



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Fernanda Hussein

**ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA
DE RATOS EM MEIO DE CULTURA
CONDICIONADO POR CÉLULAS DE SCHWANN**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Fernanda Hussein
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular na área de Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Francesco Langone

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

H964e	<p>Hussein, Fernanda</p> <p>Estudo da diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos em meio de cultura condicionado por células de Schwann / Fernanda Hussein. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.</p> <p>Orientador: Francesco Langone.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Células-tronco mesenquimais. 2. Célula de Schwann. 3. Células - Diferenciação. 4. Proteína S100. I. Langone, Francesco. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p>(rodt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiation in culture conditioned medium by Schwann cells.

Palavras-chave em inglês: Mesenchymal stem cells; Schwann cells; Cell differentiation; S100 proteins.

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Francesco Langone, Alexandre Eduardo Nowill, Jose Camillo Novello.

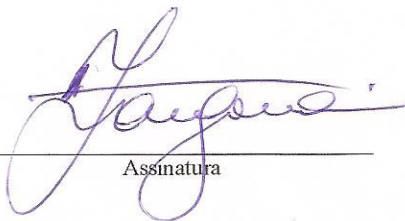
Data da defesa: 06/07/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

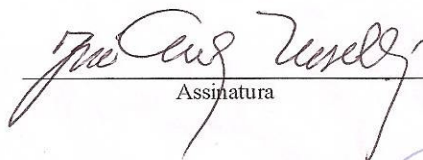
Campinas, 06 de Julho de 2007

BANCA EXAMINADORA

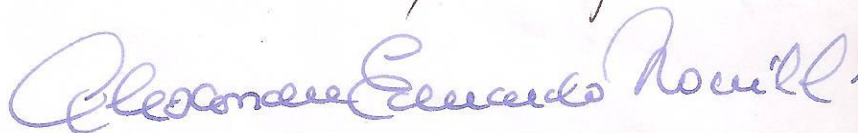
Prof. Dr. Francesco Langone (Orientador)


Assinatura

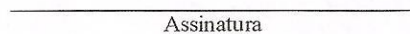
Prof. Dr. Jose Camillo Novello


Assinatura

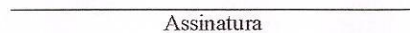
Prof. Dr. Alexandre Eduardo Nowill


Assinatura

Profª. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos


Assinatura

Prof. Dr. Jose Andres Yunes


Assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Neurobiologia do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, sob orientação do Prof. Dr. Francesco Langone, e no Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância-CIPOI da UNICAMP, com a supervisão do Prof. Dr. Alexandre Eduardo Nowill.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a meus pais, Mahmoud e Sueli, por todo incentivo, apoio e suporte durante todo este período, sem o qual não teria sido possível prosseguir. A minhas irmãs e todos os familiares pelo estímulo ao meu estudo.

Agradeço também ao Professor Francesco pela aceitação do desafio que lhe foi atribuído com a realização deste trabalho. Obrigada pela orientação e conhecimentos oferecidos. Obrigada a todos os colegas do laboratório de Neurobiologia, que tornaram essa jornada mais prazerosa: Alexandre Rezende, Cristiane de La Hoz, César Sartori, Fábio Rogério, Fernanda Pelágio, Gustavo Facchini, Rafael Cofiño, Tiago Martinelli. Agradeço também aos novos amigos do departamento de Fisiologia pelas reuniões e momentos de descontração: Adriano Mariscal, Alessandro Salerno, Amarillis Bonito, Claudia Yano, Danilo Crege, Emiliane Salomão, Heder Frank, Gislaine Ventrucchi, entre outros.

Agradeço especialmente aos colaboradores deste trabalho, sem os quais teria sido ainda mais difícil: André Schwanbach e Ricardo Shiniti. Obrigada especial também ao pessoal do CIPOI por me receberem e por toda a assistência: Dr. Alexandre Nowill, Gilberto Francchi, Andrés Yunes, Márcia Fornazim, Carolina Spago e Sílvia Gabetta.

Agradeço ainda a galera de São Paulo pela amizade e estima apesar da distância e da saudade: Pedro, George e Riviane.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro durante a execução deste projeto e a todos que fizeram deste período em Campinas uma fase inesquecível.

Sumário

<i>Resumo</i>	viii
----------------------------	-------------

<i>Abstract</i>	ix
------------------------------	-----------

I. Introdução	1
----------------------------	----------

I.1- Células Tronco: origem e potencial terapêutico.....	2
--	---

I.2- Células de Schwann.....	4
------------------------------	---

I.3- Diferenciação das CMMO em CS.....	6
--	---

I.4- Eletroforese 2DE.....	11
----------------------------	----

I.5- A Proteína S100.....	14
---------------------------	----

II. Objetivos	16
----------------------------	-----------

II.1- Objetivo Geral.....	17
---------------------------	----

II.2- Objetivos Específicos.....	17
----------------------------------	----

III. Materiais e Métodos	18
---------------------------------------	-----------

III.1- Extração de Células de Schwann.....	19
--	----

III.2- Extração de Células Mesenquimais Derivadas de Medula Óssea.....	20
--	----

III.3- Cultura de Células Mesenquimais Derivadas de Medula Óssea (CMMO) em Meio Condicionado CM).....	22
--	----

III.4- Procedimentos Imunocitoquímicos.....	22
---	----

III.5- Marcador Imunocitoquímico.....	23
---------------------------------------	----

III.6- Proliferação e Viabilidade Celular.....	24
--	----

III.7- Quantificação de proteínas.....	25
--	----

III.8- Eletroforese 2DE.....	26
------------------------------	----

IV. Resultados	28
-----------------------------	-----------

IV.1- Culturas purificadas de células de Schwann e células mesenquimais de medula óssea.....	29
---	----

IV.2- Proliferação e viabilidade das culturas de células.....	29
---	----

IV.3- Imunocitoquímica da proteína S100.....	31
--	----

IV.4- Quantificação de proteínas.....	34
---------------------------------------	----

IV.5- Eletroforese 2DE.....	35
-----------------------------	----

V. Figuras.....	37
Figura 1. Células de Scwhann após 2 dias em cultura primária.....	38
Figura 2. Células de Schwann 8 dias após serem semeadas em placas de cultura.....	39
Figura 3. Célula mesenquimal de medula óssea após 3 dias de cultura em meio D-10.....	40
Figura 4. Gráfico representando a proliferação de células de Schwann em meio D-10/mitógeno.....	41
Figura 5. Gráfico representando a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura D-10.....	42
Figura 6. Gráfico representando a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio condicionado por células de Schwann.....	43
Figura 7. Células de Schwann imunorreativas para proteína S100.....	44
Figura 8. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos cultivadas durante 3 dias em DMEM/10%SFB/2%L-glutamina.....	45
Figura 9. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos cultivadas durante 7 dias em meio condicionado por células de Schwann.....	46
Figura 10. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos cultivadas durante 14 dias em meio condicionado por células de Schwann.....	47
Figura 11. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas durante 21 dias em meio condicionado por células de Schwann.....	48
Figura 12. Perfil proteômico 2DE de lisado de células de Schwann cultivadas em meio de cultura D-10.....	49
Figura 13. Perfil proteômico 2DE de lisado de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura D-10.....	50
Figura 14. Perfil proteômico 2DE de lisado de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura condicionado por células de Schwann.....	51
VI. Discussão.....	52
VII. Conclusões.....	63
VIII. Perspectivas Futuras.....	65
IX. Referências Bibliográficas.....	67
X. Anexo.....	83

Resumo

As células tronco são células indiferenciadas capazes de se auto replicar e de se diferenciar em diversos tipos celulares maduros com funções especializadas. As células tronco de medula óssea são particularmente interessantes por serem células multipotentes, ou seja, geram células de diversos tecidos, são de fácil obtenção através da aspiração da medula óssea femural e eliminam os problemas de rejeição por ser possível realizar transplante autólogo. As células de Schwann são um dos tipos celulares mais importantes do Sistema Nervoso Periférico (SNP). Elas são uma fonte de sinais para a geração e desenvolvimento dos nervos periféricos, da mielinização e, ainda, auxiliam na regeneração axonal no caso de lesões tanto do SNP quanto do SNC.

Os estudos enfocando a indução da diferenciação de células progenitoras a tipos celulares específicos desejados estão em seus passos iniciais. Já são conhecidos diversos fatores que favorecem o desenvolvimento de um determinado tipo celular a partir de células progenitoras *in vitro*. Contudo, permanecem desconhecidos os fatores intrínsecos ao organismo que induzem esse processo. Faz-se necessário portanto que se investigue, ainda *in vitro*, porém sem manipulações exógenas e mimetizando o microambiente corpóreo, quais fatores endógenos são os responsáveis pela deflagração do processo de diferenciação. Neste sentido, o Meio Condicionado por células de Schwann mostrou exercer efeitos importantes sobre as células mesenquimais de medula óssea, promovendo sua proliferação e possivelmente induzindo o processo de diferenciação nestas células. Ainda, a Eletroforese 2DE comparativa mostrou uma similaridade maior entre CS e CMMO do que com as CMMO cultivadas em MC, indicando que esta última poderia estar sofrendo um processo de diferenciação celular, diferentemente das CS e das CMMO.

Abstract

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSC) are capable to differentiate into several cell types. The differentiation depends on culture media molecules signaling. In this study we investigated the effect of Schwann cell conditioned media on BMMSC morphology and molecular phenotype.

Schwann cells (SC) were isolated from adult Wistar rats sciatic nerve (Glia, 17: 327-338, 1996) and were cultivated in DMEM plus 10% FBS (D10). Every 48 hours the SC conditioned media (CM) were collected and stored at -80°C. The BMMSC were isolated from adult Wistar rats femur bone marrow (PNAS, 95:3908-3913,1995). BMMSC were maintained in D10. Subsequently, they were cultivated in CM for 7, 14 and 21 days. After 14 days in CM it was detected changes on the BMMSC typical flattened morphology to the SC bipolar morphology. The frequency of these changes increased after 21 days. These changes have been followed by changes on immunoreactivity and S100b protein localization on BMMSC. Before they were cultivated in CM, the BMMSC showed low immunoreactivity to S100b protein on cytoplasm. Culture in CM generated a S100b label gradual increase and it was found in nuclear compartment. Only the nucleus was S100b labeled, after 21 days. On the other hand, the bipolar morphology cells showed cytoplasmatic and nuclear S100b+. These findings agree with Deloume et al. (Mol. Cell. Neurosci. 27:453-465, 2004) about the S100b immunolabelling during the differentiation of glial progenitor cells into oligodendrocytes. Our results suggest that molecules present in CM are capable of inducing phenotypes changes related with the S100b expression and it roles on differentiation of BMMSC into SC. Moreover, 2DE electrophoresis shown a extent similarity between SC and BMMSC. This result suggests that the BMMSC cultivated in CM could be in a differentiation process.

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

O domínio da tecnologia para a obtenção e manipulação de células tronco vem aumentando significativamente as oportunidades de tratamento de doenças degenerativas. Em particular, os recursos terapêuticos conquistados neste campo representam uma esperança ímpar para os indivíduos acometidos por moléstias neurodegenerativas ou lesões traumáticas do sistema nervoso.

I.1 Células Tronco: origem e potencial terapêutico

As células tronco (CT) são células não diferenciadas capazes de se auto-replicar indefinidamente e também de se diferenciar em células maduras com funções especializadas (Kim, 2004). Segundo sua origem elas podem ser classificadas como: embrionárias, fetais ou adultas. As CT embrionárias são derivadas de estágios iniciais do desenvolvimento do embrião (Evans & Kaufman., 1981; Martin , 1981; Stravidis & Smith, 2003), enquanto as CT fetais são tipos celulares primitivos do feto que podem dar origem a vários órgãos do corpo (Temple, 1989; Brannen & Sugaya., 2000; Ogawa 2003). As CT adultas ocorrem em diferentes tecidos, como na medula óssea e no cérebro, e conservam a capacidade de se auto-replicarem e de se diferenciarem em tipos celulares do tecido de origem por toda a vida do organismo (Gage, 2000; Temple, 2001; Song *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2003; Nakamura & Toyama, 2003). A utilização de CT embrionárias, no entanto, envolve problemas éticos e, mais ainda, seu potencial carcinogênico é um sério fator de risco para aplicações clínicas (Bjorklund *et al.*, 2002). Existem várias populações de CT em tecidos adultos que poderiam contornar este problema. Além disso, diversos estudos mostraram que CT adultas possuem grande plasticidade podendo gerar outros tipos

celulares além daqueles dos tecidos nos quais elas se localizam, sendo então denominadas multipotentes (Mezey *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2001; Romero-Ramos *et al.*, 2002).

Para futuras terapias celulares, as células “ideais” devem ser de fácil acesso, imunologicamente inertes, capazes de se expandir rapidamente em cultura, sobreviver por longos períodos e capazes de se integrarem ao tecido hospedeiro (Azizi *et al.*, 1998). Dentre as candidatas mais promissoras encontram-se as Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea (CMMO), que podem ser facilmente obtidas através de aspiração da medula óssea (Bianco *et al.*, 2001).

Tem-se verificado que as CMMO são na verdade células multipotentes (Morrison & Weissman, 1994; Chopp *et al.*, 2000; Schwarz *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2001), capazes de se diferenciar principalmente em células de origem mesodérmica como, por exemplo, células dos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular (Prockop, 1997; Ferrari *et al.*, 1998). Contudo, as CMMO têm mostrado grande plasticidade e capacidade de diferenciação (Abderrahim-Ferkoune *et al.*, 2004; Tao e Ma, 2003). De fato, vários autores reportaram que essas células podem se diferenciar em células de tecido nervoso central e periférico se forem fornecidos estímulos e condições de cultura adequados (Clarke *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000; Dezawa *et al.*, 2001; Akiyama *et al.*, 2002; Bandari *et al.*, 2002; Cuevas *et al.*, 2002, 2004; Sanchez-Ramos, 2002; Alberti-Amador & García Miniet, 2003; Moura-Campos *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004; Pereira Lopes *et al.*, 2006).

Além disso, as CMMO são particularmente atrativas para futuras terapias celulares, por diversos outros fatores, tais como: 1- não deflagram problemas éticos para serem manipuladas e mantidas em laboratório. 2- não necessitam de imunossupressão. 3- podem

ser eficientemente expandidas. 4- constituem uma reserva abundante e acessível para uso clínico. 5- revelaram uma considerável tolerância à manipulação genética.

I.2 Células de Schwann

Células de Schwann (CS) dos nervos periféricos de vertebrados são geradas a partir das cristas neurais, um grupo de células transitórias que se desligam do tubo neural durante o desenvolvimento embrionário (Jessen & Mirsky, 2002). Ainda não estão claros quais sinais extracelulares são importantes para a indução do desenvolvimento glial a partir das células das cristas neurais. Experimentos onde células das cristas neurais são cultivadas isoladamente, em combinação com outros tecidos, em diferentes substratos ou em meios de cultura com composições diferentes têm demonstrado que o ambiente em que as células se encontram tem grande influência e pode determinar o tipo celular no qual ela irá se diferenciar (Le Douarin, 1982; Smith-Thomas *et al.*, 1986).

Através de experimentos *in vitro* e *in vivo* tem sido mostrado que sinais de dois fatores de crescimento estão envolvidos na regulação do desenvolvimento das CS em nervos embrionários. São eles a β -neuregulina-1 e as endotelinas (Brennan et al., 2000; Garrat et al., 2000). A β -neuregulina-1 age como um fator de sobrevivência para os precursores das CS por prevenir a apoptose desses precursores e por sustentar sua sobrevivência por vários dias, durante os quais estes se convertem a CS (Dong et al., 1995). As endotelinas permitem que os precursores das CS sobrevivam em cultura na ausência de axônios, um efeito promovido também pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Brennan et al., 2000). Além disso, o fator de crescimento glial (GGF) é um agente mitogênico para as CS, que estimula a regeneração nervosa periférica e direciona a

diferenciação das células das cristas neurais em células gliais *in vitro* (Shah et al., 1994). Intrinsecamente, outros fatores demonstram ter um papel importante durante o desenvolvimento das CS. A geração de CS pelos seus precursores é acompanhada pelo estabelecimento de um circuito autócrino que permite que as CS sobrevivam na ausência de axônios (Jessen & Mirsky, 1999). Dessa forma, as CS são capazes de sustentar sua própria sobrevivência e essa atividade de sobrevivência reside num coquetel de fatores tróficos que inclui o IGF-I, o fator de crescimento derivado das plaquetas-BB (PDGF-BB) e a neurotrofina-3 (NT-3). Esses fatores são produzidos e secretados pelas CS e juntos formam um circuito de sobrevivência autócrino e esse circuito atua via MAP Kinase para mediar a sobrevivência das células (Meier et al., 1999).

O IGF-I é uma proteína de 7KDa da família do gene da insulina que interage com o receptor IGF tipo 1, uma tirosina kinase transmembrana (Daughaday & Rotwin, 1989; Humbel, 1990), ativando uma cascata de reações que promove a proliferação tanto de astrócitos (Balloti et al., 1987) e oligodendrócitos (McMorris et al, 1986; Mozell & McMorris, 1991), como também a proliferação (Davis & Stroobant, 1990; Hansson et al., 1988; Schumacher et al., 1993) e diferenciação de células de Schwann (Stewart et al., 1996).

O PDGF é uma glicoproteína de 32KDa que também exerce seus efeitos através de uma tirosina kinase transmembrana. Da mesma maneira que o IGF, o PDGF também é conhecido por promover a proliferação de astrócitos, oligodendrócitos e células de Schwann (Davis & Stroobant, 1990; Hutchins, 1995; Stewart et al., 1991).

É bem conhecido que as CS são capazes de gerar um microambiente propício à sobrevivência dos neurônios lesados e para a regeneração e orientação do crescimento axonal em nervos periféricos (Ide, 1996; Terenghi, 1999; Hall, 2001). Neste sentido vale

ressaltar os esforços que vem sendo realizados para viabilizar o emprego das CS no tratamento de lesões traumáticas da medula espinhal. Estas mantêm suas propriedades no ambiente do sistema nervoso central (SNC) e não expressam proteínas inibidoras do crescimento axonal, tal como a NOGO-A, presentes na bainha de mielina elaborada por oligodendrócitos (Raisman, 1997; Xu *et al.*, 1995, 1997; Chen *et al.*, 2000; Schwab, 2002, 2004). As CS são capazes de facilitar a regeneração axonal após serem enxertadas no SNC e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), um processo que depende da secreção de fatores neurotróficos, de componentes da matriz extracelular e de moléculas de adesão celular (Bunge RP, 1991; Dezawa *et al.*, 2001; Shields *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1997). Em particular, CS cultivadas *in vitro* e transferidas para o interior de próteses tubulares empregadas no reparo de lesão nervosas estimularam a regeneração axonal *in vivo* (Xu *et al.*, 1997; Mosahebi *et al.*, 2001).

I.3 Diferenciação das CMMO em CS

Atualmente sabe-se que as CMMO podem ser expandidas *in vitro* como células indiferenciadas, indicando sua capacidade proliferativa, e podem ser induzidas a se diferenciarem em vários tipos de células mesenquimais (Prockop DJ, 1997; Sánchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000). Contudo, os mecanismos pelos quais substâncias químicas induzem a diferenciação de CMMO num tipo celular específico continuam obscuros. Outrossim, não parece existir um fator singular que direcione a diferenciação de CMMO num único tipo celular específico (Schuldiner *et al.*, 2000). No entanto, muitos experimentos têm aumentado o nosso conhecimento sobre esse processo. Bicknese e colaboradores mostraram, por exemplo, que a exposição ao fator básico de

crescimento de fibroblastos (bFGF) induz à expressão de marcadores gliais (Bicknese et al., 2002).

Dentro deste contexto, são poucos os trabalhos realizados até o momento para investigar a diferenciação de CMMO em CS e do seu emprego no tratamento de lesões do tecido nervoso periférico (Dezawa *et al.*, 2001; Dezawa, 2002; Moura-Campos *et al.*, 2003; Cuevas *et al.*, 2002, 2004;). Parte desses autores investigaram primariamente se as CMMO transplantadas poderiam se diferenciar em CS, e com isso dar suporte à regeneração nervosa periférica (Moura-Campos *et al.*, 2003; Cuevas *et al.*, 2002, 2004; Pereira Lopes *et al.*, 2006). Por sua vez, o grupo de Mari Dezawa foi o único que desenvolveu um protocolo de diferenciação de CMMO em CS *in vitro* para posterior transplante e reparo cirúrgico de nervo periférico (Dezawa *et al.*, 2001; Dezawa, 2002).

Dezawa e cols. (2001), após isolamento, purificação e cultivo de CMMO de ratos adultos, obtiveram a diferenciação destas células em CS através da administração sequencial de beta-mercaptoetanol (BME), ácido retinóico (RA), forskolina (FSK), fator de crescimento de fibroblástico básico (bFGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e heregulina beta 1 (HRG). Estes agentes foram administrados na ordem indicada, após lavagem e subsequente substituição das drogas no meio de cultura.

As CMMO transformadas em cultura expressavam marcadores imunocitoquímicos de CS, tais como S100 e p75. Quando foram inseridas no interior de próteses tubulares (PT), utilizadas para o reparo de nervo ciático de ratos, elas deram suporte à regeneração neuronal, inclusive mielinizando os axônios regenerados. Deve-se ressaltar que as PT tinham 1,5cm de comprimento e que as CMMO foram implantadas no interior das mesmas suspensas em Matrigel^R (laminina). Interessantemente, os autores reportaram que a

regeneração axonal foi significativamente inferior quando as CMMO foram implantadas ainda no estado indiferenciado (Dezawa *et al.*, 2001; Dezawa, 2002).

Dentre as substâncias empregadas por Dezawa e cols. (2001), sabe-se que o BME induz a formação de processos neuríticos e que o RA leva à diferenciação CT embrionárias e neurais em células nervosas (Bain *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1999; Woodbury *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2001;), enquanto que o bFGF, PDGF e HRG são potentes indutores da diferenciação e proliferação de células gliais no SNC e de CS no SNP (Chaudhary & Avioli, 1997; Cohen *et al.*, 1999; Jessen & Mirsky, 1999; Zhang *et al.*, 2004). Por sua vez, o bFGF é sabidamente um agente mitogênico para células mesenquimais, bem como a FSK, que induz o aumento nos níveis intracelulares de cAMP (Dong *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2001; Bicknese *et al.*, 2002; Leimeroth *et al.*, 2002). Já a HRG proporciona o desenvolvimento seletivo de células das cristas neurais em CS (Dong *et al.*, 1995, 1999; Shah *et al.*, 1996).

Dezawa e cols. (2001) sugeriram que a administração sequencial desses fatores teve um efeito cumulativo e determinante para a diferenciação das CMMO, uma vez que a omissão de qualquer um deles resultou na diferenciação incompleta das mesmas em CS, tanto na morfologia quanto na imunorreatividade (Dezawa *et al.*, 2001).

Por outro lado, o significado e a importância destes resultados devem ser considerados à luz das observações feitas quando CMMO indiferenciadas foram transplantadas no tecido nervoso periférico (Dezawa *et al.*, 2001; Moura-Campos *et al.*, 2003; Cuevas *et al.*, 2002, 2004; Pereira Lopes *et al.*, 2006).

Conforme consideramos acima, Dezawa e cols. (2001) reportaram que as CMMO indiferenciadas não foram capazes de dar suporte adequado à regeneração axonal no interior das PT. Além disso, esses autores não referem que tenha havido diferenciação das CMMO em CS, e atribuem a regeneração axonal observada à capacidade que as CMMO

têm de produzir IL-6, uma citocina que poderia atuar como fator neurotrófico (Gimble *et al.*, 1991; Shuto *et al.*, 2001). Estes resultados contrastam fortemente com o observado por Cuevas e cols. (2002, 2004) quando estes injetaram CMMO indiferenciadas no interior do coto distal do nervo ciático de rato imediatamente após secção e reparo por neurorafia. Estes autores mostraram que as CMMO foram induzidas a se diferenciarem em CS e contribuíram para a regeneração axonal e recuperação das funções sensorial e motora dos animais.

Confrontando as condições experimentais de Dezawa e cols. (2001) e Cuevas e cols. (2002), verifica-se que as CMMO indiferenciadas inseridas no interior das PT permaneceram em um ambiente pobre de putativos fatores indutores de diferenciação por tempo relativamente longo, até que substâncias e células derivadas dos cotos ocupassem o interior das PT. Contrariamente, ao serem injetadas diretamente no coto distal do nervo, conforme descrito por Cuevas e cols. (2002), as CMMO foram introduzidas em um cenário rico de potenciais fatores indutores de diferenciação, gerados pela degeneração Walleriana em curso. Estas diferenças nas condições experimentais parecem explicar a discrepância observada entre os resultados desses laboratórios, e evidenciam a importância que o microambiente celular e molecular tem para a diferenciação *in vivo* das CMMO.

Recentemente, obtivemos resultados análogos aos relatados por Cuevas e cols. (2002) ao colocarmos CMMO indiferenciadas em contato direto com o coto proximal de nervos ciático de camundongos (Moura-Campos *et al.*, 2003; Pereira Lopes *et al.*, 2006). Após secção do nervo, o coto proximal foi introduzido no interior de um tubo de polietileno contendo CMMO marcadas com bis-benzamida (Hoeschst 33258), sendo selada extremidade distal do mesmo. Analisando o tecido formado no interior do tubo após diferentes tempos de sobrevida foi possível comprovar a presença de CMMO exibindo

fenótipo imunocitoquímico de CS (S100+). Além disso, grande parte dessas células se localizava ao redor de axônios em regeneração, identificados imunoistoquimicamente através de anticorpo anti-neurofilamento (NF-200).

As diferentes condições experimentais empregadas por Dezawa e cols. (2001), Cuevas e cols. (2002, 2004), Moura-Campos e cols. (2003) e Pereira Lopes e cols. (2006) levantam questões interessantes e enfatizam a necessidade de se conhecer melhor a natureza do microambiente molecular e celular determinante do destino das CMMO. Além disso, é importante notar que, embora a diferenciação das células tronco em geral tem sido tema de diversos trabalhos *in vitro* e *in vivo*, é ainda insuficiente o que se sabe atualmente acerca dos reais agentes indutores do processo de diferenciação. Portanto, para se compreender o desenvolvimento biológico e a diferenciação natural das CMMO, faz-se necessário investigar a diferenciação destas células oferecendo-lhes os fatores que seriam encontrados no microambiente *in vivo*.

Destacamos ainda, que os trabalhos realizados até momento não tiveram como objetivo principal desvendar os mecanismos intrínsecos que levam as CMMO a adquirir o fenótipo e as funções das CS, bem como as técnicas adequadas para controlá-la, que são de fundamental importância para sua utilização em terapias celulares.

Certamente, um dos desafios mais importantes no desenvolvimento da tecnologia para terapia celular reside na compreensão dos fatores e mecanismos envolvidos na diferenciação de células toti, pluri ou multipotentes no tipo celular desejado. Neste contexto, o estudo da diferenciação de CMMO em CS é de especial interesse.

Alguns trabalhos têm mostrado que a secreção das CS possui um efeito de crescimento e de indução de diferenciação em células tronco (An *et al.*, 2003). À luz dessas observações, a presente proposta teve como objetivo investigar o comportamento

das CMMO, mimetizando as condições que estas encontrariam *in vivo* em nervos periféricos, administrando um meio previamente condicionado (MC) por CS para as CMMO em cultura.

Neste estudo, portanto, nós investigamos a possibilidade de o MC onde as CS cresceram, possuir a capacidade de induzir a diferenciação das CMMO em CS, devido aos fatores tróficos presentes no MC, que teriam sido secretados pelas CS. Se as CS secretam fatores tróficos de sobrevivência solúveis, o MC poderia garantir a sobrevivência de CS e promover a diferenciação das CMMO em CS.

A identificação da identidade molecular dos sinais pelos quais o MC direciona a diferenciação de CMMO em CS será de fundamental importância no entendimento dos mecanismos pelos quais as células tronco se diferenciam e como elas respondem aos sinais extracelulares.

I.4 Eletroforese em gel 2DE

A identificação e quantificação sistemática das proteínas é geralmente o objetivo inicial central numa análise proteômica. A tecnologia mais aplicada atualmente é a combinação da eletroforese de duas dimensões em gel de poliacrilamida (2DE) para separação, detecção e quantificação das proteínas, com espectrometria de massa para identificação das proteínas separadas (figura I). Enquanto a técnica de 2DE foi inicialmente introduzida na década de 70 (Klose, 1975; O'Farrel, 1975), a maioria dos métodos que possibilitaram identificar proteínas separadas em 2DE de forma rápida, conclusiva e com sensibilidade foram apenas desenvolvidos nos últimos 10 anos (Aebersold & Goodlett, 2001).

Atualmente, o exame visual dos perfis protéicos em géis 2DE, bem como sua análise diferencial representam importantes ferramentas para detectar grupamentos de proteínas diferentemente expressos e suas funções efetoras ou controladoras de processos biológicos.

A 2DE é um dos métodos disponíveis mais poderosos para separar misturas complexas de proteínas. Ela combina duas técnicas de separação baseadas em gel de poliacrilamida. A primeira separação (primeira dimensão) é a focalização isoeletrica (IEF), na qual as proteínas são separadas em um gradiente de pH até alcançarem a posição estacionária onde a carga total é zero. O pH no qual a proteína tem carga líquida zero é chamado ponto isoeletrico (pI). Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela IEF são então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE), separação esta baseada na massa molecular (MM) das proteínas. As proteínas são então visualizadas diretamente no gel, resultando num perfil bidimensional de pontos (chamados “*spots*”), cada um contendo múltiplas cópias de uma proteína. A imagem do gel é digitalizada e analisada densitometricamente por programas de computador. Diferentes géis representando diferentes perfis podem ser comparados com o objetivo de detectar proteínas diferencialmente expressas.

Vários métodos diferentes de detecção de proteínas separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida podem ser usados. Os métodos mais comuns são os de coloração com coomassie blue (CBB) ou nitrato de prata.

Para análise de imagem, os géis são digitalizados e os arquivos gerados são analisados em programas especializados que detectam e quantificam densitometricamente os *spots* e calculam seus respectivos pI e MM observados. Análise comparativa de diferentes géis é usada para detectar proteínas diferencialmente expressas.

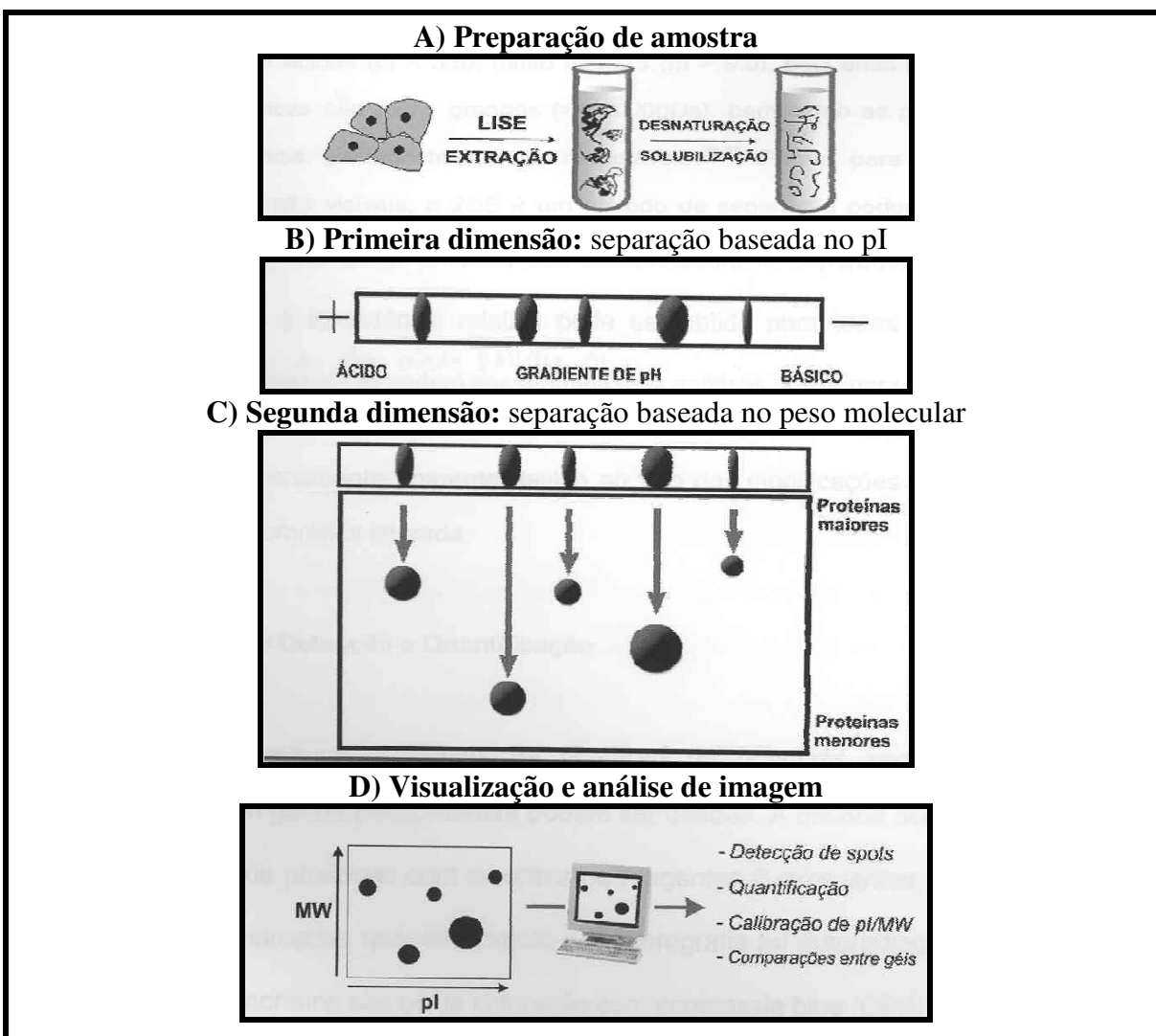


Figura I: Passos do procedimento da 2DE. A) Preparação de amostras: proteínas são primeiramente extraídas das células (ou tecidos) e solubilizadas. B) Separação na primeira dimensão é feita por IEF, onde as proteínas são separadas pelo seu ponto isoelétrico. C) Separação na segunda dimensão é feita por SDS-PAGE, que separa proteínas pela massa molecular aparente. D) As proteínas separadas são então coradas diretamente no gel, resultando num mapa de pontos, *spots*. A quantidade de proteína migrando em cada *spot* é quantificada baseando-se na intensidade de coloração do respectivo *spot*. Geralmente, a imagem do gel é digitalizada e analisada densitometricamente por programas de computador.

I.5 A Proteína S100

A família multigênica conhecida como S100 compreende 19 membros que são diferentemente expressos em um grande número de células (Donato, 1999). As proteínas S100 foram inicialmente caracterizadas como um grupo de proteínas de baixo peso molecular (10-12 KDa) abundantemente encontrada no tecido nervoso (Moore, 1965, 1982). Elas são membros de uma grande família de proteínas ligantes de cálcio (Donato, 1986; Kligman & Hilt, 1988). Alguns membros da família S100 são produzidos e podem ser secretados no espaço extracelular exercendo efeitos tróficos ou tóxicos, dependendo da concentração (Donato, 1999).

A proteína S100 é um dímero formado por duas subunidades, alfa e beta (Isobe & Okuyama, 1981; Isobe et al., 1981). Estudos realizados através de reações imunocitoquímicas mostraram que a S100 é encontrada predominantemente em células gliais do SNC (Matus & Mughal, 1975; Ludwin et al., 1976; Cocchia, 1981) e em células de Schwann no SNP (Cocchia & Michetti, 1981; Stefansson et al., 1982). Ainda, Isobe e cols. demonstraram que a proteína S100 presente nas células gliais são constituídas por uma subunidade alfa e uma beta (S100 α) ou por duas subunidades beta (S100 β) (Isobe et al., 1984).

A proteína S100 β é uma molécula ligante de cálcio intracelular caracteristicamente expressa por células gliais e tem sido utilizada como um marcador para células de Schwann maduras (Holton & Weston, 1982a; Holton & Weston, 1982b; Brockes et al., 1979).

A S100 β está presente no sistema nervoso de ratos em baixas concentrações no nascimento e aumenta rapidamente durante o primeiro mês de vida (Herschman et al., 1971; Stewart & Urban, 1972; Hyden & Ronnback, 1975; Donato, 1976; Haglid et al.,

1977), sugerindo que ela pode estar envolvida no desenvolvimento pós-natal do sistema nervoso. Nas células de Schwann, a S100 β localiza-se nos filamentos intermediários do citoplasma da célula, regulando sua morfologia e a dinâmica de certos constituintes do citoesqueleto.

Muitas funções têm sido atribuídas à S100 β como a participação no desenvolvimento cerebral (Sarnat, 1992; Stagaard-Janass et al., 1991), estimulação da sobrevivência neuronal e crescimento neurítico (Barger et al., 1992; Griffin et al., 1995). Dentre outras funções exercidas pela proteína S100 β destacamos seu papel estimulador da proliferação e maturação glial (Selinfreund et al., 1990; Selinfreund et al., 1991), que parece estar associada às possíveis propriedades tróficas da molécula (Barger et al., 1995; Griffin et al., 1995). Além disso, estudos têm demonstrado que a S100 β é secretada pelas células de Schwann e pode agir como uma citocina (Heizmann et al., 2002), exercendo efeitos parácrinos sobre as células adjacentes, via receptor.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

Investigar os fatores envolvidos na diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea em células do sistema nervoso periféricos.

II.2 Objetivos Específicos

1. Analisar o efeito do meio de cultura condicionado por células de Schwann na proliferação e diferenciação morfológica de CMMO.
2. Investigar se o meio de cultura condicionado por células de Schwann é capaz de induzir a expressão da proteína S100 β em CMMO.
3. Investigar o perfil eletroforético 2D das CMMO cultivadas em meio de cultura condicionado por células de Schwann e sua possível relação com o processo de diferenciação do fenótipo bioquímico das CMMO em células de Schwann.

MATERIAIS E MÉTODOS

III. MATERIAIS E MÉTODOS

III.1 Extração de Células de Schwann

Utilizamos o protocolo de cultura primária de CS descrito por Casella e cols. (1996). Ratos Wistar machos adultos (8-12 semanas) mantidos sob condições constantes de temperatura e umidade, com ciclo claro/escuro regular e acesso livre à ração e água foram anestesiados com pentobarbital sódico 3%, fixados à mesa cirúrgica em decúbito ventral e após incisão oblíqua bilateral na região das coxas, tiveram os nervos ciáticos evidenciados, isolados e retirados. Em seguida estes foram mergulhados em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco) com 10% do antibiótico penicilina-streptomicina (P/S) (Gibco) à temperatura de 36,5°C onde permaneceram por alguns minutos até sua dissecação.

Primeiramente, os nervos ciáticos foram submetidos a extração do perineuro e a cortes de 3mm que passaram a ser chamados de *explantes primários*. Estes foram semeados em placas de cultura e mantidos em meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de P/S (D-10). Nesta fase os explantes foram removidos a cada semana para uma nova placa de cultura, o que levou à eliminação progressiva dos fibroblastos que migravam do tecido para o fundo da placa. Após quatro semanas, esses explantes foram finalmente dissociados enzimaticamente pela adição de uma solução contendo Dispase (Roche) e Colagenase (Worthington), durante 12 horas, gerando uma população de células constituída ainda por fibroblastos e CS.

A segunda fase consistiu no tratamento da cultura para a eliminação definitiva dos fibroblastos. Num primeiro momento, as células foram ressuspensas em 8ml de D-10 e

replaqueadas numa placa de cultura de 100mm por 30 minutos a 37°C. A suspensão foi então removida e replaqueada numa segunda placa de cultura de 10mm por mais 30 minutos. Durante este período os fibroblastos aderem precocemente à placa em relação às células de Schwann. Quando as células de Schwann começaram a aderir à placa (30-45 minutos), a suspensão celular foi novamente removida e replaqueada numa terceira placa de 100mm. Dessa forma, após este plaqueamento seriado, a suspensão celular estava livre dos fibroblastos, gerando uma cultura de células de Schwann purificada, pronta para ser expandida e replicada. Para a proliferação das células foi acrescentado ao meio de cultura D-10 o agente mitogênico forskolina (Sigma) e o extrato pituitário bovino (EPB; Biom. Tech.). Seguindo este protocolo obtivemos ao final culturas de células de Schwann com aproximadamente 98% de pureza, comprovada através da observação microscópica das mesmas.

Após as culturas atingirem confluência por toda a placa (aproximadamente uma semana), as células foram removidas das placas por ação da tripsina (0,25%), centrifugadas, lavadas em DMEM duas vezes e replicadas para novas placas de cultura. A partir desse momento, as células estavam prontas para os seguintes procedimentos: 1. cultura em meio D-10 sem forskolina e EPB para obtenção do meio condicionado (MC; vide item II c); 2. Cultura sob lamínulas em placas de cultura de 24 cavidades para fixação em paraformaldeído (4% PBS) e posterior estudo imunocitoquímico.

III.2 Extração de Células Mesenquimais Derivadas de Medula Óssea

As CMMO foram isoladas segundo o protocolo proposto por Azizi e cols. (1998). Ratos Wistar machos adultos (8-12 semanas) mantidos sob condições constantes de

temperatura e umidade, com ciclo claro/escuro regular e acesso livre à ração e água foram anestesiados com pentobarbital sódico 3%, fixados à mesa cirúrgica em decúbito ventral e após incisão oblíqua bilateral na região das coxas, tiveram os fêmures evidenciados, isolados e retirados. Em seguida, os mesmos foram mergulhados em solução tampão fosfato (PBS; Gibco) com 10% do antibiótico P/S à temperatura de 36,5°C onde permaneceram por alguns minutos até sua dissecação. Brevemente, os fêmures foram limpos do tecido muscular e periósteo através de raspagem com lâmina de bisturi e, após remoção das epífises, a medula óssea foi ejetada do interior da diáfise através de um flushing com uma seringa contendo meio de cultura DMEM. Esta solução de DMEM mais medula óssea, após homogeneização com uma pipeta pasteur, foi submetida a aplicação de solução de ficoll (FICOLL-PAQUETM PLUS; Amersham Biosciences) (3ml para cada 10ml de DMEM). Em seguida, a solução foi centrifugada a 2500rpm por 25 minutos para a separação das células mesenquimais por gradiente de densidade. As células de interesse (CMMO) ficam localizadas exatamente acima da solução de ficoll e são coletadas com o auxílio de uma pipeta pasteur. Estas foram plaqueadas em frascos de cultura contendo meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino, 2% de l-glutamina e 1% do antibiótico P/S (D-10/L-Glu). Após 3 horas do plaqueamento as células não aderidas foram removidas e o meio de cultura foi renovado. Segundo este protocolo, as primeiras células aderidas correspondem a CMMO. A cada 72 horas o meio de cultura foi substituído. Em todos os ensaios envolvendo CMMO foram utilizadas células com idade entre P2 (passagem 2) e P3 (passagem 3).

III.3 Cultura de Células Mesenquimais Derivadas de Medula Óssea (CMMO) em Meio Condicionado (MC)

O meio de cultura D-10 sem forskolina nem EPB, que foi utilizado para nutrir as células de Schwann foi coletado e utilizado como meio condicionado (MC) para a cultura de CMMO.

As CMMO na passagem 2 (P2) foram retiradas de seus frascos de cultura por ação da tripsina e plaqueadas sob lamínulas dentro das cavidades de uma placa de cultura de 24 cavidades. Durante 7, 14 e 21 dias estas células receberam o MC como meio de cultura e foram observadas diariamente com a finalidade de acompanhar o processo de diferenciação. O MC era trocado a cada 48 horas para que, com a renovação do MC, fossem mantidas as condições de cultivo o mais constante possível. Após os períodos de 7, 14 e 21 dias as células foram lavadas em PBS por 3 vezes de 5 minutos cada e fixadas com paraformaldeído (4% PBS) por 10 minutos a 4°C para posterior estudo imunocitoquímico.

III.4 Procedimentos Imunocitoquímicos

Utilizamos uma adaptação do procedimento imunocitoquímico descrito por Kivell e cols (2001). Brevemente, as células foram previamente plaqueadas sob lamínulas em placas de cultura de 24 cavidades, conforme referido acima. Com as células já aderidas à placa, iniciamos a reação removendo o meio de cultura e lavando as células com uma solução PBS (0,1M) (Gibco). As células foram então fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos a 4°C e em seguida lavadas novamente com PBS por 3 vezes durante 10 minutos cada. A seguir, foram incubadas durante 30 minutos a 37°C em solução PBS 0,1M, contendo 0,3% de TRITON e 1% de soro de albumina bovina (BSA) para a permeabilização das células. As células foram lavadas novamente em PBS 0,1M, como

descrito anteriormente, e uma nova incubação de 30 minutos a 37°C foi realizada em solução de PBS 0,1M contendo 5% de soro normal da mesma espécie do anticorpo secundário para bloquear qualquer marcação inespecífica. Uma nova lavagem com PBS 0,1M foi realizada para eliminação de resíduos das outras substâncias e as células foram então incubadas na presença do anticorpo primário por 1 hora a 37°C e a seguir lavadas 4 vezes, por 10 minutos cada, em PBS 0,1M. Ao final destas lavagens, as células foram incubadas na presença do anticorpo secundário conjugado a moléculas fluorescentes por 90 minutos a 4°C e no escuro. Finalmente, as células foram lavadas 3 vezes de 10 minutos cada com PBS 0,1M para interromper a reação. As lamínulas foram removidas das cavidades da placa de cultura e colocadas numa lâmina histológica com uma pequena gota de solução preservadora (DABCO) com as células para baixo e seladas com esmalte incolor. As lâminas foram preservadas no escuro a 4°C até o exame microscópico e documentação fotográfica das mesmas.

III.5 Marcador Imunocitoquímico

Foi utilizado um marcador específico para células de Schwann para verificar se as células obtidas na cultura primária (CS) e nos protocolos de cultura das CMMO em MC são de fato células de Schwann.

O anticorpo para o reconhecimento de CS é o anti-S100 β (proteína ligante de íons cálcio). É um anticorpo policlonal produzidos em coelho (Santa Cruz Biotechnology), que foi reagido com um anticorpo secundário anti-IgG de coelho, produzido em asno e conjugado com molécula fluorescente (FITC – Santa Cruz-Biotechnology).

III.6 Proliferação e Viabilidade Celular

III.6.1 Determinação da viabilidade celular por blue trypan:

A viabilidade isolada de células pode ser determinada usando o teste de Blue Trypan (Sigma T8154) para localizar células não viáveis. Uma amostra de 20 microlitros de solução contendo células é homogeneizada com 80 microlitros de Blue Trypan (0,4%). As células viáveis e não viáveis são colocadas em uma câmara de Neubauer e contadas em microscópio óptico.

III.6.2 Determinação da proliferação celular através da contagem de células em câmara de Neubauer:

Células de Schwann e células tronco mesenquimais foram plaqueadas a uma densidade de 10^5 células por placa de 35mm. O meio de cultura foi renovado a cada 48 horas e a contagem foi realizada diariamente durante 8 dias. O dia do plaqueamento corresponde ao dia 0 da cultura. Para a contagem, primeiramente foi colocada uma lamínula especial que fornece a profundidade correta na câmara de contagem sobre a área demarcada. Aplicamos a solução contendo as células e o Tripan Blue com a ponteira encostada na borda da lamínula, até que preencha toda a área de um dos lados da câmara (figura IV). Deixamos as células sedimentarem por 2 minutos, focalizamos ao microscópio com a objetiva de menor aumento e iniciamos a contagem. Contamos as células dos 4 quadrantes da câmara e dividimos por 4, obtendo-se a média (figura V). Como a suspensão foi inicialmente diluída a 1/5, o número de células contadas é igual à média multiplicada pelo fator de diluição, no caso 5. Ao final, obtivemos o número total de células por ml multiplicando-se o valor por 10.000.

Assim, temos que:

$$\rightarrow \text{Número total de células/ml} = \frac{\text{número total de células}}{\text{número de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$$

Dessa forma, pudemos observar o padrão de crescimento das CMMO e das CS através de gráficos baseados no número de células contadas por dia.

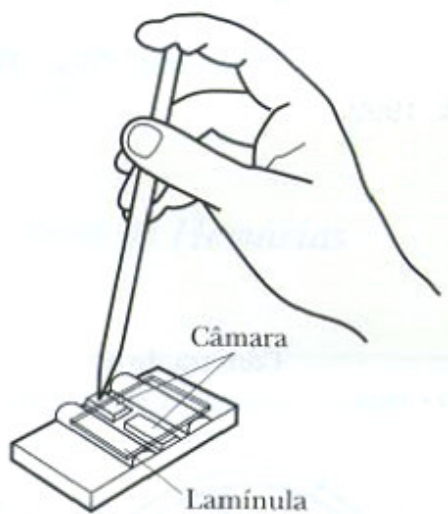


Figura IV: Câmara de Neubauer

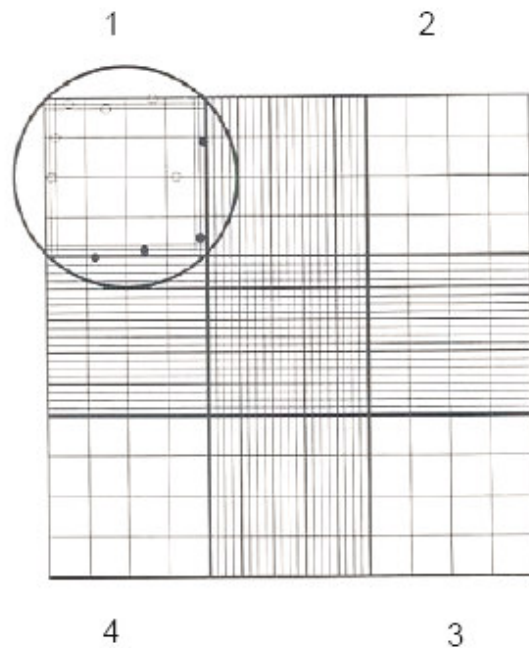


Figura V: Detalhe do quadrante 1. As células representadas por círculos vazios são contadas. As células representadas por círculos cheios não.

III.7 Quantificação de proteínas

Muitos métodos para se estimar a concentração de proteínas estão disponíveis atualmente. A escolha adequada da metodologia depende de cinco fatores principais: a quantidade de proteínas disponível no ensaio, a concentração das proteínas, a especificidade do ensaio, a presença de componentes químicos que podem interferir no ensaio e a facilidade e confiabilidade da execução do ensaio.

Utilizamos o método de dosagem de proteínas através do Coomassie Blue (Bradford, 1976). Esse ensaio baseia-se na observação de que a absorbância máxima de uma solução ácida de Coomassie Blue G-250 varia de 465nm a 595nm quando ocorre a ligação com a proteína. Ambas as interações hidrofóbicas e iônicas estabilizam a forma aniônica do corante, causando uma mudança visível de cor.

III.8 Eletroforese 2DE

III.8.1 Eletroforese 2DE das células:

Foram utilizadas para este procedimento 3 placas de cultura de 100mm com células em confluência (aproximadamente 15×10^6 células). As células foram lavadas duas vezes em PBS 0,1M e posteriormente lisadas com tampão composto por 0,5g uréia, 0,182g tiouréia, 0,048g CHAPS, 0,013g DTT 70mM e 12µl de inibidor de proteases. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 14000rpm por 30 minutos e o sobrenadante contendo as proteínas foi coletado. Em seguida a amostra foi submetida à focalização isoeletrica. A focalização isoeletrica (primeira dimensão) foi feita utilizando tiras de poliacrilamida desidratadas de 18 cm com gradiente imobilizado de faixas de pH (IPG - *Immobilized pH Gradient*) – 3 a 10 não-linear. As amostras foram aplicadas às tiras de poliacrilamida desidratadas, que foram rehidratadas por 12 horas e então submetidas à corrida eletroforética seguindo os seguintes passos: 500V por 1 hora, 1000V por uma hora e 8000V até que se acumulasse 55KVh por strip. O tampão utilizado para a corrida continha 0,167g uréia 8M, 14mg de CHAPS 4%, 3,73g de DTT 70mM, 7 µl de anfolito 2% e BPB. Terminada a corrida, a strip foi lavada com água destilada e passou por um processo de redução das pontes dissulfeto e alquilação destas. Finalmente, a strip foi posicionada sobre a superfície do gel contendo 12,5% de poliacrilamida e selada com agarose 0,5%

(w/v) para realização da corrida eletroforética onde as proteínas foram separadas de acordo com sua massa molecular. A corrida eletroforética foi feita utilizando o sistema SE-600 (Amersham Biosciences) com refrigeração interna, mantendo a temperatura em 20° C e o tampão de corrida continha 14,4g de glicina, 3,03g de Trisma e 1g de SDS 10% em 1 litro de solução. A voltagem foi inicialmente fixada em 60V durante uma hora para migração das proteínas da strip para o gel e posteriormente a corrente foi fixada em 30mA durante aproximadamente 4 horas para migração das proteínas pelo gel segundo sua massa molecular.

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente lavado em água destilada e realizou-se o procedimento de coloração por nitrato de prata para visualização das proteínas. Inicialmente o gel ficou imerso em solução fixadora contendo metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído da noite para o dia, em seguida foi lavado por 20 minutos 3 vezes em etanol 50%, seguido de um banho em tiosulfato de sódio e lavado novamente em água MilliQ. Finalmente foi corado com uma solução contendo 0,3g de prata em 150ml de água mais 112,5µl de formaldeído por 20 minutos. Os géis foram novamente lavados em água MilliQ, revelados com 200ml de solução reveladora contendo 12g Na₂CO₃, 8ml de tiosulfato de sódio e 100µl de formaldeído. A revelação foi interrompida com ácido acético 5% e o gel foi mantido em água para posterior escaneação a 300dpi (tons de cinza) com scanner específico (SharpScanner JX) para aquisição de imagem por transmitância. As imagens obtidas foram armazenadas em formato TIFF (8 bits) para análise posterior.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Culturas purificadas de células de Schwann e células mesenquimais de medula óssea

Através das metodologias empregadas obtivemos culturas de células de Schwann e de células tronco mesenquimais praticamente livres de outros tipos celulares, semelhantes às descritas na literatura (Casella et al., 1996; Azizi et al., 1998).

Após os procedimentos de purificação, as CS ficavam aderidas ao fundo da placa de cultura e apresentavam o formato fusiforme bipolar característico (Figura 1). Estas culturas proliferaram e quando atingiram a confluência, após 6 a 8 dias, as células se encontravam organizadas paralelamente umas às outras formando monocamada, sendo possível, no entanto, delimitar o contorno de cada célula (Figura 2). Por sua vez, as CMMO também ficaram aderidas ao fundo da placa e exibiam morfologia poligonal característica (Figura 3). Estas culturas proliferaram e ao atingirem a confluência, após 16 a 18, as células encontravam-se extremamente justapostas, sendo difícil sua delimitação individual, mas formando monocamada.

IV.2 Proliferação e viabilidade das culturas de células

IV.2.1 Proliferação e viabilidade da cultura de células de Schwann

Os procedimentos para avaliação de proliferação celular durante 9 dias de cultivo mostraram que as culturas de CS tiveram acentuado crescimento até o 7º dia, quando o número total de células atingiu o valor de $7,25 \pm 0,42 \times 10^5$ por placa de 100 mm de diâmetro. No período compreendido entre o 7º e o 9º dia esse valor não sofre alterações significativas, conforme mostra a figura 4 (Anexo 1). O tratamento das culturas com Tripan

Blue mostrou que após 24 horas do plaqueamento o número de células não viáveis ($0,41 \pm 0,14 \times 10^5$) correspondeu a 28% do número total de células. Embora número absoluto de células não viáveis tenha aumentado no dias subsequentes, seu valor percentual relativo ao número total de células diminuiu, atingindo o valor de 14% no 6º dia cultura. Após esse período, à medida que a cultura alcançava a confluência, houve uma ligeira tendência de aumento do número de células não viáveis, atingindo o valor de 18% no 9º dia de cultura (Figura 4; Anexo 1).

IV.2.2 Proliferação e viabilidade da cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea

A avaliação de proliferação celular das CMMO durante 9 dias de cultivo mostrou que após 24 horas do plaqueamento houve pequeno aumento do número total de células na cultura ($1,08 \pm 0,28 \times 10^5$). Contudo, 39% destas corresponderam a células não viáveis (Figura 5). No decorrer das subsequentes 24 horas houve um notável aumento do número total de células ($1,67 \pm 0,28 \times 10^5/\text{ml}$). Porém, a quantidade de células não viáveis continuou relativamente alta ($0,58 \pm 0,14 \times 10^5/\text{ml}$), correspondendo a 35% do número total. Após esse período, não houve variação no número total de células até o 6º dia de cultura, bem como do número de células não viáveis. Nos dias subsequentes houve aumento do número total de células, atingindo o valor de $2,83 \pm 0,14 \times 10^5/\text{ml}$ no 9º dia de cultura. Este aumento foi acompanhado por um aumento proporcional de células não viáveis, de tal forma que o percentual destas com relação ao número total de células se manteve ao redor de 39% e correspondeu no 9º dia a $1,08 \pm 0,14 \times 10^5/\text{ml}$ (Figura 5; Anexo 1).

IV.2.3 Proliferação e viabilidade da cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas em meio condicionado

A avaliação da proliferação celular das CMMO cultivadas durante 9 dias em Meio Condicionado por células de Schwann mostrou um progressivo aumento do número de células total em função do tempo, indicando proliferação de células (Figura 6). Contudo, o número de células inviáveis analisadas por meio de coloração com Tripán Blue manteve-se relativamente constante durante todo o período experimental variando de 21% a 27% do número total de células (Anexo 1). Desta forma, as células viáveis apresentaram um considerável crescimento ocorrido de forma relativamente linear do primeiro ao último dia do estudo proliferativo. No 9º dia de cultura as células viáveis atingiram o valor de $3,45 \pm 0,26 \times 10^5/\text{ml}$, o que corresponde a aproximadamente três vezes o número de células inicialmente semeado. As células não viáveis apresentaram um discreto crescimento até o 6º dia de cultura, chegando ao número de $1,08 \pm 0,14 \times 10^5/\text{ml}$, que correspondeu a 27% do número total de células. A partir deste momento até 9º dia de cultivo, houve uma tendência à estabilização do número de células não viáveis na cultura.

IV.3 Imunocitoquímica da proteína S100β

IV.3.1 Imunocitoquímica da proteína S100β em células de Schwann cultivadas em meio de cultura D-10

As culturas primárias de células de Schwann obtidas a partir do nervo ciático de ratos adultos mostraram-se reativas à proteína S100β quando submetidas ao procedimento imunocitoquímico descrito.

Nota-se a imunorreatividade da proteína S100 β em todo o compartimento citoplasmático da célula, inclusive em seus prolongamentos (Figura 7). Foi realizado o teste do branco, onde o anticorpo primário não foi aplicado, para validar as marcações obtidas (dados não mostrados).

IV.3.2 Imunocitoquímica da proteína S100 β em células tronco mesenquimais cultivadas em meio de cultura D-10

As culturas de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, quando cultivadas em meio de cultura igual ao das células de Schwann, apresentaram uma baixa imunorreatividade à proteína S100 β . Esta fraca marcação pode ser observada em apenas algumas células, distribuída pelo compartimento citoplasmático. Conforme pudemos observar, em alguns casos, existe uma grande dificuldade até mesmo em se estabelecer os limites do corpo celular (Figura 8).

IV.3.3 Imunocitoquímica da proteína S100 β em células tronco mesenquimais cultivadas em MC por 7 dias

As culturas de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, quando cultivadas por 7 dias em meio condicionado por células de Schwann, apresentaram ligeiras alterações morfológicas e fenotípicas quando comparadas com as culturas cultivadas em meio D-10.

Observou-se que a imunorreatividade das células à proteína S100 β aumentou com relação às culturas em meio D-10. Além de mais intensa, a marcação mostrou-se não restrita ao compartimento citoplasmático, mas também presente no núcleo das células.

Ainda, com o aumento da intensidade da marcação, foi possível visualizar que a imunorreatividade se apresenta de forma granulosa pela célula (Figura 9).

Alterações morfológicas também foram identificadas nas culturas de células mesenquimais cultivadas em meio condicionado por 7 dias. É possível notar a presença de algumas células com formato bipolar característico de células de Schwann, indicando alterações morfológicas possivelmente relacionadas a um princípio de diferenciação celular (Figura 9 D e F).

IV.3.4 Imunocitoquímica da proteína S100 β em células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado por 14 dias

As culturas de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, quando cultivadas por 14 dias em meio condicionado por células de Schwann, apresentaram alterações mais expressivas quando comparadas com as culturas cultivadas em meio D-10 e em meio condicionado por 7 dias.

Observou-se um princípio de migração da imunorreatividade da S100 β do citoplasma para o compartimento nuclear das células, além de uma maior intensidade dessa marcação, com relação ao observado nas culturas cultivadas durante 7 dias em MC. Ainda é possível observar a marcação no compartimento citoplasmático, porém com uma intensidade menor e menos ampla. Já no núcleo, nota-se uma forte imunorreatividade (Figura 10 A-D).

Outrossim, alterações morfológicas das células se fazem novamente presente e, agora, mais frequentes. É possível localizar diversas células apresentando um formato

bipolar característico de células de Schwann (Figura 10 C, D e F), concomitantemente com células com morfologia tipicamente mesenquimal (Figura 10 E).

IV.3.5 Imunocitoquímica da proteína S100 β em células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado por 21 dias

As culturas de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, quando cultivadas por 21 dias em meio condicionado por células de Schwann, apresentaram alterações mais relevantes quando comparadas com as culturas cultivadas em meio D-10, em meio condicionado por 7 dias e em meio condicionado por 14 dias.

Observou-se nesta situação, que a imunorreatividade da proteína S100 β estava quase totalmente restrita ao compartimento nuclear, porém ausente no interior dos nucléolos. Os nucléolos tornaram-se evidentes por não apresentarem a imunorreatividade à S100 β , e estavam presentes de dois a três por célula. Desta forma, a observação e identificação da morfologia das células com marcação nuclear tornou-se menos precisa (Figura 11 A e D). No entanto, observou-se também a presença de células com formato bipolar característico de células de Schwann, com a imunorreatividade tipicamente distribuída por toda a célula (Figura 11 C). Em contraste de fase também foi possível observar as duas morfologias celulares diferentes (Figura 11 E e F).

IV.4 **Quantificação de proteínas**

IV.4.1 Quantificação de proteínas do meio de cultura das células de Schwann (D-10) e do meio condicionado

Utilizamos o método de dosagem de proteínas através do Coomassie Blue. De acordo com a leitura das absorbâncias no equipamento Multiskan EX (Labsystems), o MC apresentou um valor correspondente a 50% de proteínas a mais do que o meio de cultura D-10, o que nos indica que o MC deve ter uma constituição significativamente diferente do meio de cultura D-10. O meio de cultura D-10 apresentou uma concentração protéica de 2,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, enquanto o MC apresentou uma concentração de 3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

IV.4.2 Quantificação das proteínas das células de Schwann, das células tronco mesenquimais e das células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado

Utilizamos o método de dosagem de proteínas através do Coomassie Blue. De acordo com a leitura das absorbâncias no equipamento Multiskan EX (Labsystems), as células de Schwann apresentaram uma concentração de proteínas de 3,38 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. O mesmo procedimento foi realizado para as células tronco mesenquimais de medula óssea (CMMO), que apresentaram uma concentração de 8,95 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Já as CMMO cultivadas durante 21 dias em MC apresentaram uma concentração de proteínas de 2,61 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A quantificação das proteínas presente em cada amostra foi utilizada na realização do SDS-PAGE para o procedimento conhecido como normalização. A normalização foi realizada através de uma análise da densidade óptica das bandas que verificou se foi aplicada a mesma quantidade de proteínas para as diferentes amostras. Desta forma, confirmamos que foi aplicada a mesma quantidade de proteínas para a realização da eletroforese, validando os perfis obtidos.

IV.5 Eletroforese 2DE

Os perfis 2DE das células foram obtidos através da aplicação de 100µg de proteínas num gel de poliacrilamida submetido a uma corrida eletroforética conforme previamente descrito. Os géis foram corados com nitrato de prata para a visualização dos *spots*, que representam as proteínas dispersas pelo gel conforme seu peso molecular e focalização isoeletrica. Após cuidadosa análise dos perfis 2DE das células de Schwann, das células tronco mesenquimais e das células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado, foram selecionados grupamentos de *spots* comuns a dois ou três dos perfis obtidos. Foram selecionados grupos de *spots* que estavam presentes apenas em um dos tipos de células, grupos comuns a dois perfis proteômicos e alguns grupos presentes nos três perfis proteômicos.

A análise visual dos perfis das três amostras sugere que há uma maior semelhança com relação à expressão protéica entre as células de Schwann e as células tronco mesenquimais cultivadas em meio de cultura normal. O padrão de distribuição dos *spots* nos géis correspondentes às células de Schwann e às células tronco mesenquimais está equivalente, como mostram os conjuntos representados de 2 a 6 (Figura 12 e 13), enquanto o padrão de distribuição dos *spots* no gel correspondente às células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado possui apenas o conjunto 1 em comum com as células de Schwann e o conjunto 6 em comum com as células de Schwann e com as células tronco mesenquimais cultivadas em meio de cultura normal (Figuras 12 a 14).

FIGURAS

V. FIGURAS

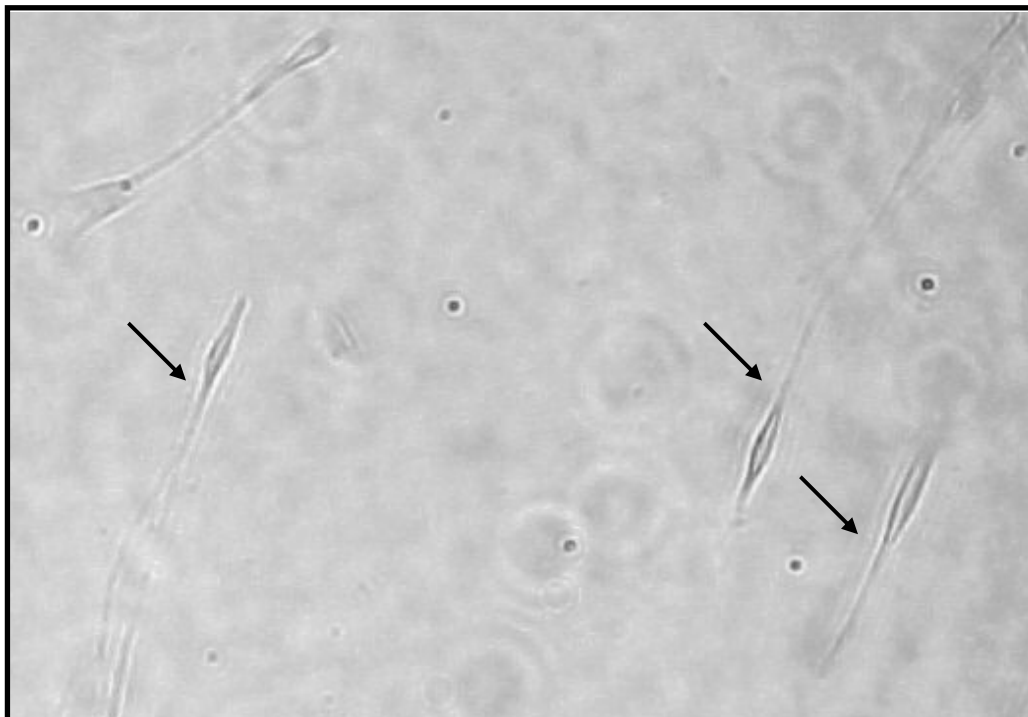


Figura 1. Células de Scwhann após 2 dias em cultura primária. Notar a morfologia alongada e bipolar característica de células de Schwann (setas). Contraste de fase. Aumento 40X.

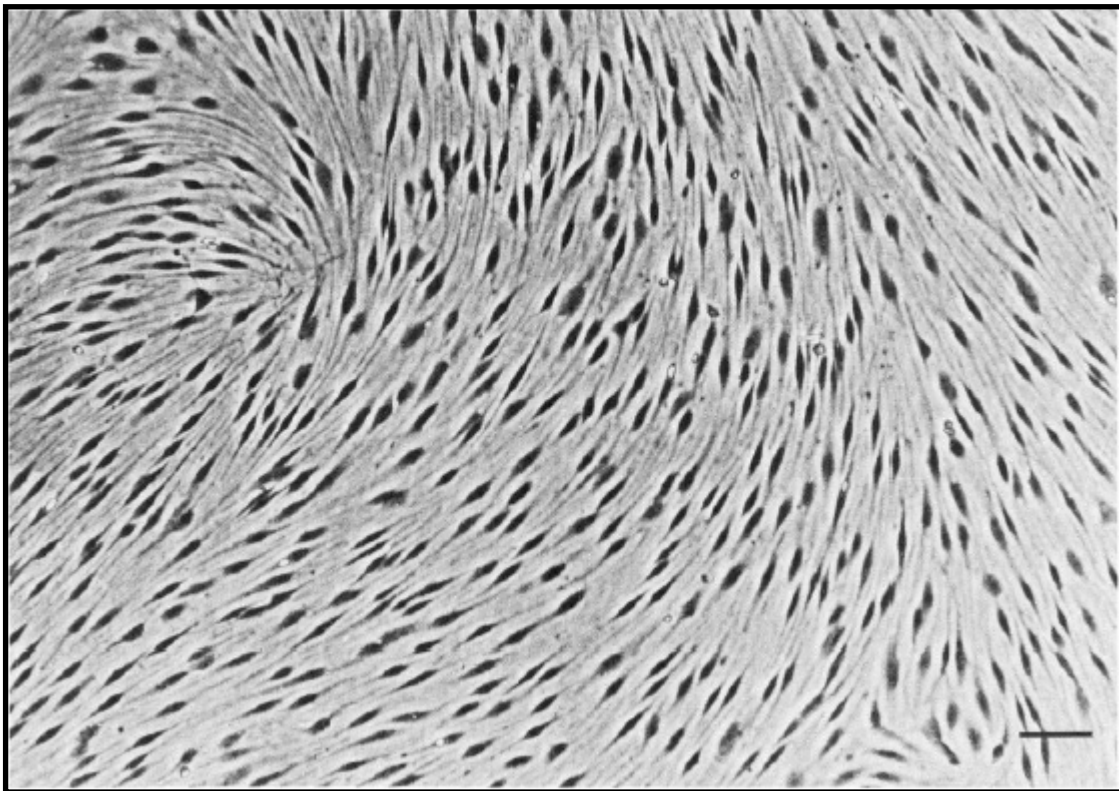


Figura 2. Células de Schwann 8 dias após serem semeadas em placas de cultura de 100 mm e nutridas com meio D-10/mitógeno. Contraste de fase. Aumento 20X.

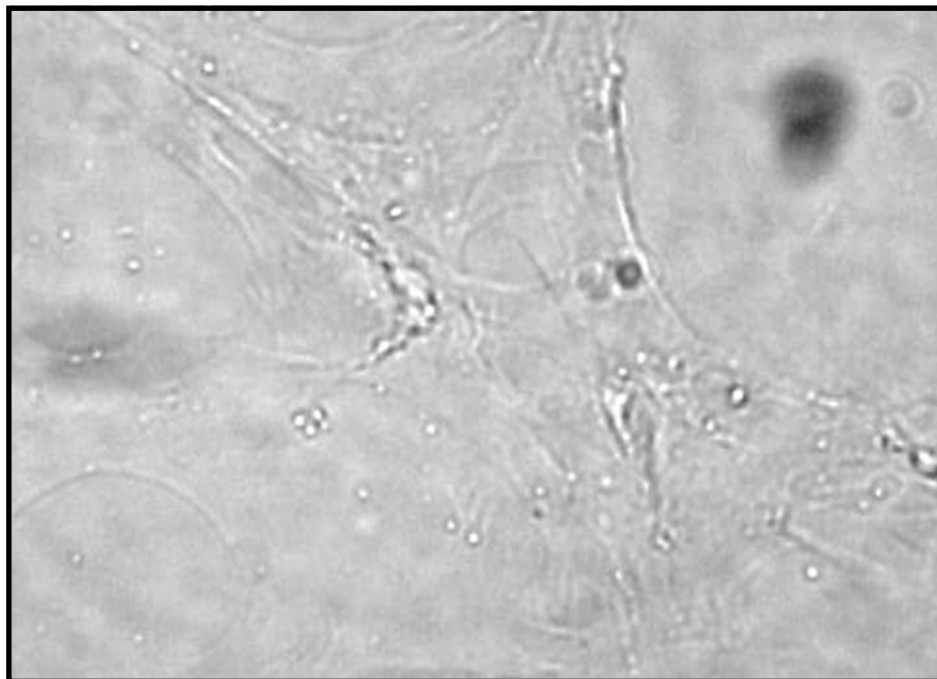


Figura 3. Célula mesenquimal de medula óssea após 3 dias de cultura em meio D-10. Notar a morfologia poligonal característica destas células. Contraste de fase. Aumento 20X.

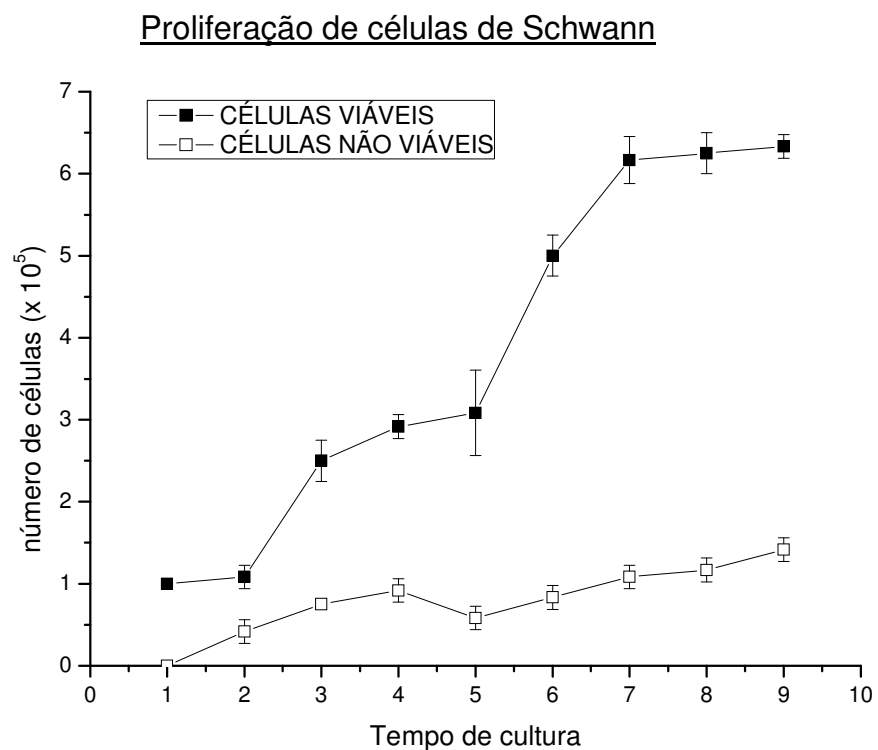


Figura 4. Gráfico representando a proliferação de células de Schwann em meio D-10/mitógeno durante 9 dias de cultivo. Notar o grande aumento do número de células viáveis após o 2º dia de cultivo. Notar também que, embora o número de células não viáveis tenha aumentado durante o período de cultivo, este foi relativamente baixo se considerado o número de células viáveis.

Proliferação de células tronco mesenquimais

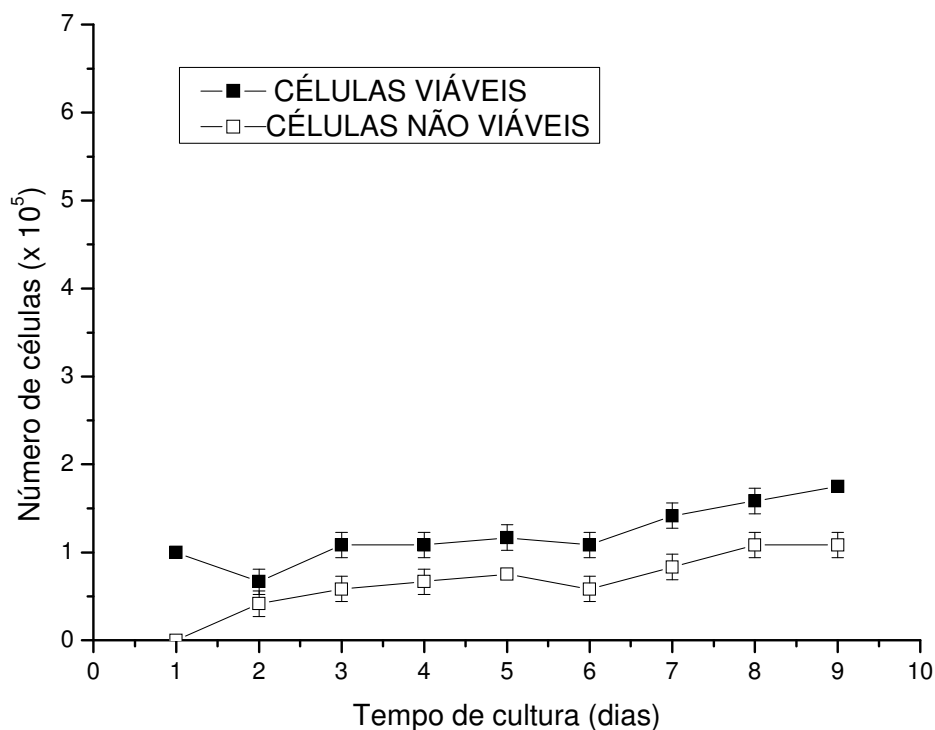


Figura 5. Gráfico representando a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura D-10. Notar que o número de células se manteve estável até o 6º dia de cultura, seguido de um discreto aumento nos dias subsequentes. Notar também que esse número foi relativamente alto se considerado o número de células viáveis ao longo do período de cultura.

Proliferação de células tronco mesenquimais cultivadas em Meio Condicionado

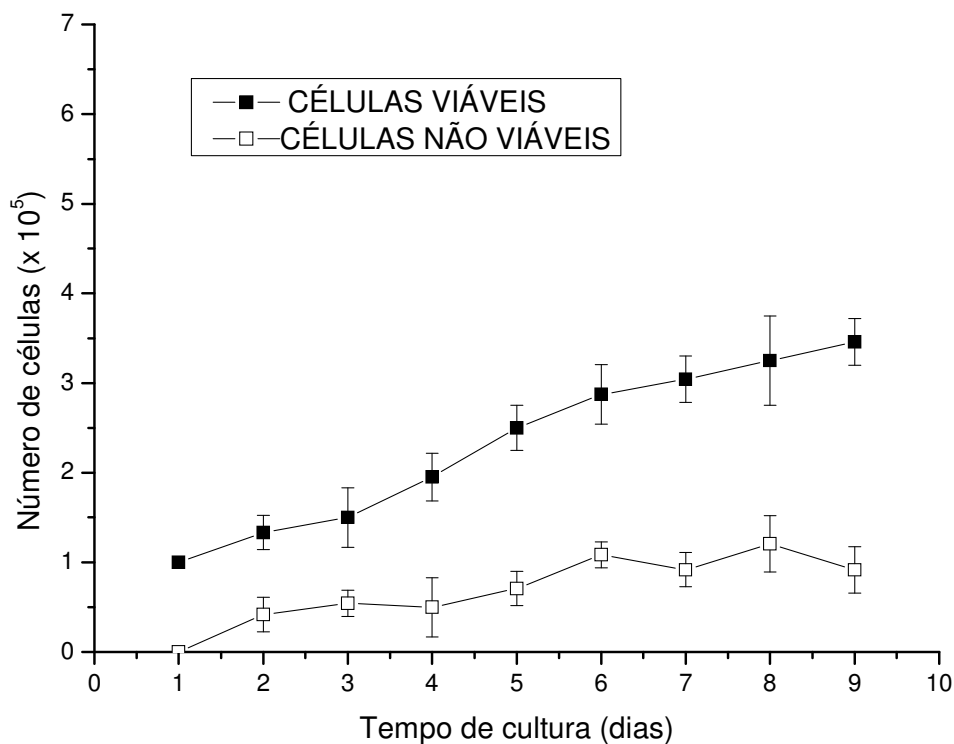


Figura 6. Gráfico representando a proliferação de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio condicionado por células de Schwann. Notar que houve um gradativo e expressivo aumento do número de células viáveis em função do tempo. Notar também que o número de células não viáveis apresentou um ligeiro aumento nos primeiros dias de cultivo, estabilizando-se porém a partir do 6º dia.

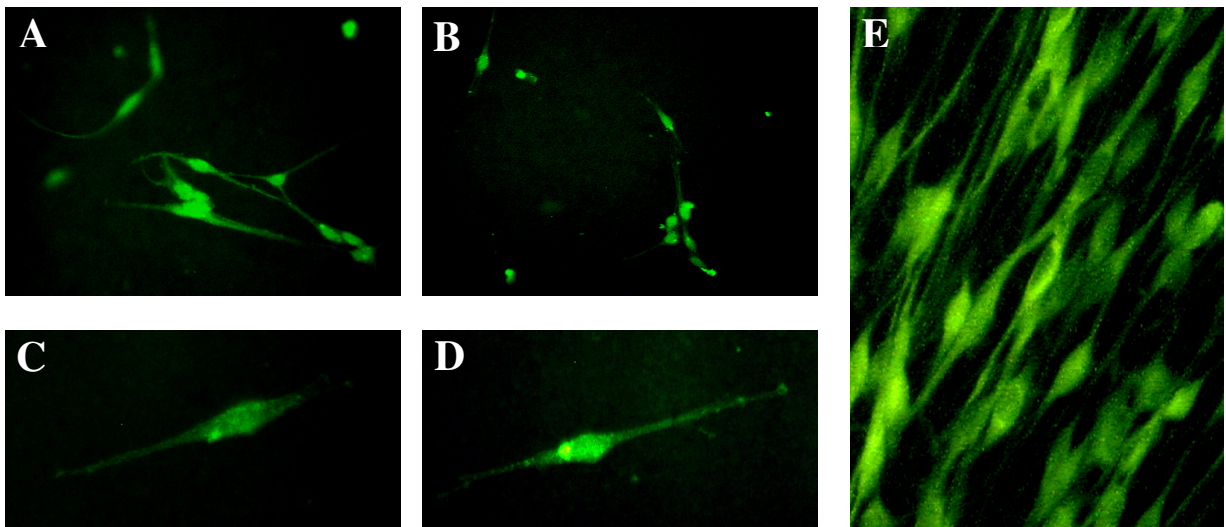


Figura 7. Células de Schwann em P2 imunorreativas para proteína S100 β evidenciada pelo método de imunofluorescência indireta com o FITC. Aumento de 20X (A, B e E) e 40X (C e D).

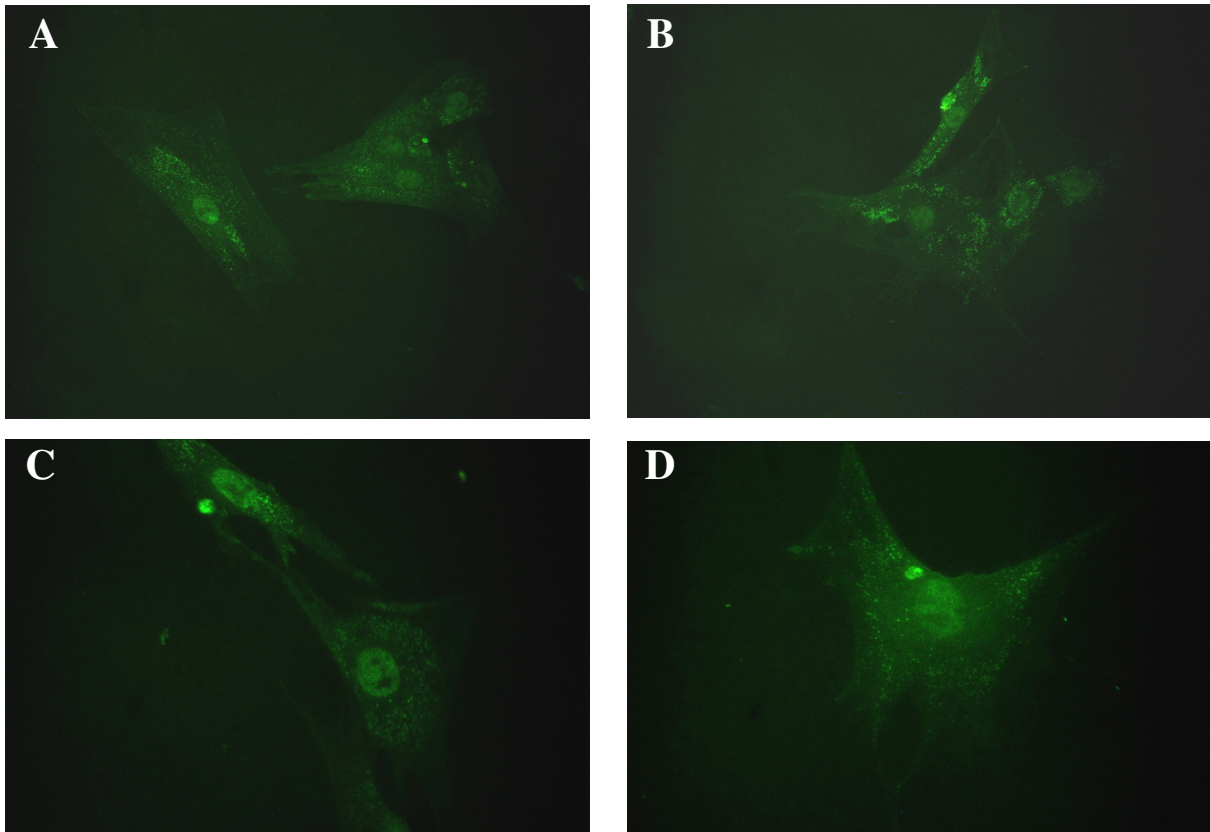


Figura 8. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos em P2 cultivadas durante 3 dias em meio de cultura DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 2% de L-glutamina. As células mesenquimais foram marcadas pela imunorreatividade da proteína S100 β . Utilizou-se o método da imunofluorescência indireta com o FITC. Observa-se uma fraca marcação por todo o compartimento celular. Aumento de 20X (A, B, C e D).

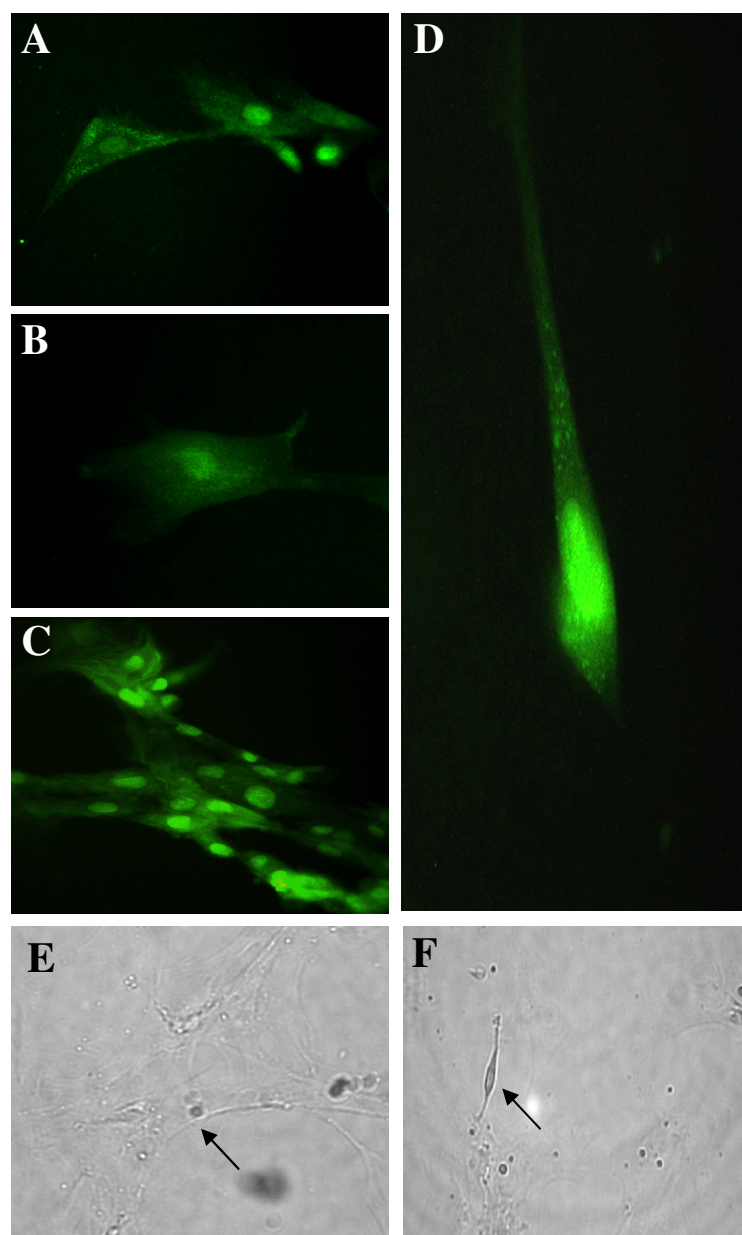


Figura 9. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos em P2 cultivadas durante 7 dias em meio condicionado por células de Schwann. As células mesenquimais foram marcadas pela imunorreatividade da proteína S100 β . Utilizou-se o método da imunofluorescência indireta com FITC. Em D, observamos uma célula com formato bipolar característico das células de Schwann. Em E e F observamos as células mesenquimais em contraste de fase. Pode-se notar a ocorrência de células tanto com morfologia poligonal típica das células mesenquimais (seta-E), quanto células com morfologia bipolar característica de células de Schwann (seta-F). Aumento de 20X (A, B, C, E e F) e 40X (D).

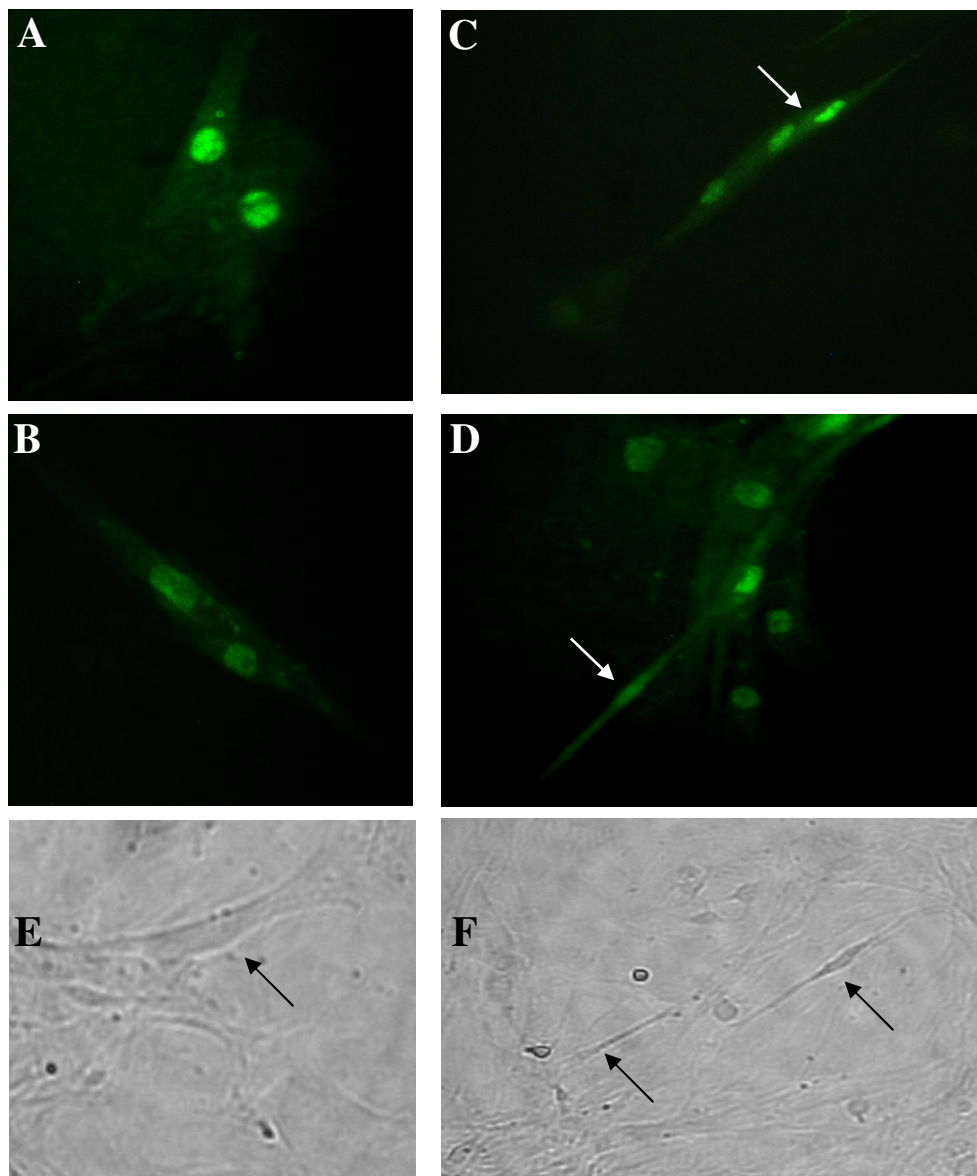


Figura 10. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos em P2 cultivadas durante 14 dias em meio condicionado por células de Schwann. As células mesenquimais foram marcadas pela imunorreatividade da proteína S100 β . Utilizou-se o método da imunofluorescência indireta com FITC. Nota-se em C e D que algumas células (setas) apresentam características morfológicas semelhantes às células de Schwann com formato bipolar característico. Em E e F observamos as células mesenquimais em contraste de fase. Pode-se notar a ocorrência de células tanto com morfologia poligonal típica das células mesenquimais (seta-E), quanto células com morfologia bipolar característica de células de Schwann (setas-F). Aumento de 20X.

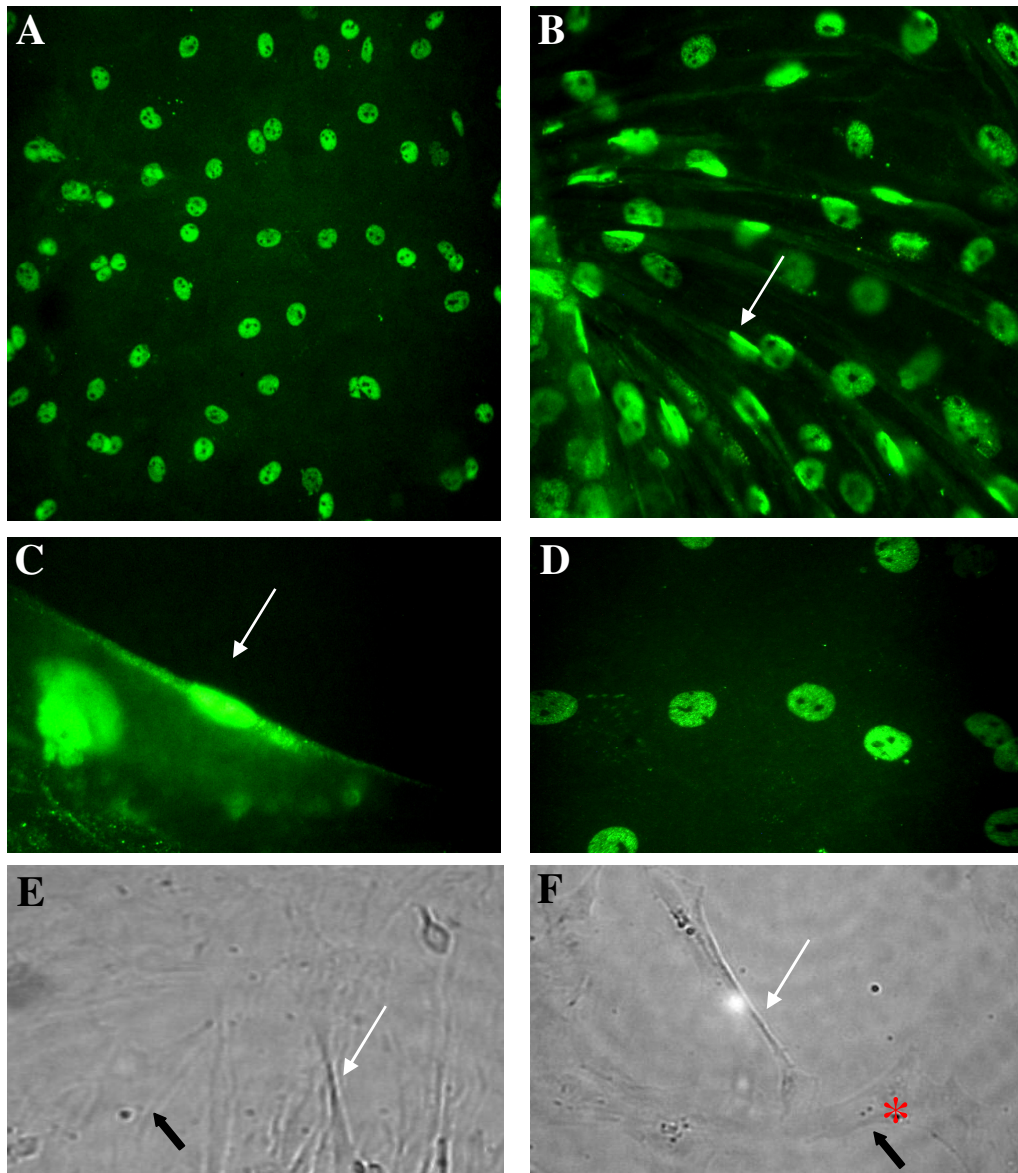


Figura 11. Células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea em P2 cultivadas durante 21 dias em meio condicionado por células de Schwann. As células mesenquimais foram marcadas pela imunorreatividade da proteína S100 β . Utilizou-se o método da imunofluorescência indireta com FITC. Em A e D podemos observar uma internalização da imunorreatividade no compartimento nuclear. Nota-se em B e C que algumas células (setas) apresentam características morfológicas semelhantes às células de Schwann com formato bipolar. Em E e F observamos as células mesenquimais em contraste de fase. Pode-se notar a ocorrência de células tanto com morfologia poligonal típica das células mesenquimais (setas pretas), quanto células com morfologia bipolar de células de Schwann (setas brancas). Ainda, o detalhe em F evidencia o compartimento nuclear com dois nucléolos aparentes. Aumento de 10X (A), 20X (B, E e F) e 40X (C e D).

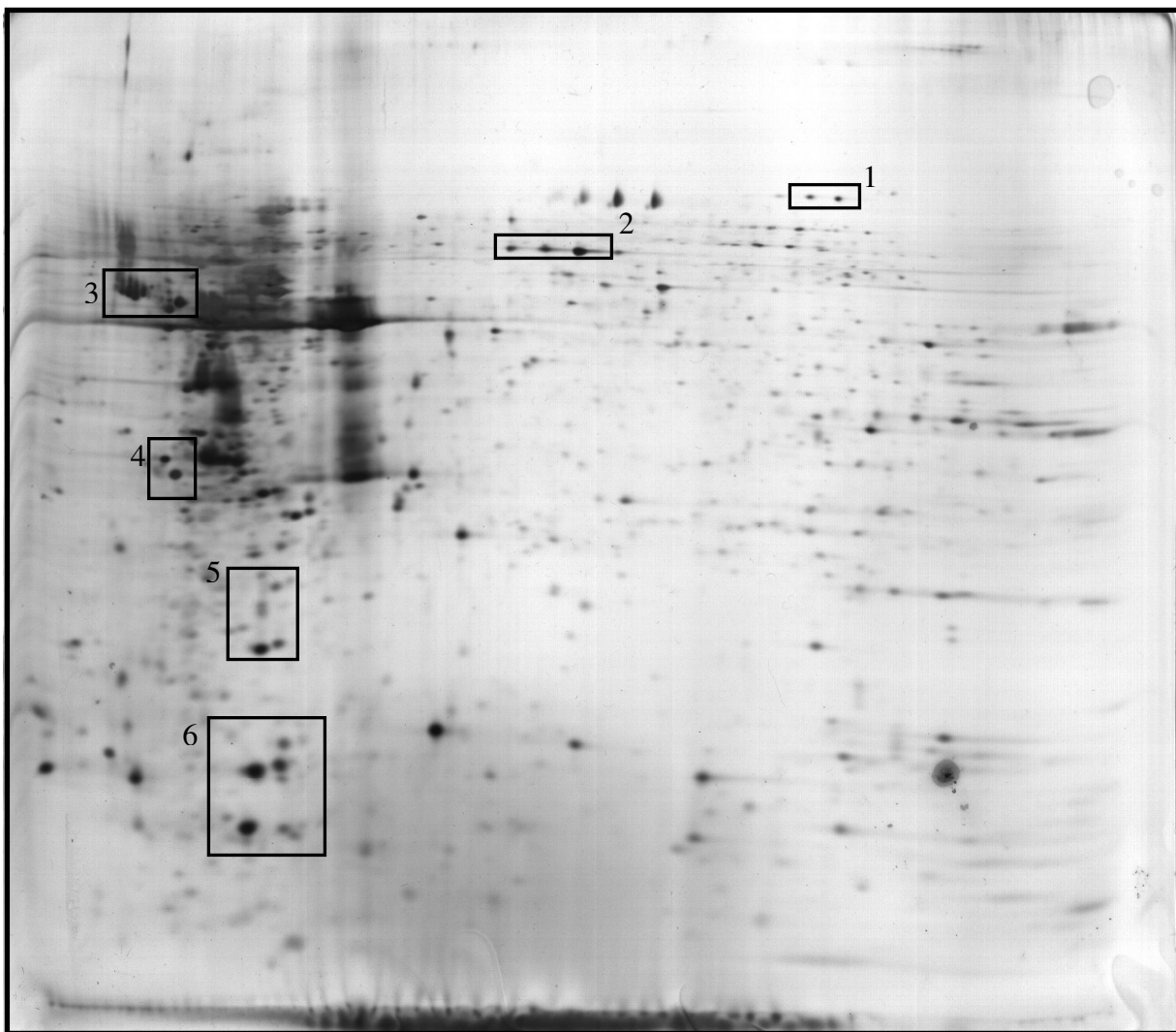


Figura 12. Perfil proteômico 2DE de lisado de células de Schwann cultivadas em meio de cultura D-10. A extração protéica foi feita com o auxílio de um sonicador e um tampão de lise, e a separação das proteínas foi realizada através de focalização isoeletrica com strip não linear pH 3-10 e subsequente SDS-PAGE numa matrix de 12,5% seguida por coloração com prata para visualização dos *spots*.

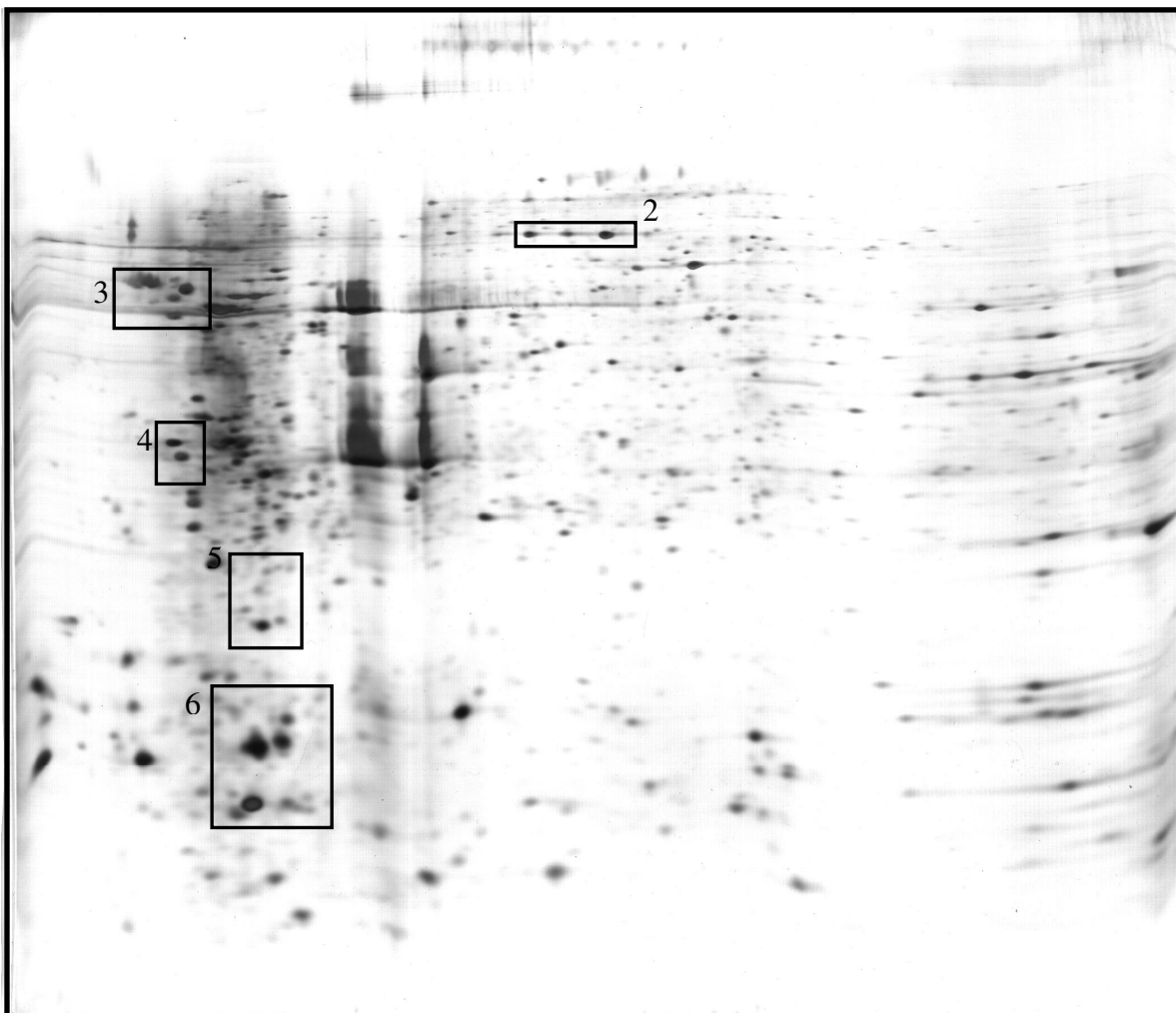


Figura 13. Perfil proteômico 2DE de lisado de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura D-10. A extração protéica foi feita com o auxílio de um sonicador e um tampão de lise, e a separação das proteínas foi realizada através de focalização isoeletrica com strip não linear pH 3-10 e subsequente SDS-PAGE numa matrix de 12,5% seguida por coloração com prata para visualização dos *spots*.

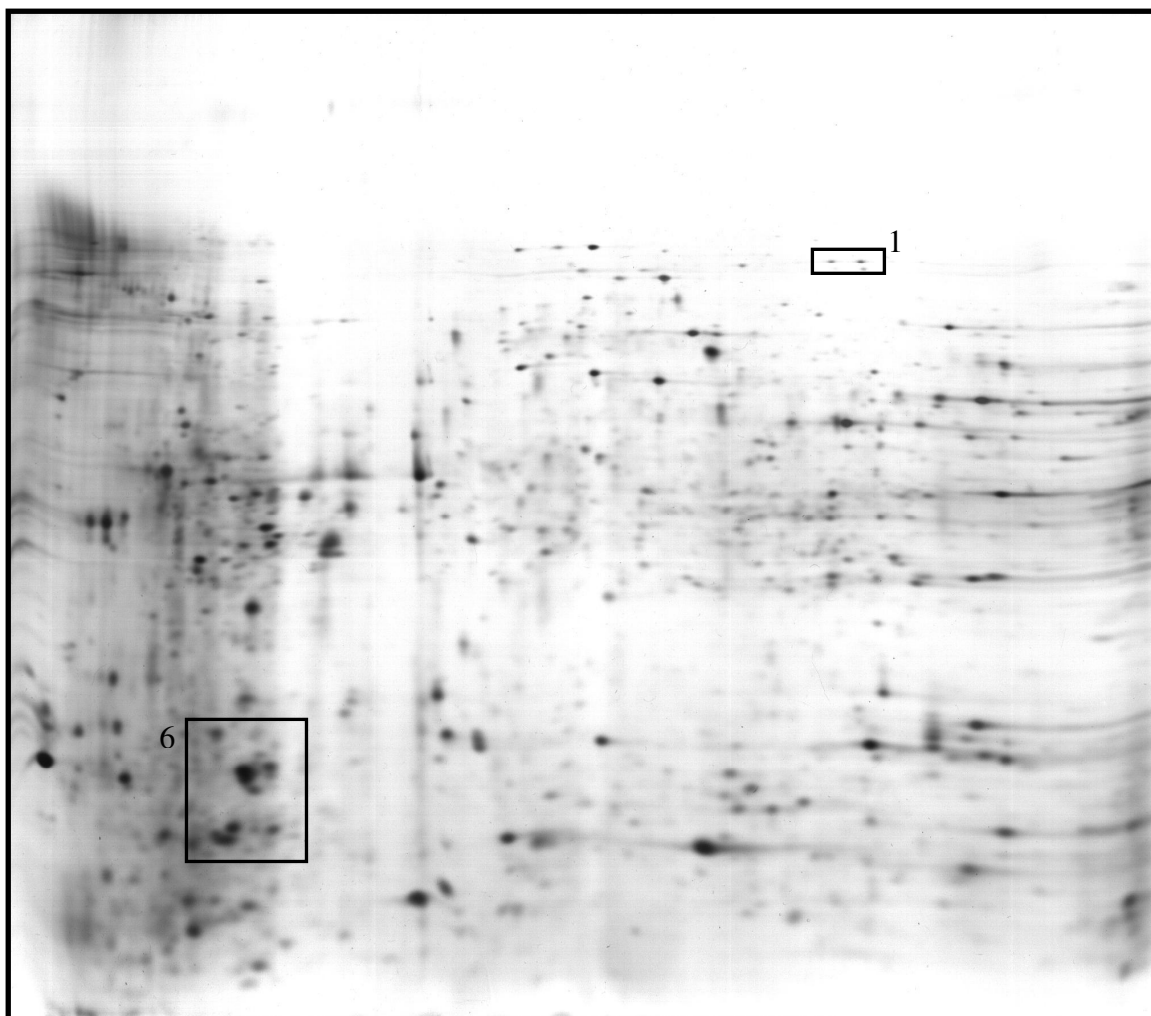


Figura 14. Perfil proteômico 2DE de lisado de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura condicionado por células de Schwann. A extração protéica foi feita com o auxílio de um sonicador e um tampão de lise, e a separação das proteínas foi realizada através de focalização isoeletrica com strip não linear pH 3-10 e subsequente SDS-PAGE numa matrix de 12,5% seguida por coloração com prata para visualização dos *spots*.

DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

Nos últimos anos tem sido amplamente considerado que as células tronco mesenquimais (CMMO) possuem potencial de se diferenciarem em diversas linhagens celulares. As células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CMMO) são vistas como uma fonte muito promissora de células tronco pela sua acessibilidade e pelo seu potencial de proliferação e diferenciação. Compreender como o microambiente do meio em que se encontram, *in vitro* e *in vivo*, promove sua diferenciação em tipos celulares específicos é um grande desafio no momento. Além disso, não obstante seu fácil isolamento, elas são obtidas em baixas quantidades e faz-se necessário sua expansão *in vitro*, através de suplementações adequadas do meio de cultura (Stute et al., 2004; Fehrer and Lepperdinger, 2005).

Nossos experimentos mostraram uma clara interferência da composição do meio de cultura sobre no padrão de proliferação das células de Schwann (CS) e das CMMO, especialmente quando estas últimas foram cultivadas em meio condicionado pelas CS.

Progressos consideráveis foram obtidos com o desenvolvimento de metodologias para o isolamento de CS a partir de fragmentos de nervos e para sua expansão *in vitro* (Askanas et al., 1980; Levi and Bunge, 1994; Morrissey et al., 1991; Rutkowski et al., 1992). Particularmente, a adição de mitógenos ao meio de cultura, tais como a forskolina que estimula a produção de AMP cíclico, promove a rápida expansão das CS. Este efeito foi observado em nossos experimentos de proliferação, nos quais pudemos verificar que as culturas atingiram a confluência no 7º dia de cultivo.

No entanto, o mesmo não foi observado nas culturas de CMMO. Houve um ligeiro crescimento do número de células em função do tempo, porém acentuadamente menor do

que a proliferação das CS. Além disso, o percentual de células não viáveis na cultura também foi consideravelmente maior do que na cultura de CS, indicando uma possível ausência de condições favoráveis à proliferação e viabilidade dessas células em cultura. O meio de cultura utilizado para nutrir as CMMO não estava provido dos mesmos agentes mitogênicos adicionados ao meio de cultura das CS a fim de se evitar quaisquer interferências no comportamento metabólico das células. Estudos mostram que, após a extração e isolamento das CMMO obtém-se uma população heterogênea de células, constituída de células pequenas de rápida proliferação e de células grandes de proliferação mais lenta (Colter et al., 2001). Contudo, essa heterogeneidade está intimamente relacionada à densidade celular na placa de cultura. Culturas ricas em células pequenas de rápida proliferação podem ser expandidas rapidamente se forem mantidas em baixa densidade; quando elas se aproximam da confluência, células grandes de proliferação lenta são observadas (Fehrer and Lepperdinger, 2005). Este fenômeno parece explicar, ao menos em parte, a baixa proliferação obtida nas culturas de CMMO. Estas células foram plaqueadas numa densidade mediana para os estudos de proliferação e viabilidade (10^5 células/placa) que tiveram a duração de 9 dias. Ao final do experimento, as placas, que já apresentavam uma densidade celular um pouco maior ($2,83 \times 10^5$), continham uma grande quantidade de células grandes.

Igualmente, diversos estudos têm demonstrado que ocorre um aumento no número de células de proliferação lenta em função do tempo de cultivo, que estaria relacionado a um processo de envelhecimento da cultura ao qual acompanha uma diminuição da proliferação assim como um declínio na multipotencialidade de diferenciação (D'Ippolito et al., 1999), ambos correlacionados ao encurtamento dos telômeros (Sharpless and DePinho, 2004). A literatura diz que o comprimento do telômero diminui após cada ciclo de divisão

celular, levando a uma gradual senescência. Ainda, Bonab e colaboradores (2006) demonstraram que as CMMO iniciam o processo de senescência e começam a perder suas características de células tronco a partir do momento em que são colocadas em cultura e que devem, portanto, serem utilizadas somente em estágios iniciais para estudos e práticas clínicas, bem como para as pesquisas experimentais básicas.

No entanto, estudos *in vitro* também têm mostrado que condições ambientais e tratamentos de diferenciação podem alterar significativamente a sobrevivência da cultura (Bonab et al., 2006). Segundo Rubin (2002), as células tronco ficam num estado quiescente *in vivo* por longos períodos de tempo, e somente reiniciariam o ciclo celular através de um sinal próprio para promover a regeneração e processos de reparo. Isto sugere que as células tronco regulam seu ciclo celular de maneira diferente da maioria das outras células somáticas (Rubin, 2002).

Tanto a análise do potencial proliferativo quanto os estudos de diferenciação celular foram realizados utilizando-se o Soro Fetal Bovino (SFB) como suplemento para o meio de cultura. Estudos recentes têm mostrado que o SFB supra-regula a expressão de determinados genes relacionados com o prolongamento do ciclo celular, como o growth arrest specific 1 (GAS1) e antiproliferative protein 1 (Shahdadfar et al., 2005). Sendo assim, podemos inferir que o SFB presente na constituição dos meios de cultura utilizados pode ter alterado o comportamento das CMMO, ampliando seu ciclo celular e tornando a proliferação mais lenta.

Em nossos experimentos, as CMMO foram cultivadas durante 21 dias em meio de cultura contendo SFB. De acordo com nossas observações e com os dados da literatura, podemos sugerir que o SFB pode ter influenciado não só no processo de proliferação dessas

células, como também no processo de diferenciação, uma vez que esse soro atua no metabolismo do desenvolvimento das mesmas.

Mais ainda, obtivemos no estudo de proliferação e viabilidade das CMMO cultivadas em MC por células de Schwann, uma curva de crescimento significativamente diferente da curva de crescimento das CMMO cultivadas em meio de cultura padrão. Pudemos observar que houve um crescimento no número total de células e que o percentual de células não viáveis foi reduzido, atingindo um máximo de 27% (Anexo 1). Além disso, a contagem do número de células viáveis mostrou um crescimento linear em função do tempo. Ao final do experimento, esse valor aproximou-se do dobro do número de CMMO viáveis cultivadas em meio de cultura padrão. Esse resultado deve ser analisado levando em consideração que o meio de cultura foi o único fator diferente nas condições de cultivo dessas células.

As células de Schwann produzem e secretam diversos fatores tróficos como o NGF, BDNF, NT-3, CNTF, GDNF, IL-6, TNF- α e LIF (Bunge, 1994; Thoenen, 1991; Bolin et al., 1995; Sendtner et al., 1992; Wagner and Myers, 1996; Kurek et al., 1996), além de algumas neuregulinas (Raabe et al., 1996). Além desses conhecidos fatores, sabe-se que as células de Schwann também produzem e secretam a proteína S100 β que, dentre outras funções, pode agir como uma citocina exercendo efeitos parácrinos em outras células (Heizmann et al., 2002). Considerando-se o esperado processo de diferenciação das CMMO cultivadas em MC por CS, enfatizamos aqui seu papel estimulador da proliferação e maturação glial (Selinfreund et al., 1990; Selinfreund et al., 1991) associado às propriedades tróficas da molécula (Barger et al., 1995; Griffin et al., 1995). Somando-se a isto, recentemente diversos autores têm demonstrado uma variedade de efeitos relacionados

ao cultivo de células em meio condicionado por células de Schwann. O MC por CS mostrou ser eficaz em promover a sobrevivência de células PC12, crescimento neurítico e a produção de neurofilamentos (Bampton and Taylor, 2005). Ainda, foi demonstrado que o MC promoveu a proliferação e maturação de células gliais (Torres et al., 2002) e que este efeito deve estar relacionado a proteínas e moléculas tróficas solúveis. Neste contexto, podemos destacar as enzimas Tirosina Kinases que são direta ou indiretamente ativadas por diferentes moléculas tróficas produzidas por células de Schwann (Barbacid, 1994; Bunge, 1994; Watabe et al., 1995).

Dessa forma, podemos sugerir que o MC com suas moléculas solúveis e proteínas secretadas pelas células de Schwann deve ter sido o responsável por tais alterações nos perfis de proliferação e viabilidade das CMMO e das CMMO cultivadas em MC.

A família das proteínas S100 é multigênica e compreende 19 membros, os quais são diferentemente expressos em uma grande variedade de tipos de células (Donato, 1999). Isobe e colaboradores (1984) demonstraram que a proteína S100 presente nas células gliais são constituídas por uma subunidade alfa e uma beta (S100 α) ou por duas subunidades beta (S100 β). Estes autores verificaram que nas células de Schwann a S100 β localiza-se nos interfilamentos citoplasmáticos e propuseram que a mesma participa na dinâmica dos constituintes do citoesqueleto e, conseqüentemente, na regulação da morfologia da célula de Schwann.

Corroborando essa hipótese, mais recentemente foi demonstrado que a proteína S100 β estimula processos de divisão e morfologia celular dependente de cálcio através de sua interação com a proteína nuclear kinase Ndr (Millward et al., 1998; Donato, 1999). Membros dessa família participam na regulação do cálcio intracelular e parecem estar

envolvidos em diversos processos relacionados à proliferação e diferenciação celular, tais como a dinâmica do citoesqueleto. Além disso, existem evidências de sua participação nos mecanismos de proteção da célula contra danos oxidativos (Qi & Kuo, 1984; Qi et al., 1984; Fanò et al., 1994; Donato, 1999).

Estudos demonstraram, ainda, que no sistema nervoso a S100 β parece participar no desenvolvimento cerebral estimulando o crescimento dos neuritos e a sobrevivência neuronal (Stagaard-Janus et al., 1991; Barger et al., 1992; Sarnat, 1992; Griffin et al., 1995). Outro aspecto do papel funcional da S100 β no sistema nervoso é sua ação estimuladora da proliferação e maturação glial (Selinfreund et al., 1990; Selinfreund et al., 1991), o que reforça a hipótese sobre suas possíveis propriedades tróficas (Barger et al., 1995; Griffin et al., 1995). Outrossim, diversos estudos têm demonstrado que a S100 β é secretada pelas células gliais e que pode atuar como uma citocina, exercendo efeitos parácrinos sobre as células adjacentes, como por exemplo, em neurônios promovendo sua sobrevivência durante o desenvolvimento ou após uma lesão, via receptor de membrana RAGE (receptor de produtos glicosilados) (Heizmann et al., 2002). Neste sentido, Nishiyama e colaboradores (2002) mostraram que a S100 β é capaz de promover a sobrevivência neuronal in vitro. Além disso, estes autores verificaram que a S100 β parece contribuir no fenômeno da potenciação a longo prazo (LTP), fato que corrobora as evidências do envolvimento da mesma em processos de aprendizagem e memória (Gerlai et al., 1994; Janus et al., 1995).

Neste trabalho verificamos que células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea cultivadas em meio de cultura previamente condicionado por células de Schwann apresentam alterações morfológicas e de imunorreatividade para S100 β . De acordo com as

imagens obtidas nos ensaios imunocitoquímicos das CMMO cultivadas em meio condicionado, podemos inferir que não houve uma completa diferenciação das CMMO em CS, mas que, provavelmente, o MC estimulou e induziu o início desse processo, haja vista a presença da proteína S100 β nas CMMO e suas implicações reguladoras já citadas.

De acordo com o trabalho de Heizmann e colaboradores (2002), a proteína S100 β foi secretada pelas células de Schwann, acumulando-se no meio de cultura. Dessa forma ela poderia ter atuado como uma citocina extracelular sobre as células tronco mesenquimais posteriormente cultivadas nesse meio, alterando seu fenótipo.

Nas CMMO cultivadas em meio condicionado pudemos evidenciar, através das marcações imunocitoquímicas para a proteína S100 β , uma gradativa internalização da S100 β do citoplasma para o núcleo. Deloulme e colaboradores (2004) também observaram este fenômeno de internalização da S100 β durante o processo de diferenciação de oligodendrócitos em cultura, através de ensaios imunocitoquímicos. Esses autores demonstraram que o acúmulo da proteína S100 β no núcleo das células ocorre especificamente em células com proliferação lenta e está estritamente correlacionada à alterações morfológicas associadas ao estágio de diferenciação celular. Segundo Deloulme e colaboradores (2004), S100 β é um marcador precoce da diferenciação ou maturação da linhagem oligodendrocítica. O mecanismo pelo qual a S100 β regula o mecanismo de diferenciação ainda não está completamente entendido. A S100 β pode participar da transformação morfológica dessas células que acompanham sua diferenciação (Deloulme et al., 2004). Estudos anteriores atribuem à S100 β a determinação da morfologia astrocitária (Selinfreund et al., 1990), bem como um alvo nuclear para a S100 β envolvido na regulação da diferenciação e morfogênese celular já identificado como a proteína kinase Ndr

(Millward et al., 1998). A proteína kinase Ndr é estruturalmente relacionada com diversas outras proteínas kinases que regulam a divisão e morfogênese celular (Millward et al., 1998).

O processo de translocação da proteína S100 β para o núcleo das células ainda não está elucidado. A proteína kinase C (PKC ϵ) parece estar correlacionada com a S100 β neste processo pois ela possui um papel central na transdução de sinais e tem sido amplamente implicada no controle do crescimento celular, diferenciação, transformação e apoptose (Scotto et al., 1999). Parece haver uma interdependência entre a PKC ϵ e a S100 β em vias de sinalização (Deloulme et al., 1990). Assim como a calmodulina, a S100 β regula diversas proteínas alvo. Uma variedade de proteínas efetoras da S100 β , inclusive proteínas do citoesqueleto e kinases associadas ao citoesqueleto, ou outras proteínas sinalizadoras poderiam estimular e ativar a associação da S100 β com a PKC ϵ promovendo, direta ou indiretamente, sua translocação para o núcleo celular (Millward et al., 1998). A ativação da PKC ϵ colaboraria com a S100 β na regulação da translocação nuclear da p53, bem como seu acúmulo nuclear nas fases iniciais do ciclo celular, segundo Scotto e colaboradores (1999). Além disso, esses mesmo autores sugerem que a indução e translocação da S100 β associada à translocação nuclear da p53 pode ocorrer em diversas células em resposta à diversos tipos de estímulos.

Desta forma, nossos resultados permitem sugerir que a proteína S100 β expressa pelas células de Schwann pode ter sido secretada para o meio condicionado e, desta forma, pode ainda estar implicada no processo de diferenciação de células tronco mesenquimais em células de Schwann in vitro.

Estudos bioquímicos moleculares das células de Schwann e das CMMO foram realizados a fim de se obter maiores indícios que suportem nossa hipótese.

Estratégias baseadas na proteômica provaram ser ferramentas eficazes na pesquisa básica e aplicada com células tronco, facilitando a identificação de alterações em componentes de vias sinalizadoras relacionadas à plasticidade, proliferação ou diferenciação celular (Resing, 2002; Maurer et al., 2003, 2004; Wang et al., 2004). Desta forma, o conhecimento do proteoma celular também é um instrumento para a investigação de mudanças na expressão protéica sob diferentes condições criadas *in vitro* pela modificação do meio de cultura (Maurer et al., 2003; Jiang et al., 2003). Sendo assim, no presente trabalho procuramos identificar e analisar as alterações na expressão de proteínas pelas células de Schwann, CMMO e nas CMMO cultivadas em meio condicionado. Os perfis eletroforéticos 2D obtidos mostraram *spots* diferentemente expressos entre as três amostras, indicando que cada uma delas difere das outras. Tais diferenças que podem ser decorrentes do momento metabólico em que as células se encontram e/ou das características de origem de cada célula.

De acordo com os perfis eletroforéticos obtidos, pudemos verificar maior semelhança entre os perfis das células de Schwann e das CMMO cultivadas em meio de cultura normal. As CMMO cultivadas em meio condicionado apresentaram um perfil proteômico diferente com relação aos outros dois. Particularmente, a considerável diferença observada entre os perfis protéicos das CMMO cultivadas em meio de cultura normal e em meio condicionado, sugerem que estas células podem estar passando por processos metabólicos diferentes e/ou não compartilharem mais a identidade de CMMO.

Por outro lado, os experimentos de proliferação e viabilidade mostraram que as culturas de células de Schwann e de células tronco mesenquimais em meio condicionado

apresentaram um crescimento e o maior número de células viáveis. Somando-se a isto, o estudo imunocitoquímico indicou a presença da proteína S100 β no compartimento nuclear das células tronco mesenquimais cultivadas em meio condicionado. Este dado, conforme demonstrado por Deloulme e colaboradores (2004), sugere que as CMMO cultivadas em meio condicionado podem também estar em processo de diferenciação celular. Para cada um destes processos, de proliferação e diferenciação, leva a alterações na expressão de determinadas proteínas. A vimentina, por exemplo, é uma das primeiras proteínas a ser expressa durante a diferenciação celular (Rosada et al., 2003; Li et al., 1995), a gelsolina é outra proteína envolvida no processo de diferenciação, assim como a α -actina (Wang et al., 2004). Desta forma, podemos sugerir que as semelhanças do perfil proteômico das células de Schwann e das CMMO em meio condicionado pode ser devido ao fato de ambas células estarem proliferando na placa de cultura. No entanto, de acordo com a literatura e com os resultados obtidos, as CMMO cultivadas em meio condicionado parecem estar passando também pelo processo de diferenciação celular, o que elucidaria a discrepância do perfil proteômico dessas com as demais, especialmente com as CMMO cultivadas em meio normal. Neste sentido, embora os dados imunocitoquímicos obtidos não permitam afirmar que houve uma completa diferenciação das CMMO em células de Schwann, as evidências sugerirem que tais células se encontravam em processo de diferenciação celular.

CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

1. As CMMO cultivadas em meio condicionado por células de Schwann apresentam maior proliferação do que as CMMO cultivadas em meio de cultura padrão.
2. O meio condicionado por células de Schwann promove alterações morfológicas nas CMMO.
3. O meio condicionado por células de Schwann altera o perfil da imunorreatividade da proteína S100 β nas CMMO.
4. O meio condicionado por células de Schwann é capaz de contribuir para o direcionamento do processo de diferenciação celular.
5. O perfil eletroforético das CMMO foi modificado pela adição do meio condicionado por células de Schwann, sugerindo a ocorrência de um processo de diferenciação do seu fenótipo bioquímico.

PERSPECTIVAS FUTURAS

VIII. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho contribuiu com o esclarecimento de alguns aspectos relacionados ao processo de diferenciação de células tronco num tipo celular específico. No entanto, inúmeras outras questões surgiram durante o desenvolvimento do projeto.

Identificamos importantes pontos que consideramos essenciais para contribuir ainda mais com o conhecimento acerca do processo de diferenciação de células tronco.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e ferramentas, tornou-se possível e necessária a identificação das células tronco mesenquimais através de imunofenotipagem com anticorpos específicos ou ainda utilizando-se os “meios de diferenciação” de células tronco em osteócitos e/ou adipócitos.

Mais ainda, buscando um maior entendimento dos mecanismos moleculares que controlam o processo de diferenciação celular, faz-se necessário uma profunda investigação dos componentes moleculares presentes no meio condicionado por células de Schwann que podem estar, de alguma forma ainda não elucidada, envolvidos em diversas vias de sinalização relacionadas ou não com o processo de diferenciação celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABDERRAHIM-FERKOUNE A, BEZY O, ASTRI-ROQUES S, ELABD C, AILHAUD G, AMRI EZ. Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. **Exp. Cell Res.** **293**: 219-228, 2004.
2. AEBERSOLD R, GOODLETT D. Mass spectrometry in proteomics. **Chem. Rev.** **101**: 269-295, 2001.
3. AKIYAMA Y, RADTKE C, HONMOU O, KOCSIS JD. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. **Glia**, **39(3)**: 229-236, 2002.
4. ALBERTI-AMADOR E, GARCÍA-MINIET R. Células estromales de la medula ósea: una fuente terapéutica alternativa en la restauración de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central. **Rev. Neurol**, **37(8)**: 752-758, 2003.
5. AN YH, WAN H, ZHANG ZS, WANG HY, GAO ZX, SUN MZ, WANG ZC. Effect of rat Schwann cell secretion on proliferation and differentiation of human neural stem cells. **Biomed. Environ. Sci.**, **16(1)**: 90-94, 2003.
6. ASKANAS V, ENGEL WK, DALAKAS MC, LAWRENCE JV, CARTER LS. Human Schwann cell in tissue culture: histochemical and ultrastructural studies. **Neurology**, **37**: 329-337, 1980.
7. AZIZI SA, STOKES D, AUGELLI BJ, DIGIROLAMO C, PROCKOP DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **95**: 3908-3913, 1998.
8. BAIN G, KITCHENS D, YAO M, HUETTNER JE, GOTTLIEB DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. **Develop. Biol.**, **168**: 342-357, 1995.
9. BALLOTTI R, NIELSEN FC, PRINGLE N, KOWALSKI A, RICHARDSON WD, VAN OBBERGHEN E, GAMMELTOFT S. Insulin-like growth factor 1 in cultured rat astrocytes: Expression of the gene and receptor tyrosine kinase. **EMBO J.**, **6**: 3633-3639, 1987.
10. BAMPTON ETW, TAYLOR JSH. Effects of Schwann cell secreted factors on PC12 cell neuritogenesis and survival. **J. Neurobiol.** **63 (1)**: 29-48, 2005.

11. BANDARI PS, QIAN J, YEHIA G, SEEGOPPAUL HP, HARRISON JS, GASCON P, FERNANDES H, RAMESHWAR P. Differences in the expression of neurokinin receptor in neural and bone marrow mesenchymal cells: implications for neuronal expansion from bone marrow cells. **Neuropept.**, **36 (1)**: 13-21, 2002.
12. BARBACID M. The Trk family of neurotrophin receptors. **J. Neurobiol.** **25**: 1386-1403, 1994.
13. BARGER SW, VanELDIK LJ. S100b stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. **J. Biol. Chem.**, **267**: 9689-9694, 1992.
14. BARGER SW, VanELDIK LJ, MATTSON MP. S100 beta protects hippocampal neurons from damage induced by glucose deprivation. **Brain Res.**, **677**: 167-170, 1995.
15. BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stromal cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, **19**: 180-192, 2001.
16. BICKNESE AR, GOODWIN HS, QUINN CO, HENDERSON VC, CHIEN SN, WALL DA. Human umbilical cord blood cells can be induced to express markers for neurons and glia. **Cell transplantation**, **11(3)**: 261-264, 2002.
17. BJORKLUND LM, SANCHEZ-PERNAUTE R, CHUNG S, ANDERSSON T, CHEN IY, McNAUGHT KS, BROWNELL AL, JENKINS BG, WAHLESTEDT C, KIM KS, ISACSON O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **99**: 2344-2349, 2002.
18. BOLIN LM, VERITY AN, SILVER JE, SHOOTER EM, ABRAMS JS. Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. **J. Neurochem.**, **64**: 850-858, 1995.
19. BONAB MM, ALIMOGHADDAM K, TALEBIAN F, GHAFFARI SH, GHAVAMZADEH A, NIKBIN B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biol.**, **7**: 14-20, 2006.
20. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.

21. BRANNEN CL, SUGAYA K. In vitro differentiation of multipotent human neural progenitors in serum-free medium. **Neuroreport**, **11(5)**: 1123-1128, 2000.
22. BRENNAN A, DEAN CH, ZHANG AL, CASS DT, MIRSKY R, JESSEN KR. Endothelins control the timing of Schwann cell generation *in vitro* and *in vivo*. **Develop. Biol.**, **227**: 545-557, 2000.
23. BROCKES JP, FIELDS KL, RAFF MC. Studies on cultured rat Schwann cells. 1. Establishment of purified populations from cultures of rat peripheral nerve. **Brain Research**, **165**: 105-118, 1979.
24. BUNGE RP. Schwann cells in central regeneration. **Ann New York Acad Sci**, **633**: 229-233, 1991.
25. BUNGE RP. The role of the Schwann cell in trophic support and regeneration. **J. Neurol.**, **241**: S19-S21, 1994.
26. CASELLA GTB, BUNGE RP, WOOD PM. Improved method for harvesting human Schwann cells from mature peripheral nerve and expansion in vitro. **Glia**, **17**: 327-338, 1996.
27. CELIS JE, GROMOV P, OSTERGAARD M, MADSEN P, HONORE B, DEJGAARD K, OLSEN E, VORUM H, KRISTENSEN DB, GROMOVA I, HAUNSO A, VAN DAMME J, PUYPE M, VANDERKERCKHOVE J, RASMUSSEN HH. Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. **FEBS Lett.** **398(2-3)**: 129-134, 1996.
28. CHAUDHARY LR, AVIOLI LV. Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1 and ERK2) by FGF-2 and PDGF-BB in normal human osteoblastic and bone marrow stromal cells: differences in mobility and in-gel renaturation of ERK 1 in human, rat and mouse osteoblastic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **238**: 134-139, 1997.
29. CHEN J, LI Y, CHOPP M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. **Neuropharmacol.**, **39**: 711-716, 2000.
30. CHOPP M, ZHANG XH, LI Y, WANG L, CHEN J, LU D, LU M, ROSEMBLUM M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. **Neuroreport**, **11**: 3001-3005, 2000.

31. CHU K, KIM M, JEONG S, KIM S, YOON B. Human neural stem cells can migrate, differentiate, and integrate after intravenous transplantation in adult rats with transient forebrain ischemia. **Neurosci Lett.**, **343**: 129-133, 2003.
32. CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J, VERESS B, NILSSON E, KARLSTROM H. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science**, **288**: 1660-1663, 2000.
33. COCCHIA D. Immunocytochemical localization of S100 protein in the brain of adult rat. **Cell and Tissue Res.**, **214**:529-540: 1981.
34. COCCHIA D & MICHETTI F. S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. **Cell and Tissue Res.**, **215**: 103-112, 1981.
35. COHEN RI, MCKAY R, ALMAZAN G. Cyclic AMP regulates PDGF-stimulated signal transduction and differentiation of an immortalized optic-nerve-derived cell line. **J. Exp. Biol.**, **202**: 461-473, 1999.
36. COLTER DC, SEKIYA I, PROCKOP DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **98(14)**: 7841-7845, 2001.
37. CUEVAS P, CARCELLER F, DUJOVNY M, GARCIA-GOMEZ I, CUEVAS B, GONZALEZ-CORROCHANO R, DIAZ-GONZALEZ D, REIMERS D. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. **Neurol. Res.**, **24(7)**: 634-638, 2002.
38. CUEVAS P, CARCELLER F, GARCIA-GOMEZ I, YAN M, DUJOVNY M. Bone marrow stromal cell implantation for peripheral nerve repair. **Neurol. Res.**, **26(2)**: 230-232, 2004.
39. DAUGHADAY WH, ROTWEIN P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic and gene structures, serum and tissue concentrations. **Endocrine Rev.**, **10**: 68-91, 1989.
40. DAVIS JB, STROOBANT P. Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat SCs. **J. Cell Biol.**, **110**: 1353-1360, 1990.

41. DELOULME JC, SENSENBRENNER M, BAUDIER J. Interactions of S100 proteins with protein kinase substrates, biological implication. **Calcium binding proteins in normal and transformed cells**. Plenum Press, New York: 153-157, 1990.
42. DELOULME JC, RAPONI E, GENTIL BJ, BERTACCHI N, ALEXANDER M, LABOURDETTE G, BAUDIER J. Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. **Mol. Cel. Neurosc.**, **27 – 4**: 453-465, 2004.
43. DENG W, OBROCKA M, FISCHER I, PROCKOP DJ. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **282**: 148-152, 2001.
44. DEZAWA M, TAKAHASHI I, ESAKI M, TAKANO M, SAWADA H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of *in vitro* differentiated bone-marrow stromal cells. **Eur J. of Neuroscience**, **14**: 1771-1776, 2001.
45. DEZAWA M. Central and peripheral nerve regeneration by transplantation of Schwann cells and transdifferentiated bone marrow stromal cells. **Anat. Science Intern.**, **77**: 12-25, 2002.
46. D'IPPOLITO G, SCHILLER PC, RICORDI C, ROOS BA, HOWARD GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. **J. Bone Miner. Res.** **14**: 1115-1122, 1999.
47. DONATO R. Soluble and membrane-bound S-100 protein in rat cerebral cortex synaptosomes during early postnatal development. **Brain Res.**, **109**: 649-655, 1976.
48. DONATO R. S-100 proteins. **Cell Calcium**, **7**: 123-145, 1986.
49. DONATO R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochim. Biophys. Acta**, **1450**: 191-231, 1999.
50. DONG Z, BRENNAN A, LIU N, YARDEN Y, LEFKOWITZ G, MIRSKY R, JESSEN KR. Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation and maturation of rat Schwann cell precursors. **Neuron**, **15**: 585-596, 1995.

51. DONG Z, SINANAN A, PARKINSON D, PARMANTIER E, MIRSKY R, JESSEN KR. Schwann cell development in embryonic mouse nerves. **J. Neurosci. Res.**, **56**: 334-348, 1999.
52. EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, **292**: 154-156, 1981.
53. FEHRER C, LEPPERDINGER G. Mesenchymal stem cell aging. **Exp. Gerontol.** **40**: 926-930, 2005.
54. FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAULOCCHI E, STORNAIULO A, COSSU G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, **279**: 1528-1530, 1998.
55. GAGE FH. (2000) Mammalian neural stem cells. **Science**, **287**: 1433-1438, 2000.
56. GARRAT AN, BRITSCH S, BIRCHMEIER C. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. **Bioessays**, **22**: 987-996, 2000.
57. GERLAI R, MARKS A, RODER J. T-maze spontaneous alternation rate is decreased in S100 beta transgenic mice. **Behav. Neurosci.**, **108**: 100-106, 1994.
58. GIMBLE JM, HUDSON J, HENTHORN J, HUA XX, BURSTEIN SA. Regulation of interleukin 6 expression in murine bone marrow stromal cells. **Exp. Hematol.**, **19**: 1055-1060, 1991.
59. GRIFFIN WST, YERALAN O, SHENG JG, BOOP FA, MRAK RE, ROVNAGHI CR, BURNETT BA, FEOKTSKOVA A, VanELDICK L. Overexpression of the neurotrophic cytokine S100b in human temporal lobe epilepsy. **J. Neurochem.**, **65**: 228-233, 1995.
60. HAGLID KG, HANSSON HA, RONNBACK L. S-100 in the central nervous system of rat, rabbit and guinea pig during postnatal development. **Brain Res.**, **123**: 331-345, 1977.
61. HALL S. Nerve repair: a neurobiologist's view. **Braz. J. Hand Surg.**, **26**: 129-136, 2001.
62. HANSSON HA, NILSSON A, ISGAARD J, BILLIG H, ISAKSSON O, SKOTTNER A, ANDERSON IK, ROZELL B. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I in the adult rat. **Histochem.**, **89**: 403-410, 1988.

63. HEIZMANN CW, FRITZ G, SCHAFER BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. **Front. Biosci.**, **7**: d1356-d1368, 2002.
64. HERSCHMAN HR, LEVINE L, DEVELLIS J. Appearance of a brain-specific antigen (S-100) protein in the developing rat brain. **J. Neurochem.**, **18**: 629-633, 1971.
65. HOLTON B & WESTON JA. Analysis of glial cells differentiation in peripheral nervous tissue. 1. S100 accumulation in quail embryo spinal ganglion cultures. **Develop. Biol.**, **89**: 64-71, 1982a.
66. HOLTON B & WESTON JA. Analysis of glial cells differentiation in peripheral nervous tissue. 2. Neurons promote S100 synthesis by purified glial precursor cell population. **Develop. Biol.**, **89**: 72-81, 1982b.
67. HUMBEL RE. Insulin-like growth factor I and II. **Eur. J. Biochem.**, **190**: 445-462, 1990.
68. HUTCHINS JB. Platelet-derived growth factor receptors of mouse central nervous system cells in vitro. **J. Comp. Neurol.**, **360** (1): 59-80, 1995.
69. HYDEN H & RONNBACK L. S-100 in isolated neurons and glial cells from rat, rabbit and guinea pig during early postnatal development. **Neurobiol.**, **5**: 291-302, 1975.
70. IDE C. Peripheral nerve regeneration. **Neurosci Res.**, **25**: 101-121, 1996.
71. ISOBE T, ISHIOKA N, OKUYAMA T. Structural relation of two S-100 proteins in bovine brain; subunit composition of S-100a protein. **Eur. J. Biochem.**, **115**: 469-474, 1981.
72. ISOBE T & OKUYAMA T. The amino acid sequence of the alpha subunit in bovine brain S100a protein. **Eur. J. Biochem.**, **116**: 79-86, 1981.
73. ISOBE T, TAKAHASHI K, OKUYAMA T. S-100a₀ (alpha, alpha) protein is present in neurons of the central and peripheral nervous system. **J. Neurochem.**, **43**: 1494-1496, 1984.
74. JANUS C, JANUS M, RÖDER J. Spatial exploration in transgenic mice expressing human beta-S100. **Neurobiol. Learn. Mem.**, **64**: 58-67, 1995.
75. JESSEN KR, MIRSKY R. Why do Schwann cells survive in the absence of axons? **Ann N Y Acad Sci.**, **883**: 109-115, 1999.

76. JESSEN KR, MIRSKY R. Signals that determine Schwann cell identity. **J. of Anatomy**, **200**: 367-376, 2002.
77. JIANG L, LINDPAINTNER K, LI HF, GU NF, LANGEN H, HE L, FOUNTOULAKIS M. Proteomic analysis of the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. **Aminoacids**, **25**: 49-57, 2003.
78. KIM HA, RATNER N, ROBERTS TM, STILES CD. Schwann cell proliferative responses to cAMP and Nf1 are mediate by cyclin D1. **J. Neurosci.**, **21**: 1110-1116, 2001.
79. KIM SU. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. **Neuropathol.**, **24**: 159-171, 2004.
80. KIVELL BM, McDONALD FJ, MILLER JH. Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. **Brain Res. Protoc.**, **6**: 91-99, 2001.
81. KLIGMAN D & HILT DC. The S100 protein family. **Trends in Biochem. Sci.**, **13**: 437-443, 1988.
82. KLOSE J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik** **26 (3)**: 231-243, 1975.
83. KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARIU O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow derived stem cell. **Cell**, **105**: 369-377, 2001.
84. KUREK JB, AUSTIN L, CHEEMA SS, BARTLETT PF, MURPHY M. Up-regulation of leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 in transected sciatic nerve and muscle following denervation. **Neuromuscu. Disord.**, **6**: 105-114, 1996.
85. LE DOUARIN NM. The neural crest. **Cambridge University Press**, 1982.
86. LEIMEROOTH R, LOBSIGER C, LÜSSI A, TAYLOR V, SUTER U, SOMMER L. Membrane-bound neuregulin 1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent progenitor cells. **Devel. Biol.**, **246**: 245-258, 2002.
87. LEVI ADO, BUNGE RP. Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. **Exp. Neurol.**, **130**: 41-52, 1994.

88. LI J, SENSEBE L, HERVE P, CHARBORD P. Nontransformed colony-derived stromal cell lines from normal human marrows. II. Phenotypic characterization and differentiation pathway. **Exp. Hematol.**, **23(2)**: 133-141, 1995.
89. LUDWIN SK, KOSEK JC, ENG LF. The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. **J. Comparative Neurol.**, **165**: 197-208, 1976.
90. MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. USA**, **78**: 7634-7638, 1981.
91. MATUS A & MUGHAL S. Immunohistochemical localization of S-100 protein in brain. **Nature**, **258**: 746-748, 1975.
92. MAURER MH, BERGER C, WOLF M, FÜTTERER CD, FELDMANN RE, SCHWAB S, KUSCHINSKY W. The proteome of human brain microdialysate. **Proteome Sci.**, **1(1)**: 7, 2003.
93. MAURER MH, FELDMANN RE, FÜTTERER CD, KUSCHINSKY W. The proteome of neural stem cells from adult rat hippocampus. **Proteome Sci.**, **1(1)**: 4, 2003.
94. MAURER MH, FELDMANN RE, FÜTTERER CD, BUTLIN J, KUSCHINSKY W. Comprehensive proteome expression profiling of undifferentiated versus differentiated neural stem cells from adult rat hippocampus. **Neurochem. Res.**, **29**: 1129-1144, 2004.
95. McMORRIS FA, SMITH TM, DeSALVO S, FURIANETTO RW. Insulin-like growth factor I/somatomedin C: a potent inducer of oligodendrocyte development. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, **83**: 822-826, 1986.
96. MEIER C, PARMANTIER E, BRENNAN A, MIRSKY R, JESSEN KR. Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet derived growth factor-BB. **J. of Neurosci.**, **19(10)**: 3847-3859, 1999.

97. MEZEY E, CHANDROSS KJ, IARTA G, MAKI RA, MCKERCHER SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. **Science**, **290**: 1779-1782, 2000.
98. MILLWARD TA, HEIZMANN CW, SCHÄFER BW, HEMMINGS BA. Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins. **EMBO**, **17**: 5913-5922, 1998.
99. MOORE BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochem. Biophys. Research Communications**, **6**: 739-744, 1965.
100. MOORE BW. Chemistry and biology of the S-100 protein. **Scand. J. Immunol.**, **15(Suppl.9)**: 53-74, 1982.
101. MORISSON SJ, WEISSMAN IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cell is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, **1**: 661-673, 1994.
102. MORRISEY TK, KLEITMAN N, BUNGE RP. Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. **J. Neurosci.**, **11**: 2433-2442, 1991.
103. MOSAHEBI A, WOODWARD M, WIBERG M, MARTIN R, TERENCE G. Retroviral labeling of Schwann cells: *in vitro* characterization and *in vivo* transplantation to improve peripheral nerve regeneration. **Glia**, **34**: 8-17, 2001.
104. MOURA CAMPOS LC, CORRÊA JÚNIOR JD, LOPES FRP, VICENTINI CE, OLIVEIRA MP DE BALDUÍNO A, LORA S, LANGONE F, BOROJEVIC R, MARTINEZ AMB. Effect of bone marrow-derived cells on regeneration of transected sciatic nerve. **Acta Microsc.**, **12**: 171-172, 2003.
105. MOZELL RL & McMORRIS FA. Insulin-like growth factor I stimulates oligodendrocyte development and myelination in rat brain aggregate cultures. **J. Neurosci. Res.**, **30**: 382-390, 1991.
106. NAKAMURA M, TOYAMA Y. Transplantation of neural stem cells into spinal cord after injury. **Nippon Rinsho**, **61(3)**: 463-468, 2003.
107. NISHIYAMA H, KNOPFEL T, ENDO S, ITOHARA S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **99**: 4037-4042, 2002.

108. O'FARREL PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** **250(10)**: 4007-4021, 1975.
109. OGAWA M. Embryonic stem cell differentiation: the role of growth factors. **Nippon Rinsho**, **61(3)**: 401-405, 2003.
110. PEREIRA LOPES FR, CAMARGO DE MOURA CAMPOS L, DIAS CORREA J JR, BALDUINO A, LORA S, LANGONE F, BOROJEVIC R, BLANCO MARTINEZ AM. Bone marrow stromal cells and resorbable collagen guidance tubes enhance sciatic nerve regeneration in mice. **Exp. Neurol.**, **198(2)**: 457-468, 2006.
111. PROCKOP DJ. Marrow stromal cells for nonhematopoietic tissues. **Science** **276**: 71-74, 1997.
112. RAABE TD, CLIVE DR, NEUBERGER TJ, WEN D, DEVRIES GH. Cultured neonatal Schwann cells contain and secrete neuregulins. **J. Neurosci. Res.**, **46(2)**: 263-270, 1996.
113. RAISMAN G. Use of Schwann cells to induce repair of adult CNS tracts. **Rev. Neurol.** **153**: 521-525, 1997.
114. RESING KA. Analysis of signaling pathways using functional proteomics. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **971**: 608-614, 2002.
115. ROMERO-RAMOS M, VOURC'H P, YOUNG HE, LUCAS PA, WU Y, CHIVATAKARN O, ZAMAN R, DUNKELMAN N, EL-KALAY MA, CHESSELET MF. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle. **J. Neurosci. Res.**, **69(6)**: 894-907, 2002.
116. ROSADA C, JUSTESEN J, MELSVIK D, EBBESEN P, KASSEM M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. **Calcif. Tissue Int.**, **72**: 135-142, 2003.
117. RUBIN H. The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. **Nat. Biotechnol.** **20**: 675-681, 2002.
118. RUTKOWSKI JL, TENNEKOON GI, MCGILLICUDDY JE. Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. **Ann. Neurol.**, **31**: 580-586, 1992.

119. SÁNCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, HAZZI C, STEDEFORD T, WILLING A, FREEMAN TB, SAPORTA S, JANSSEN W, PATEL N, COOPER DR, SANBERG PR. Adult bone marrow stromal cells differentiated into neural cells *in vitro*. **Exp. Neurology**, **164**: 247-256, 2000.
120. SÁNCHEZ-RAMOS JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. **J. Neurosci. Res.**, **69(6)**: 880-893, 2002.
121. SARNAT HB. Regional differentiation of the human fetal ependyma: immunohistochemical markers. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **51**: 58-75, 1992.
122. SASAKI M, HONMOU O, AKIYAMA Y, UEDE T, HASHI K, KOCSIS JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. **Glia**, **35**: 26-34, 2001.
123. SCHULDINER M, YANUKA O, ITSKOVITZ-ELDER J, MELTON DA, BENVENISTY N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**: 11307-11312, 2000.
124. SCHUMACHER M, JUNG-TESTAS I, ROBEL P, BAULIEU E-E. Insulin-like growth factor 1: a mitogen for rat SCs in the presence of elevated levels of cyclic AMP. **Glia**, **8**: 232-240, 1993.
125. SCHWAB ME. Repairing the injured spinal cord. **Science**, **295**: 1029-1031, 2002.
126. SCHWAB ME. NOGO and axon regeneration. **Curr. Opin. Neurobiol.**, **14**: 118-124, 2004.
127. SCHWARZ EJ, REGER RL, ALEXANDER GM, CLASS R, AZIZI SA, PROCKOP DJ. Rat marrow stromal cells rapidly transduced with a self-inactivating retrovirus synthesize L-DOPA in vitro. **Gene Ther.**, **8**: 1214-1223, 2001.
128. SCOTTO C, DELPHIN C, DELOULME JC, BAUDIER J. Concerted regulation of wild-type p53 nuclear accumulation and activation by S100B and calcium-dependent protein kinase C. **Mol. Cell. Biol.**, **9 (10)**: 7168-7180, 1999.
129. SELINFREUND RH, BARGER SW, PLEDGER WJ, VanELDICK LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, **88**: 3554-3558, 1991.

130. SELINFREUND RH, BARGER SW, WELSH MJ, VanELDICK LJ. Antisense inhibition of glial S100b production results in alterations in cell morphology, cytoskeletal organization, and cell proliferation. **J. Cell Biol.**, **111**: 2021-2028, 1990.
131. SENDTNER M, SOTÖCKLI KA, THOENEN H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. **J. Cell Biol.**, **118**: 139-148, 1992.
132. SHAH NM, MARCHIONNI MA, ISAACS I, STROOBANT P, ANDERSON DJ. Glial growth factor restricts mammalian neural crest stem cells to a glial fate. **Cell**, **77**: 349-360, 1994.
133. SHAH NM, GROVES AK, ANDERSON DJ. Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. **Cell**, **85**: 331-343, 1996.
134. SHAHDADFAR A, FRONSDAL K, HAUG T, REINHOLT FP, BRINCHMANN JE. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. **Stem Cell**, **23**: 1357-1366, 2005.
135. SHARPLESS NE, DePINHO RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. **J. clin. Invest.**, **113**: 160-816, 2004.
136. SHIELDS SA, BLAKEMORE W, FRANKLIN R. Schwann cell remyelination is restricted to astrocyte-deficient areas after transplantation into demyelinated adult rat brain. **J. of Neurosci. Res.** **60**: 571-578, 2000.
137. SHUTO T, HORIE H, HIKAWA N, SANGO K, TOKASHIKI A, MURATA H, YAMAMOTO I, ISHIKAWA Y. IL-6 up-regulates CNTF mRNA expression and enhances neurite regeneration. **Neuroreport.**, **12**: 1081-1085, 2001.
138. SMITH-THOMAS LC, DAVIS JP, EPSTEIN ML. The gut supports neurogenic differentiation of periocular mesenchyme, a chondrogenic neural crest-derived cell population. **Develop. Biol.**, **115**: 293-300, 1986.
139. SONG H, STEVENS CF, GAGE FH. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. **Nature Neurosci.**, **5**: 438-445, 2002.

140. STAGAARD-JANAS M, NOWAKOWSKI RS, MOLLGARD K. Glial cell differentiation in neuron-free and neuron-rich regions: II. Early appearance of S-100 protein positive astrocytes in human fetal hippocampus. **Anat. Embryol. Berl., 184:** 559-569, 1991.
141. STAVRIDIS MP, SMITH AG. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells. **Bioch. Soc.:** 45-49, 2003.
142. STEFANSSON K, WOLLMANN RL, MOORE BW. Distribution of S-100 protein outside the central nervous system. **Brain Res., 234:** 309-317, 1982.
143. STEWART HJS, ECCLESTON PA, JESSEN KR, MIRSKY R. Interaction between cAMP elevation, identified growth factors, and serum components in regulating Schwann cell growth. **J. Neurosci. Res., 30:** 346-352, 1991.
144. STEWART HJS, BRADKE F, TABERNERO A, MORRELL D, JESSEN KR, MIRSKY R. Regulation of rat Schwann cell P₀ expression and DNA synthesis by insulin-like growth factors in vitro. **Eur. J. Neurosci., 8:** 553-564, 1996.
145. STEWART JA & URBAN IA. The postnatal accumulation of S-100 protein in mouse central nervous system. **Dev. Biol., 29:** 372-384, 1972.
146. STUTE N, HOLTZ K, BUBENHEIM M, LANGE C, BLAKE F, ZANDER AR. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. **Exp. Hematol., 32:** 1212-1225, 2004.
147. TAKAHASHI J, PALMER TD, GAGE FH. Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. **J. Neurobiol., 38:** 65-81, 1999.
148. TAO H, MA DD. Evidence of transdifferentiation of human bone marrow-derived stem cells: recent progress and controversies. **Pathol., 35:** 6-13, 2003.
149. TEMPLE S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. **Nature, 340:** 471-473, 1989.
150. TEMPLE S. The development of neural stem cells. **Nature, 414:** 112-117, 2001.
151. TERENCE G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. **J. Anat. 194:** 1-14, 1999.
152. THOENEN H. The changing scene of neurotrophic factors. **TINS 14:** 165-170, 1991.

153. TORRES PMM, GUILARDUCCI CVV, FRANCO AS, ARAUJO EG. Sciatic conditioned medium increases survival, proliferation and differentiation of retinal cells in culture. **Int. J. Devl. Neurosc.** **20**: 11-20, 2002.
154. WAGNER R, MYERS RR. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. **Neurosc.**, **73**: 625-629, 1996.
155. WANG D, PARK JS, CHU JS, KRAKOWSKI A, LUO K, CHEN DJ, LI S. Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. **J. Biol. Chem.** **279 (42)**: 43725-43734, 2004.
156. WATABE K, FUKUDA T, TANAKA J, HONDA H, TOYOHARA K, SAKAI O. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cell secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities. **J. Neurosci. Res.** **41**: 279-290, 1995.
157. WILKINS MR, LINDSKOG I, GASTEIGER E, BAIROCH A, SANCHEZ JC, HOCHSTRASSER DF, APPEL RD. Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS-a World Wide Web accessible tool. **Electrophoresis** **18**: 403-408, 1997.
158. WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, BLACK IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **J. of Neurosci. Res.** **61**: 364-370, 2000.
159. XU XM, GUÉNARD V, KLEITMAN N, BUNGE MB. Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. **J. Comp. Neurol.**, **351**: 145-160, 1995.
160. XU XM, CHEN A, GUÉNARD V, KLEITMAN N, BUNGE MB. Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. **J. of Neurocytol.**, **26**: 1-16, 1997.
161. ZHANG H, WANG JZ, SUN HY, ZHANG JN, YANG SY. The effects of GM1 and bFGF synergistically inducing adult rat bone marrow stromal cells to form neural progenitors cells and their differentiation. **Chin. J. Traumatol.** **7(1)**: 3-6, 2004.

ANEXO

Anexo 1

Dia	Células total (x 10 ⁵)	Células viáveis (x 10 ⁵)	Células não viáveis (x 10 ⁵) / porcentagem do total
1	1	1	0 / 0%
2	1,49	1,08	0,41 / 28%
3	3,25	2,5	0,75 / 23%
4	3,82	2,91	0,91 / 24%
5	3,66	3,08	0,58 / 16%
6	5,83	5	0,83 / 14%
7	7,24	6,16	1,08 / 15%
8	7,41	6,25	1,16 / 16%
9	7,74	6,33	1,41 / 18%

Tabela 1: Número total de células, número de células viáveis e número de células não viáveis durante experimento de proliferação e viabilidade de cultura de células de Schwann.

Dia	Células total (x 10 ⁵)	Células viáveis (x 10 ⁵)	Células não viáveis (x 10 ⁵) / porcentagem do total
1	1	1	0 / 0%
2	1,08	0,66	0,41 / 39%
3	1,66	1,08	0,58 / 35%
4	1,74	1,08	0,66 / 38%
5	1,91	1,16	0,75 / 39%
6	1,66	1,08	0,58 / 35%
7	2,24	1,41	0,83 / 37%
8	2,66	1,58	1,08 / 41%
9	2,83	1,75	1,08 / 38%

Tabela 2: Número total de células, número de células viáveis e número de células não viáveis durante experimento de proliferação e viabilidade de cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea.

Dia	Células total (x 10 ⁵)	Células viáveis (x 10 ⁵)	Células não viáveis (x 10 ⁵) / porcentagem do total
1	1	1	0 / 0%
2	1,74	1,33	0,41 / 23%
3	2,04	1,5	0,54 / 26%
4	2	1,95	0,5 / 25%
5	3,2	2,5	0,7 / 21%
6	3,95	2,87	1,08 / 27%
7	3,95	3,04	0,91 / 23%
8	4,45	3,25	1,2 / 27%
9	4,36	3,45	0,91 / 21%

Tabela 3: Número total de células, número de células viáveis e número de células não viáveis durante experimento de proliferação e viabilidade de cultura de células tronco mesenquimais de medula óssea cultivadas em Meio Condicionado.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha tese de doutorado intitulada “ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS EM MEIO DE CULTURA CONDICIONADO POR CÉLULAS DE SCHWANN”

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1302-1). *pp 18/11/2007*

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (Protocolo nº _____).

Fernanda Hussein

Aluna: Fernanda Hussein

Francesco Langone

Orientador: Francesco Langone

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Ana Maria Francisca Guaraldo

Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEA/IB - UNICAMP