainda estimula a hematopoese em camundongos, especificamente a granulopoiese e expansão de progenitores mielóides e recrutamento de neutrófilos (HUANG et al., 2006; REYNOLDS et al., 2010; DUFFY et al., 2011). A IL-17A ainda parece agir sobre células estromais da medula óssea, uma vez que possuem o receptor para essa citocina (IL17Ra), que em resposta a estimulação da IL17-A produzem citocinas pró-inflamatórias e secundárias a estimulação da hematopoese (IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF e SCF) (HUANG et AL., 2006).

O IFN γ é a citocina de assinatura produzida pelas células Th1, possuindo ação pró-inflamatória, mas também derivadas de células TCD8⁺, células T $\gamma\delta$, células NKT e NK estimuladas por IL-12 (ALSHAKER; MATALKA, 2011). O IFN γ tem importante função na imunidade celular contra microrganismos intracelulares, ativando macrófagos a destruir microrganismos fagocitados. O IFN γ também age sobre células B promovendo a troca de subclasses de IgG e ainda estimula a expressão de moléculas do MHC classe I e classe II e moléculas co-estimulatórias em células apresentadoras de antígenos (ABBAS et al., 2011). O IFN γ é bem reconhecido também por seu papel central na regulação de respostas imunes tumorais (ALSHAKER; MATALKA, 2011).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, células T ativadas, células NK e mastócitos e também significativamente produzida por células não-imunes como as células estromais da medula óssea. Atua sobre a maioria das células do organismo, pois expressam o receptor TNF-R1 e células do sistema imune, células endoteliais e fibroblastos que expressam o receptor TNF-R2. Seu efeito é amplificar a resposta

inflamatória e aumentar a produção de quimiocinas e outras citocinas. O TNF- α , juntamente com os produtos resultantes de sua estimulação, potenciam a resposta imune em caso de infecção (CANTAERT et al., 2010).

2.5 Propriedades Imunes das Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais.

As CTHs são conhecidas por terem uma possibilidade muito pequena de escape da rejeição imunológica após o transplante alogênico. A evidência atual sugere que *in vivo* o nicho das CTHs fornece um sítio imunológico privilegiado para essas células. Além disso, as CTHs também possuem certo perfil imunológico privilegiado através da regulação da expressão de moléculas de superfície (ZHENG et al., 2011).

Fujisaki et al. (2011) utilizando imagem *in vivo* de alta resolução demonstraram que as células T regulatórias (Treg) localizadas na área endosteal na medula óssea fornece proteção para as CTHs contra o ataque das células do sistema imune, através da produção de IL-10. Fora do nicho, as CTHs são capazes de se protegerem da fagocitose pelos macrófagos na resposta imune inata, através da expressão do CD47⁺, a qual se liga na proteína alfa de sinal regulatório presente na superfície do macrófago e assim inibe a fagocitose. Quando as CTHs são ativadas por potentes sinais inflamatórios e mobilizadas para a circulação, a expressão de CD47⁺ aumenta acentuadamente na superfície dessas células tronco (JAISWAL et al., 2009).

A CTH apresenta também mecanismo de escape do sistema imune adaptativo através da expressão da molécula CD274⁺ (B7-H1), a qual inibe ação do linfócito T. A expressão do CD274⁺ também aumenta após a mobilização. Desta forma a CTH pode superar a barreira imunológica alogênica modulando a resposta imune adaptativa (ZHENG et al., 2011).

As CTHs podem responder diretamente a um patógeno específico ou através da estimulação por citocinas (figura 10). As CTHs expressam receptores para as citocinas IFN- γ

(IFNR) e TNF- α (TNFR) e receptores Toll-like (TRL). A infecção ou os sinais inflamatórios ativam as CTHs a se diferenciarem para produzir células efetoras da resposta imunológica para combaterem a infecção (SIOUD, et al.,2006; REZZOUG et al., 2008; REZZOUG et al., 2008;ESSERS, et al., 2009; BALDRIDGE, et al., 2010; BALDRIDGE et al., 2011; KING; GOODELL, 2011).

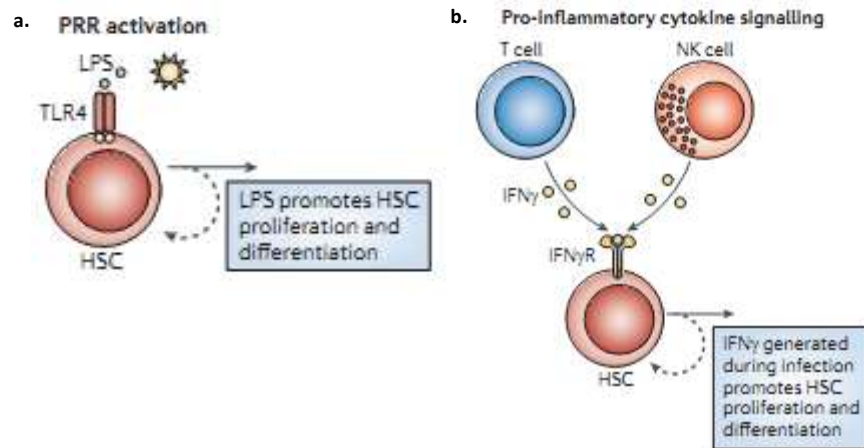


Figura 10. Imunomodulação das CTHs durante a infecção.
 FONTE: KING; GOODELL (2011).

Com base nesses achados, Zheng et al. (2011) propôs um modelo de interação entre as CTHs e o sistema imunológico interna e externamente ao nicho medular. A sinalização externa (“out” signals) é mediada pelas moléculas CD47⁺ e CD274⁺ que inibem o ataque dos componentes das respostas imunes inata e adaptativa. A sinalização interna (“in” signals) é mediada por citocinas inflamatórias, as quais induzem a diferenciação das CTHs através de receptores de superfície como TLR, TNFR, IFNR e outros (figura 11).

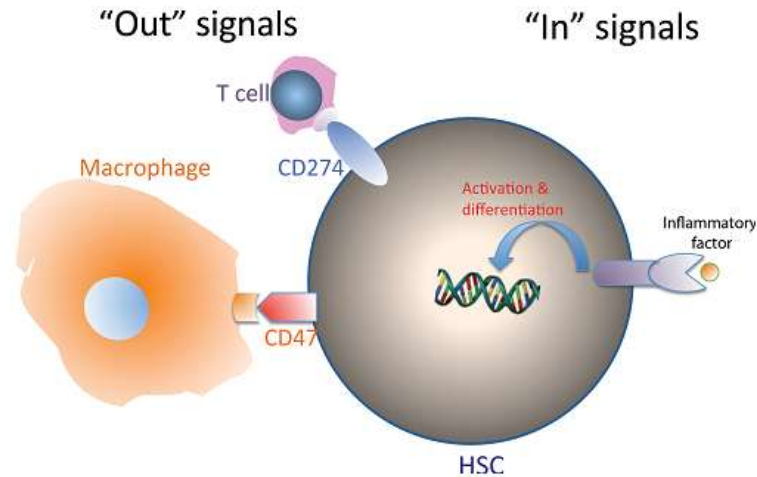


Figura 11. Modelo de interação entre as CTHs e o sistema imunológico.
FONTE: ZHENG et al. (2011).

As CTMs apresentam potencial regenerativo não somente pela sua capacidade de diferenciação celular (plasticidade), mas também pela sua capacidade de modular a resposta imunológica inata e adaptativa com efeitos imunossupressores e secreção de um largo espectro de substâncias bioativas como citocinas e fatores de crescimento (CAPLAN, 2007; REBELATTO, 2008; HOOGDUIJN et al., 2010). Essa capacidade das CTMs secretarem fatores solúveis altera funcionalmente o microambiente tecidual e superam a capacidade de transdiferenciação (XIANG et al., 2009; CHAMULEAU et al., 2009).

Essas características tornam o estudo contínuo sobre as CTMs de suma importância para otimizar sua utilização para terapia celular na área da Medicina Regenerativa e na Engenharia Tecidual (CAPLAN, 2007; REBELATTO, 2008).

Haynesworth et al. (1996) e Caplan (2006) estão entre os primeiros a descrever a capacidade das CTMs para expressar citocinas. Dentre os vários fatores parácrinos, as CTMs secretam IL-1, IL-1 β , IL-3 (CHEN et al., 2008), IL-7, IL-8, IL-11 (KRAMPERA et al., 2007), IL-6, IL-10 (UCCELLI et al., 2008), TNF- α , TGF- β 1 (ABARBANELL et al., 2009), fatores de crescimentos como fator de crescimento de célula-tronco (SCF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) (MEIRELLES et al., 2009) e quimiocinas como fator derivado de célula estromal 1 (SDF-1) (TING et al., 2008).

Acredita-se que essas citocinas exerçam efeitos "tróficos" que ajudam na reparação tecidual e na diferenciação das CTMs (HAYNESWORTH et al., 1996 apud ABARBANELL et al., 2009; CAPLAN; DENNIS, 2006). Esses efeitos tróficos podem ser subdivididos em anti-apoptóticos, suportivos (estimulação da mitose, proliferação e diferenciação de células tronco ou precursores intrínsecos do tecido) e angiogênico (figura 12) (MEIRELLES et al., 2009).

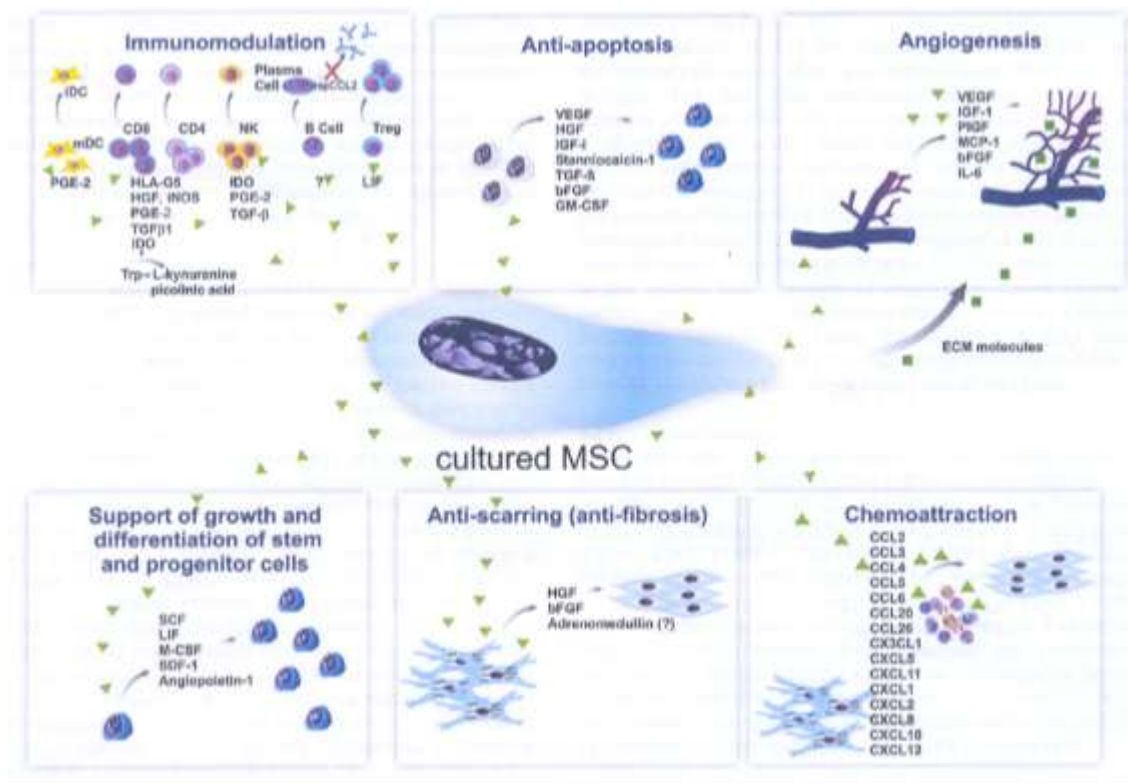


Figura 12. Efeitos parácrinos das CTMs.
FONTE: MEIRELLES et al. (2009).

Os mecanismos pelos quais as CTMs exercem seus efeitos imunossupressores ainda não estão totalmente esclarecidos, mas provavelmente envolvem contato célula-célula e a secreção de diversos fatores solúveis (YAGI et al., 2010). As CTMs influenciam a atividade imune dos linfócitos T e B, células natural killer (NK), células dendríticas (DC), macrófagos e neutrófilos, suprimindo através da secreção de fatores solúveis como TGF- β 1, HGF, óxido

nítrico (NO), idolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e prostaglandina E2 (PGE2) ou estimulando através da secreção das citocinas IL-1 e IL-6 (NASEF et al., 2007; ENGLISH et al., 2007; BARANIAK; McDEVITT, 2010).

As CTMs adultas são caracteristicamente desprovidas de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe II na superfície celular, porém apresentam baixos níveis de MHC classe I e não expressam moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 ou CD40, ou seja, não são imunogênicas (imunofenótipo MHC I⁺ MHC II⁻ CD40⁻, CD80⁻ e CD86⁻), portanto um transplante em um hospedeiro alogênico não requer imunossupressão. Essas características fazem das CTMs células pobres em apresentação de antígeno (BALL et al., 2008). O MHC classe I^{Low} expresso poderia ativar as células TCD8⁺, mas com a ausência de moléculas co-estimulatórias, um sinal secundário não seria acionado, deixando as células T CD8⁺ anérgicas (NELSON et al., 2009; CHEN et al., 2011).

As CTMs apresentam efeito inibitório sobre a maturação, ativação e diferenciação das células dendríticas através da produção de IL-6, M-CSF e PGE2 e pelo contato célula-célula (BARANIAK; McDEVITT, 2010; YAGI et al., 2010). Djouab et al. (2007) mostraram que as CTMs secretam altas concentrações de IL-6, a qual está envolvida na reversão da maturação das células dendríticas para um fenótipo imaturo e na inibição parcial da diferenciação de células progenitoras da medula óssea em células dendríticas. Chen et al. (2007) demonstraram que a PGE2 produzida pelas CTMs inibem a diferenciação e ativação das células dendríticas e com isso ocorre a inibição da produção e secreção de citocinas inflamatórias TNF- α e IFN- γ e a estimulação da produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; NAUTA; FIBBE, 2007). O aumento desta citocina leva ao aumento na proporção de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (MEIRELLES et al., 2008; HOOGDUIJN et al., 2010).

As CTMs suprimem a ativação e proliferação das células T em resposta a mitógenos e aloantígenos inespecíficos com a inibição da divisão celular na fase G0/G1 e pela indução de apoptose através da secreção da enzima IDO, a qual transforma o triptofano que é um aminoácido essencial para ativação dessas células, em produtos tóxicos no citoplasma. As CTMs suprimem principalmente as células Th1, reduzindo a secreção de IFN- γ . Porém, as CTMs aumentam a produção de IL-4 polarizando para células Th2. Isso indica que as CTMs alteram as células T de um estado pro-inflamatório (IFN- γ) para um estado antiinflamatório (IL-4) (AGGARWAL; PITTINGER, 2005; MEIRELLES et al., 2008; HERRERO; PÉREZ-SIMÓN, 2010).

As CTMs como potentes produtoras de IL-6 e TGF- β , podem influenciar significativamente na diferenciação de células Th17 e desta forma modular doenças autoimunes e reações imunes protetoras (SVOBODOVA et al., 2011). Carrión et al. (2011) demonstraram que as CTMs promovem a expansão do fenótipo Th17 pela alta secreção de IL-6 em co-cultura com linfócitos TCD4⁺ pré-ativados.

Os linfócitos B tem a sua proliferação, migração e diferenciação em plasmócitos e conseqüentemente a produção de imunoglobulinas inibidas por IL-6 e PGE2 secretadas pelas CTMs (NAUTA; FIBBE, 2007; ASSARI et al., 2009).

As CTMs inibem a proliferação e ativação das células NK mediada pelo TGF- β , IDO e PGE2 (BARANIAK; McDEVITT, 2010; YAGI et al., 2010).

Ortiz et al. (2007) e Raffaghello et al. (2008) sugeriram que as CTMs exercem papel na função de neutrófilos e macrófagos. A produção de TNF- α por macrófagos ativados é inibida e os neutrófilos são protegidos da apoptose pela secreção de IL-6.

Com esse perfil imunomodulatório por contato célula-célula e ações parácrinas, as CTMs induzem um fenótipo imunotolerante o que pode estender perspectivas futuras da utilização das CTMs em mais aplicações clínicas (YAGI et al., 2011).

2.6 Mobilização de Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais pela ação de G-CSF.

Os fatores de crescimento hematopoéticos são citocinas que atuam na formação, regulação e várias atividades funcionais das células hematopoéticas progenitoras e maduras como quimiotaxia, degranulação, ativação e citotoxicidade. Dentro dessa classe estão os fatores estimuladores de colônias (BARREDA et al. 2004; LICHTMAN et al., 2006), como o G-CSF (Fator estimulante de colônias de granulócitos, do inglês Granulocyte colony-stimulating factor) (NERVI et al., 2006; ARSLAN; MOOG, 2007).

O G-CSF é uma potente citocina produzida por vários tipos celulares da linhagem hematopoética como os monócitos, células progenitoras endoteliais, fibroblastos, células precursoras mesenquimais e cardiomiócitos (FIBBE et al., 1988; SCHWARZMEIER, 1996; LENHOFF et al., 1999; LAPIDOT; PETIT, 2002; HONOLD et al., 2006; VANDERVELDE et al., 2007; TATSUMI et al., 2008; ZHANG et al., 2011).

O alvo de atuação do G-CSF consiste em precursores tardios da linhagem neutrofílica e o próprio neutrófilo maduro (LICHTMAN et al., 2006; BARREDA et al. 2004). Os receptores de G-CSF (G-CSFRs) são encontrados em vários tipos celulares, tal como progenitores mielóides e endoteliais, neutrófilos maduros e monócitos (AVALOS, 1998; SRINIVAS et al., 2009).

O G-CSF regula a produção e acelera o processo maturativo de neutrófilos dentro da medula óssea e a sua liberação para o sangue periférico (BARREDA et al. 2004; LICHTMAN et al., 2006; ZHANG et al., 2011) e também proporciona a saída de células tronco (BALDO et al., 2010; ZHANG et al., 2011). A ação do G-CSF é similar ao do fator estimulante de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), consiste na liberação de enzimas serina-proteases, como elastase e G-catepsina, no microambiente medular, as quais irão clivar

proteínas de ancoragem VCAM-1 e c-kit e quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 que regulam mobilização e adesão de células (figura 13) (MÉNDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007). O fenômeno em que as células tronco hematopoéticas e mesenquimais, e progenitoras endoteliais saem da medula óssea, induzidas por fatores estimulantes, é denominado de “mobilização” (PELUS, 2008).

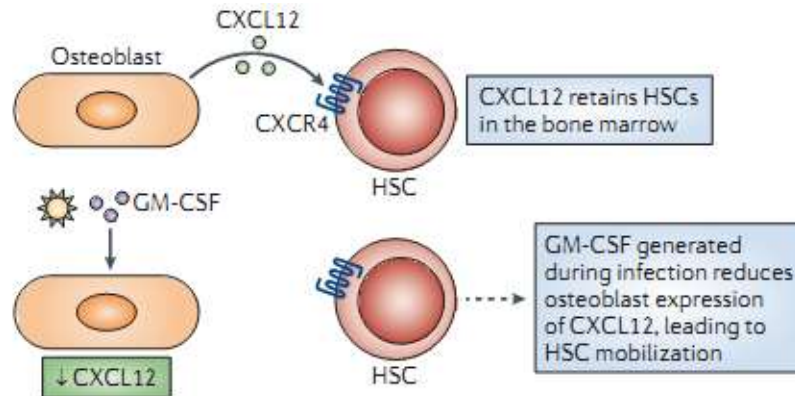


Figura 13. Ação do G-CSF para mobilização das CTHs.
 FONTE: KING; GOODELL (2011).

Durante a hematopoese não-estimulada na medula óssea, somente um pequeno número de células tronco hematopoéticas e as células progenitoras endoteliais circula no sangue periférico (PELUS, 2008). A administração de G-CSF aumenta acentuadamente a proliferação de progenitores hematopoéticos e células estromais mesenquimais na medula óssea e no sangue periférico (NERVI et al., 2006; CASHEN et al., 2007; RIPA et al., 2007; TATSUMI et al., 2008; CESSSELLI et al., 2009 BROUARD et al., 2010; BROUARD et al., 2010).

As CTHs de sangue periférico são capazes de reconstituir a hematopoese em curto e em longo prazo e são mais facilmente obtidas através de equipamentos automatizados de aférese, o qual é menos invasivo do que a coleta de medula óssea e o que permite a substituição da medula óssea como fonte de CTH tanto em transplantes autólogos quanto alogênicos (MENDRONE JÚNIOR, 2009; PELUS, 2010). No entanto, para se coletar um número suficiente de células tronco hematopoéticas do sangue periférico que garanta a

enxertia medular em um transplante autogênico e alogênico, as CTHs devem ser recrutadas da medula óssea para a circulação através de fatores estimulantes como o G-CSF (MENDRONE JÚNIOR, 2009).

O G-CSF é o mobilizador mais predominantemente usado na clínica, pois mobiliza mais células CD34⁺ e é geralmente bem tolerado (PELUS, 2010).

As primeiras evidências da presença de CFU-Fs no sangue periférico são provavelmente representadas pelas observações feitas no início do século passado por Maximow (1928) sobre a transformação de leucócitos circulantes em células fibroblásticas, com posterior diferenciação em tecido conjuntivo (MENDRONE JÚNIOR, 2009).

A presença de células com imunofenótipo de CTM no sangue periférico de indivíduos normais foi comparada com a de grandes queimados, com o objetivo de testar a hipótese de que, durante situações de grande lesão tecidual, o número destas células aumenta na circulação. Os autores encontraram CTM na circulação de ambos os grupos. No entanto, quando comparado com amostras obtidas de indivíduos normais, o sangue de pacientes com queimaduras mostrou uma percentagem significativamente maior de CTM. A porcentagem de CTM no sangue periférico apresentou correlação direta com a extensão e a gravidade da queimadura. Os autores concluíram que as CTMs encontradas no sangue periférico provavelmente desempenham importante papel no processo de regeneração de tecidos humanos (MANSILA et al., 2006 apud MENDRONE JÚNIOR, 2009).

O aumento da concentração de citocina inflamatória no sítio da inflamação é o maior causador do aumento da migração das CTMs preferencialmente para esses sítios, uma vez que, as CTMs apresentam receptores para essas quimiocinas (FOX et al., 2007). Além disso, a maioria dessas quimiocinas são mais efetivas quando estimuladas por citocinas inflamatórias TNF- α ou IL-1 β . Esses achados sugeriram que a mobilização de CTMs e o subsequente

“*homing*” dessas células para tecidos injuriados devem depender de um estado inflamatório local e sistêmico (PONTE et al., 2007).

Experimentos realizados *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que as CFU-Fs de sangue periférico mantêm a mesma capacidade de diferenciação mesenquimal das CFU-Fs provenientes da medula óssea, incluindo diferenciação em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblatos. A sua habilidade de multidiferenciação faz das CTMs de sangue periférico uma candidata potencial para aplicação em terapia celular e engenharia de tecidos. Além disso, constitui uma fonte mais facilmente acessível do que a medula óssea que requer um procedimento mais invasivo. No entanto, o número de CTMs no sangue periférico é inferior ao da medula óssea (KUZNETSOV et al., 2001; TONDREAU et al., 2005).

O isolamento de CTMs a partir do sangue periférico e a mobilização dessas células não estão bem esclarecidos. Tanto a presença quanto a ausência de CTMs no sangue periférico tem sido reportado (FERNANDEZ et al., 1997; LAZARUS et al., 1997; ZVAIFLER et al., 2000; KUZNETSOV et al., 2001; WEXLER et al., 2003; KASSIS et al., 2006). No geral, essa controvérsia pode ser devido a uma variação no volume de sangue usado como fonte de células e diferenças nos métodos usados para identificação das CTMs (PELUS, 2008).

Os relatos sobre a presença de CTMs na circulação e a sua capacidade de multidiferenciação, associada à maior facilidade na coleta em relação à medula óssea, tem despertado o interesse de vários pesquisadores sobre a utilização do sangue periférico como fonte de CTMs com propostas de terapia celular. Embora a medula óssea ainda represente a principal fonte de CTM, a identificação de marcadores imunofenotípicos que possam caracterizar as CTM de forma mais prática e objetiva e o conhecimento sobre mecanismos envolvidos no aparecimento destas células na circulação com possíveis estratégias para a

mobilização, poderão fazer o sangue periférico uma importante fonte de CTMs (MENDRONE JÚNIOR, 2009).

2.7 Cultivo de Células Tronco Mesenquimais

O cultivo celular é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo, mantendo o máximo de suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas (FRESHNEY, 1994). Na terapia regenerativa e engenharia tecidual, o cultivo celular também é realizado com o objetivo de expansão do número de células isoladas. As CTMs podem ser isoladas por vários métodos, sendo o mais frequente o gradiente de densidade para obtenção de células mononucleares (BYDLOWSKI et al., 2009). Em cultivo primário, as células são colocadas em uma superfície de crescimento, no caso das CTMs é uma superfície de poliestireno, isoladas a partir de um tecido ou órgão, a qual se mantém proliferando por um período de tempo limitado. Essa expansão é realizada pela manutenção das células em frascos de cultivo, com meio de cultivo apropriado, suplementado com diversos fatores, de acordo com o destino final das células, até que as células atinjam 80-85% de confluência. Após o cultivo primário, é necessário fornecer uma nova fonte de nutrientes e espaço para o crescimento contínuo das linhagens celulares, levando ao requerimento periódico das subculturas (MATHER; ROBERTS, 1998; FRESHNEY, 2006). Para realização de uma subcultura, após atingir confluência, as células devem sofrer uma dissociação enzimática ou remoção mecânica da superfície de crescimento, para serem expandidas para mais frascos de cultura, técnica denominada de passagem celular ou expansão (PATRÍCIO, 2010).

As CTMs podem ser cultivadas em meio de cultivo completo, em frascos ou placas de cultura, nos quais elas se aderem, começam a se proliferar (KRAMPERA et al., 2006). As células são mantidas em incubadora a 37° com 5% de CO₂ o que facilita a manutenção do pH

do meio, permitindo que as trocas das células com o meio sejam mais eficientes (FRESHNEY, 1994). Os meios mais comumente utilizados são os meios contendo solução balanceada de sais como MEM, Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbeco (DMEM), Meio de Dulbeco modificado por Iscove`s (IMDM), Meio Basal de Eagle (BME), com adição de soro fetal bovino (SFB) normalmente na concentração de 10-20% (TAPP et al., 2009 apud PATRICIO, 2010).

A concentração de SFB afeta a proliferação das CTMs por conter diversas citocinas e fatores de crescimento, como fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidermal (TAPP et al., 2009).

As trocas de meio de cultivo e o número de passagens variam de acordo com o protocolo utilizado, mas o mais comum são as trocas de meio a cada três dias e a realização de subcultura até 3^a e 4^a passagens para início da diferenciação celular (TROPEL et al., 2004; BITTENCOURT et al., 2006; BUNNELL et al., 2008; NEUPANE et al., 2008; SUNG et al., 2008).

Em cultura, as CTMs apresentam 3 fases de crescimento: a) inicial, com duração de 3 a 4 dias, logo após o plaqueamento, com crescimento celular muito lento; b) logarítmica, durante as primeiras passagens, com crescimento acelerado; c) *plateau*: inicia-se quando a célula atinge a senescência e perde a capacidade de expansão (BRUDER, et al., 1997; COLTER et al., 2000).

Uma das características das células tronco mesenquimais, quando cultivadas em baixa densidade é a adesão com formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóide (CFU-F) (FRIEDENSTEIN et al., 1976 apud KRAMPERA et al., 2006). Presume-se que essas colônias sejam derivadas de uma única célula precursora (DEANS; MOSELEY, 2000). Na literatura, a frequência de CFU-F foi descrita em diversos trabalhos variando entre $3,4 \times 10^{-3}$ a 10^{-6} de células tronco mesenquimais plaqueadas a partir das células mononucleares da medula

óssea (GUTIERREZ-RODRIGUEZ et al., 2000; DAZZI et al., 2006; WEXLER et al., 2003 apud WENCESLAU, 2009).

Algumas células da linhagem hematopoética também podem aderir, mas, com o tempo, com as várias trocas do meio de cultura, são removidas. Portanto, enquanto este procedimento elimina a maior parte das células contaminantes, a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente com as diversas trocas de meio e passagens e, após determinado número delas, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as CTMs (BYDLOWSKI et al., 2009).

Apesar de não serem imortais, as CTMs tem capacidade de se expandir numerosas vezes em cultura, mantendo seu potencial de crescimento e multipotencialidade, com um tempo de duplicação dependente do doador do qual as células foram obtidas e da densidade de plaqueamento inicial. Este último constitui um parâmetro crítico para assegurar uma boa taxa de expansão e a manutenção do potencial de diferenciação das CTMs. Alguns pesquisadores demonstraram que, para algumas culturas, há necessidade de iniciá-las com uma densidade muito baixa. De acordo com estudos de caracterização com CTMs humanas, elas têm potencial para se proliferarem sem se diferenciarem por até 40 gerações ou passagens (HORWITZ et al., 1999; PITTENGER et al., 1999).

À microscopia de contraste de fase, as CTMs apresentam-se como fibroblastos alongadas e fusiformes, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante (TAGAMI et al., 2003). Durante o cultivo, ocorre transição da morfologia das células, de alongadas para células grandes, achatadas e largas, com proliferação lenta (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito do G-CSF sobre o perfil de citocinas produzidas pelas células tronco mesenquimais e hematopoéticas da medula óssea e sangue periférico em cultura primária.

3.2 Específicos

- Avaliar a cinética de mobilização das células tronco mesenquimais e hematopoéticas da medula óssea para o sangue periférico induzida pelo G-CSF;
- Caracterizar as células tronco mesenquimais e hematopoéticas através de marcadores de superfície em aspirado de medula óssea e sangue periférico;
- Avaliar o efeito do G-CSF sobre a produção de citocinas na cultura primária das células tronco;
- Relacionar a produção das citocinas no sobrenadante das culturas primárias com a diferenciação das células tronco mesenquimais.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Esse estudo se caracteriza por uma pesquisa básica, com experimentação em modelo animal de laboratório, pelo qual foi avaliado o efeito do G-CSF sobre a produção de citocinas pelas células-tronco hematopoéticas e mesenquimais de medula óssea e sangue periférico de camundongos.

4.2 Informações Éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEa-UFAM) no protocolo nº017/2010 em reunião de 07/05/2010, por estar de acordo com os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº6638 da Republica Federativa do Brasil que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais.

4.3 População de Estudo

Para este estudo foram usados 72 camundongos fêmeas Swiss com 3-4 semanas de vida provenientes do Biotério Central da CEDEME de São Paulo. Esses animais foram divididos em 6 grupos de 12 animais. Os mesmos foram mantidos em gaiolas apropriadas, alimentados com ração padrão e água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), temperatura e umidade controlados, no Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Os grupos foram organizados da seguinte forma:

- Grupo Controle– grupo C ($n = 12$)
Neste grupo não foi administrado o G-CSF.
- Grupo Dose#1 ($n = 12$)
Neste grupo foi administrada apenas uma dose de G-CSF.
- Grupo Dose#2 ($n = 12$)
Neste grupo foram administradas duas doses de G-CSF em intervalo de 24 horas.
- Grupo Dose#3 ($n = 12$)
Neste grupo foram administradas três doses de G-CSF em intervalo de 24 horas.
- Grupo Dose#4 ($n = 12$)
Neste grupo foram administradas quatro doses de G-CSF em intervalo de 24 horas.
- Grupo Dose #5 ($n = 12$)
Neste grupo foram administradas cinco doses de G-CSF em intervalo de 24 horas.

4.4 Procedimentos

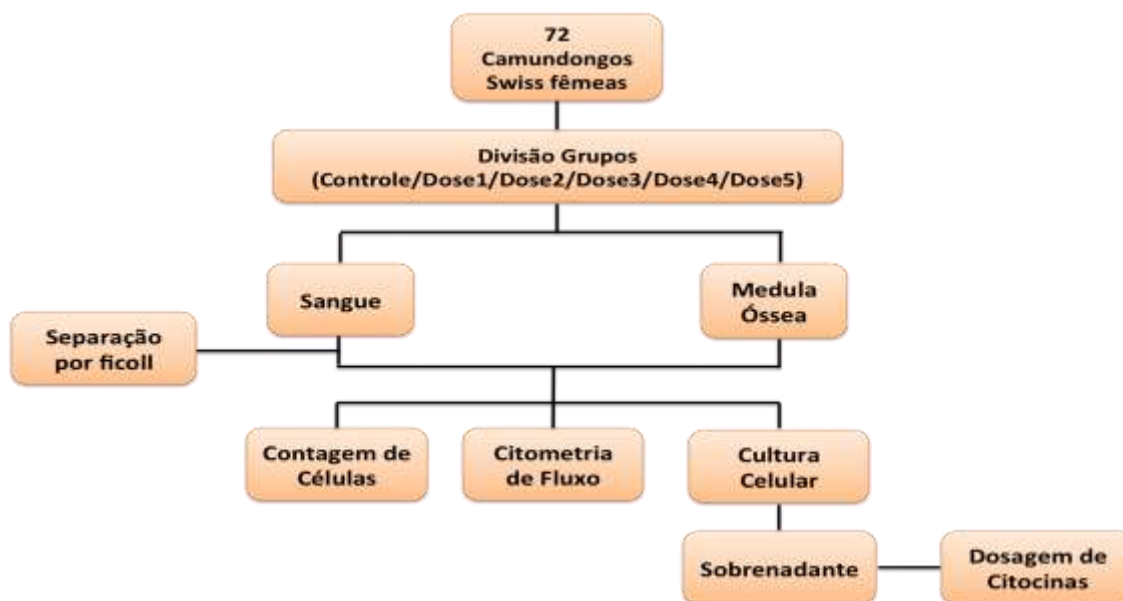


Figura 14. Fluxograma de procedimentos.

4.4.1 Preparo e Isolamento de Células Tronco Hematopoéticas e Mesenquimais

Para obtenção das células tronco hematopoéticas e mesenquimais foi administrado o G-CSF (Filgrastine[®], Blausiegel, Cotia, SP), na dose de 200 µg/kg, por via intraperitoneal por um período de cinco dias consecutivos em intervalo de 24 horas. O procedimento de coleta foi realizado na sala Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas. Foi coletado através do plexo ocular com pipeta Pasteur heparinizada, um volume de aproximadamente 2mL de sangue de dois animais por dia, durante cinco dias consecutivos, para que se obtivesse um pool celular, sendo que a primeira coleta foi feita no segundo dia após o início do tratamento com G-CSF e a última coleta foi realizada 24 horas após a quinta dose. Após a coleta, as amostras de sangue foram acondicionadas em recipiente refrigerado e transportadas para o Laboratório de Terapia Celular da Fundação HEMOAM para serem processadas.

Em seguida a coleta de sangue periférico os animais foram eutanasiados por deslocamento da coluna cervical. Para a coleta da medula óssea, os fêmures direito e esquerdo de cada animal foram retirados por procedimento cirúrgico. Os mesmos foram lavados em placa de Petri com PBS estéril (Solução tamponada com fosfato) e as epífises foram cortadas, possibilitando a entrada da agulha da seringa de 1mL na cavidade medular e a injeção de 1mL de PBS estéril para a retirada das células. O lavado foi coletado em tubo de fundo cônico de 15mL estéril. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em recipiente refrigerado e transportadas para o Laboratório de Terapia Celular da Fundação HEMOAM para serem processadas.

O sangue coletado foi processado dentro da capela de fluxo laminar nível II, previamente esterilizado com álcool a 70% e depois por 15 minutos com ultra-violeta (UV) ligada. Uma

alíquota do sangue foi separada para citometria de fluxo e o restante foi utilizado para o isolamento das células mononucleares por gradiente de Ficoll-Hypaque™, volume a volume (sangue/Ficoll) em tubo de fundo cônico de 15mL estéril. Este passou por centrifugação a 1900 rpm por 25 minutos, a 18-20°C e sem freio. Em seguida, o anel formado de células mononucleares (creme de leucócitos) foi cuidadosamente coletado com micropipeta de 100µL e transferido para outro tubo de fundo cônico de 15mL (figura 15). Esse anel de células foi ressuspenso em 2mL de PBS estéril e centrifugado a 1900 rpm por 15 minutos a 18-20°C com freio. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspenso mais uma vez em 2mL de PBS estéril para ser centrifugado a 1900rpm por 15 minutos a 18-20°C com freio. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuspenso em 2mL de PBS estéril e homogeneizado. Uma alíquota dessa suspensão foi separada para realização da contagem de células através do hemocitômetro (SYSMEX, modelo XT-2000i). Diante do número de células foi feito o plaqueamento nos frascos de cultivo.

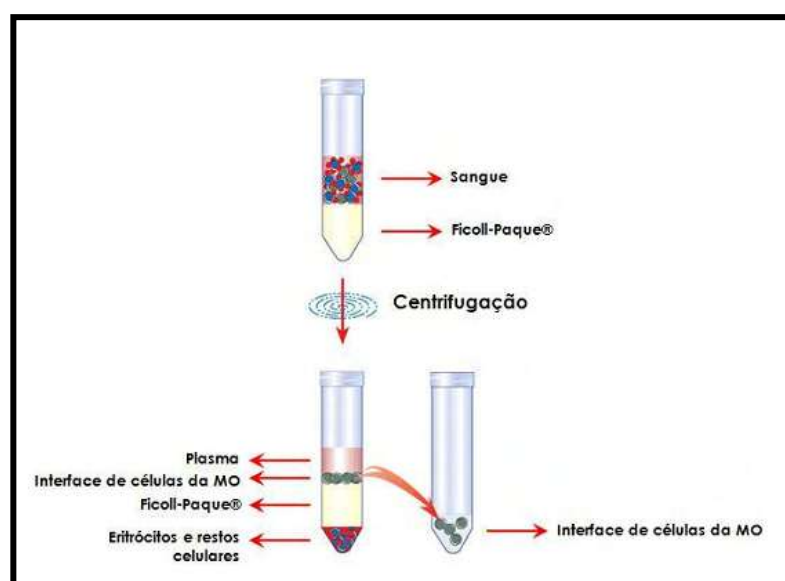


Figura 15. Procedimento de separação celular em gradiente de Ficoll.

FONTE: WODEWOTZKY (2008).

Após a coleta, a medula óssea foi centrifugada a 1200rpm por 10 minutos a 18-20°C. Em seguida, a medula óssea foi processada dentro da capela de fluxo laminar nível II. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspendido em 2mL de PBS estéril para ser novamente centrifugado a 1200rpm por 10 minutos a 18-20°C. Em seguida, esse processo foi repetido. Da suspensão celular obtida, uma alíquota foi separada para a contagem do número de células através do hemocitômetro (SYSMEX, modelo XT-2000i). Diante do número de células foi feito o plaqueamento nos frascos de cultivo.

4.4.2 Imunofenotigem *ex vivo* das CTHs e CTMs

A caracterização morfológica e imunofenotípica das células tronco hematopoéticas e mesenquimais mobilizadas para o sangue periférico e da medula óssea dos camundongos foram feitas por citometria de fluxo. A primeira etapa da citometria consistiu na marcação das células com anticorpos monoclonais que se fixaram nas moléculas de superfície das células tronco. Esses anticorpos são marcados com fluorescência e estas são captadas pelo citômetro de fluxo. Nesse estudo foi utilizado, tanto para o sangue quanto para medula, o seguinte painel de anticorpos monoclonais marcados divididos em 2 tubos: 1) anti-CD14⁻ marcado com FITC (Isotiocianato de fluoresceína-VERDE - Code 553739, lote 24790, marca Becton Dickinson Biosciences), anti-CD73⁺ marcado com PE (Ficoeritrina-VERMELHA- Code 550741, lote 69192, marca Becton Dickinson Biosciences), anti-CD90⁺ marcado com PercP (Clorofilpiridina-LARANJA - code 557266, lote 51139, marca Becton Dickinson Biosciences) e anti-CD105⁺ marcado com APC (Aloficocianina - code 130-092-930, lote 5100528058, marca Miltenyi Biotec); 2) anti-CD34⁻ marcado com PE (Ficoeritrina-VERMELHA- Code 551387, lote 53197, marca Becton Dickinson Biosciences) e anti-CD45⁻ marcado com PercP (Clorofilpiridina-LARANJA - code 557235, lote 60517, marca Becton Dickinson Biosciences). Foi utilizado um terceiro tubo (tubo controle)

contendo apenas sangue total ou medula óssea, o qual foi usado como controle para realização de ajustes na leitura da população celular e eliminação da auto-fluorescência das células. Após a marcação foi feita a destruição (lise) das hemácias, com o uso de solução de lise (FACS Lysing solution, BD®).

Em cada tubo de citometria foi utilizado 5µL de cada anticorpo e em seguida, foi adicionado 100µL do sangue total e da medula óssea nos seus respectivos tubos. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após essa etapa de marcação, foi adicionado, em cada tubo, 2mL da solução de lise de hemácias (FACS Lysing solution, BD®) diluída 10x em água destilada. Os tubos foram homogeneizados e incubados por mais 10 minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Passada essa incubação, os tubos foram centrifugados a 1300 rpm por 7 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se sobre as células 2mL de PBS-wash 1X (solução tamponada com fosfato com 0,5% de albumina bovina) para serem lavadas e em seguida novamente homogeneizadas e centrifugadas a 1300 rpm por 7 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 300µL de PBS-wash 1X para fazer a aquisição da amostra no citômetro de fluxo. A leitura foi feita no Citômetro de Fluxo Becton Dickinson (BD) – FACSCalibur® da Fundação HEMOAM.

Para a identificação morfométrica e imunofenotípica das CTMs e CTHs foi utilizado o programa FlowJo (versão 9.4). Foram utilizados “gates” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas com características imunofenotípicas das células identificadas pelo uso dos anticorpos monoclonais marcados com fluorescências descritos acima. Os gráficos utilizados foram do tipo “contour plot” e histograma, pois apresentaram uma melhor visualização das estratégias de análise.

Para identificação das CTMs foi feito primeiramente um gráfico de SSC x CD90 (Figura 16A) e uma “gate” foi feita na região CD90⁺ cujo marcador é expresso pelas CTMs. Em seguida, foram excluídas as células CD14⁺ (Figura 16B) e por fim foram selecionadas as células duplo marcadas com CD105⁺ e CD73⁺ (Figura 16C).

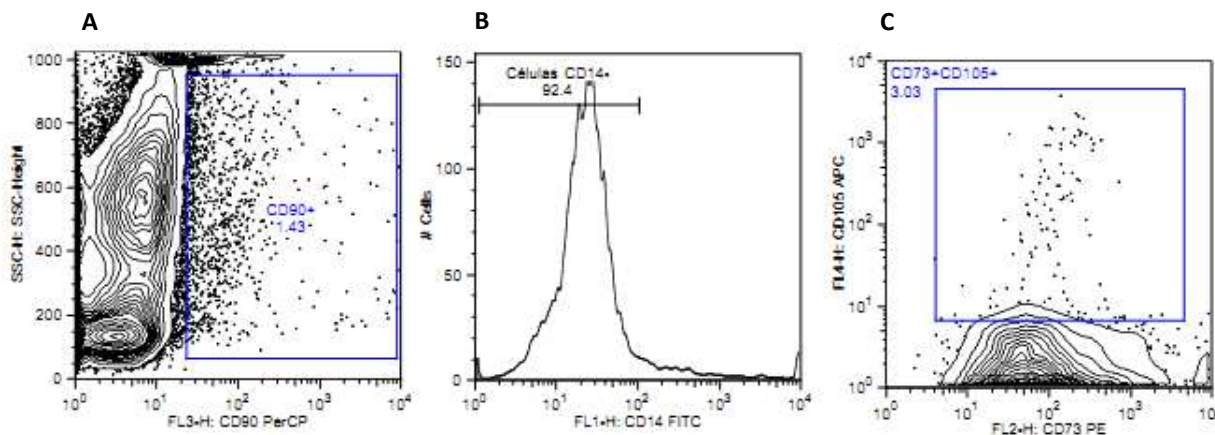


Figura 16. Identificação da população de células tronco mesenquimais no programa FlowJo (versão 9.4). Gráfico A – Identificação da população CD90⁺. Gráfico B – Identificação da população CD90⁺CD14⁻. Gráfico C – Identificação da população de célula tronco mesenquimal (CD73⁺CD105⁺)

As CTHs foram caracterizadas primeiramente pela expressão de CD45⁺ utilizando-se gráficos de SSC x CD45 (Figura 17A), em seguida foram selecionadas as células CD34⁺ com pouca granulosidade em gráfico de SSC x CD34 (Figura 17B). O passo seguinte foi identificar as células com baixa expressão de CD45⁺ (Figura 17C) e por fim selecionar as células com tamanho e granulosidade baixos (Figura 17D).

Após a identificação e quantificação das CTMs e CTHs foram geradas tabelas no excel com todos os percentuais e quantitativos das populações de interesse para posterior análise estatística.

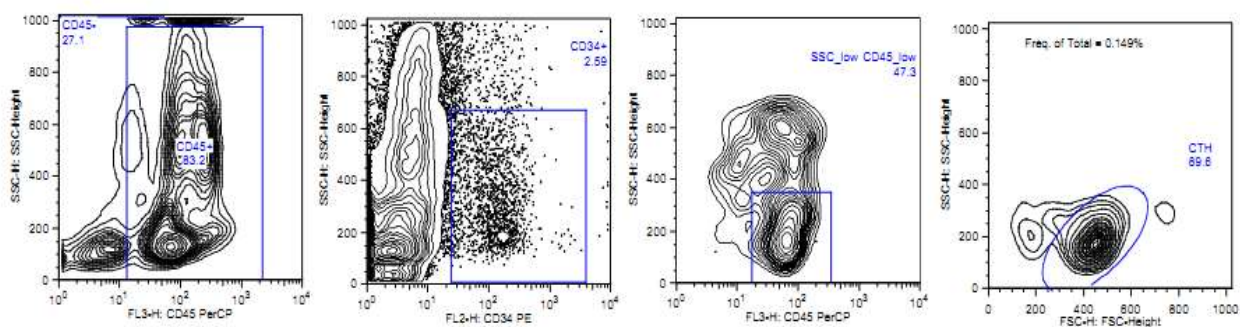


Figura 17. Identificação da população de células tronco hematopoéticas no programa FlowJo (versão 9.4). Gráfico A – Identificação da população CD45⁺. Gráfico B – Identificação da população CD34⁺. Gráfico C – Identificação da população CD45^{+Low}. Gráfico D – Identificação da população de célula tronco hematopoética (CD34⁺CD45^{+Low}).

4.4.3 Cultura *in vitro* das Células tronco Mesenquimais

O plaqueamento das células foi feito em frascos de cultivo de 25cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) a partir das células mononucleares isoladas, tanto do sangue periférico quanto da medula óssea, ressuspensas em 1mL de PBS estéril. Um total de 1x10⁶ células/mL foi plaqueado em 5mL de meio IMDM (Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium) (GibcoTM Invitrogen, NY, USA) suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (GibcoTM Invitrogen, NY, USA) e 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (GibcoTM Invitrogen, NY, USA). Em seguida, os frascos de cultivos foram colocados em estufa a 37° C com 5% CO₂. Para esse procedimento foram utilizados dois frascos para cada amostra de sangue e de medula.

Cerca de 72h após o plaqueamento, foi realizada a primeira troca de meio de cultivo, desprezando-se as células que não aderiram a superfície plástica dos frascos de cultura. Essa troca foi feita continuamente a cada 3 dias até completar um período de 15 dias de cultura primária (P0). Antes de cada troca de meio, os frascos de cultivos foram levados ao microscópio invertido (NIKON, modelo Eclipse TS100) para observação da população celular e registro através da

câmera fotográfica (MOTIC, modelo moticam 2300) acoplada ao microscópio. A cada troca de meio, uma alíquota de 1mL do sobrenadante de cada frasco foi separada em tubos criogênicos estéreis e congeladas em freezer -80°C , para posterior dosagem de citocinas. As CT mesenquimais em cultivo têm grande capacidade de aderência à superfície de crescimento da placa de cultivo, desta forma, as células das linhagens hematopoiéticas e progenitoras, que não eram de interesse para o estudo, foram descartadas por aspiração do sobrenadante do frasco de cultivo.

4.4.4 Dosagem de Citocinas no Sobrenadante da Cultura Primária das Células-tronco Mesenquimais (Cytometric Bead Array-CBA).

Para a dosagem de citocinas as amostras de sobrenadante foram descongeladas e homogeneizadas. A dosagem foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (Cytometric Bead Array) seguindo os protocolos preconizados pelo Kit BDTM MS TH1-TH2-TH17 CBA KIT da Becton Dickinson Biosciences. Através desse kit foram quantificadas as citocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17: IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-17.

O BDTM Cytometric Bead Array (CBA) utiliza uma série de partículas (microesferas ou beads) com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada bead de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE)-conjugado a anticorpos que fornece um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a bead. Os complexos formados de bead de captura + citocina da amostra + reagente de detecção são mensurados através da citometria de fluxo. A intensidade da fluorescência PE de cada complexo revela a

concentração em pg/mL de cada citocina. Foi utilizado o citômetro de fluxo Becton Dickinson (BD) - FACScalibur[®] da Fundação HEMOAM para aquisição das amostras. Para o cálculo das concentrações e intensidade média de fluorescência de cada citocina foi utilizado o software FCAP array[™] versão 1.0.1.

4.4.5 Análise Estatística

Os resultados das variáveis (porcentagem de células, concentração de citocinas, tempo de cultura e dosagem de G-CSF) foram armazenados no programa Excel[®] 2007 para Windows7[®]. Para a análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPadPrism[®] versão 5.

Os dados foram testados quanto à hipótese de normalidade por meio do teste de Bartlett. Os dados não-paramétricos foram comparados pela análise de variância em relação à mediana utilizando o teste Mann-Whitney e para a análise das correlações foi utilizado o teste de comparação múltipla Tukey. Foi utilizado intervalo de confiança de 95% e os dados considerados com significância estatística foram aqueles que apresentaram p valor < 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da administração do G-CSF na cinética de Mobilização das CTMs e CTHs

O primeiro passo no presente estudo foi avaliar a influência do número de doses de G-CSF na mobilização de CTMs e CTHs, nos diferentes compartimentos, medula óssea e sangue periférico de camundongos. Como demonstra o gráfico 01, o pico de CTMs derivada da medula óssea ocorreu com 4 doses de G-CSF, e foi significativamente diferente quando comparado com a 2ª dose, enquanto que o percentual de CTHs na medula óssea foi significativamente maior na 2ª dose de G-CSF, diminuindo progressivamente até a 4ª dose.

Por outro lado, observou-se um percentual significativamente maior de CTMs na 5ª dose quando comparado com as doses 2, 3 e 4, no sangue periférico. O percentual de CTHs foi maior na 4ª dose de G-CSF, porém não houve diferença estatística significativa do percentual destas células quando comparado com as demais doses administradas (gráfico 01).

A razão de CTMs em relação às CTHs, em ambos os compartimentos avaliados, tanto medula óssea quanto sangue periférico foi maior com 4 doses de G-CSF, sendo que a quantidade de CTMs mobilizadas foi maior que a de CTHs, sendo esta diferença entre as doses estatisticamente significativa. Além disso, como pode ser observado no gráfico 02, a razão de CTMs/CTHs, foi maior na medula óssea que no sangue periférico.

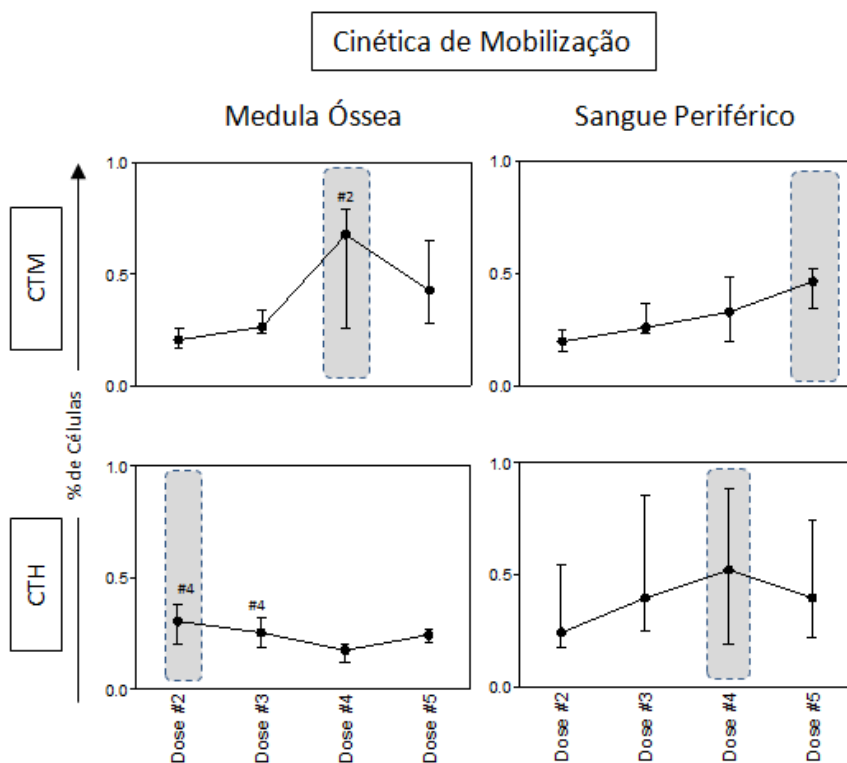


Gráfico 01. Influência do número de doses aplicadas de G-CSF na mobilização de CTMs e CTHs na medula óssea e sangue periférico. Pico de CTMs na medula óssea com 4 doses de G-CSF (#2 $p < 0,05$ vs duas doses de G-CSF). Percentual de CTH significativamente maior com 2 doses de G-CSF (#4 $p < 0,05$ vs quatro doses de G-CSF). Percentual de CTMs maior na 5ª dose em comparação com as demais ($p < 0,05$) no sangue periférico. Percentual de CTHs maior na 4ª dose sem diferença significativa ($p > 0,05$). Quadro cinza tracejado indica a dose que estimulou maior concentração de células.

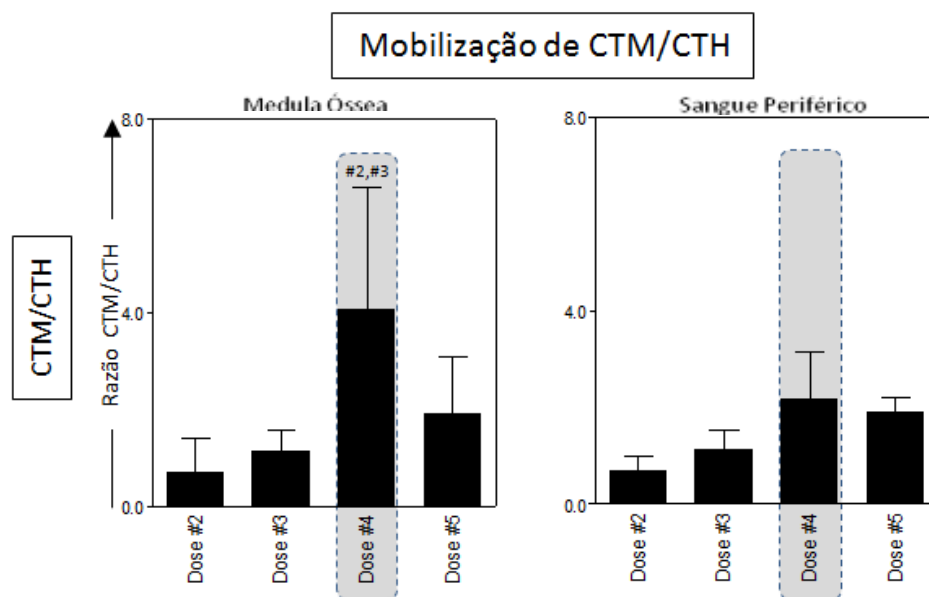


Gráfico 02. Razão de CTM/CTH mobilizadas na medula óssea e no sangue periférico em relação as doses de G-CSF. Razão CTM/CTH maior na 4ª dose de G-CSF em ambos medula óssea e sangue periférico indicada pelo quadro cinza tracejado. Foi identificado diferença significativa comparado com as demais doses ($p < 0,05$). Maior razão CTM/CTH na medula óssea.

5.2 Fotomicroscopia de culturas *in vitro* das CTMs e CTHs de medula óssea e sangue periférico

O uso de células tronco na terapia celular requer uma expansão do número de células isoladas através da técnica de cultivo celular, o qual permite também manter células isoladas fora do organismo, preservando o máximo de suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Assim, após a mobilização de CTs por meio do G-CSF, as células isoladas foram colocadas em cultura para expansão de CTMs, observação do efeito da dose de G-CSF sobre essa expansão e avaliação das citocinas secretadas no meio de cultivo.

Nas culturas primárias (P0) de medula óssea dos animais que receberam 2 doses de G-CSF não foi observado células com morfologia fibroblastóide (fusiforme) alongadas e aderentes em todo o período de cultivo, apenas uma pequena população de células hematopoéticas (figura

18). Entretanto, nas culturas de medula óssea dos animais que receberam 3, 4 e 5 doses foi observado células com morfologia fibroblastóide (fusiforme) alongadas e aderentes e ainda pequenas formações de colônias celulares foram observadas, por meio da microscopia de contraste de fase, partir do 6º dia de cultura de 3 doses e a partir do 9º dia de cultura de 4 e 5 doses de G-CSF (figuras 19, 20 e 21). Nas culturas de 4 e 5 doses ainda foi observado células grandes, achatadas, largas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante, características de células tronco mesenquimais após transição das células fibroblastóides alongadas (figuras 20 e 21).

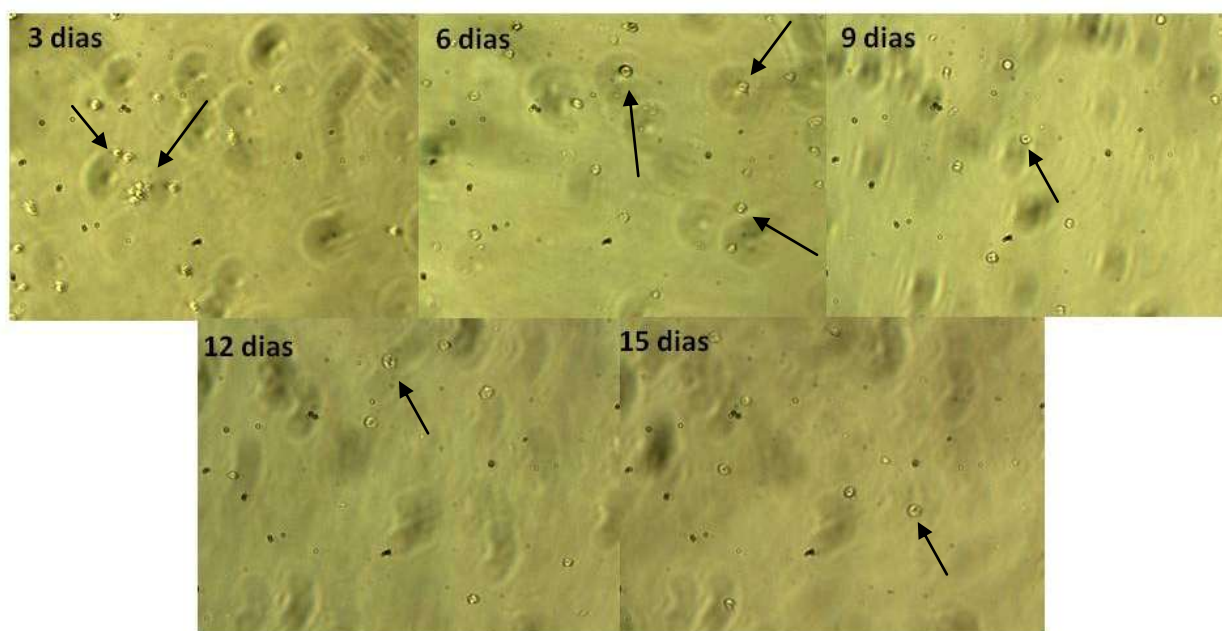


Figura 18. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 2 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

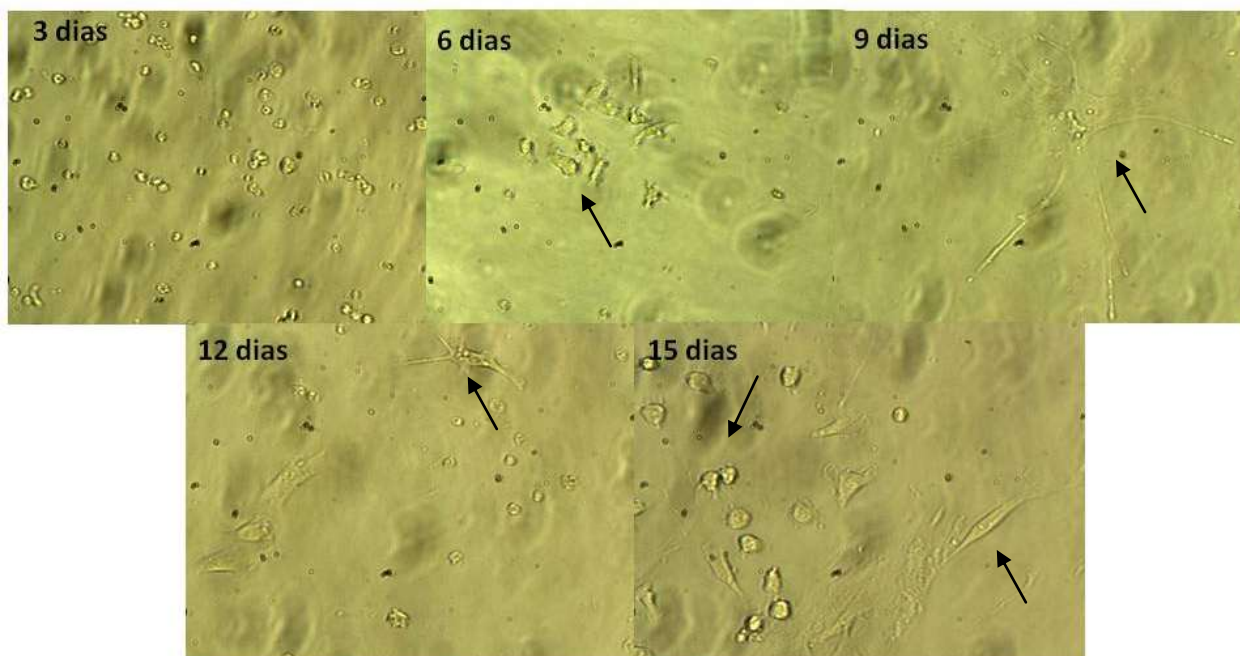


Figura 19. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 3 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

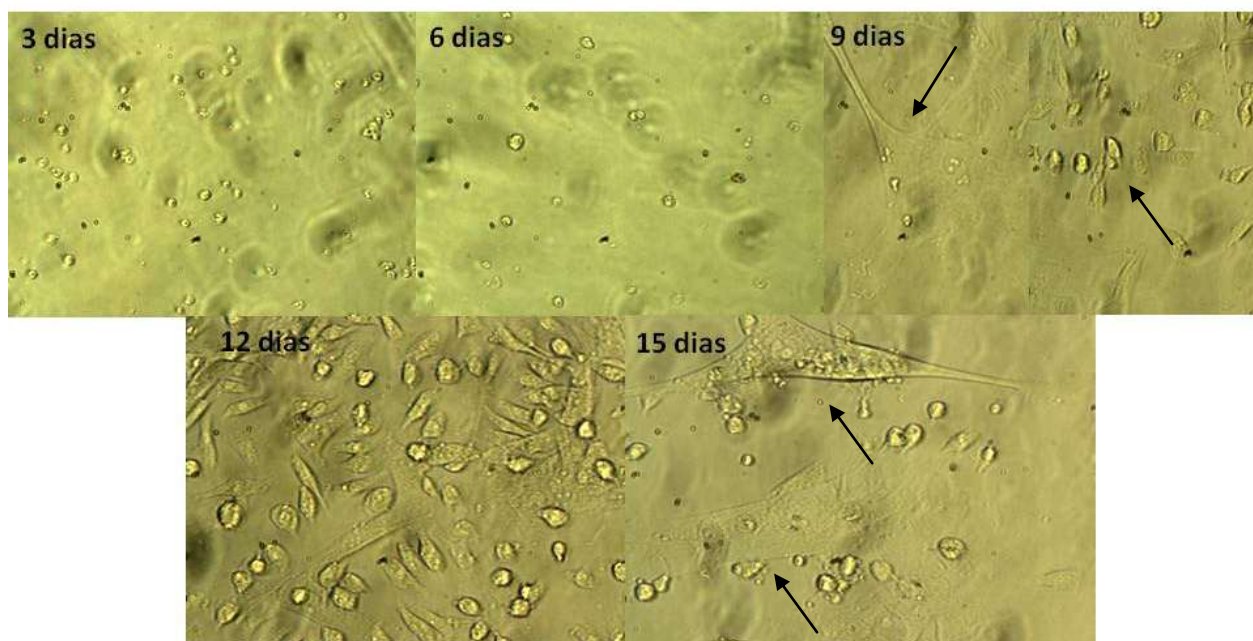


Figura 20. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 4 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

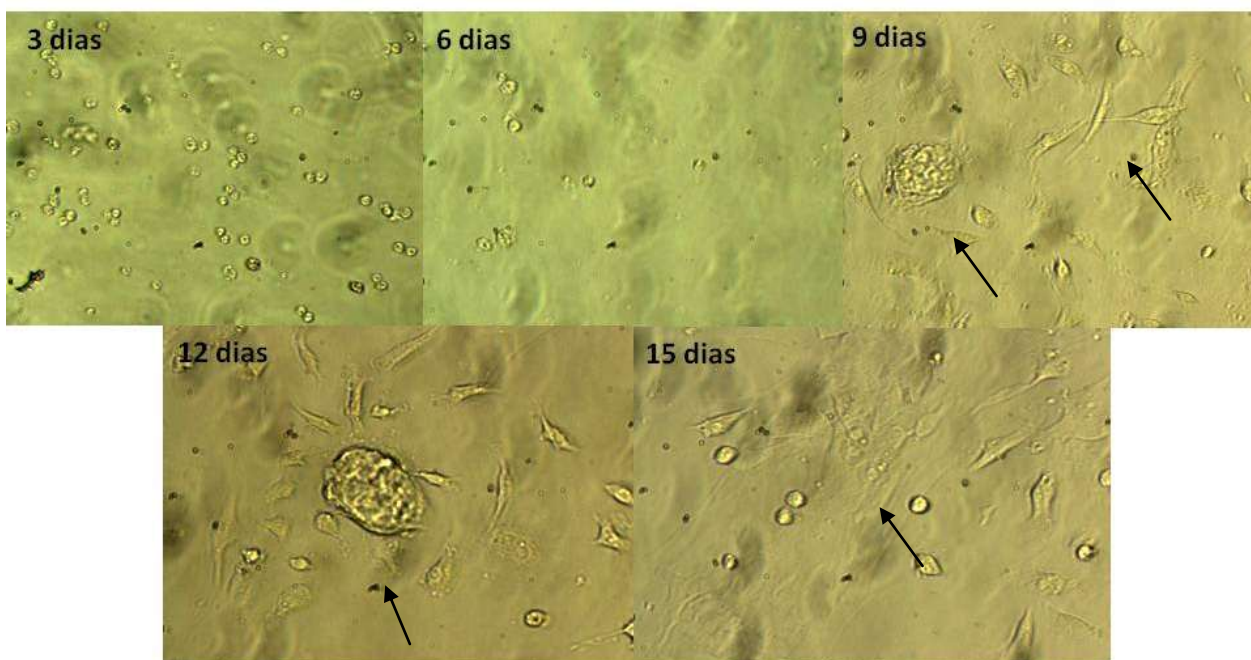


Figura 21. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de medula óssea de camundongos que receberam 5 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

Diferente das culturas de medula óssea, nas culturas primárias (P0) de sangue periférico dos animais que receberam 2 doses de G-CSF, a presença de células com morfologia fibroblastóide (fusiforme) alongadas e aderentes foi observada a partir do 12^o dia até o final de cultivo (figura 22). No entanto, nas culturas dos animais que receberam 3 doses de G-CSF foi observado a presença dessas células durante os 15 dias de cultivo. A partir do 12^o dia, houve transição dessas células fibroblastóides para células mais diferenciadas, grandes, achatadas, largas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante (figura 23). Nas culturas de sangue periférico de 4 e 5 doses, ao contrário das culturas de medula, não foram observadas células fibroblastóides alongadas (figuras 24 e 25). As células hematopóéticas foram observadas em maior quantidade nos primeiros dias de cultura tanto da medula óssea quanto de

sangue periférico, porém essa quantidade foi reduzindo com as várias trocas de meio até o final do cultivo primário (P0).

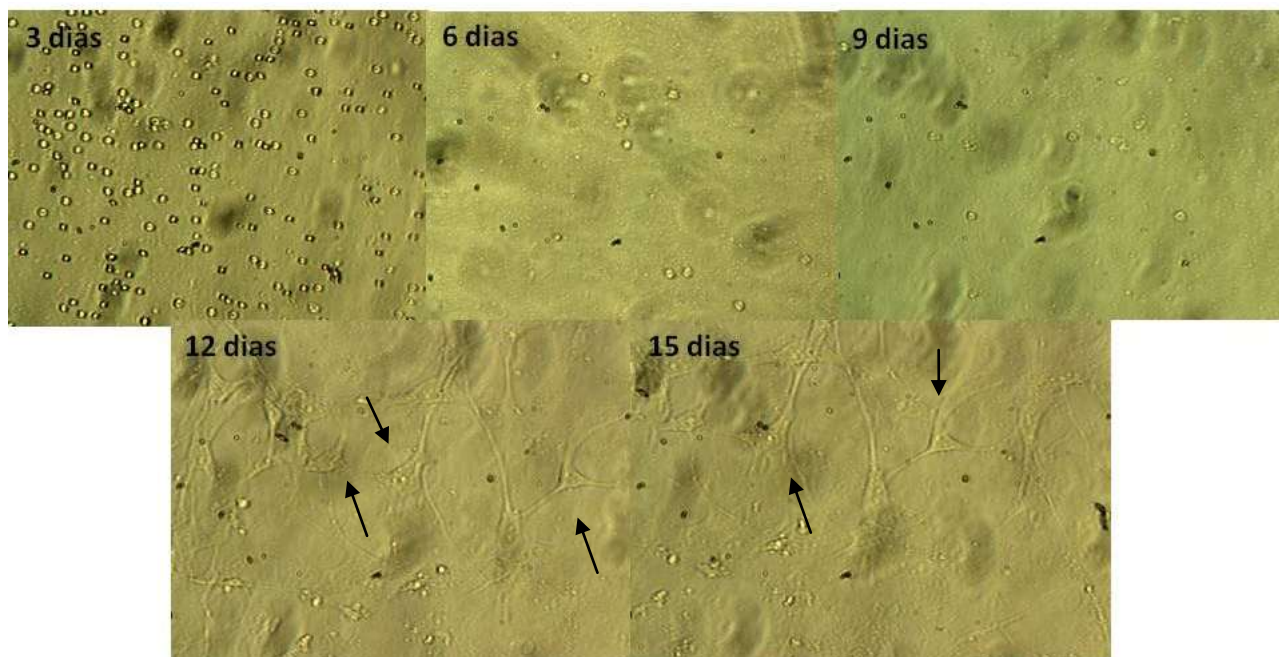


Figura 22. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 2 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

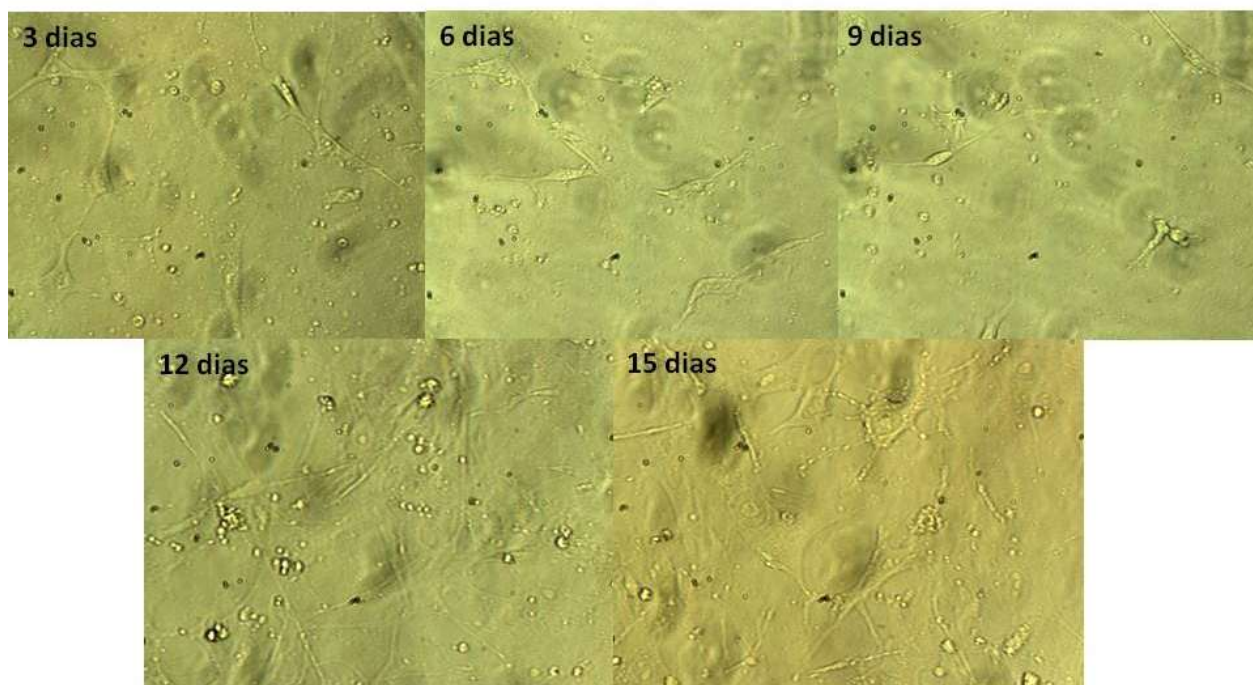


Figura 23. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 3 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

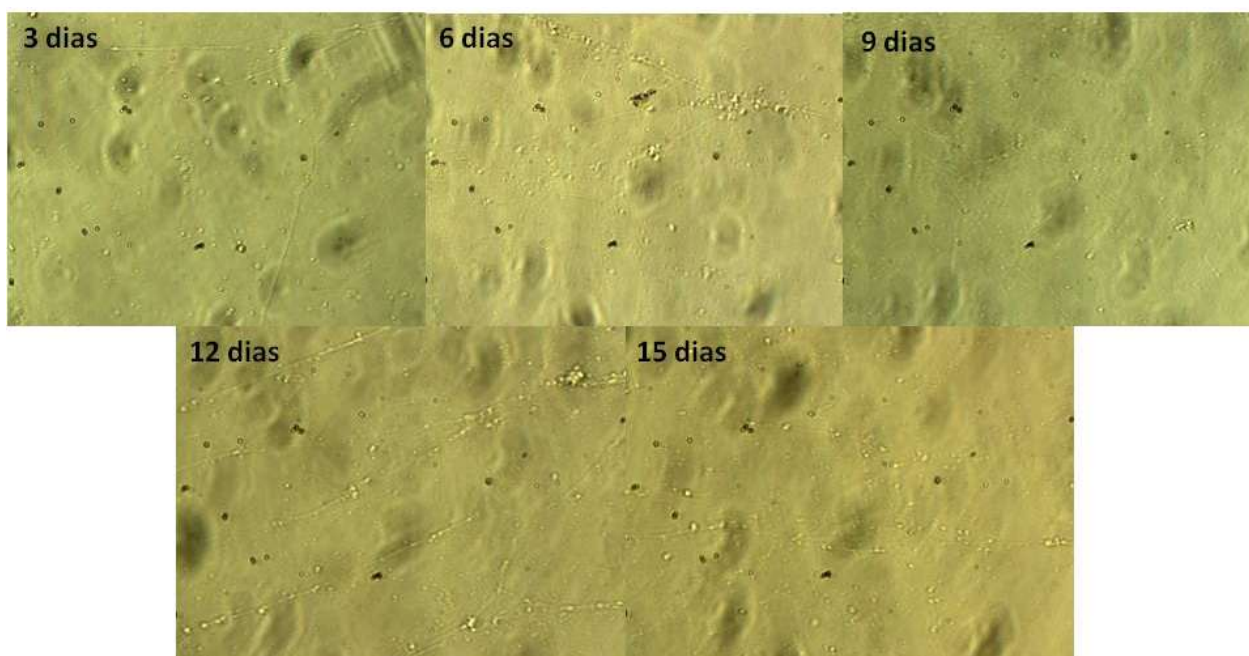


Figura 24. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 4 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

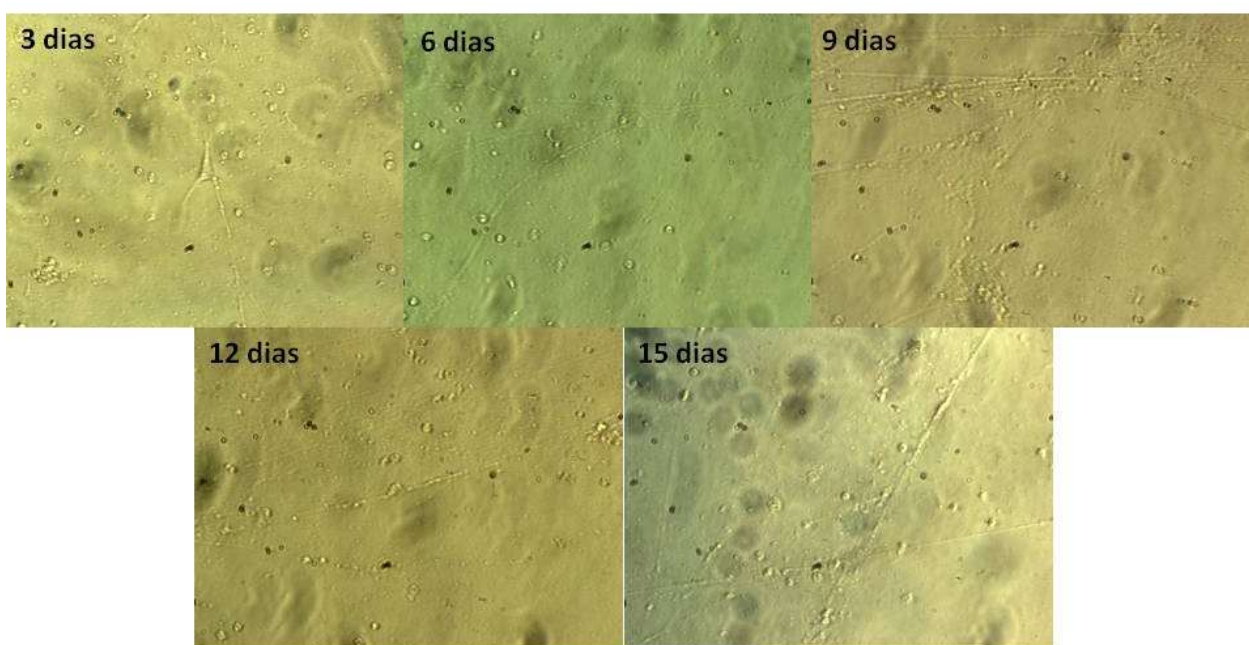


Figura 25. Cultura primária (P0) de CTMs e CTHs de sangue periférico de camundongos que receberam 5 doses de G-CSF. Aumento 200X, MO invertido.

5.3 Produção de citocinas por CTMs e CTHs em cultura primária

Um papel importante atribuído às CTMs é a imunomodulação exercida por estas células, através da produção de citocinas. Desta forma, após caracterizar-se o melhor tempo de obtenção das CTMs e CTHs, na medula e sangue periférico, o próximo passo foi caracterizar o perfil de citocinas produzidas por estas células *in vitro*. Os dados demonstram que houve aumento progressivo das IL-2 e IL-4 nos diferentes tempos de cultura, atingindo a maior concentração 12 dias após, tanto naquelas culturas derivadas da medula óssea, quanto de sangue periférico. Ao contrário do observado para estas citocinas, a IL-6 e o TNF- α apresentavam-se aumentados nos três primeiros dias de cultura, sendo que houve uma diminuição no 6º dia, seguido por um aumento gradativo até o 15º (gráfico 03).

Em relação ao IFN- γ , observou-se que na cultura de células tronco obtidas da medula óssea a concentração desta citocina estava aumentada no terceiro dia em relação às de sangue periférico. Como pode ser observado no gráfico 03, houve um decréscimo no 6º dia em ambos os compartimentos, voltando a aumentar a partir do 9º, sendo que na cultura de células da medula, a maior concentração foi observada no 12º dia, declinando no 15º. Por outro lado, o pico de IFN- γ na cultura de células do sangue, ocorreu no 15º dia de cultivo.

Interessantemente, observou-se que a citocina IL-17A apresentou um aumento gradativo a partir do 3º dia, atingindo o pico no 12º, voltando a diminuir no 15º, em ambas as culturas avaliadas. A IL-10, uma citocina antiinflamatória, apresentou-se aumentada no 3º dia de cultura, tanto de células da medula óssea, quanto de sangue periférico, sendo que foi observado uma diminuição da concentração no 9º dia da cultura de medula, voltando a aumentar e atingindo o pico no 12º dia. Por outro lado, observou um aumento acentuado da IL-10 no 9º dia da cultura de células do sangue, declinando no 12º dia e aumentando gradativamente até o 15º.

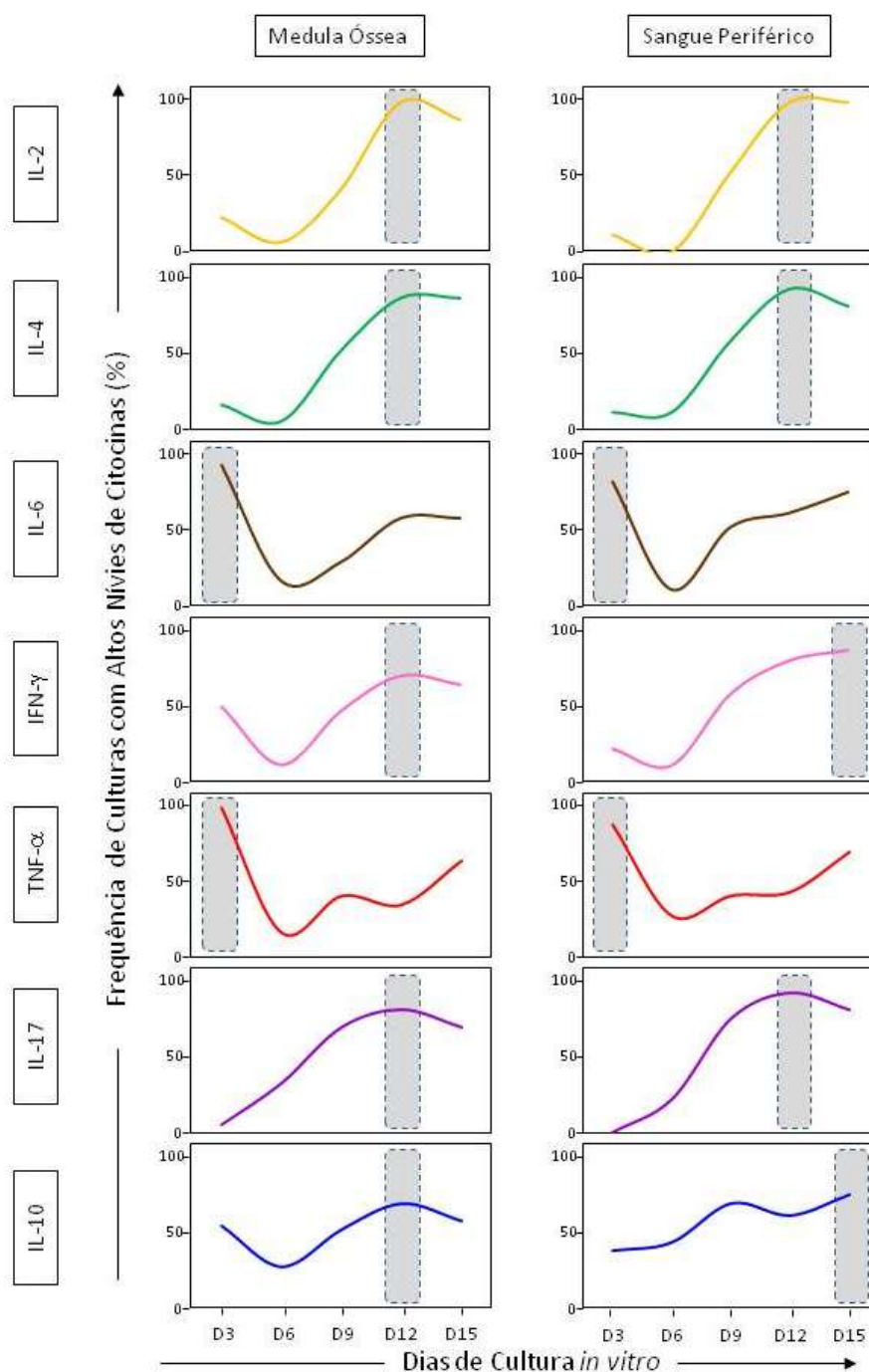


Gráfico 03. Cinética de síntese de citocinas pelas CTMs e CTHs durante os dias de cultura *in vitro*. Culturas da medula óssea e do sangue periférico com níveis de citocinas acima de 50 percentil foram consideradas com alta porcentagem de citocinas. O quadro cinza tracejado indica o pico de concentração das citocinas em determinado tempo de cultura.

5.4 Estabelecimento do ponto de corte de síntese de citocinas para segregação em altos e baixos produtores após cultura *in vitro*

Para a segregação da síntese de citocinas em altos e baixos produtores, o ponto de corte foi estabelecido, pela determinação da mediana global da intensidade média de fluorescência (MIF) de cada amostra, sendo que as amostras dos diferentes tempos de cultura foram agrupadas em um único eixo para a análise. Como mostra o gráfico 04, as MIFs que se apresentaram acima das medianas foram consideradas como altos produtores e abaixo deste valor, foram tratadas como baixo produtores de citocina. A mediana de cada citocina foi descrita gráfico 04.

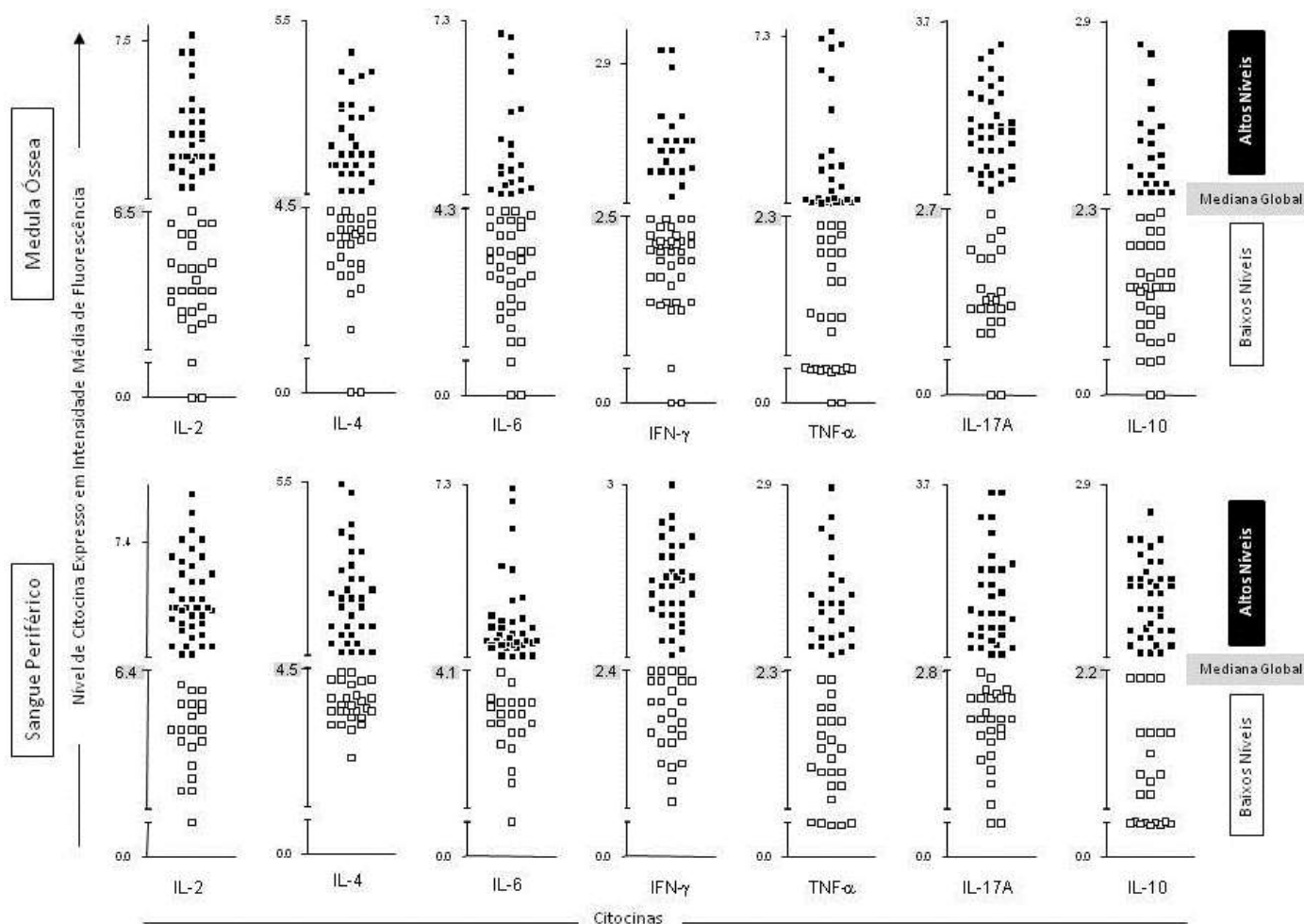


Gráfico 04. Ponto de Corte para segregação da síntese de citocinas em altos e baixos produtores a partir da mediana global das intensidades médias de fluorescência (MIF).

A figura 26 demonstra a frequência de citocinas produzidas individualmente ao longo do tempo de cultura e frente às diferentes doses. Através desta figura foi possível determinar o percentual de altos produtores nas culturas de células de sangue e medula óssea. Os indivíduos altos produtores foram colocados como quadros pretos e baixos produtores como quadros brancos. Para cada citocina analisada, foi calculada a frequência e o percentual de altos produtores. O percentual foi utilizado no gráfico 05 para demonstrar o panorama geral da produção de citocinas.

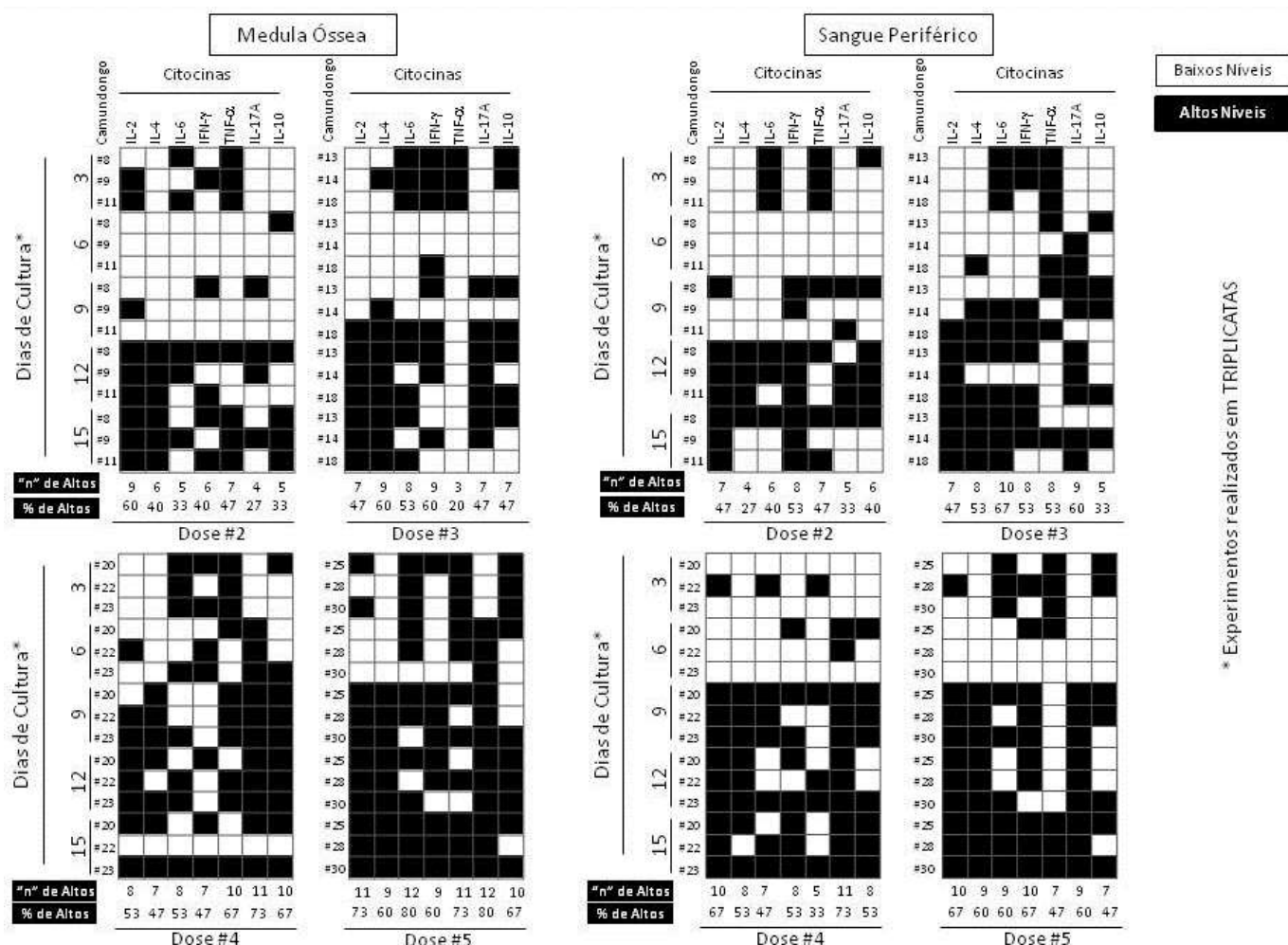


Figura 26. Percentual de altos produtores de citocinas ao longo do tempo de cultura de medula óssea e sangue periférico frente as diferentes doses de G-CSF.

5.5 Influência do número de doses administradas de G-CSF no perfil panorâmico de citocinas

Complementando a figura 25, o gráfico 05 demonstra a influência da administração das diferentes doses de G-CSF na produção de citocinas. O perfil panorâmico das citocinas analisadas foi caracterizado pela frequência encontrada de altos produtores de citocinas para cada dose administrada *in vivo*. Os dados demonstram que houve diferença estatisticamente significativa da concentração do TNF- α na cultura de células derivadas da medula óssea, entre as

diferentes doses analisadas. No entanto, não foi observada diferença significativa desta citocina na cultura de células provenientes do sangue. Em relação a IL-6, outra citocina inflamatória, observou-se que houve diferença estatística significativa entre a 5ª e a 2ª dose, na cultura de medula, mas esta diferença não foi observada na cultura de sangue periférico.

Em relação a IL-2, foi observada diferença estatística significativa entre a 5ª e a 3ª dose, na cultura de células da medula, enquanto esta diferença não foi encontrada na cultura de sangue periférico. Não foi observada diferença estatística significativa em relação ao IFN- γ em nenhum dos compartimentos analisados (medula óssea e sangue periférico).

Ao contrário do IFN- γ , foi observada diferença estatística significativa para IL-4 entre a 5ª e a 2ª dose, na cultura de medula óssea, enquanto que na cultura de sangue periférico esta diferença foi observada nas doses 4 e 5 quando comparadas à 2ª. Também houve diferença estatística significativa das doses 4 e 5, em relação às 2ª e 3ª, na cultura de células derivadas da medula óssea, e em relação a 2ª na cultura de sangue periférico.

Para as citocinas IL-10 foi observada diferença estatística significativa entre as doses 4 e 5 quando comparadas com a 2ª dose, na cultura de medula óssea. Na cultura de sangue periférico, observou-se diferença estatística significativa entre a 4ª e 3ª, e a 5ª e 2ª doses. Para a IL-17A, observou-se diferença significativa entre as doses 4 e 5 quando comparadas a 2ª e 3ª doses. Por outro lado, na cultura de sangue periférico a diferença foi encontrada entre as doses 4 e 5 em relação à 2ª.

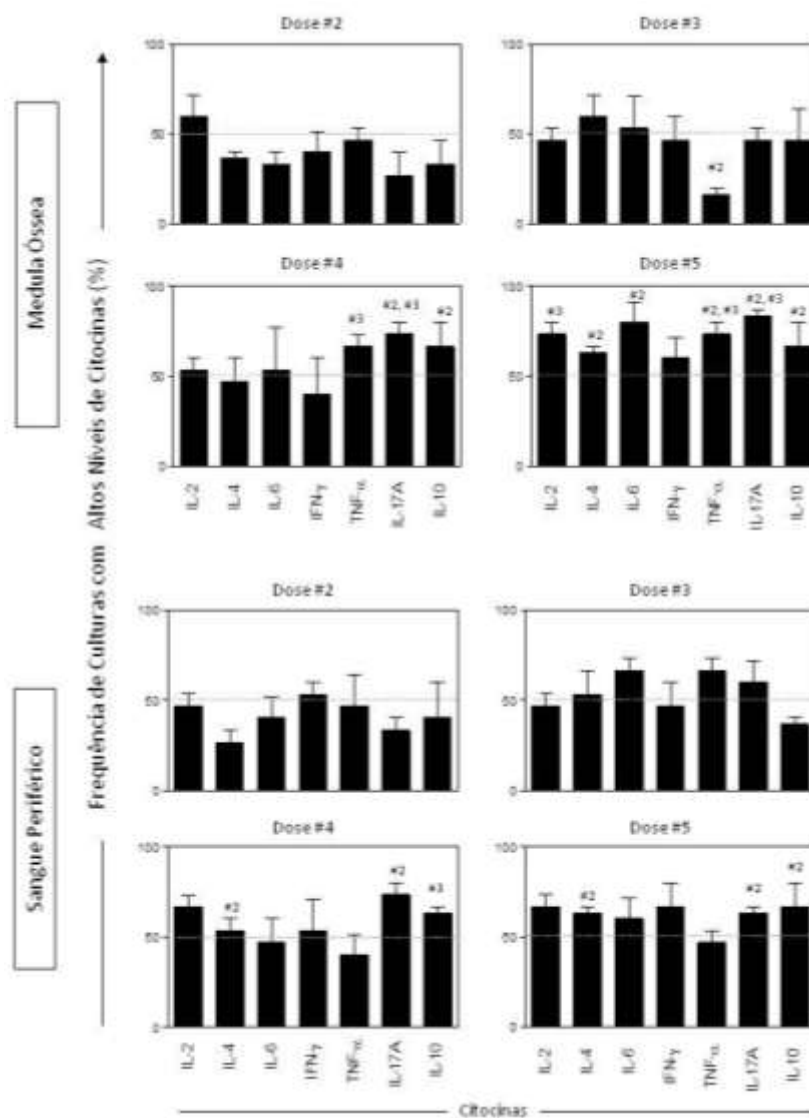
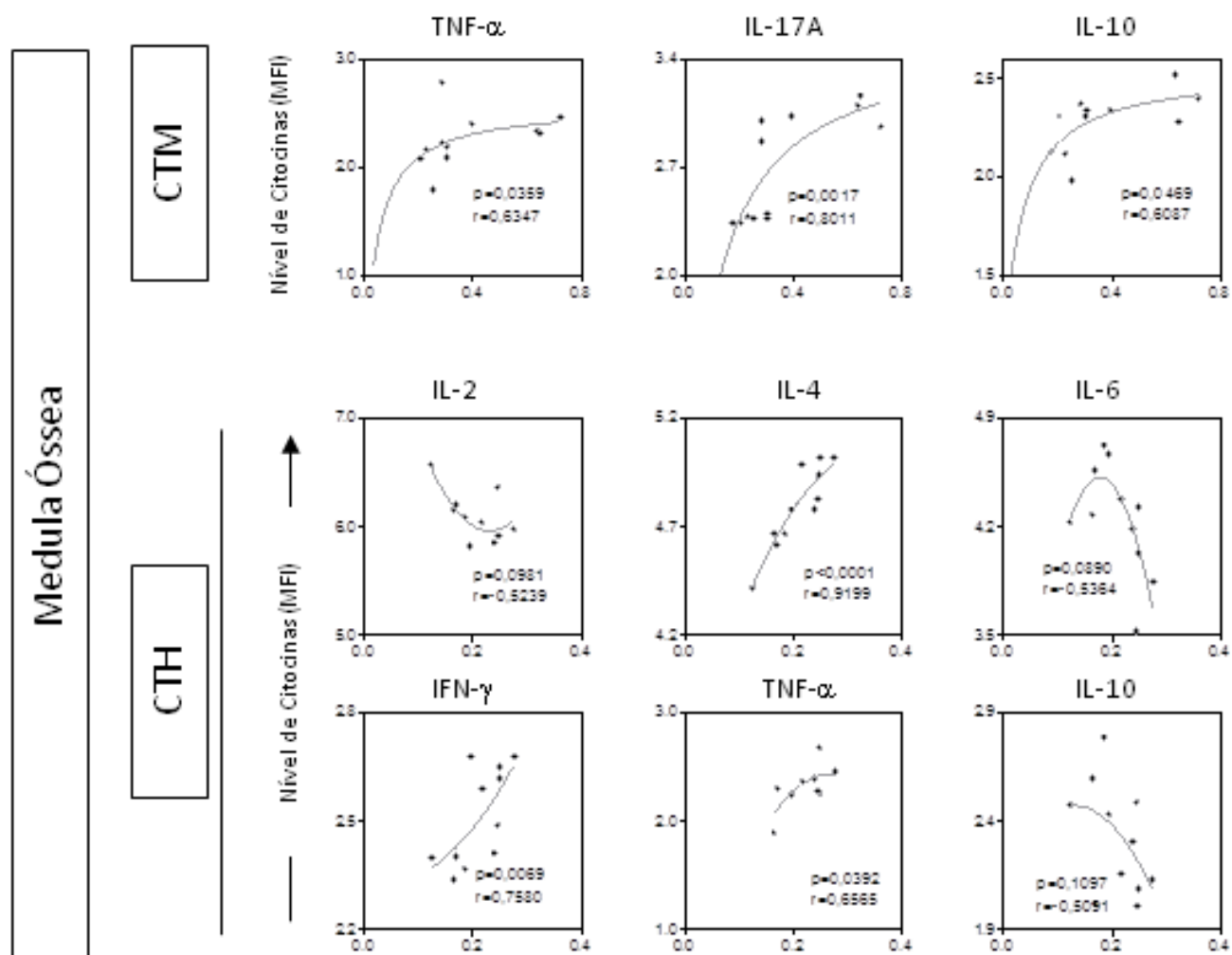


Gráfico 05. Influência do número de doses administradas de G-CSF no perfil panorâmico de citocinas. a. Dose #2 de G-CSF não influenciou significativamente na produção de citocinas *in vitro* ($p > 0,05$). b. Dose #3 de G-CSF influenciou significativamente na produção de TNF- α em relação a dose#2 ($p = 0,0158$). c. Dose #4 de G-CSF influenciou significativamente na produção de TNF- α em relação a dose #3 ($p = 0,0026$), IL-17A em relação a dose#2 ($p = 0,0352$) e dose#3 ($p = 0,0474$), IL-10 com relação a dose#2 ($p = 0,0151$). d Dose #5 de G-CSF somente não influenciou significativamente a produção de IFN- γ ($p > 0,05$). e. Dose #2 de G-CSF não influenciou significativamente a produção de citocinas ($p > 0,05$). f. Dose #3 de G-CSF não influenciou significativamente a produção de citocinas ($p > 0,05$). g. Dose #4 de G-CSF influenciou significativamente a produção de IL-4 com relação a dose#2 ($p = 0,0474$), IL17A com relação a dose#2 ($p = 0,01$) e IL-10 com relação a dose #3 ($p = 0,0048$). h. Dose #5 de G-CSF influenciou significativamente na síntese de IL-4 com relação a dose #2 ($p = 0,0079$) e IL-17A com relação a dose #2 ($p = 0,0158$). (#) relevant frequency of *High* cytokine producers considered for values above the 50th percentile. Dados analisados por t Teste.

5.6 Correlação entre a percentagem de CTM e CTH e o perfil panorâmico de citocinas

Como demonstra o gráfico 06, houve uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre as citocinas TNF- α , IL-17A e IL-10 e as células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Estes resultados demonstram que quanto maior a concentração destas citocinas, maior a diferenciação das CTMs *in vitro*. Por outro lado, quando avaliamos a correlação entre as CTHs da medula óssea e o perfil de citocinas, observou-se que houve correlação negativa estatisticamente significativa entre IL-2, IL-6 e IL-10 e estas células, mostrando que quanto maior a concentração destas citocinas, menor a quantidade destas células encontradas na cultura. Porém, foi observada correlação positiva estatisticamente significativa entre IL-4, TNF- α e IFN- γ e as CTHs, ou seja, quanto maior a concentração destas citocinas maior o número destas células encontradas na cultura.

Quando se avaliou as CTHs derivadas do sangue periférico, observou-se que houve correlação positiva estatisticamente significativa entre as citocinas TNF- α e IL-10, Porém, as citocinas IL-4 e IL-6 apresentaram correlação positiva estatisticamente não significativa. Além disso, foi observada uma correlação negativa entre a IL-4 e as CTMs do sangue periférico. No entanto, ao contrário do observado na medula óssea, a IL-6 apresentou correlação positiva em relação às CTMs do sangue periférico.



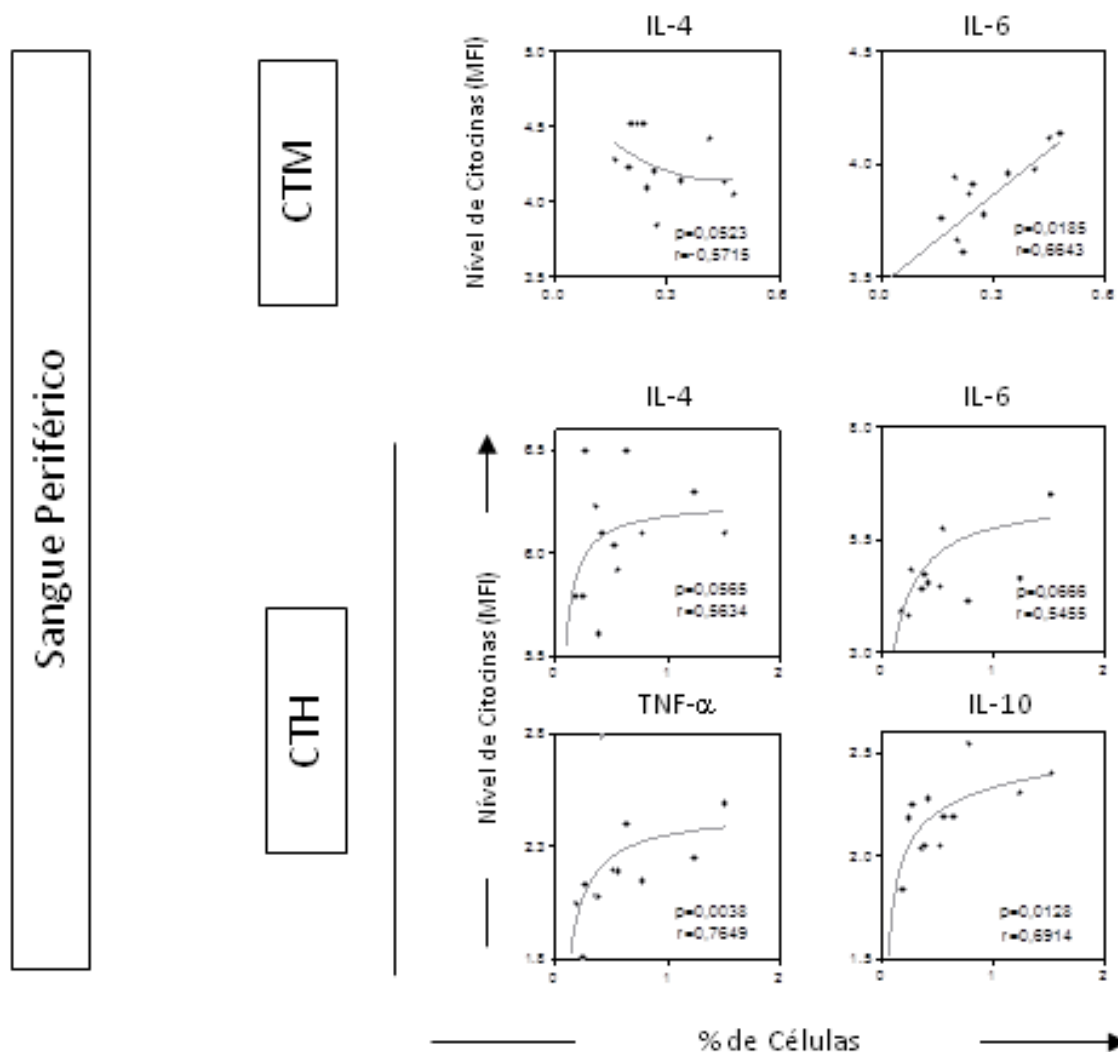


Gráfico 06. Correlação entre a porcentagem de CTMs e CTHs e o perfil de citocinas *in vitro* pelo teste de Spearman r. **a.** $p=0,0387$ e $r=0,6011$, correlação positiva significativa. **b.** $p=0,0017$ e $r=0,8011$, correlação positiva significativa. **c.** $p=0,0469$ e $r=0,6087$, correlação positiva significativa. **d.** $p=0,0981$ e $r=-0,5239$, correlação negativa não significativa. **e.** $p<0,0001$ e $r=0,9199$, correlação positiva estatisticamente significativa. **f.** $p=0,0890$ e $r=-0,5364$, correlação negativa não significativa. **g.** $p=0,0069$ e $r=0,7580$, correlação positiva significativa. **h.** $p=0,0392$ e $r=0,6565$, correlação positiva significativa. **i.** $p=0,1097$ e $r=-0,5091$, correlação negativa não significativa. **j.** $p=0,0523$ e $r=-0,5715$, correlação positiva não significativa. **k.** $p=0,0185$ e $r=0,6643$, correlação positiva significativa. **l.** $p=0,0565$; $r=0,5634$, correlação positiva estatisticamente não significativa. **m.** $p=0,0666$ e $r=0,5455$, correlação positiva não significativa. **n.** $p=0,0038$ e $r=0,7649$, correlação positiva estatisticamente significativa. **o.** $p=0,0128$ e $r=0,6914$, correlação positiva estatisticamente significativa. **p.** $p=0,0128$ e $r=0,6914$, correlação positiva estatisticamente significativa.

6. DISCUSSÃO

Atualmente, a aplicação clínica de células tronco adultas humanas tem representado a mais promissora abordagem para regeneração celular orgânica no tratamento de diversas doenças, não só pelas propriedades de transdiferenciação e imunomodulatórias, mas também por serem facilmente obtidas, não terem objeções éticas e por permitirem transplante autólogo sem a necessidade de imunossupressão (GUTENSOHN et al., 2000; MYLOTTE et al., 2008; MEIRELLES et al., 2009). Alguns estudos demonstram que a utilização de CTHs de sangue periférico em transplantes de medula óssea tanto autólogos quanto alogênicos, foram capazes de reconstituir a hematopoese em curto e longo prazo (HAAS et al., 1995; SCHMITZ et al., 2006 apud MENDRONE JÚNIOR, 2009).

As CTMs têm-se revelado muito eficazes, pois seu elevado potencial regenerativo ocorre não somente pela sua capacidade de diferenciação celular, mas também pela sua capacidade de modular a resposta imune inata e adaptativa com efeitos imunossupressores e secreção de um largo espectro de substâncias bioativas, como citocinas e os fatores de crescimento, o que não foi completamente esclarecido e, portanto, buscar novos conhecimentos a respeito desses mecanismos tanto *in vivo* quanto *in vitro* é de grande importância (CAPLAN, 2007; REBELATTO, 2008; NOVOTNY et al., 2008; XIANG et al., 2009; HOOGDUIJN et al., 2010).

O isolamento de um elevado número de CTs estabelece a base de novos métodos para regeneração de tecidos e terapia celular como a utilização de G-CSF para estimular potencialmente a mobilização de CTs para o sangue periférico, permitindo fácil obtenção dessas células (HILL et al., 2005; KASSIS et al., 2006). No entanto, pouco ainda se sabe sobre o efeito deste fator de crescimento sobre a transdiferenciação das CTs, *in vivo* e *in vitro*. Desta forma, no

presente estudo tivemos como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses do G-CSF na mobilização e diferenciação *in vitro* das CTs mesenquimais e hematopoiéticas. Para tanto lançamos mão do uso do cultivo primário destas células, obtidas da medula óssea ou sangue periférico de camundongos swiss.

Inicialmente, foi observado que o pico de células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea correu com 2 doses de G-CSF. Porém, estes dados não estão de acordo com que é observado em pacientes que apresentam um aumento de mais de 10 vezes no número de CTHs na medula óssea no 3º dia de tratamento (MORRISON et al. 1997). Por outro lado foi observado pico de CTMs, na 4ª dose de G-CSF. Estes dados demonstraram que o G-CSF estimula a mobilização das CTHs e CTMs de forma dose dependente, sugerindo um mecanismo mediado por outros fatores de crescimento celular ou citocinas. Zhdanov et al. (2007) já demonstraram que as CTMs aumentam no 3º dia (2 doses) após o início do tratamento com G-CSF. Essa diferença necessária na dose de G-CSF para aumentar a quantidade de CTs na medula óssea pode estar relacionada com a diferença na quantidade basal dessas células, já que as CTHs estão ainda em maior número que as CTMs.

Após avaliar-se a cinética de mobilização das CTHs e CTMs, o próximo passo foi analisar a saída destas células da medula para o sangue periférico. Como foi demonstrado nos resultados, as CTMs estão significativamente aumentadas no sangue periférico na 5ª dose de tratamento com G-CSF, demonstrando que elas parecem se diferenciarem e expandirem na medula óssea para depois serem mobilizadas para o sangue periférico. Ao contrário do observado para as CTMs, não foi observado diferença significativa em relação à mobilização de CTHs para o sangue periférico, frente às diferentes doses. Porém foi observado aumento na 4ª dose, sugerindo assim como para as CTMs, um mecanismo mais tardio da mobilização destas células para o sangue periférico. Morrison et al. (1997) também observaram uma abrupta migração das

CTHs para a periferia no 5^o dia de tratamento (4 doses). Segundo Lapidot e Petit (2002), a mobilização das células tronco é um procedimento que induz uma rápida proliferação de células hematopoéticas na medula óssea e depois a liberação de alta quantidade dessas células pra a corrente sanguínea.

A mobilização e a subsequente saída de células tronco para o sangue são potencialmente mediadas pela ação regulatória do G-CSF nas moléculas de adesão (MOHLE et al., 1993). Os mecanismos envolvidos na mobilização dos precursores ainda são pouco compreendidos e conhecidos. No entanto, essas modificações nas moléculas de adesão podem alterar a capacidade de aderir ao estroma medular, pois as células precursoras interagem com células estromais e com proteínas da matriz extracelular como, por exemplo, a fibronectina, recebendo sinais regulatórios de proliferação e diferenciação (MOHLE et al., 1993).

Já está bem estabelecido na literatura que o número de CTH na medula óssea é maior do que as CTMs (MENDRONE JÚNIOR, 2009; ABDELHAY et al., 2009). Curiosamente quando avaliamos a razão CTM/CTH, observou-se que na 4^a dose de G-CSF, ocorreu um aumento nessa razão, demonstrando um número maior de CTM em relação à CTH. Este resultado nos surpreendeu, uma vez que dados da literatura demonstram um efeito do G-CSF sobre a mobilização das CTHs altamente eficaz para proporcionar um transplante de no mínimo 2×10^6 céls/Kg (TAKEYAMA; OHTO, 2004; MENDRONE JÚNIOR, 2009; KOLONIN; SIMMONS, 2009).

O G-CSF é uma citocina importante na modulação da produção de outras citocinas e fatores de crescimento (GORGEN et al., 1992; HARTUNG, 1998; SANGANALMATH et al., 2011). Baseado nesse conhecimento da literatura e diante dos resultados observados e descritos anteriormente, o próximo passo no presente estudo foi avaliar a produção de citocinas nas culturas de células tronco derivadas da medula óssea e aquelas obtidas do sangue periférico.

Como foi demonstrado no gráfico 03, interessante as interleucinas 2 e 4 apresentaram a mesma cinética de produção, tanto nas culturas de CTs de medula, quanto de sangue periférico. Este resultado foi interessante e nos sugeriu um papel importante destas citocinas na indução da proliferação e diferenciação das CTs *in vitro*. Bocelli-Tyndall et al. (2009) também observaram a ação da IL-2 na indução da proliferação de células mononucleares no sangue periférico. A IL-2 tem sido descrita como uma citocina importante na proliferação e diferenciação das CTs CD34⁺ (BYKOVSKAJA et al., 1998).

Dados da literatura descrevem a tendência das CTMs favorecerem uma resposta Th2 (LU et al. 2009). Chen et al. (2008) demonstraram a secreção de IL-4 pelas CTMs *in vitro*. Em nosso estudo, a presença elevada de IL-4 na fase final da cultura pode estar relacionado com o fato das CTMs estarem aumentadas nesta fase e, portanto liberando essa citocina no meio. Esses relatos corroboram os nossos resultados, onde observamos a presença de CTHs no início do cultivo e o aparecimento de CTMs mais na fase final como mostrado nas figuras 20, 21 e 22.

Ao contrário do observado para estas citocinas citadas anteriormente, observou-se que a IL-6 e o TNF- α estão aumentados no terceiro dia de cultura, diminuem a partir do 6º dia e voltam a aumentar no final da cultura. Ambas citocinas apresentam características inflamatórias e estão presentes no processo inicial de proliferação e diferenciação celular, como demonstrado no remodelamento tecidual cardíaco após infarto e no remodelamento de tecidos conectivos (GADIANT et al., 1997). Liu e Hwang (2005) evidenciaram o papel essencial da IL-6 principalmente no desenvolvimento, diferenciação e regeneração de diferentes células tronco. Haynesworth et al. (1996) reportaram a expressão constitutiva de IL-6 na fase de crescimento das CTMs de medula óssea e cordão umbilical. Semelhante a ação dessa citocina, o TNF- α estimula a proliferação de CTMs (BOCKER et al., 2008). O mecanismo exato como isso ocorre ainda não está elucidado, mas auxilia a sugerirmos que a presença de elevadas concentrações de IL-6 e

TNF- α no início e depois no final do cultivo seja devido a alta proliferação característica na fase inicial da cultura dessas células e o aumento da diferenciação ao final do cultivo (gráficos 03 e 05). Estes resultados observados no estudo foram evidenciados pela correlação positiva da produção de IL-6 e TNF- α (gráfico 06).

Outros autores demonstram ainda que o TNF- α é uma citocina pleiotrópica que tem a capacidade de alterar a produção de outras citocinas pelas CTMs, através da ativação do NF- κ B (MELDRUM, 1998). Como citado anteriormente, concomitante com a produção de TNF- α , observou-se aumento da produção da IL-6. Estes dados sugerem que o TNF- α induz a produção desta citocina pelas CTMs, mesmo na ausência de estímulos como o LPS. Este efeito foi observado por outros autores. Markel et al. (2007) demonstraram que camundongos knockout do receptor de TNF- α (TNFR1), em células tronco mesenquimais, tiveram aumento da produção VEGF, diminuição do TNF- α , seguido do aumento da IL-6, quando estimulados com o próprio TNF- α . Similarmente, estes autores observaram que quando os animais foram estimulados com LPS, houve aumento de VEGF, diminuição do TNF- α e diminuição da IL-6, mostrando que ocorre um sinergismo na produção destas citocinas estímulo dependente (Markel et al., 2007).

Alguns autores sugerem que o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, funcionaria como um sinal de “start” para a imunomodulação exercida pelas CTMs (KOC et al., 2000; REN et al., 2008). Estes trabalhos da literatura demonstram *in vitro* e *in vivo* que as CTMs suprimem as células T e diminuem os efeitos da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GvDH do inglês *Graft-versus-host disease*), somente quando o IFN- γ está presente em concentrações suficientes para ativação destas células. As CTMs respondem ao IFN- γ de maneira dose-dependente *in vivo*, quanto maior a dose de IFN- γ mais eficiente a imunossupressão pelas CTMs. Potian et al. (2003), analisando o perfil de citocinas das CTMs de medula óssea *in vitro*,

demonstraram que essas células expressam constitutivamente IFN- γ , corroborando com o achado no nosso estudo que mostrou que essa citocina encontra-se em maior concentração na fase final da cultura, de ambos os compartimentos analisados, na qual as CTMs se encontram em maior quantidade (gráficos 03 e 05). Além do perfil panorâmico da produção de citocinas, também foi observado uma correlação positiva entre a produção de IFN- γ e CTHs, na cultura de medula. Apesar deste perfil não ter sido avaliado em relação as CTMs, os dados nos permitem sugerir, que o IFN- γ presente na cultura estimula as CTMs a produzirem a IL-10, como demonstrado em nossos experimentos.

Interessantemente, observou-se que a IL-17A apresentou-se aumentada em ambas as culturas de medula e sangue, porém a cinética foi diferente da observada para as outras citocinas inflamatórias anteriormente citadas. Observamos que houve um aumento gradativo e um pico na produção de IL-17A na fase final da cultura. Recentes estudos tem mostrado uma relação desta citocina na proliferação e diferenciação de CTMs humanas, e um aumento na formação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos em cultura, a partir de células da medula óssea (HUANG et al. 2009). Isso está de acordo com nossos resultados onde observamos a formação dessas colônias nas culturas de medula óssea a partir do 9^o dia de cultivo (figura 21 e um aumento gradativo de IL-17A (gráficos 03, 05 e 06). Portanto, sugerimos que esse aumento de IL-17A observado esteja relacionado com a diferenciação final de CTMs.

Como é conhecido de outros trabalhos, as CTMs apresentam potente atividade anti-inflamatória independentemente do seu tecido de origem. Elas suprimem a inflamação através da secreção de citocinas, como a IL-10 (BURDON et al., 2011). Os resultados apresentados no nosso estudo corroboram com o descrito na literatura, pois observamos uma elevação na concentração desta citocina no final do cultivo, fase em que as CTMs encontram-se aumentadas, possivelmente secretando a IL-10 no meio (gráficos 03, 05 e 06).

Avaliando a influência das doses de G-CSF na produção de citocinas em cultura de CTHs e CTMs tanto de medula óssea quanto de sangue periférico observamos que possivelmente houve uma influência do número de doses de G-CSF administrado *in vivo* na produção de citocinas *in vitro*. Observamos que houve diferença significativa na secreção de TNF- α nas culturas de medula óssea entre as diferentes doses administradas, principalmente nas culturas de 5 doses de G-CSF. No entanto, alguns estudos demonstraram o efeito contrário do G-CSF sobre esta citocina *in vivo*, reduzindo a liberação de TNF- α pelos macrófagos (GORGEN et al., 1992). Da mesma forma, a concentração de IL-6 foi estatisticamente diferente entre as culturas de medula de 2^a e 5^a doses. A partir destes dados pode-se sugerir que o G-CSF atua no aumento da proliferação celular e induz a produção de outras citocinas, como no caso da IL-6, como descrito anteriormente.

Diante do exposto no presente estudo, podemos concluir que o G-CSF parece modular ou induzir a produção de citocinas inflamatórias, que funcionariam como start para a diferenciação das CTMs e estas por sua vez, iniciariam a sua transdiferenciação, promovendo uma imunomodulação e um ambiente favorável para sua manutenção.

7. CONCLUSÕES

- O G-CSF estimula a mobilização de CTs tanto na medula quanto no sangue periférico. As CTMs e CTHs apresentam uma cinética de mobilização diferente, sendo que ocorre de forma dose dependente;
- O G-CSF parece modular ou induzir a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, que funcionariam como “start” para a diferenciação das CTMs e estas por sua vez, iniciariam a sua transdiferenciação e promoveriam uma imunomodulação, criando um ambiente favorável para sua manutenção;
- A correlação encontrada entre as citocinas TNF- α , IL-17A e IL-10 e as CTMs, sugerem um papel importante destas citocinas no processo de diferenciação e maturação dessas células *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABARBANELL, A.M.; COFFEY, A.C.; FEHRENBACHER, J.W.; BECKMAN, D.J.; HERRMANN, J.L.; WEIL, B.; MELDRUM, D.R.; Proinflammatory Cytokine Effects on Mesenchymal Stem Cell Therapy for the Ischemic Heart. **The Annals of Thoracic Surgery**, v.88, p.1036-1043, 2009.

ABBAS, Abul k.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 7ed. Philadelphia: Elsevier, 2011.

ABDELHAY, E.S.F.W.; PARAGUAÇÚ-BRAGA, F.H.; BINATO, R.; BOUZAS, L.F.S. Células-Tronco de Origem Hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.2-8, 2009.

ABUD, Ana Paula Ressetti. **Atividade Imunomodulatória de Complexos Altamente Diluídos sobre Células de Medula Óssea Murina e Linhagem Leucêmica Humana**. Curitiba: UFPR, 2010. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2010.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cell modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, p.1815-1822, 2005.

ALLA F.; ZANNAD, F.; FILIPPATOS, G. Epidemiology of acute heart failure syndromes. **Heart Failure Review**, v.12, p. 91-95, 2007.

ALSHAKER, H.A; MATAKKA, K.Z. IFN- γ , IL-17 and TGF- β involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors. **Cancer Cell International**, v.11, n.36, p.1-11, 2011.

ANGELI, F.S; OLIVEIRA, E.M. Terapia Celular no Tratamento do Infarto Agudo do Miocárdio. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.15, n.2, p.145-150, 2007.

ARSLAN, O.; MOOG, R. Mobilization of peripheral blood stem cells. **Transfusion Apheresis Science**, v.37, n.2, p.179-185, 2007.

ASARI, S.; ITAKURA, S.; FERRERI, K.; Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. **Experimental Hematology**, v. 37, n.5, p.604-615, 2009.

AVALOS, B.R. The granulocyte colony-stimulating factor receptor and its role in disorders of granulopoiesis. **Leuk Lymphoma Journal**, v.28, p.265–273, 1998.

BALDO, M.P.; RODRIGUES, S.L.; MILL, J.G. Granulocyte colony-stimulating factor for ischemic heart failure: should we use it? **Heart Failure Review**, v.15, p.613-623, 2010.

BALDRIDGE, M.T.; KING, K.Y.; BOLES, N.C.; WEKSBERG, D.C.; GOODEL, M.A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. **Nature**, v.465, n.7299, p.793-797, 2010.

BALDRIDGE, M.T.; KING, K.Y.; GOODELL, M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. **Trends in Immunology**, v.32, n. 2, p.57-65, 2011.

BALL, L.M.; BERNARDO, M.E.; LOCATELLI, F.; EGELER, R.M. Potential role of mesenchymal stromal cells in pediatric hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, v.42, p.S60-S66, 2008.

BATTEN, P.; ROSENTHAL, N.A.; YACOUB, M.H. Immune Response to Stem Cells and Strategies to Induce Tolerance. **Journal Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.362, p.1343-1356, 2007.

BARANIAK, P.R; McDEVITT, T.C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. **Regenerative Medicine**, v.5, n.1, p.121-143, 2010.

BARREDA, D.R.; HANINGTON, P.C.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v.28, p.509-554, 2004.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Stem Cells in Tissue Engineering. **Nature**, v.414, p.118-121, 2001.

BIANCO, P. ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cell: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Journal Cell Stem Cell**, v.2, n.4, p.313-319, 2008.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, P.E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, n.14, v.1, p.22-24, 2006.

BOCKER, W.; DOCHEVA, D.; PRALL, W.C. IKK-2 is required for NF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. **Journal of Molecular Medicine**, v.86, p.1183-1192.

BOONPRASERT, P.; LAILERD, N.; CHATTIPAKORN, N. Urocortins in Heart Failure and Ischemic Disease. **International Journal of Cardiology**, v. 127, p.307-312, 2008.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78, Supl.1, p.42-46, 2008.

BRANDT, E.B.; SIVAPRASAD, U. Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. **Journal of Clinical & Cell Immunology**, v.2, n.3, p.1-25, 2011.

BREHM M, Z.T.; STRAUER, B.E. Stem Cells and Perspectives. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 611-620, 2002.

BROFMAN, P.R.; CARVALHO, K.A.; GUARITA-SOUZA, L.C.; REBELLATO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A.C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J.C.; OLANDOSKIM, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.19, n.3, p. 261-266, 2004.

BROUARD N.; DRIESSEN, R.; SHORT, B.; ENOKI, C.; IWASAKA, T.; IMAMURA, H. G-CSF increases mesenchymal precursor cell numbers in the bone marrow via an indirect mechanism involving osteoclast-mediated bone resorption. **Stem Cell Research**, v.5, n.1, p.65-75, 2010.

BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, n.2, p.278-294, 1997.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, p.115-120, 2008.

BURDON, T.J.; PAUL, A.; NOISEUX, N.; PRAKASH, S.; SHUM-TIM, D. Bone Marrow Stem Cell Derived Paracrine Factors for Regenerative Medicine: Current Perspectives and Therapeutic Potential, **Bone Marrow Research**, p.1-14, 2011.

BYKOVSKAJA, S.N. BUFFO, M.J.; Bunker, M.; ZHANG, H.; Majors, A.; Herbert, M.; LOKSHIN, A.; LEVITT, M.L.; JAJA, A.; SCALISE, D.; KOSIBAN, D.; EVANS, C.; MARKS, S.; SHOGAN, J. Interleukin-2 induces development of dendritic cells from cord blood CD34⁺ cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.63, p.620-630, 1998.

BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características Biológicas das Células-tronco Mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.25-35, 2009.

CANTAERT, T.; BAETEN, D.; TAK, P.P.; VAN BAARSEN, L.G.M. Type I IFN and TNF α cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance. **Arthritis Research & Therapy**, v.12, n.219, p.1-10, 2010.

CAPLAN, A.J. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Cellular Physiology**, v.213, p.341-347, 2007.

CAPLAN, A.J. Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.9, p.641-650, 1991.

CAPLAN, A.J. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v.217, p.318-324, 2009.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.98, p.1076-1084, 2006.

CARRIÓN, F.; NOVA, E.; LUZ, P.; APABLAZA, F.; FIGUEROA, F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 polarization according to the state of CD4⁺ T cell activation. **Immunology Letters**, v.135, p.10-16, 2011.

CARVALHO, Ana Carolina Souza Ramos. **Estudo da proliferação e diferenciação de células tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos**. São Paulo: USP, 2008. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, 2008.

CARVALHO, C.C.A.; GOLDENBERG, R.C.S.; TUCHE, F.A.A.; DOHMANN, H.F.R. Base da Terapia celular na Cardiologia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p. 75-78, 2009.

CASHEN, A.F.; LAZARUS, H.M.; DEVINE, S.M. Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? **Bone Marrow Transplant**, v.39, n.10, p.577-588, 2007.

CESSELLI, D.; BELTRAMI, A.P.; RIGO, S.; BERGAMIN, N.; D'AURIZIO, F.; VERARDO, R.; PIAZZA, S.; KLARIC, E.; FANIN, R.; TOFFOLETTO, B.; MARZINOTTO, S.; MARIUZZI, L.; FINATO, N.; PANDOLFI, M.; LERI, A.; SCHNEIDER, C.; BELTRAMI, C.A.; ANVERSA, P.; Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. **Circulation Research**, v.104, p. 1225–1234, 2009.

CHALLEN, G.A.; BOLES, N.C.; CHAMBERS, S.M.; GOODELL, M.A. Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGFβ1. **Cell Stem Cell**, v.6, n.3, p.265-278, 2010.

CHAMBERLAIN, G.; WRIGHT, K.; ROT, A.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Murine Mesenchymal Stem Cells Exhibit a Restricted Repertoire of Functional Chemokine Receptors: Comparison with Human. **Journal Plos One**, v.3, n.8, 2008.

CHAMULEAU, S.A.J.; VRIJSEN, K.R.; ROKOSH, D.G.; TANG, X.L.; PIEK, J.J.; BOLLI, R. Cell Therapy for Ischaemic Heart Disease: Focus on the Role of Resident Cardiac Stem Cells. **Netherlands Heart Journal**, v.17, n.5, p.199-207, 2009.

CHAN, J.Y.H.; WATT, S.M. Adhesion receptors on haematopoietic progenitor cells. **British Journal of Haematology**, v.112, p. 541-557, 2001.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal Stem Cells: A Promising Candidate in Regenerative Medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.815-820, 2008.

CHEN, P.M.; YEN, M.L; LIU, K.J.; SYTWU, H.K.; YEN, B.L. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v.18, n.49., p.1-11, 2011.

CHEN, L.; ZHANG, W.; YUE, H.; HAN, Q.; CHEN, B.; SHI, M.; LI, J.; LI, B.; YOU, S.; SHI, Y.; ZHAO, R.C. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. **Stem Cells and Development**, v.16, n.5, p.719–731, 2007.

CHRISTENSEN, J., L & WEISSMAN, I.L. Flk-2 is a Marker in Hematopoietic Stem Cell Differentiation: a Simple Method to Isolated Long-Term Stem Cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-PNAS**, v. 98, n.25, p.14541-14546, 2001.

CHUTE, J.P.; ROSS, J.R.; McDONNELL. Minireview: Nuclear Receptors, Hematopoiesis and Stem Cells. **Molecular Endocrinology**, v.24, p.1-10, 2010.

COUTER, D.C; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C.M.; PROCKOP, D.J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v.97, n.7, p.3213-3218, 2000.

COVAS, D.T. A Identificação das Células-tronco. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco A Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006-a.

COVAS, D.T. Células-tronco Mesenquimais. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco A Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006-b.

CROXFORD; A.L.; BUCH, T. Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned. **Immunology Review Article**, v. 132, p.1-8, 2010.

DAI, W.; HALE, S.L.; MARTIN, B.J.; KUANG, J.Q.; DOWN, J.S.; WOLD, L.E. et al. Allogenic Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Postinfarcted Rat Myocardium: Short- and Long-term Effects. **Circulation**, v.112, n.2, p.214-223, 2005.

DAZZI, F.; RAMASAMY, R.; GLENNIE, S.; JONES, S.P.; ROBERTS, I. The role of mesenchymal stem cells in haematopoiesis. **Blood Reviews**, v. 20, n.3, p.161-171, 2006.

DEANS, R.J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal Stem Cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**, v.28, n.8, p.875-884, 2000.

DEL CARLO, R.J. Células-tronco: Células da Esperança. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Ano XI, n.Q35, 2005.

DESIKAN, K.R.; BARLOGIE, B.; JAGANNATH, S.; Comparable engraftment kinetics following peripheral blood stem cell infusion mobilized with granulocyte colony-stimulating factor with or without cyclophosphamide in multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, p.1547-1553, 1998.

DJOUAD, F.; CHARBONNIER, L.M.; BOUFFI, C.; LOUIS-PLENCE, P.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; CANTOS, C.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. **Stem Cells**, v.25, n.8, p.2025-2032, 2007.

DREXLER, H.; RIEDE, U.; MUNZEL, T.; KONIG, H.; FUNKE, E.; JUST, H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. **Circulation**, v.85, p. 1751-1759, 1992.

DUFFY, M.M.; PINDJAKOVAL, J.; HANLEY, S.A.; MCCARTHY, C.L.; WEIDHOFER, G.A.; SWEENEY, E.M.; ENGLISH, K.; SHAW, G.; MURPHY, J.M.; BARRY, F.P.; MAHON, B.P.; BELTON, O.; CEREDIG, R.; GRIFIN, M.D. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell-differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. **European Journal of Immunology**, v.41, n. 2, p.840– 2851, 2011.

ENGLISH, K.; BARRY, F.P.; FIELD-CORBETT, C.P.; MAHON, B.P. IFN- γ and TNF- α Differentially Regulate Immunomodulation by Murine Mesenchymal Stem Cells. **Immunology Letters**, v.110, p.91-100, 2007.

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n.3, p.421-428, 2011.

ESSERS, M.A.; OFFNER, S.; BLANCO-BOSE, W.E.; WAIBLER, Z.; KALINKE, U.; DUCHOSAL, M.A.; TRUMPP, A. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. **Nature**, v.458, n.7240, p.904-908, 2009.

FANG, Z.Y.; MARWICK, T.H. Vascular dysfunction and heart failure: epiphenomenon or etiologic agent? **American Heart Journal**, v.143, p. 383-390, 2002.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental Gerontology**, v. 40, n.12, p.926-930, 2005.

FERNANDEZ, M.; SIMON, V.; HERRERA G.; CAO, C.; DEL FAVERO, H.; MINGUELL, J.J. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. **Bone Marrow Transplantation**, v.20, n.4, p.265-271, 1997.

FIBBE, W.E.; VAN DAMME J.; BILLIAU A.; DUINKEERKEN, N.; LURVINK, E.; RALPH, P.; ALTROCK, B.W.; KAUSHANSKY, K.; WILLEMZE, R.; FALKENBURG, J.H. Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macro-phage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulating by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC). **Blood**, v.72, p.860–866, 1988.

FOX, J.M.; CHAMBERLEIN, G.; ASHTON, B.A.; MIDDLETON, J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. **Brazilian Journal of Haematology**, v.137, n.6, p.491-502, 2007.

FRANGOIANNIS, N.G. The Immune System and Cardiac Repair. **Journal Pharmacological Research**, v.58, n.2, p.88-111, 2008.

FRESHNEY, R.I. Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Technique. 4th edition, New York, 1994, 672p.

FRESHNEY, R.I. Basic Principles of Cell Culture: Culture of Cells for Tissue Engineering. Scotland: Copyright, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, U.F.; JULAGINA N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v.4, p.267-274, 1976.

FUJISAKI, J.; WU, J.; CARLSON, A.L.; SILBERSTEIN, L.; PUTHETI, P.; LAROCCA, R.; GAO, W.; SAITO, T.I.; LO, CELSO, C.; TSUYUZAKI, H.; SATO, T.; COTE, D.; SYKES, M.; STROM, T.B.; SCADDEN, D.T.; LIN, C.P. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. **Nature**, v.474, n.7350, p.216-219, 2011.

GADIANT, R.A; OTTEN, U.H. Interleukin-6 (IL-6) A molecule with both beneficial and destructive potentials. **Progress in Neurobiology**, v.52, p.379-390, 1997.

GANGENAHALLI, G.U.; SINGH, V.K.; VERMA, Y.K.; GUPTA, P.; SHARMA R.K.; CHANDRA, R.; LUTHRA, P.M. Hematopoietic Stem Cell antigen CD34: role in adhesion or homing.

GERSH, B.J.; SIMARI, R.; BEHFAR, A.; TERZIC, C.M.; TERZIC, A. Cardiac Cell Repair Therapy: A Clinical Perspective. **Mayo Clinic Proceedings**, v.84, n.10, p. 876-892, 2009.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V.J. Paracrine Mechanisms in Adult Stem Cell Signaling and Therapy. **Circulation Research**, v. 103, n.11, p.1204-1219, 2008.

GOMES, T.L.; PRANKE, P. Comparação entre as Células-tronco de Sangue de Cordão Umbilical de Neonatos Prematuros e Nascidos a Termo: uma Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.40, n.1, p.25-30, 2008.

GORGEN I., HARTUNG, T.; LEIST, M., NIEHORSTER, M. TIEGS, G.; UHLIG, S.; WEITZEL, F.; WENDEL, A. Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v.149, p.918-924, 1992.

GOWDAK, L.H.; SCHETTERT, I.T.; ROCHITTE, C.E.; LISBOA, L.A.; DALLAN, L.A.; CESAR, L.A.; KRIEGER, J.E.; RAMIRES, J.A.; OLIVEIRA, S.A. Cell therapy plus transmyocardial laser revascularization for refractory angina. **The Annals Thoracic Surgery**, v.80, p.712-714, 2005.

GUTENSOHN, K. et al.; In vitro Biocompatibility Analyses of Stents Coated with Diamond-Like Carbon by Flow Cytometry, Cell Growth Assays and Electron Microscopy, **Inf.Ther.Transf. Med.**, .4, v.27, 2000, p. 200-205.

GUTIERREZ-RODRIGUEZ, M.; REYES-MALDONADO, E.; MAYANI, H. Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood. **Stem Cells**, v. 18, n.1, p.46-52, 2000.

HAAS, R.; WITT, B.; MÖHLE, R.; GOLDSCHMIDT, H.; HOHAUS, S.; FRUEHAUF, S.; WANNENMACHER, M.; HUNSTEI, W. Sustained long-term hematopoiesis after myeloablative therapy with peripheral blood progenitor cell support. **Blood**, v. 85, n.12, p. 3754-3761, 1995.

HAMBRECHT, R.; FIEHN, E.; YU, J.; NIEBAUER, J.; WEIGL, C.; HILBRICH, L., ADAMS, V.; REIDE, U.; SHULER, G. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. **Journal of the American College Cardiology**, v.29, p. 1067-1073, 1997.

HARTUNG, T. Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. **Current Opinion Hematology**, v.5, p.221-225, 1998.

HAYNESWORTH, S.E.; BABER, M.A.; CAPLAN, A.I. Cytokine Expression by Human Marrow-derived Mesenchymal Progenitor Cells *in vitro*: Effects of Dexamethasone and IL-1 alpha. **Journal of Cellular of Physiology**, v. 166, p.585-592, 1996.

HERRERO, C.; PÉREZ-SIMÓN, J.A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.425-430, 2010.

HONOLD, J.; LEHMANN, R.; HEESCHEN, C.; Walter, D.H.; ASSMUS, B.; SASAKI, K.; MARTIN, H.; HAENDELER, J.; ZEIHNER, A.M.; DIMMELER, S. Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.26, 2238 – 43, 2006.

HOOGDUIJN, M.J.; POPP, F.; VERBEEK, R.; MASOODI, M.; NICOLAOU, A.; BAAN, C.; DAHLKE, M.H. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. **International Immunopharmacology**, v.10, p.1496-1500, 2010.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; FITZPATRICK, L.A.; KOO, W.W.; GORDON, P.L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J.C.; PYERITZ, R.E.; BRENNER, M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v.5, n.3, p.309-313, 1999.

HILL, J.M.; SYED, M.A.; ARAI, A.E.; POWELL, T.M.; PAUL, J.D., ZALOS, G.; READ, E.J.; KHUU, H.M.; LEITMAN, S.F. HORNE, M.D.; CZAKO G.; DUNBAR, C.E.; WACLAWIW, M.A.; CANNON, R.O. Outcomes and Risk of Granulocyte Colony-Stimulating Factor in Patients with Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. v.46, n.9, p.1643-1648, 2005.

HUANG, H.; KIM, H.J.; CHANG, E-J.; LEE, Z.H.; HWANG, S.J.; KIM, H-M.; LEE, Y.; KIM, H-H. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. **Cell Death and Differentiation**, v.16, p.1332–1343, 2009.

HUANG, W.; RUSSA, V.L.; ALZOUBI, A.; SCHWARZENBERGER, P. Interleukin-17A: A T-Cell-Derived Growth Factor for Murine and Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v.24, p.1512-1518, 2006.

ITESCU, S.; KOCHER, A.A.; SCHUSTER, M.D. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. **Heart Failure Reviews**, v.8, p. 253-258, 2003.

JAISWAL, S.; JAMIESON, C.H.; PANG, W.W.; PARK, C.Y.; CHAO, M.P.; MAJETI, R.; TRAVER, D.; VAN ROOIJEN, N.; WEISSMAN, I.L. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. **Cell**, v.138, n.2, p.271-285, 2009.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MAJKA, M.; RATAJCZAK, J.; RATAJCZAK, M.Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. **Stem Cells**, v.19, n.2 p. 99-107, 2001.

KARRA, R.; WU, S.M. Multipotent Stem Cells in Cardiac Regeneration. **Regenerative Medicine**, v.3, n.2, p.189-198, 2008.

KASSIS, I.; ZANGI, L.; RIVKIN, R.; LEVDANSKY, L.; SAMUEL, S.; MARX, G.; GORODETSKY, R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. **Bone Marrow Transplantation**, v.37, p.967-976, 2006.

KAWASAKI-OYAMA, R.S.; PAVARINO-BERTELLI, E.C.; ABBUD FILHO, M.; GOLONI-BERTOLLO, E.M. Cardiomioplastia Celular. **Arquivo Ciência e Saúde**, v.11, n.4, p.266-271, 2004.

KIEL, M.J., YILMAZ, O.H., IWASHITA, T., TERHORST, C., MORRISON, S. J. SLAM Family Receptors Distinguish Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Reveal Endothelial Niches for Stem Cells. **Cell Press**, v.121, n.7, p.1109-1121, 2005.

KING, K.W.; GOODELL, M.A. Inflammatory modulation of HSC: viewing the HSC as a foundation for the immune response. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p.685-692, 2011.

KOC, O.N.; GERSON, S.I.; COOPER B.W. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high dose chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v.18, n.2, p.307-316, 2000.

KOLONI, M.G.; SIMMONS, P.J. Combinatorial stem cell mobilization. **Nature News and Views**, v.23, p.252-253, 2009.

KLINKER, M.W.; LUNDY, S.K. Multiple Mechanisms of Immune Suppression by B Lymphocytes. **Molecular Medicine**, p.1-41, 2011.

KRAMPERA, M.; FRANCHINI, M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. Mesenchymal Stem Cells: From Biology to Clinical Use. **Blood Transfusion**, v.5, p.120-129, 2007.

KRAMPERA, M.; PIZZOLA, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v.39, p. 678-683, 2006.

KUZNETSOV, S.A.; MANKANI, M.H.; GRONTHOS, S.; SATOMURA K.; BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Circulating skeletal stem cells. **Journal of Cell Biology**, v.153, n.5, p.1133-1140, 2001.

LANE, T.A.; LAW, P.; MARUYAMA, M.; Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. **Blood**, v. 85, p.275-282, 1995.

LAPIDOT, T.; PETIT, I. Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. **Experimental Hematology**, v.30, p. 973–81, 2002.

LAZARUS, H.M.; HAYNESWORTH, S.E.; GERSON, S.I.; CAPLAN, A.I. Human bone marrow-derived mesenchymal (stromal) progenitor cells (MPCs) cannot be recovered from peripheral blood progenitor cell collections. **Journal of Hematotherapy**, v.6, p.447-455, 1997.

LENHOFF, S.; ROSBERG, B.; OLOFSSON, T. Granulocyte interactions with GM-CSF and GCSF secretion by endothelial cells and monocytes. **European Cytokine Network**, v.10, p.525–532, 1999.

LIAO, W.; LIN, J.X.; WANG, L.; LI, P.; LEONARD, W.J. Modulation of cytokines receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cells lineages. **Nature Immunology**, v.12, n.6, p.551-560, 2011.

LICHTMAN, M.A.; BEUTLER, E., SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T.J. **Williams Hematology**. 7th ed. United States: MacGraw-Hill, 2006.

LIU, C.H.; HWANG, S.M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. **Cytokine**, v. 32, p.270-279, 2005.

LOCATELLI, F.; ROCHA, V.; REED, W.; BERNAUDIN, F. ERTEM, M.; GRAFAKOS, S.; BRICHARD, B.; LI, X.; NAGLER, A.; GIORGIANI, G.; HAUT, P.R.; BROCHSTHEIN, J.A.; NUGENT, D.J.; BLATT, J.; WOODARD, P.; KURTSBERG, J.; RUBIN, C.M.; MINIERO, R.; LUTZ, P.; RAJA T.; ROBERTS, I.; WILL, A.M.; YANIV, I.; VERMYLEN, C.; TANNIOIA, N.;

LU, X.; LIU, T.; GU, L.; HUANG, C.; ZHU, H.; MENG, W.; XI, Y.; LI, S.; LIU, Y. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells involved in favoring type 2 T cell subsets. **Transplant Immunology**, v.22, p. 55 –61, 2009.

GARNIER, F.; IONESCU, I.; WALTERS, M.C.; LUBIN, B.H.; GLUCKMAN, E. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. **Blood**, v. 101, n.6, p. 2137-2143, 2003.

LOURES, V.A.; NORONHA, M.F.A.; BASTOS, R.G.; GIRARDI, J.M. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Insuficiência Cardíaca. **Revista do Hospital Universitário de Juiz de Fora**, v. 35, n.2, p.89-96, 2009.

MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.; FRAZÃO, P.J.; CHAPARRO, M.B.; KERKIS, A.; ZOPPA A.L.; KERKIS, I. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering**, v.15, n.1, p.87-94, 2009.

MANSILLA, E.; MARÍN, G.H.; DRAGO, H.; STURLA, F.; SALAS, E.; GARDINER, C.; BOSSI, S.; LAMONEGA, R.; GUZMÁN, A.; NUÑEZ, A.; GIL, M.A.; PICCINELLI, G.; IBAR, R.; SORATTI, C. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. **Transplantation Proceedings**, v.38, n.3, p.967-969, 2006.

MARIN-GARCIA, J.; GOLDENTHAL, M.J.; MOE, G.W. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. **Cardiovascular Research**, v.52, p.103-110, 2001.

MARKEL, T.A.; CRISOSTOMO, P.R.; WANG, M.; HERRING, C.M.; MELDRUM, D.R. Activation of individual tumor necrosis factor receptors differentially affects stem cell growth factor and cytokine production **American Journal of Physiology**, v.293, p.657– 662, 2007.

MASET, A.L.; PIRON-RUIZ, L.; GRECO, O.T.; LAGO, M.; POLONIS, A.F.C.; RUIZ, M.A. O G-CSF na Terapia do Acidente Vascular Cerebral. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, Supl. 1, p.104-111, 2009.

MATHER, J.P.; ROBERTS, P.E. **Introduction to cell and tissue culture: theory and technique**. New York: Plenum, 1998. 241p.

MAXIMOW A. Culture of blood leucocytes: from lymphocyte and monocyte to connective tissues. **Archives of Experimental Zellforsch**, v.5, p.169-268, 1928.

MEIRELLES, L.S.; FONTES, A.M.; COVAS, D.T.; CAPLAN, A.I. Mechanisms Involved in the Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem Cells. **Journal Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.20, p.419-427, 2009.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identify of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, p.2287-2299, 2008.

MEIRELLES, L.S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Brazilian Journal Haematology**, v.123, p.702-711.

MELDRUM, D.R. Tumor necrosis factor in the heart. **American Journal of Physiology**, v.274, p.577–95, 1998.

MÉNDEZ-FERRER, S.; FRENETTE, P.S. Hematopoietic Stem Cell Trafficking Regulated Adhesion and Attraction to Bone Marrow Microenvironment. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1116, p.392-413, 2007.

MENDRONE JÚNIOR, A. Sangue Periférico como Fonte de Células para Terapia Celular. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, supl.1, p.19-24, 2009.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, p. 485-491, 2008.

METCALF, D. Concise Review: Hematopoietic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered Questions. **Stem Cells**, v.10, p. 2390-2395, 2007.

MOHLE, R.; MUREA, S.; KIRSH, M. AND HAAS, R. Differential Expression Of L-Selectin, V α -4, And Lfa-1 On Cd34 Progenitor Cells From Bone Marrow And Peripheral Blood During G-Csf Enhance Recovery. **Experimental Hematology**, v. 23, p.1535, 1993.

MORRISON, S.J.; WRIGHT, D.E; WEISSMAN, I.L. Cyclophosphamide/Grnulocyte Colony-Stimulating Factor Induces Hematopoietic Stem cells to Proliferate Prior to mobilization. **Proceedings of The National Academy of Science**, v. 94, p.1908-1913, 1997

MURRAY, A.J.; LYGATE, C.A.; COLE, M.A.; CARR, C.A.; RADDA, G.K.; NEUBAUER, S.; CLARKE, K. Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. **Cardiovascular Research**, v.71, p.149-157, 2006.

MYLOTTE, L.A.; DUFFY, A.M.; MURPHY, M.; O`BRIEN, T.; SAMALI, A.; BARRY, F.; SZEGEZDI, E. Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. **Stem Cell**, v.26, p.1325-1336, 2008.

NARDI, N.B.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: isolation in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, n.174, p.249-282, 2006.

NASEF, A.; CHAPEL, A.; MAZURIER, C.; BOUCHET, S.; LOPEZ, M.; MATHIEU, N.; SENSEBÉ, L.; ZHANG, Y.; GORIN, N.C.; THIERRY, D.; FOUILLARD, L. Identification of IL-10 and TGF- β transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. **Gene Expression**, v.13, p.217-226, 2007.

NAOUM, P.C. Citocinas e Interleucinas. **Academia de Ciência e Tecnologia de São José do Rio Preto**, 2009.

NAUTA, A.J.; FIBBE, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. **Blood**, v.110, n.10, p.3499-3506, 2007.

NELSON, T.J.; BEHFAR, A.; YAMADA, S.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; TERZIC, A. Stem cell Platforms for Regenerative Medicine. **Clinical and Translational Science**, v.2, n.3, p. 222-227, 2009.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. **Tissue Engineering: Part A**, volume 14, n.6, p.1007-1015, 2008.

NERVI, B.; LINK, D.C; DIPERSIO, J.F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, n.3, p.690-705, 2006.

NIEMINEN, M.S.; HARJOLA, V.P. Definition and epidemiology of acute heart failure syndromes. **American Journal of Cardiology**, v.96, p. 5G-10G, 2005.

NOVOTNY, N.M.; RAY, R.; MARKEL, T.A.; CRISOSTOMO, P.R.; WANG, M.; WANG, YUE.; MELDRUM, D.R. Stem Cell Therapy in Myocardial Repair and Remodeling. **Journal American College of Surgeons**, v.207, n.3, p. 423-434, 2008.

OLIVEIRA, D.M.; CAMPOS, A.H. Uso Terapêutico de Células-tronco em Cardiologia. **Einstein**, v.7, n.2, p.229-236, 2009.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Transplanted Adult Bone Marrow Cells Repair Myocardial Infarcts in Mice. **Annals New York Academy of Sciences**, 2006.

ORTIZ, L.A.; DUTREIL, M.; FATTMAN, C.; PANDEY, A.C.; TORRES, G.; GO, K.; PHINNEY, D.G. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the anti-inflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings of The National Academy of Science**, v.104, n.26, p.11002-11007, 2007.

PAPAYANNOPOULOU, T. Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. **Blood**, v. 103, p. 1580-1585, 2004.

PAPAYANNOPOULOU, T.; SCADDEN, D.T. Stem-cell ecology and stem cells in motion. **Blood**, v. 111, p. 3923-3930, 2008.

PARTOVIAN, C.; SIMONS, M. Stem Cell Therapies in Cardiovascular Disease A “Realistic” Appraisal. **Journal Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v.5, n.1, p.73-78, 2008.

PATRÍCIO, Lia Fordiani Lenati. **Isolamento, Cultivo e Diferenciação de Células-Tronco Mesenquimais de Cães**. Curitiba: UFPR, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2010.

PAYNE, T.R.; OSHIMA, H.; OKADA, M.; MOMOI, N.; TOBITA, K.; KELLER, B.B.; HAIRONG, P.; HUARD, J. A relationship between vascular endothelial growth factor, angiogenesis, and cardiac repair after muscle stem cell transplantation into ischemic hearts. **Journal of the American College of Cardiology**, v.50, p. 1677-1684, 2007.

PELUS, L.M. Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. **Current Opinion of Hematology**, v. 15, n.4, p.285-292, 2008.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Models of Tissue Repair-Current Views. **Stem Cells**, v.25, p.2896-2902, 2007.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p. 143-147, 1999.

PLACZEK, M.R.; CHUNG, I.M.; MACEDO, H.M.; ISMAIL, S.; BLANCO, T.M.; LIM, M.; CHA, J.M.; FAUZI, I.; KANG, Y.; YEO, D.C.L.; MA, C.Y.J.; POLAK, J.M.; PANOSKALTSIS, N.; MANTALARIS, A. Stem Cell Bioprocessing: Fundamentals and Principles. **Journal of the Royal Society Interface**, v.6, p.209-232, 2009.

PRENTICE, D.A. Current Science of Regenerative Medicine with Stem Cells. **Journal of Investigative Medicine**, v. 54, p.33-37, 2006.

PROCKOP, D.J. Marrow Stromal Cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v.276, n.5309, p.71-74, 1997.

PONTE, A.L.; MARAIS, E.; GALLAY, N.; LANGONNE, A.; DELORME, B.; HERAULT, O.; CHARBORD, P.; DOMENECH, J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. **Stem Cells**, v. 25, n.7, p.1737-1745, 2007.

POTIAN, J.A.; AVIV, H.; PONZIO, N.M.; HARRISON, J.S.; RAMESHWAR, P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. **Journal of Immunology**, v.171, p.3426-3434, 2003.

RAFFAGHELLO, L.; BIANCHI, G.; BERTOLOTTI, M.; MONTECUCCO, F.; BUSCA, A.; DALLEGRI, F.; OTTONELLO, L.; PISTOIA, V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. **Stem Cells**, v.26, n.1, p.151-162, 2008.

REBELATTO, Carmen Lúcia Kuniyoshi. **Células-Tronco Mesenquimais: Caracterização e Potencial de Diferenciação a Cardiomiócitos Induzida por Doadores de Óxido Nítrico**

(SNAP e DEA/NO). Curitiba: PUCPR, 2008. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde), Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2008.

REN, G.; ZHANG, I.; ZHAO, X. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, v.2, n.2, p.141-150, 2008.

REYA, T., MORRISON S.J., CLARKE M.F., WEISSMAN, I.L. Stem Cell, Cancer and Cancer Stem Cells. *Nature*, v. 414, n.6859, p.105-111, 2001.

REYNOLDS, J.M. ANGKASEKWINAI, P.; DONG, C. IL-17 family member cytokines: Regulation and function in innate immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, v.21, p.413-423, 2010.

REZZOUG, F.; HUANG, Y.; TANNER, M.K.; WYSOCZYNSKI, M.; SCHANIE, C.L.; CHILTON, P.M.; RATAJCZAK, M.Z.; FUGIER-VIVIER, I.J.; ILDSTAD, S.T. TNF-alpha is critical to facilitate hemopoietic stem cell engraftment and function. *The Journal of Immunology*, v.180, n.1, p. 49-57, 2008.

RIPA, R.S.; HAACK-SØRENSEN, M.; WANG, Y.; JØRGENSEN, E.; MORTENSEN, S.; BINDSLEV, L.; et al. Bone marrow derived mesenchymal cell mobilization by granulocyte-colony stimulating factor after acute myocardial infarction: results from the stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, v.116; p.124-30, 2007.

ROBE, P.G. Stem Cells Near the Century Mark. *Journal Clinical Investigation Thorofare*, v.105, p. 1489-1491, 2000.

ROSENBAUM, A.J.; GRANDE, D.A.; DINES, J.S. The Use of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering. *Organogenesis Journal*, v.4, n.1, p.23-27, 2008.

ROSSI, J.M. A dimensão do problema da insuficiência cardíaca do Brasil e do mundo. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo*, v.1, p. 1-10, 2004.

SANGANALMATH, S.K.; LATIF, A.A.; BOLLI, R.; XUANG, Y.T.; DAWN, B. Hematopoietic cytokines for cardiac repair: mobilization of bone marrow cells and beyond. *Basic Research in Cardiology*, 2011.

SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.; CARVALHO, A.C.C. Transplante de células da Medula Óssea no tratamento da cardiopatia chagástica crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n.6, p. 490-495, 2004.

SHELLER, j.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, p.878-888, 2011.

SCHIMIEGUEL, Dulce Marta. **Análise da Hematopoese em amostras de medula óssea nas fases pré e pós mobilização para transplante autólogo de células tronco hematopoéticas periféricas.** São Paulo: UNIFESP, 2009. Tese (Doutorado em Ciências), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2009.

SCHMITZ, N.; EAPEN, M.; HOROWITZ, M.M.; ZHANG, M.J.; KLEIN, J.P.; RIZZO, J.D. FAUSTO, R.; LOBERIZA, A.G.; RICHARD, E.C. Long-term outcome of patients given transplants of mobilized blood or bone marrow: A report from the International Bone Marrow Transplant Registry and the European Group for Blood and Marrow Transplantation. **Blood**, v.108, n.13, p.4288-4290, 2006.

SCHWARZMEIER, J.D. The role of cytokines in haematopoiesis. **European Journal of Haematology**, v. 60, p.69–74, 1996.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n.1, p. 13-19, 2005.

SILVA JÚNIOR F.C.; ODONGO, F.C.A.; DULLEY, F.L. Células-tronco hematopoéticas: utilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, n.1, p. 53-58, 2009.

SIOUD, M.; FLOISAND, Y.; FORFANG, L.; LUND-JOHANSEN, F. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. **Journal of Molecular Biology**, v.364, n.5, p.945-954, 2006.

SRINIVAS, G.; ANVERSA, P.; FRISHMAN, W.H. Cytokines and myocardial regeneration. A novel treatment option for acute myocardial infarction. **Cardiology Review**, v.17,p.1–9, 2009.

SULLIVAN, M.J.; GREEN, H.J.; COBB, F.R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, v.81, p.518-527, 1990.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p.2649-2654, 2008.

SVOBODOVA, E.; KRULOVA, M.; ZAJICOVA, A.; POKORNA, K.; PROCHAZKOVA, J.; TROSAN, P.; HOLAN, V. The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naïve T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or pro-inflammatory Helper T-cell 17 population. **Stem Cells and Development**, v.00, n.00, p.1-10, 2011.

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA M.; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and Tissue Research**, v.312, n.1; p.31-40, 2003.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Morphological Aspects of Apoptosis in Heart Diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, n.1, p.56-75, 2006.

TAKEYAMA, K.; OHTO, H. PBSC Mobilization. **Transfusion and Apheresis Science**, v.31, p.233-243, 2004.

TAPP, H.; HANLEY JR, E.N.; PATT, J.C.; GRUBER, H.E. Adipose-derived stem cells: characterization and current applications in orthopaedic tissue repair **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.1-9, 2009.

TATSUMI, K.; OTANI, H.; SATO, D.; ENOKI, C.; IWASAKA, T.; IMAMURA, H.; TANIUCHI, S.; KANEKO, K.; ADACHI, Y.; IKEHARA, S. Granulocyte-colony stimulating factor increases donor mesenchymal stem cells in bone marrow and their mobilization into peripheral circulation but does not repair dystrophic heart after bone marrow transplantation. **Circulation**, v.72, 1351–1358, 2008.

TROPEL, P.; NÖEL, D.; LEGRAND, P.; BENABID, A.; BERGER, F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental cell research**, v. 295, p.395-406, 2004.

TING, A.E.; MAYS, R.W.; FREY, M.R.; HOF, W.V.; MEDICETTY, S.; DEANS, R. Therapeutic Pathways of Adult Stem Cell Repair. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.65, p.81-93, 2008.

TONDREAU, T.; MEULEMAN, N.; DELFORGE, A.; DEJENEFFE, M.; LEROY, R.; MASSY, M.; MORTIER, C.; BRON, D.; LAGNEAUX, L.; BORDET, J. Mesenchymal Stem Cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct-4 expression, and plasticity. **Stem Cells**, v. 23, n.8, p.1105-1112, 2005.

BOCELLI-TYNDALL, C.; BRACCI, L.; SCHAEREN, S.; FEDER-MENGUS, C.; BARBERO, A.; TYNDALL, A.; Spagnoli, G.C. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.68, p.1352-1359, 2009.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Immunoregulatory Function of Mesenchymal Stem Cells. **European Journal of Immunology**, v.36, p.2566-2573, 2006.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal Stem Cells in the Health and Disease. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.726-736, 2008.

VANDERVELDE, S.; VAN LUYN, M.J.A.; ROZENBAUM, M.H.; PETERSEN, A.H.; TIO, R.A.; HARMSSEN, M.C. Stem cell-related cardiac gene expression early after murine myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v.73, p.783–793, 2007.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, V.C.N. Cytokines: A Review. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 24, n.4, p.146-154, 2001.

VILAS-BOAS, F., FEITOSA, G.S.; SOARES, M.P.B.; MOTA, A.; PINHO-FILHO, J.A.; ALMEIDA, A.J.G.; ANDRADE, M.V.; CARVALHO, H.G.; DOURADO-OLIVEIRA, A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R. Resultados Iniciais do Transplante de Células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com Insuficiência cardíaca de Etiologia Chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.87, n.2, p. 159-166, 2006.

WENCESLAU, C.V. **Análise de células mesenquimais de saco vitelino, fígado e medula óssea de fetos caninos**. São Paulo: USP, 2009. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

WEXLER, S.A.; DONALDSON, C.; DENNING-KENDALL, P.; RICE, C.; BRADLEY, B.; HOWS, J.M. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. **Brazilian Journal Haematology**, v. 121, p.368-374, 2003.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow Haematopoietic Stem-Cell Niches. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p.93-106, 2006.

WODEWOTZKY, Thaila Izabel. **Células-Tronco e Terapia Celular**. Botucatu: UNESP, 2008. Trabalho de Instrumentação, Departamento de Educação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, 2008.

XIANG, M.X, HE, A.; WANG, J.; GUI, C. Protective Paracrine Effect of Mesenchymal Stem Cells on Cardiomyocytes. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v.10, n.8, p.619-624, 2009.

YANG, L., BRYDER, D., ADOLFSSON, J., NYGREN, J., MANSSON, R., SIGVARDSSON, M., EIRIK, S. Identification of Lin⁻ Sca1⁻ Kit⁻ CD34⁻ FLT3⁻ Short-Term Hematopoietic Stem Cells capable of rapidly Reconstituting and Rescuing Myeloablated Transplant Recipients. **Blood Journal**, v.105, n.7, p.2717-2723, 2005.

YAGI, H.; SOTO-GUTIERREZ, A.; PAREKKADAN, B.; KITAGAWA, Y.; TOMPKINS, R.G.; KOBAYASHI, N.; YARMUSH, M.L. Mesenchymal Stem Cell: Mechanisms of Immunomodulation and Homing. **Cell Transplantation**, v.19, n.6, p.667-679, 2010.

ZAGO, M.A. Células-tronco: Origens e Propriedades. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco A Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006-a.

ZAGO, M.A. Terapia Celular, Transplante de Células, de Tecidos ou de Órgãos. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco A Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006-b.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco, a Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

ZHANG, C.; ZHANG, X.; CHEN, X.H. Granulocyte-colony stimulating factor mobilized mesenchymal stem cells: A new resource for rapid engraftment in hematopoietic stem cell transplantation. **Medical Hypotheses**, v. 76, p.241-243, 2011.

ZHDANOV, V.V.; STAVROVA, L.A.; DYGAJ, A.M.; GOLDBERG, E.D. Mechanism of mobilization of mesenchymal stem cell under the effect of granulocyte colony-stimulating factor. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v.144, p. 151-153, 2007.

ZHENG, J.; SONG, C.; ZHANG, C.C. A new chapter: hematopoietic stem cells are direct players in immunity. **Cell & Bioscience**, v.1, n.33, p.1-5, 2011.

ZEIDÁN-CHULIÁ, F.; NODA, M. “Opening” The Mesenchymal Stem Cell Tool Box. **European Journal of Dentistry**, v.3, p.240-249, 2009.

ZWAIFLER, N.J.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; ADAMS, G.; EDWARDS, C.J.; MOSS, J.; BURGER, J.A.; MAINI, R.N. Mesenchymal Precursor Cells in the Blood of Normal Individuals. **Arthritis Research & Therapy**, v.2, n.6, p.477-488, 2000.