

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

MARIA FERNANDA P. A. D. FORNI

**Bases Moleculares da Depleção de Glutathione
sobre a Potencialidade, Diferenciação e
Envelhecimento de Células-Tronco de Pele**

Versão original da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
14/02/2013

MARIA FERNANDA P. A. D. FORNI

**Bases Moleculares da Depleção de Glutathiona
sobre a Potencialidade, Diferenciação e
Envelhecimento de Células-Tronco de Pele**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo
2013

Dedico esta tese à minha querida filha Helena, por toda a compreensão, carinho e incentivo ao longo de todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao princípio criador universal (cada um nomeie com sua preferência) pela oportunidade de estar viva e compartilhar essa maravilhosa aventura com pessoas fantásticas.

À querida Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, agradeço por me apoiar de maneira incondicional e acreditar em mim do começo ao fim, por me ofertar todas as oportunidades possíveis e imagináveis para o meu desenvolvimento. Por ser um grande exemplo de força, determinação, simplicidade e humildade.

I am also grateful to Professor Fiona Mary Watt for providing her laboratory for the development of part of this project, for the affection and time for my guidance and for providing animals, reagents and staff to help me. Thank you also for the warm welcome and all the careful advice along the way.

Ao Prof. Etelvino Bechara por me ajudar tão prontamente no desenvolvimento deste projeto em uma colaboração essencial para o meu desenvolvimento pessoal e profissional e pelo exemplo de paixão pela ciência.

À Profa. Bettina Malnic por ter me permitido tão gentilmente o uso de seu laboratório para as criosecções e ao Prof. Ivan Schumacher por todos os ensinamentos e ajuda com citometria de fluxo.

I would like to thank the post-doctoral student Ryan Driskell for all the help with the animal experiments in embryonic development, but most of all for your friendship and for all the brutal amount of knowledge you shared with me. Thanks also to the post-doctoral student Alex Schreiner for all the help with the experiments in CRI, thank you for all the times you could have said no but said yes! To all the other people who helped me: Celine, Sven, Fabian and Ajay, thanks! I would also like to thank Marta for all the love and care for me and for treating me like a sister with Harry Potter's dinners on cold nights! I would not forget to demonstrate my appreciation to the dedicated and efficient Betina, Emma and Liz for making my stay a lot more smooth and infinitely more fun with your lab management quality and all other members for the warm welcome and fruitful discussions: Gabor, Nathan, Simon, Sara, Giacomo, Ryan F, Hiro, Esther, Grace, Alexander K, Paul, Pawel, Mariya, Denny, Kai, Britta and Kif.

À Profa. Anna Carla Goldberg por todas as conversas animadas e pelo carinho e apoio principalmente no início desta tese, me acolhendo em sua sala quando eu ainda era uma “sem-mesa”.

À querida Profa. Leticia Labriola pela amizade, e incentivo durante todo o meu doutorado. Pelo exemplo de seriedade, profissionalismo e garra. Mas, principalmente, por todos os momentos de “mentorship” que foram essenciais para o meu amadurecimento.

À jovem pesquisadora Katiucia Paiva por todo o carinho, amizade, risadas, ajuda e momentos compartilhados no limbo do FACS. Muito obrigada por ser um exemplo pra mim de determinação e dedicação à pesquisa sem perder o bom humor ou a classe!

Ao Prof Wagner Montor por todo o apoio e amizade durante este período e também por ter participado do evento de sincronicidade mais engraçado da minha vida.

Aos meus ex-alunos Laura Polizel e Gabriel Antonini, por serem tão diferentes um do outro e me mostrarem que mesmo assim competência, dedicação e seriedade podem ser um dom em comum! Vocês (talvez sem saberem) foram essenciais para o meu doutorado e para minha vida! Obrigada por confiarem em mim!

Ao Erik Halcsik, vulgo Rasputinho, pela miríade de conselhos sábios, por compartilhar comigo o exílio do sanduíche, me ajudar com experimentos chatíssimos e fazer o tempo na QBQ666 muito mais divertido.

Agradeço à querida Marina Trombetta Lima, minha amiga e colaboradora, com quem eu dividi até os meus placódios, “a legjobb barátja bárki valaha is szeretne!”

À querida Marluce Mantovani por toda a ajuda com os experimentos de spinners, por ser um exemplo de dedicação, garra, competência e bondade.

Agradeço minha querida amiga Rosângela por ser uma pessoa iluminada e me incentivar diariamente, pelo seu exemplo de luta e superação, agradeço também pelos abraços em momentos chave.

À Ana Cristina Barbosa, Raquel Santana e Erika Molina por serem tão especiais na minha vida, muito obrigada por todas as conversas, caronas, segredos e desabafos, vocês foram (e são) uma alegria muito grande na minha vida.

À Aline Lobba, por me ensinar as frases mágicas que me garantiram a sobrevivência na pós-graduação! Por compartilhar comigo tantos momentos bons e ser uma ótima amiga!

À Luciana Gomes por ser uma amiga muito especial, por todo seu apoio e por ser um exemplo de pós-graduanda espetáculo.

Ao Alexandre Hamilton Ferreira pela ajuda no começo do meu doutorado e antes disso por ser um chefe compreensivo e competente.

Ao amigo e colaborador Adriano Sartori pela ajuda nos momentos decisivos e pelas intermináveis conversas sobre praticamente tudo (até sobre filmes péssimos!).

Ao pós-doutorando Marcos Demasi por ser um exemplo de integridade, calma e sabedoria, muito obrigada “São Marcos” por toda a ajuda durante esses anos!

À Roberta Mourão, a amiga que entre tantos momentos de riso, foi a que mais zelou pela integridade do meu nome, obrigada Robs por ensinar ao mundo que Fernanda não tem “S” (porque realmente não tem, né!). À Paty Kossugue por ser uma companheira de viagem (e pós) espetacular e dividir comigo da primeira água de côco ao último goham!

À querida Letícia Terra por todos os bons momentos e por sempre ouvir minhas onomatopéias bizarras!

Às queridas labrioletes Ancely e Talita, pelos lanchinhos da tarde divertidos e pelas conversas animadas.

E à Fezinha por acreditar em mim tão completamente que me fez acreditar também!

A todas as outras pessoas do laboratório de hoje pelo apoio diário: Ana Lúcia, Theri, Ana Cláudia, Paula, Aduino, Luís (I-s-a-I-k-i), Nicole, Fábio, Gisella, Cris, Tatiane, Thienne (linda!), Caio, Renato, Guilherme, Gabriel Levin, Camila, Gustavo, Fernando. E também às pessoas de outrora: Ilana, Michelle, Carol, Rômulo, Carin, Nicole, Flávia Tobaruella, Mateus, Joes, Maya, Flavinha e Erica Moreira. Muito obrigada por tudo!!!

Agradeço também à Zizi, Ricardo, Sandra e Deborah por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos. Sem vocês este trabalho não teria sido possível, muito obrigada de coração!

Aos meus queridos amigos de pós-graduação pelo apoio e por compartilhar todos os momentos bons e ruins: Ana Ayupe, Lauren, Mateus, Crislaine, Rita, Marcinha, Talita, Felipe, Yuri e Tati Lobo.

Aos médicos do Hospital Universitário da USP por viabilizarem a coleta de pele humana utilizada nesta tese, e a todos os pacientes que se dispuseram a doar um pedaço de si para este trabalho.

Agradeço à excelente equipe do Biotério de Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química da USP pelo cuidado com os animais utilizados neste projeto.

Não posso deixar de agradecer à minha família também! Agradeço em primeiro lugar à minha filha Helena por todo carinho e paciência, por sempre apoiar e compreender muito além da sua idade, eu te amo, meu anjo! Agradeço também ao meu pai Mário César *in memoriam* pelo seu exemplo de amor ao saber e por ter sempre me incentivado e confiado em mim. À minha querida mãe Marilza Alice por toda a imensa ajuda durante o meu doutorado, especialmente pela compreensão e carinho na reta final. Ao meu tio José Eduardo por ter apostado em mim ajudando no financiamento da minha educação e às minhas tias Laudicéia, Stella (ambas *in memoriam*) e Mônica por me acolherem ainda adolescente em sua casa o que me permitiu cursar escolas de qualidade na “cidade grande”! Aos tios Nelito e Tereza pela acolhida quando cheguei em São Paulo. Agradeço ainda à minha irmã Maria Sílvia pelo apoio durante estes anos e ao meu cunhado Sérgio e a Stelinha. E por último gostaria de agradecer à Magali e Magalu, que foram essenciais para contrabalancear o estresse das fases finais!

Apoio Financeiro

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento social e econômico

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos

PRP - USP - Pró-Reitoria de Pesquisa da USP.

“O que há de mais profundo no homem é a pele... depois medula, cérebro, tudo que é necessário para sentir, sofrer, pensar... ser profundo... todas essas coisas são invenções da pele. Nós nos esforçamos em vão em nos aprofundar doutor, nós somos... ectoderma!”

Paul Valéry, La Pleiade, tomo 2

RESUMO

Forni, MF. **Bases Moleculares da Depleção de Glutathiona sobre a Potencialidade, Diferenciação e Envelhecimento de Células Tronco de Pele**. 2013. 182 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A pele está em contínua auto-renovação graças a vários nichos de células-tronco presentes neste tecido. Células progenitoras epidérmicas surgem durante o desenvolvimento embrionário e contribuem para a reposição celular da epiderme durante todo o período de vida dos mamíferos. Neste trabalho, buscou-se analisar o papel da depleção de glutathiona durante a estratificação da epiderme embrionária e na manutenção da homeostase no tecido adulto. Encontramos evidências de que este tiol tem um importante papel durante a proliferação da epiderme e formação do folículo capilar. As alterações observadas na ausência de GSH foram relacionados com um padrão diferencial de fosforilação dos fatores de transcrição *forkhead-homeobox-tipo-O* (FOXO). Em resumo, foi estabelecida uma correlação entre o estado de GSH, a fosforilação de FOXO e o desenvolvimento da epiderme. Para melhor estudar a importância do balanço de GSH, na pele do adulto, e seu papel na manutenção deste tecido, camundongos foram tratados com um inibidor da síntese de GSH e, com N-acetilcisteína. Foi observado um aumento da fosforilação de Akt, padrões alterados de fosforilação FOXO e aumento da expressão de genes de genes relacionados à diferenciação. Estes resultados mostram que a via Akt/FOXO desempenha um papel importante na manutenção e diferenciação de células-tronco epidérmicas. O envelhecimento cronológico leva a alterações morfológicas/funcionais que conduzem à diminuição da auto-renovação, o que ocorre concomitantemente com uma diminuição dos níveis de GSH na pele. Utilizamos, também, animais idosos e avaliamos quais mecanismos eram compartilhados pelo envelhecimento e a depleção deste tiol. Observou-se que uma resposta hiperproliferativa ligada à exaustão de células-tronco pode

ser o elo entre a depleção de GSH e o envelhecimento. A influência desse processo também foi investigada no compartimento dérmico, através da análise do impacto da depleção de glutathiona sobre a osteogênese de células-tronco mesenquimais murinas. Quando induzidas a se diferenciarem em osso (Alizarin-Red+/Von-Kossa-stain +, aumento dos níveis de mRNA para fosfatase alcalina/osteopontina/osterix), o balanço GSH/GSSG e seu sistema antioxidante correlato é diferencialmente regulado em células-tronco mesenquimais derivadas da derme. Sendo regulado de uma forma redox-dependente através da via de MAPKs. A depleção de GSH leva à diminuição nos níveis de osteogênese em favor da adipogênese, levando ao processo comumente associado ao envelhecimento denominado “*adipogenic switc*”.

Em conclusão, os dados obtidos permitem propor um papel central para a glutathiona na manutenção/comprometimento de células-tronco na pele.

Palavras-chave: células-tronco, pele, glutathiona, Akt/FOXO, MAPK, envelhecimento.

ABSTRACT

Forni, MF. **Molecular basis of glutathione depletion upon the Potenciality, Differentiation Potential and Aging of Skin Stem Cells.** 2013. 182 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The skin is continuously self-renewing thanks to several stem cell niches. Epidermal progenitor cells arise during embryonic development and contribute to the replenishment of the epidermis during the lifetime of mammals. We set out to analyze the glutathione (GSH) antioxidant system during embryonic epidermis stratification and follicle development and the effect of glutathione withdrawal in this process. We found that glutathione plays an important role during epidermis proliferation and hairshaft formation. The changes observed in the absence of GSH were related to a differential phosphorylation pattern of the forkhead-homeobox-type-O (FOXO) transcription factors. In brief, a correlation between GSH *status*, FOXO phosphorylation and skin development was established. To further study the importance of GSH in adult skin maintenance and understand the effects of ROS in the Akt/FOXO pathway, we treated cells and mice with an inhibitor of GSH synthesis, and with N-acetylcysteine. Increased Akt phosphorylation, altered FOXO phosphorylation patterns and increased gene expression of differentiation-related genes were observed. Our results show that the Akt/FOXO pathway plays an important role in maintenance/differentiation of epidermal stem cells. Chronological ageing leads to morphological/functional changes causing a decline in self-renewal, as well as decreased levels of GSH. We also observed that a cell cycle hyperproliferative response was the link between stem cell exhaustion in GSH-depletion and ageing. Dermal mesenchymal stem cells (MSCs), are capable of adipo-chondro- and osteogenesis. Little is known about the impact of ROS in MSC differentiation. We induced murine skin MSCs to differentiate into bone (Alizarin-Red/Von-Kossa-stain⁺, increased levels of mRNA for alkaline-

phosphatase/osteopontin/osterix). In brief, the balance of GSH/GSSG and related antioxidant system is differentially regulated during this process, found to be regulated in a redox-dependent fashion through the MAPK pathway. When depleted, GSH leads to an adipogenic switch in MSC differentiation.

In conclusion, our data leads us to propose a central role for glutathione in the maintenance/commitment of stem cells in skin.

Keywords: skin stem cell, glutathione, Akt/FOXO, MAPK, aging.

ÍNDICE DE TABELAS

(Todas na seção ANEXOS)

Tabela 1: Lista de anticorpos empregados neste trabalho.

Tabela 2: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo (Murino).

Tabela 3: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo (Humano).

Tabela 4: Concentração final e Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo (Murino).

Tabela 5: Concentração final e Eficiências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo (Humano).

Tabela 6: Genes regulados por fatores de transcrição da família FOXO e suas funções.

ÍNDICE DE FIGURAS

-----Figuras Introdução-----

Figura 1: Aspectos estruturais da pele de mamíferos.....	29
Figura 2: Células-tronco presentes na Epiderme.....	32
Figura 3: Células-tronco presentes na Derme.....	37
Figura 4: Etapas da diferenciação óssea in vitro e in vivo.....	39
Figura 5: Principais eventos da embriogênese da Epiderme e Folículo Piloso.....	40
Figura 6: Representação gráfica da contribuição das células-tronco para a homeostase de diversos tecidos.....	43
Figura 7: Eventos relacionados ao controle do ciclo celular.....	46
Figura 8: Etapas da redução do Oxigênio Molecular.....	49
Figura 9: Compartimentalização das principais enzimas do sistema antioxidante em células de mamíferos.....	51
Figura 10: Principais etapas da Homeostase da Glutathione nas células de mamíferos.....	53
Figura 11: Esquema simplificado do eixo de sinalização PI3k/Akt/FOXO.....	57

-----Figuras Objetivos-----

Organograma 1: Seções abordadas na tese.....	63
---	----

-----Figuras Material e Métodos-----

Figura 12: Etapas do processo de adesão de células aos microcarregadores.....	69
Figura 13: Princípio do isolamento de populações por citometria de fluxo (FACS).....	80

-----Figuras Resultados-----

-----Seção 4.1-----

Figura 14: Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco epidermais murinas.....96

Figura 15: Isolamento e caracterização de células-tronco precursoras da pele (SKP) murinas.....101

Figura 16: Diferenciação de células-tronco precursoras da pele (SKP) murinas.....103

Figura 17: Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais estromais de derme murina.....105

Figura 18: Diferenciação de células-tronco mesenquimais estromais de derme murina.....107

Figura 19: Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana.....110

Figura 20: Diferenciação de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana.....112

Figura 21: Comparação do efeito do subcultivo *in vitro* sobre o fenótipo de marcadores de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana.....114

Figura 22: Comparação do efeito do subcultivo *in vitro* sobre a taxa de proliferação de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana.....116

Figura 23: Crescimento em biorreator de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana - Parâmetros de proliferação celular.....119

Figura 24: Crescimento em biorreator de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana - Parâmetros bioquímicos.....120

Figura 25: Crescimento em Biorreator de Células-tronco mesenquimais estromais de derme humana - Parâmetros de Potencialidade.....121

-----Seção 4.2-----

Figura 26: Padrão de expressão e atividade de enzimas do sistema antioxidante canônico durante a diferenciação terminal de células-tronco mesenquimais em osteoblastos.....124

Figura 27: Padrão de expressão e atividade de enzimas do sistema antioxidante relacionado à glutathione durante a diferenciação terminal de células-tronco mesenquimais em osteoblastos.....	126
Figura 28: Padrão de expressão de peroxiredoxinas e tioredoxina durante a diferenciação terminal de osteoblastos.....	127
Figura 29: Homeostase da glutathione durante a diferenciação terminal de osteoblastos.....	129
Figura 30: Padrão de expressão de enzimas do sistema antioxidante canônico e relacionado à glutathione durante o comprometimento de células-tronco mesenquimais com a osteogênese.....	131
Figura 31: Cinética de fosforilação de MAPKs e Akt em precursores mesenquimais murinos induzidos à diferenciação osteogênica.....	133
Figura 32: Contribuição sinérgica do balanço de glutathione intracelular e da fosforilação de MAPKs para o comprometimento de células-tronco mesenquimais com a osteogênese.....	135
Figura 33: A depleção de glutathione leva a um “adipogenic switch” durante a diferenciação osteogênica de precursores mesenquimais de pele murina.....	137

-----Seção 4.3-----

Figura 34: A depleção de glutathione durante o desenvolvimento embrionário da epiderme - resposta hiperproliferativa e de ativação do programa de diferenciação celular.....	141
Figura 35: Homeostase da glutathione em epidermes de animais jovens, idosos e depletados de glutathione.....	142
Figura 36: Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathione sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais dorsais murinos <i>in vivo</i>	144
Figura 37: Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathione sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais da orelha e cauda murinos <i>in vivo</i>	145
Figura 38: Papel da depleção de glutathione sobre a morte celular de células-tronco epidermais da pele dorsal murina <i>in vivo</i>	148

Figura 39: Papel da depleção de glutathione sobre a fosforilação de Akt na epiderme dorsal murina *in vivo*.....150

Figura 40: Papel da depleção de glutathione sobre a proliferação de células-tronco epidermais da pele dorsal murina *in vivo*.....152

Figura 41: Papel da depleção de glutathione sobre a proliferação de células-tronco epidermais da pele dorsal murina *in vitro*.....154

-----**Figuras Discussão**-----

Figura 42: Esquema do mecanismo molecular proposto para a contribuição do balanço intracelular de glutathione sobre a osteogênese de células-tronco da derme.....162

Figura 43: Esquema do mecanismo molecular proposto para a contribuição do balanço intracelular de glutathione sobre a homeostase de células-tronco epidermais.....167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4OHT	<i>4-hydroxytamoxifen</i>
7AAD	<i>7-aminoactinomycin D</i>
A, C, T, G	adenina, citosina, timina e guanina
ATP	adenosina trifosfato
BSA	bovine serum albumin
BSO	<i>buthionine sulfoximine</i> , ou sulfóxido de butionina
Ca ²⁺	íon cálcio
CD	<i>cluster of differentiation antigen</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
Cdk	<i>cyckin dependent kinase</i> ou quinase dependente de ciclina
cRNA	RNA complementar amplificado
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DCF/ DCFH2	2',7'-diclorofluoresceína oxidada/reduzida
DEPC	dietilpirocarboneto
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagles' medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i>
DP	<i>dermal papilla</i>
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentaacético
DTT	<i>dithiothreitol</i>
E	<i>embryonic day</i> ou dia embrionário pós-plug
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	ethyldiaminotetraacetic acid disodium salt
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	F12 + Adenina + DMEM
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GCLC	<i>glutamate cysteine ligase catalytic subunit</i>
GCLM	<i>glutamate cysteine ligase modifier subunit</i>
GPx	Glutaciona peroxidase
GSR	Glutaciona redutase
GSH	glutaciona
GSSG	glutaciona dissulfeto
HE	hematoxilina e eosina
HEPES	<i>N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]</i>
HICE	<i>hydrocortisone, insulin, cholera enterotoxin and EGF</i>
HRP	horseradish peroxidase, ou peroxidase de raiz forte
IFE	<i>interfollicular epidermis</i>
Ig	Imunoglobulina
IRS	<i>inner root sheath</i>
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
K	queratina
kDa	quilo dalton
kg	quilograma

LB	Meio de Luria Brentani
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MTT	<i>1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazana</i>
NAC	<i>N-acetylcysteine</i>
NBT	nitrotetrazolium blue, ou azul de nitrotetrazólio
OCT	<i>optimal cutting temperature</i>
ORS	<i>outer root sheath</i>
PAGE	<i>polyacrilamide gel electrophoresis</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBSA	solução salina tamponada com sais de fosfato sem cálcio
PBS-T	PBS adicionado de Tween 20 (0,1%, V/V)
PFA	paraformaldeído
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
q-RT-PCR	PCR quantitativo em tempo real
RIPA	tampão para <i>radio immuno precipitation assay</i>
RNA	ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
rpm	rotações por minuto
SDS	sodium dodecyl sulphate, ou dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SFB	soro fetal bovino
SOD	superóxido dismutase
SG	<i>sebaceous gland</i>
SKP	<i>skin-derived precursor</i> ou “célula precursora da pele”.
TA	<i>transit amplifying cell</i> , célula epidermal que está proliferando mas já se encontra comprometida com o processo da diferenciação.
TBS	Tris buffered saline
TBS-T	TBS adicionado de Tween 20 (0,1%, V/V)
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA buffer
TEMED	Tetrametiletlenodiamina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

ÍNDICE/SUMÁRIO

1. Introdução

1.1 A pele dos mamíferos: estrutura e anexos.....	28
1.2. Epiderme.....	29
1.2.1 Epiderme Interfolicular.....	30
1.2.1.1 Células-tronco epidermais interfoliculares.....	30
1.2.2 Apêndices da epiderme interfolicular	32
1.2.2.1 O Folículo piloso.....	32
1.2.2.1.1 Células-tronco epidermais do bulge.....	33
1.2.2.2 Glândula sebácea e sudorípara.....	34
1.3. Derme.....	35
1.3.1 Células-tronco da papila dérmica do folículo (SKPs).....	35
1.3.2 Células-tronco mesenquimais da derme.....	36
1.3.2.1 Diferenciação osteogênica e formação do tecido ósseo.....	37
1.4. Desenvolvimento embrionário da pele.....	40
1.5. Homeostase da pele do adulto e envelhecimento.....	42
1.5.1 Envelhecimento intrínseco versus extrínseco.....	42
1.5.2 O papel das células-tronco no envelhecimento tecidual.....	42
1.5.3 Envelhecimento e controle do Ciclo Celular.....	45
1.6 Controle do Ciclo Celular em Mamíferos.....	45
1.7 Envelhecimento e estresse oxidativo.....	48
1.8 Espécies Reativas de Oxigênio - Atuação Fisiológica e Estresse Oxidativo.....	48
1.8.1 Espécies reativas de oxigênio.....	49
1.8.2 Sistema de defesa antioxidante enzimático.....	50
1.8.3 Sistema antioxidante não enzimático.....	52
1.8.3.1 Glutathiona.....	52
1.8.3.1.1 Biossíntese e Homeostase da Glutathiona.....	54
1.8.3.1.2 Compartmentalização intracelular e degradação da Glutathiona.....	55
1.9 Vias de sinalização redox.....	55

1.10 FOXO.....	56
----------------	----

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral.....	60
2.2 Objetivos Específicos.....	60

3. Material e Métodos

3.1 Soluções e meios de cultura para células de mamífero.....	64
3.2 Obtenção de culturas primárias celulares.....	65
3.3 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	66
3.4 Geração de Células-tronco Epidermais expressando os construtos A2-Akt e Myr-Akt através de transdução retroviral.....	67
3.5 Crescimento em microcarregadores <i>Spinners</i>	68
3.6 Indução da diferenciação terminal de precursores epidermais.....	70
3.7 Indução da diferenciação neuronal e de glia.....	70
3.8 Indução da diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica.....	71
3.9 Tratamento de linhagens celulares com inibidores farmacológicos para as proteínas ERK½, JNK e PI3k/Akt.....	71
3.10 Indução do estresse oxidativo nas de linhagens celulares através da depleção de glutathiona.....	72
3.11 Determinação da curva de crescimento.....	72
3.12 Animais e código de ética para experimentação animal.....	73
3.13 Modelo animal de envelhecimento e depleção de glutathiona.....	73
3.14 Modelo animal de desenvolvimento embrionário.....	73
3.15 Ensaio de Viabilidade Celular.....	74
3.16 Preparação de lâminas histológicas de linhagens celulares.....	74
3.17 Coleta e processamento de secções congeladas e parafinadas de tecidos e embriões.....	75
3.18 Preparação tridimensional de epiderme e derme de cauda de	

camundongo (<i>wholemout</i>).....	76
3.19 Imunofluorescência de tecidos e células de mamífero.....	76
3.20 Histologia e Imunohistoquímica de tecidos e células de mamífero.....	77
3.21 Coloração de Von Kossa.....	77
3.22 Coloração de Vermelho de Alizarina.....	77
3.23 Coloração de Oil Red O.....	78
3.24 Coloração com Toluidina Blue.....	78
3.25 Citometria de fluxo.....	79
3.26 Citometria de fluxo para imunofenotipagem de marcadores de membrana celular.....	79
3.27 Ensaio de separação celular em citômetro de fluxo (<i>fluorescence activated cell sorting</i>).....	79
3.28 Avaliação do ciclo celular através de citometria de fluxo.....	81
3.29 Avaliação de Fragmentação de DNA.....	81
3.30 Avaliação de morte celular (apoptose e necrose) por iodeto de propídeo e anexina-V.....	81
3.31 Extração e purificação de RNA total de tecidos e células de mamífero.....	82
3.32 Síntese de cDNA.....	83
3.33 Desenho e obtenção dos oligos iniciadores.....	84
3.34 Determinação da concentração final de iniciadores.....	85
3.35 Determinação da eficiência dos iniciadores.....	85
3.36 Reação de RT-PCR quantitativo.....	86
3.37 Confirmação da expressão diferencial.....	87
3.38 Ensaio de Western Blot.....	89
3.39 Obtenção do lisado protéico total de tecidos e células de mamífero.....	89
3.40 Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose.....	89
3.41 Incubação das membranas com antisoros específicos e revelação utilizando conjugado IgG-Peroxidase.....	90
3.42 Quantificação das formas reduzida e oxidada da glutathiona.....	91

3.43 Medida da atividade de enzimas do Sistema Antioxidante.....	91
3.44 Medida da atividade total da Superóxido Dismutase (CuZnSOD + MnSOD).....	92
3.45 Medida da atividade de Catalase.....	93
3.46 Medida da atividade de Glutathiona Redutase.....	93
3.47 Medida da atividade de Glutathiona Peroxidase.....	93
3.48 Análise de Fluorescência de Diclorofluoresceína Diacetato (DCF-DA).....	94
3.49 Análise estatística dos dados.....	94

4. Resultados

4.1 Seção 1 de Resultados - Estabelecimento de modelo experimental murino e Humano.....	95
4.1.1 Estabelecimento de modelo experimental murino - Isolamento simultâneo de três populações de células-tronco de pele murina.....	95
4.1.2 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação e comportamento <i>in vitro</i> de EpiSC murinas.....	95
4.1.3 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento <i>in vitro</i> de SKPs murinas.....	99
4.1.4 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento <i>in vitro</i> de MSCs murinas.....	104
4.1.5 Estabelecimento de modelo experimental humano - Expansão de células em microcarregadores para uso em terapia celular.....	107
4.1.6 Isolamento de progenitores de derme humana de doares de diversas faixas etárias (jovem, adulto e idoso).....	108
4.1.7 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento <i>in vitro</i> de progenitores dérmicos.....	108

4.1.8 Padronização do cultivo em bioreator de progenitores dérmicos humanos e avaliação dos possíveis efeitos deletérios deste processo sobre o potencial de diferenciação e expressão de marcadores.....117

4.2 Seção 2 de Resultados - Papel da homeostase de glutathiona durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais de derme murina.....122

4.2.1 Comparação do perfil de expressão de componentes do sistema antioxidante enzimático em precursores mesenquimais de derme e em osteoblastos gerados a partir da diferenciação das mesmas.....122

4.2.2 Papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada durante o processo de diferenciação osteogênica.....128

4.2.3 Participação da via de MAPK durante o processo de diferenciação osteogênica e sua contribuição nas alterações resultantes da mudança do potencial redox ao longo deste processo.....132

4.2.4 A depleção de glutathiona leva a um “*adipogenic switch*” ao longo da osteogênese em precursores dérmicos murinos.....136

4.3 Seção 3 de Resultados - Avaliação do papel do balanço GSH/GSSG ao longo do desenvolvimento embrionário da pele murina e na manutenção da homeostase deste tecido no adulto - possíveis correlações entre o processo de envelhecimento da epiderme e a depleção de glutathiona.....139

4.3.1 Avaliação do papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada no comprometimento e desenvolvimento de precursores epidermais ao longo da embriogênese.....139

4.3.2 Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais murinas adultas in vivo e in vitro.....142

4.3.3 Papel da depleção de glutathiona sobre a homeostase de células-tronco epidermais murinas - Morte Celular.....146

4.3.4 Análise da participação do estado de fosforilação de Akt e seu impacto sobre o perfil de fosforilação dos constituintes da família de fatores de transcrição FOXO durante esse processo.....	149
4.3.5 Análise do status e expressão dos principais componentes do ciclo celular compartilhados pelo processo de envelhecimento e depleção de glutathiona: busca de reguladores do ciclo que sejam comuns aos processos de estresse e envelhecimento.....	151

5. Discussão.....	156

6. Conclusões.....	168

7. Perspectivas.....	170

7. Referências Bibliográficas.....	172

Lista de Anexos

Tabelas 1 a 6

Súmula Curricular

Termo do Comitê de Ética em Pesquisa HU-USP

Termo do Comitê de Ética CECUA/COBEA

1. Introdução

1.1 A pele dos mamíferos: estrutura e anexos

A pele dos mamíferos é um órgão complexo formado por diversos tecidos e uma variedade de estruturas acessórias (pêlos, glândulas, etc). A função primária da pele nos animais terrestres é evitar a perda excessiva de água pelo organismo, servindo como uma barreira de permeabilidade. Além disso, a pele é o primeiro órgão de defesa do organismo contra agentes externos, conferindo proteção mecânica, química, contra raios solares e infecção por microorganismos. Tem, ainda, função termorreguladora, sensorial e metabólica (Fuchs e Raghavan, 2002).

A pele pode ser dividida em três camadas (Figura 1). A mais externa, chamada epiderme, com espessura média variável de 0,05 a 1,5 mm, é constituída de um epitélio estratificado escamoso, composto principalmente por queratinócitos, possuindo também anexos, os quais se encontram inseridos na derme, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas (Niemann e Watt, 2002). A derme (1-2 mm), mais profunda e separada da epiderme por uma membrana basal, constituída por matriz extracelular, é um sistema de sustentação no qual se encontram unhas, vasos sanguíneos e linfáticos e terminações nervosas. A hipoderme (1-2 mm) é formada por tecido adiposo, que se amolda aos músculos e ossos que se encontram abaixo da pele (Fuchs e Raghavan, 2002; Niemann e Watt, 2002).

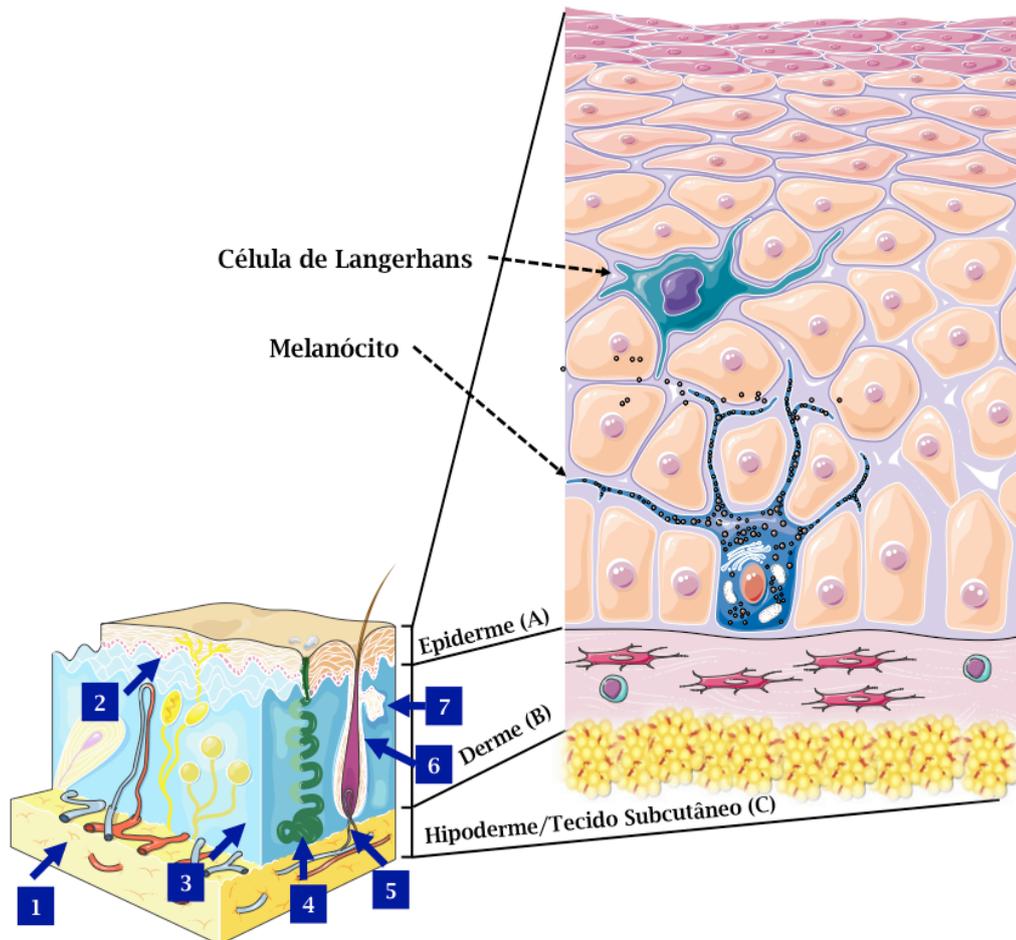


Figura 1: Aspectos estruturais da pele de mamíferos – Representação esquemática de um corte transversal evidenciando as três camadas de tecido que compõe este órgão: a epiderme (A), camada mais externa em contato com o meio externo, sob ela se encontra a derme (B) e separando estas duas estruturas a membrana basal, logo abaixo da qual está a hipoderme (C) que conecta a pele ao tecido conjuntivo adjacente. Em evidência, as diversas populações de células-tronco residentes na pele: (1) célula-tronco mesenquimal do tecido adiposo (hipoderme); (2) célula-tronco da epiderme interfolicular (epiderme); (3) célula-tronco mesenquimal da derme (derme); (4) célula-tronco unipotente da glândula sudorípara (epiderme); (5) célula-tronco precursora da pele da papila dérmica do folículo piloso, SKP (derme); (6) célula-tronco da epiderme folicular, no *bulge* (epiderme); (7) célula-tronco da glândula sebácea (epiderme). Adaptado de (Fuchs e Raghavan, 2002; Niemann e Watt, 2002).

1.2 Epiderme

A epiderme desempenha o papel de barreira hídrica, podendo ser subdividida em duas partes: a epiderme interfolicular e os apêndices epidermais tais como a unidade pilosebácea (folículo piloso e glândula sebácea). O principal componente celular da epiderme é o queratinócito, assim denominado pela abundância de filamentos da classe das queratinas (Matoltsy e Odland, 1955). Outras células residentes são os melanócitos e células dendríticas como células de

Langerhans e Merkel (Escalona, Magana Lozano *et al.*, 1960).

1.2.1 Epiderme Interfolicular

A epiderme interfolicular é compreendida pela porção ao redor dos folículos, sendo composta por diversos estratos, através dos quais uma célula-tronco gerada na camada basal é endereçada às camadas mais externas e se torna progressivamente cornificada (Watt, 1989). Ao longo desse processo as células passam por ciclos distintos de proliferação, diferenciação e morte, com conseqüente perda das mesmas através da descamação. Para que a homeostase seja mantida deve ocorrer um equilíbrio entre a taxa de proliferação da camada basal e a de descamação da camada cornificada (Watt, 1983; Candi, Schmidt *et al.*, 2005).

O tempo médio para uma célula progredir da camada basal até ser perdida por descamação na superfície da epiderme é de 12-48 dias em humanos (Jakic-Razumovic, Browne *et al.*, 1992) e cerca de 5-11 dias na pele dorsal de camundongo (Watt, 1998; Hsieh, Chai *et al.*, 2004) e esta taxa de reposição se deve à homeostase das células-tronco epidermais interfoliculares.

1.2.1.1 Células-tronco epidermais interfoliculares

Artigos recentes mostram a presença de células-tronco na camada basal da epiderme interfolicular (Liang, et al. 2004; Bickenbach & Grinnell, 2004) (Figura 2). Estas células foram denominadas células-tronco epidermais (EpiSC). Quando isoladas e injetadas em blastocistos, estas células são incorporadas a estes, mostrando-se capazes de dar origem a diversos tecidos (Liang et al. 2004). Isto sugere que estas células, quando em contato com um ambiente embrionário, sofrem um processo de dediferenciação, tornando-se pluripotentes. Neste mesmo trabalho, foi mostrado, também, que estas células, quando inoculadas em local próximo à uma injúria, eram capazes de acelerar o processo de cicatrização.

A camada basal exerce duas funções: a de adesão da epiderme à

derme subjacente através de proteínas da família das integrinas; e a de nicho para células-tronco responsáveis pela reposição contínua deste tecido altamente dinâmico (Watt, 2002a). As proteínas estruturais mais abundantes das células da camada basal são a queratina 5 e 14 (Fuchs e Green, 1980), enquanto que para especificar as células-tronco existem descritos na literatura diversos marcadores, dentre os quais as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ e o fator de transcrição p63 (Arwert, Hoste et al., 2012). As células-tronco basais podem sofrer divisões assimétricas e gerar células comprometidas com a diferenciação conhecidas como células “*transit amplifying*”. Após sofrerem cerca de 3 a 7 ciclos de mitose essas células migram para estratos suprabasais denominados coletivamente de camada espinosa, perdendo sua capacidade mitótica e iniciando a síntese de proteínas estruturais e enzimas que serão responsáveis pela montagem do envelope cornificado (Watt, 2002b; Watt, Lo Celso *et al.*, 2006). A perda de expressão de K5 e K14 é sucedida pela expressão de K1 e K10 (Watt, 2002b). Quando as células deixam a camada espinosa e adentram a camada granular, assim denominada em função dos grânulos queratohialinos de profilagrina (precursor da filagrina), inicia-se também a produção de outras proteínas de filamentos intermediários como involucrina, envoplaquina e periplaquina. Os filamentos de filagrina se unem em feixes densos e levam a um colapso da estrutura celular, que se torna achatada, característica de células da camada cornificada. A rede de filagrina e queratina será o suporte no qual os demais filamentos intermediários serão unidos por ligações covalentes através da atividade de transglutaminases (Watt, Lo Celso *et al.*, 2006). A esses eventos soma-se a produção e secreção de diversos lipídios (principalmente ceramidas) que culminará na maturação do envelope cornificado (Watt, 1991).

1.2.2 Apêndices da epiderme interfolicular

Os principais apêndices da epiderme são as glândulas sebáceas e sudoríparas e os folículos pilosos.

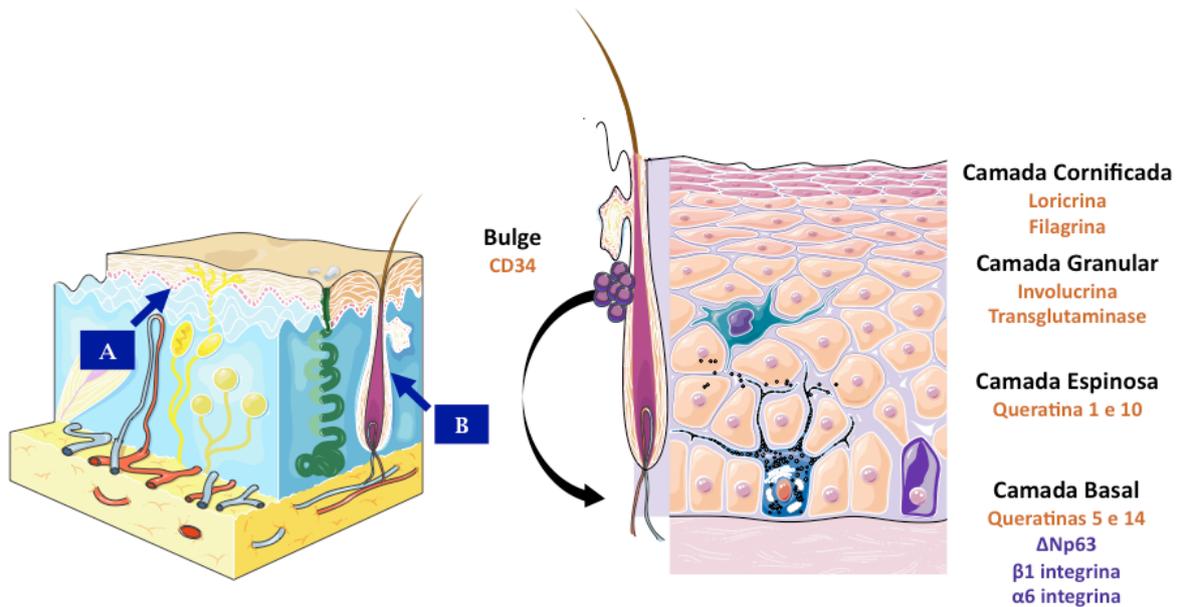


Figura 2: Células-tronco presentes na Epiderme - (A) Nicho das células-tronco epidermais interfoliculares, a membrana basal da epiderme; (B) Nicho das células-tronco epidermais do folículo piloso, a região denominada de *bulge*. As células do *bulge* podem repovoar a camada basal da epiderme em casos de extrema injúria tecidual. Após deixar a camada basal a **célula-tronco** sofre diversos ciclos de proliferação seguidos por diferenciação. Conforme a célula migra em direção à superfície. Os marcadores de cada etapa estão representados à direita. Adaptado de (Watt, 1983; 2001; Arwert, Hoste *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Folículo piloso

Inseridos na epiderme interfolicular de maneira diagonal se encontram os folículos pilosos. Nos seres humanos podem ser classificados em dois tipos: lanugo (no recém nascido), que são pêlos finos e claros, e vellus (no adulto), mais grossos e com mais pigmento (sombrancelha, região pubiana e escalpo) (Schmidt-Ullrich e Paus, 2005). Nos murinos, a pelagem é composta por quatro diferentes tipos de pêlo denominados guarda (2-10%), sovela ou auchene (28%) e zigzag (70%). Os camundongos possuem ainda pêlos especializados como as vibrissas, popularmente conhecidas como bigodes, com função sensorial. Os diversos tipos de pêlo podem ser distinguidos pelo

tamanho, espessura (número de colunas medulares) e presença de curvas (Driskell, Clavel *et al.*, 2011).

A porção intraepitelial dos folículos pode ser dividida em duas partes: uma porção superior (mais próxima da superfície) que é permanente, conhecida como *infundibulum* e se estende do ducto da glândula sebácea até a superfície da epiderme, estrutura que contém ainda a região do *isthmus*, local de inserção do músculo eretor do pêlo, e a estrutura denominada de *bulge*, uma extensão convexa que abriga células-tronco epidermais foliculares (Arwert, Hoste *et al.*, 2012). A parte inferior possui ciclos de crescimento e retração, sendo continuamente remodelada a cada ciclo capilar a partir do bulbo, região que está em contato com a papila dérmica (DP), a qual constitui um condensado de células mesenquimais. Durante o crescimento do folículo a papila dérmica se encontra confinada pelo bulbo, que contém queratinócitos da matriz do pêlo, os quais logo em seguida se diferenciam em todas as células que compõe esta estrutura (Schneider, Schmidt-Ullrich *et al.*, 2009).

Enquanto a epiderme interfolicular e a glândula sebácea estão sempre se auto-renovando, os folículos pilosos possuem um padrão de crescimento cíclico na vida pós-natal, com alternância entre crescimento e regressão (Stenn e Paus, 2001; Driskell, Clavel *et al.*, 2011). A fase de repouso é conhecida como fase de telogênese, a de crescimento como anagênese e a de regressão como catagênese (Muller-Rover, Handjiski *et al.*, 2001; Stenn e Paus, 2001). Durante a fase catágena, as células epiteliais na base do folículo sofrem apoptose, mas a DP permanece intacta e migra para cima. Esta situação persiste durante a telogênese. Em anagênese, as células presentes na base do folículo começam a proliferar, o que resulta em crescimento para baixo do folículo e envolvimento da DP pelo mesmo (Muller-Rover, Handjiski *et al.*, 2001).

1.2.2.1.1 Células-tronco epidermais foliculares (*bulge*)

Experimentos utilizando pulsos de BrDU *in vivo* foram os primeiros a demonstrar que além da epiderme interfolicular havia retenção de marcação em células na região intermediária do folículo piloso, indicando a presença de células quiescentes (Cotsarelis, Sun *et al.*, 1990). A confirmação da natureza desta região como um nicho de células-tronco foi realizada através de experimentos de “lineage tracing” utilizando vetores regulados por tetraciclina que expressavam a proteína de fluorescência GFP e permitiram identificar a contribuição destas células durante a homeostase normal (Tumbar, Guasch *et al.*, 2004; Jaks, Barker *et al.*, 2008) ou reparo a danos neste tecido e carcinogênese (Youssef, Van Keymeulen *et al.*, 2010). Estas células foram subsequentemente identificadas pela presença de CD34 em sua membrana plasmática (Trempeus, Morris *et al.*, 2007) sendo que uma subpopulação das mesmas foram identificadas como positivas para o marcador Lrg5 (Jaks, Barker *et al.*, 2008).

1.2.2.2 Glândula sebácea e sudorípara

A maior parte das glândulas sebáceas são apêndices de folículos pilosos (Zouboulis, 2003). Elas são glândulas holócrinas, ou seja, o sebo produzido nas mesmas é uma mistura de ácidos graxos e conteúdo celular da própria glândula. A camada celular periférica é constituída por queratinócitos que expressam K14 e são cuboidais e indiferenciados. Ao longo de sua maturação os sebócitos se dirigem para o centro da glândula aumentando seu conteúdo de retículo endoplasmático e Golgi, necessários para a síntese aumentada de lipídios. Eventualmente, essas células sofrem apoptose e liberam o sebo na superfície dos folículos e da epiderme (Strauss, 1974).

Em camundongos selvagens, as glândulas sudoríparas écrinas se encontram, predominantemente, nos coxins plantares e dígitos das patas (Kennedy, Sakuta *et al.*, 1984) ao contrário dos seres humanos, nos quais elas se distribuem de maneira homogênea por todo o corpo (Prasad e Shil, 1993). Sua principal função é a de termoregulação

através da secreção de suor (Sundberg e King, 1996). Camundongos apresentam glândulas sudoríparas apenas na superfície das patas dependendo primariamente da vasculatura das orelhas e cauda para a perda de calor (Matthias, Lockworth *et al.*, 2012).

1.3 Derme

A derme é um tecido conectivo fibroelástico, podendo ser subdividida em duas regiões: a derme papilar e reticular. Ambas são compostas por fibras colagênicas e elásticas (fibrilina e elastina), além de um gel interfibrilar de glicosaminoglicanos e proteoglicanos que são sintetizados por fibroblastos (Groves e Brown, 1972). A derme papilar se encontra imediatamente abaixo da epiderme, possuindo sistema linfático e circulatório associados. A derme reticular é mais próxima da hipoderme e possui uma estrutura de matriz extracelular mais densa, sendo muitas vezes avascular e acelular. A derme possui ainda células do sistema imune tais como mastócitos e macrófagos, além de uma intrincada rede de nervos (Hendrix, Picker *et al.*, 2008).

1.3.1 Células-tronco da papila dérmica do folículo (SKPs)

Fernandes e colaboradores demonstraram em 2004 que a papila dérmica do folículo piloso é um nicho de células-tronco (Fernandes, Mckenzie *et al.*, 2004). Estas células, denominadas células precursoras da pele (SKPs), foram isoladas inicialmente por Toma e colaboradores, utilizando condições seletivas de cultura, nas quais estas crescem na forma de colônias (“*clusters*”) em suspensão nestina-positivas (Toma, Akhavan *et al.*, 2001). Estas células podem ser expandidas *in vitro*, sendo que seus limites de proliferação ainda não foram determinados (Kawase, Yanagi *et al.*, 2004). As SKPs seriam células originadas diretamente da crista neural. Durante a embriogênese, estas células migrariam para a derme e lá permaneceriam, indiferenciadas, até a fase adulta do indivíduo (Fernandes, Mckenzie *et al.*, 2004; Wong,

Paratore *et al.*, 2006). Estas células são capazes de se diferenciar nos diversos tipos celulares originados de células da crista neural, como: neurônios periféricos, células da glia, células musculares lisas e células de Schwann (Fernandes, McKenzie *et al.*, 2004; Kawase, Yanagi *et al.*, 2004). SKPs podem ser geradas não só a partir da pele de roedores, mas também a partir do folículo capilar humano (Hunt, Morris *et al.*, 2008). A observação de que SKPs podem ser isoladas a partir da pele dorsal do tronco (Biernaskie, Paris *et al.*, 2009) é surpreendente porque estas células dérmicas multipotentes foram anteriormente identificadas como derivadas da crista neural enquanto que a derme do corpo dos mamíferos (ao contrário da cabeça) é integralmente gerada a partir da mesoderme (dermomiótomo), sugerindo que estas células-tronco migram durante a embriogênese para ocupar este nicho (Driskell, Clavel *et al.*, 2011).

1.3.2 Células-tronco mesenquimais da derme

As células-tronco mesenquimais (MSCs do inglês *mesenchymal stem cells*) são clonogênicas, ou seja, apresentam, *in vitro*, unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFUs, do inglês *colony forming unit*) e multipotentes, com capacidade de auto-renovação e diferenciação em diversas linhagens celulares (Caplan, 2005) (Figura 3). Nos últimos anos, foi descrito que essas células podem ser isoladas a partir de virtualmente todos os tecidos, dentre eles a medula óssea, córnea, retina, polpa dentária, tecido adiposo, fígado e pele, entre outros (Da Silva Meirelles, Chagastelles *et al.*, 2006). Devido à facilidade de isolamento e potencial de diferenciação as MSCs apresentam grande apelo para a introdução na clínica médica através do uso em terapias celulares (Le Blanc e Pittenger, 2005). As MSCs são células fusiformes, com formato semelhante a fibroblastos devendo apresentar, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular três critérios básicos para poderem ser classificadas como tal: aderência a superfície do plástico; expressão positiva de um perfil de moléculas de superfície (em geral mas não somente CD105, CD73, CD90 e CD49) e

expressão negativa (em geral mas não somente CD45, CD31, CD34 e CD14) e potencial de diferenciação osteogênico, condrogênico e adipogênico (Dominici, Le Blanc *et al.*, 2006).

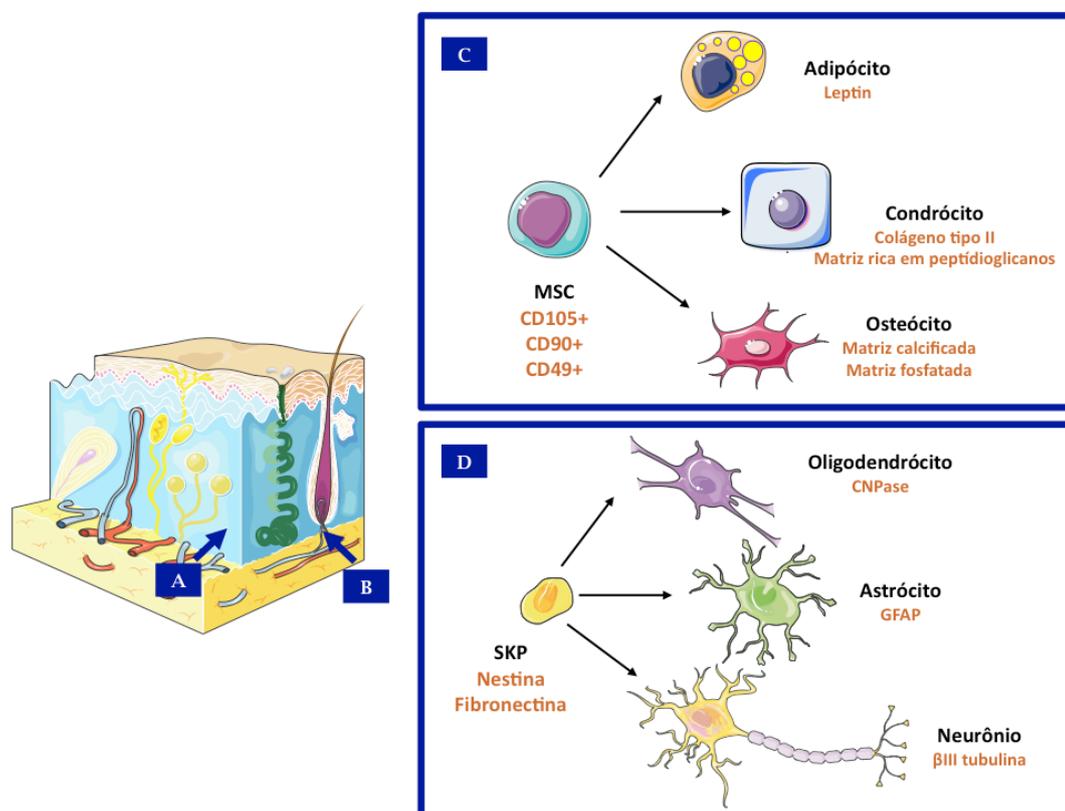


Figura 3: Células-tronco presentes na Derme - (A) Nicho das Células-tronco mesenquimais dermais, estas células quando isoladas são capazes de se diferenciar *in vitro* nos clássicos tipos celulares associados a células estromais do mesênquima (C), ou seja, adipócitos, condrócitos e osteócitos; (B) Nicho das Células-tronco precursoras da pele (SKPs) a região denominada de papila dérmica do folículo piloso e as células nas quais estas podem se diferenciar *in vitro* (D) neurônios e células da glia (oligodendrócitos e astrócitos). Os marcadores de cada tipo de diferenciação estão representados à direita. Adaptado de (Fernandes, Mckenzie *et al.*, 2004; Da Silva Meirelles, Chagastelles *et al.*, 2006; Dominici, Le Blanc *et al.*, 2006).

1.3.2.1 Diferenciação osteogênica e formação do tecido ósseo

Durante a embriogênese, o tecido ósseo é formado através de dois processos, que envolvem a transformação de um tecido mesenquimal, previamente formado, em tecido ósseo. A diferenciação

direta de células mesenquimais em osteoblastos é chamada ossificação intramembranosa, originando os ossos achatados do corpo, como, por exemplo, os ossos do crânio (Opperman, 2000). A outra forma é a ossificação endocondral ou intracartilaginosa, que ocorre por substituição de um molde cartilaginoso por osso, originando a maioria dos ossos do corpo, como, por exemplo, o fêmur, o úmero e a tibia (Ornitz e Marie, 2002).

Os precursores mesenquimais são capazes de recapitular *in vivo* e *in vitro* praticamente todas as etapas da ossificação intramembranosa e gerar osteoblastos, embora raramente alcancem a diferenciação terminal (Morikawa, Mabuchi *et al.*, 2009; Long, 2012) (Figura 4). Os osteoblastos produzem uma combinação única de matriz extracelular que inclui osteocalcina, fosfatase alcalina e grande quantidade de colágeno tipo I. A matriz extracelular é subsequentemente mineralizada através do acúmulo de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita (Morikawa, Mabuchi *et al.*, 2009).

A diferenciação de osteoblastos a partir de progenitores mesenquimais requer a atividade de fatores de transcrição específicos, como por exemplo SOX9, que é um fator de transcrição expresso por todos os progenitores de osteoblastos, sendo também expresso por células progenitoras comprometidas com o destino condrocítico. Ainda há divergência na literatura, mas acredita-se que células SOX9+ se constituiriam em progenitores bipotentes sendo expresso na primeira etapa de comprometimento e não sendo um bom marcador de diferenciação terminal (Akiyama, Kim *et al.*, 2005).

Runx2, um fator de transcrição contendo um domínio Runt é indispensável para a diferenciação intramembranosa dos osteoblastos (Long, 2012). A deleção homozigótica de Runx2 em camundongos resulta em perda completa de osteoblastos (Komori, Yagi *et al.*, 1997). Além de necessário para a diferenciação osteoblástica, Runx2 é essencial para a funcionalidade de osteoblastos maduros, incluindo a síntese da matriz do osso (Ducy, Starbuck *et al.*, 1999).

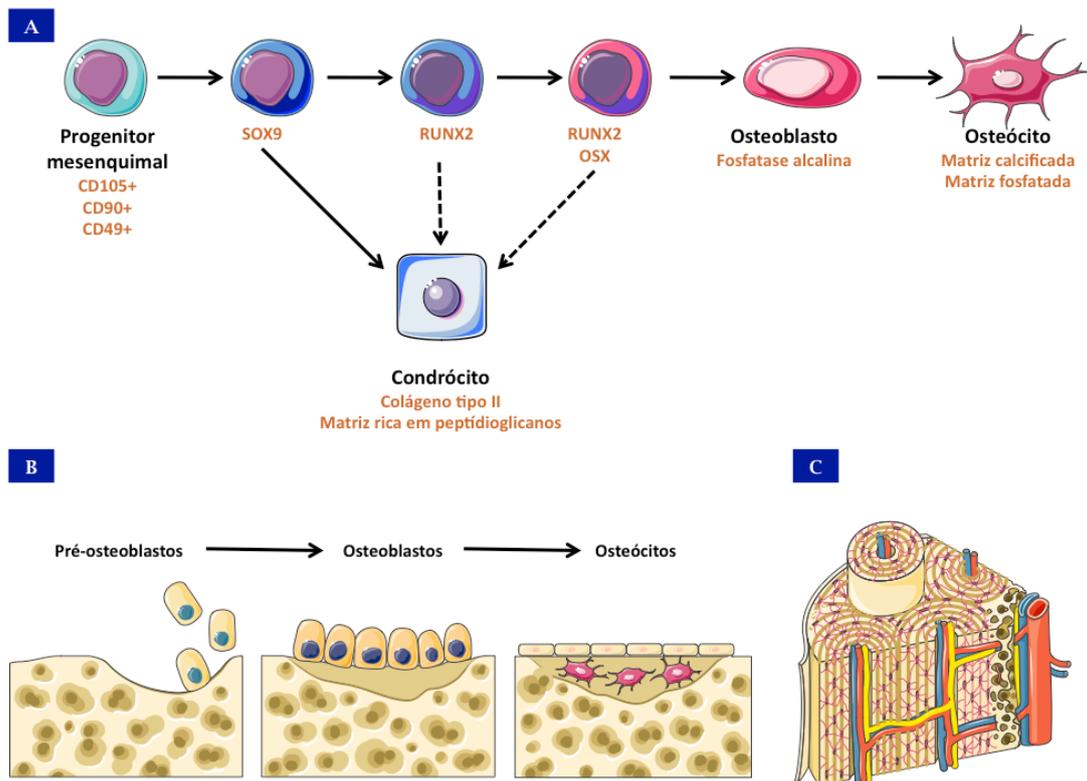


Figura 4: Etapas da diferenciação óssea *in vitro* e *in vivo* - (A) Principais marcadores moleculares das diferentes etapas da diferenciação osteogênica; (B) Esquema demonstrando que as mesmas etapas são recapituladas *in vivo* até a formação final (C) de um osso derivado de ossificação intramembranosa.

Diversos fatores de transcrição tem sido descritos por interagirem com Runx2 durante o processo de osteogênese tornando o mesmo um regulador central do processo. Dentre estes destacam-se: GLI2, Dlx5 e MSX2, que atuam de maneiras diferentes, seja aumentando a expressão de Runx2 ou agindo como co-ativadores (Lee, Kim *et al.*, 2005; Long, 2012). Descoberto como um gene induzido por BMP em células progenitoras de osso, C2C12, o fator de transcrição OSX, quando suprimido, leva à ausência completa de osteoblastos em embriões de rato, apesar da expressão relativamente normal de Runx2, indicando sua atividade como sendo a jusante deste gene (Nakashima, Zhou *et al.*, 2002).

Outro gene envolvido na formação óssea é o fator de transcrição da família *Forkhead homeobox type O* (FOXO) que se mostrou essencial para a síntese de proteínas e a proteção contra o estresse oxidativo

durante a osteodiferenciação. (Ambrogini, Almeida *et al.*, 2010; Rached, Kode *et al.*, 2010)

1.4 Desenvolvimento embrionário da pele

A pele é um órgão de origem mista, sendo que a epiderme e seus apêndices tem origem ectodérmica enquanto que a derme pode ser gerada tanto do mesoderma quanto da crista neural (Figura 5) (revisado em (Forni, Trombetta-Lima *et al.*, 2012). Em camundongos, uma camada unicelular de células ectodérmicas surge no dia embrionário 9.5 (E9.5) se estendendo até E12.5. As células do mesênquima subjacente começam a interagir com a ectoderme e transmitir sinais que levam à estratificação, gerando o padrão de condensados que vão gerar os folículos pilosos (Koster e Roop, 2007).

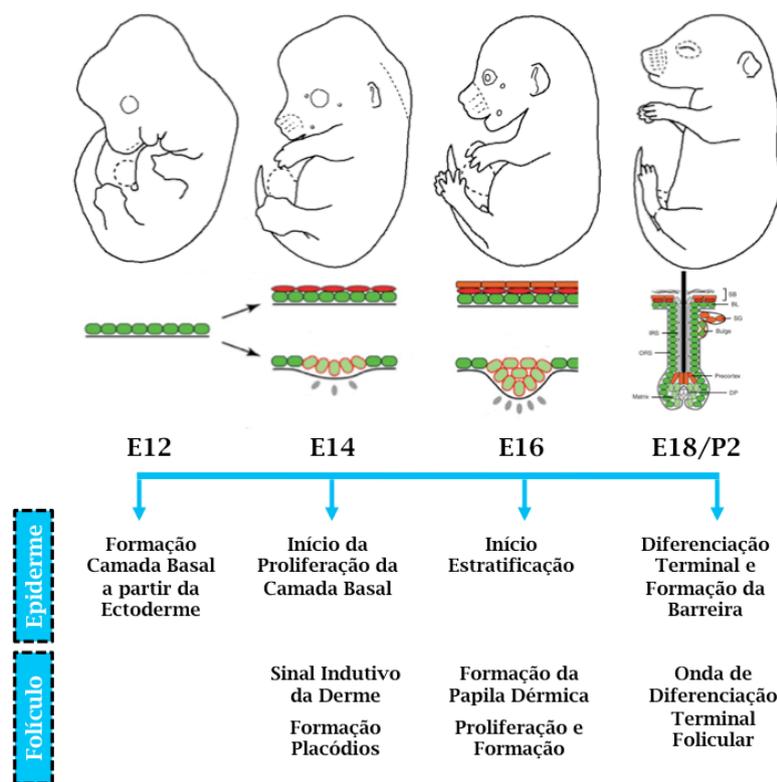


Figura 5: Principais eventos da embriogênese da Epiderme e do Folículo Piloso.

Adaptado de (Benitah e Frye, 2012; Forni, Trombetta-Lima *et al.*, 2012).

Em resposta, a camada basal da epiderme em estratificação gera a membrana basal, através da secreção de proteínas extracelulares e fatores de crescimento (Millar, 2002).

Durante os primeiros estágios de estratificação (E12.5) a epiderme é uma camada unicelular sendo coberta por uma camada rígida de células denominada periderme (M'boneko e Merker, 1988). A função da periderme ainda não é clara, mas é provável que a mesma forme uma barreira epidérmica precoce para proteger a pele em desenvolvimento da exposição constante ao fluido amniótico (Benitah e Frye, 2012). Uma vez que o programa de estratificação é concluído e a epiderme se encontra totalmente estratificada e diferenciada, a periderme é perdida (cerca de E17.5) (M'boneko e Merker, 1988).

O desenvolvimento do folículo piloso pode ser dividido em três estágios: formação do placóide folicular, organogênese folicular e diferenciação folicular. Estas três fases são subdivididas em oito fases morfológicas distintas (Schmidt-Ullrich e Paus, 2005; Schneider, Schmidt-Ullrich *et al.*, 2009). O primeiro estágio é caracterizado por um agrupamento de queratinócitos epidérmicos, que se tornam aumentados em volume e alongados, formando os placóides foliculares (Estágio 1, E14). Segue-se a agregação de fibroblastos induzidos formando um aglomerado com papel sinalizatório logo abaixo do placóidio. O *crosstalk* entre estas duas estruturas leva à proliferação de ambas as populações celulares (Mill, Mo *et al.*, 2003). Durante este processo, ocorre um crescimento epidérmico descendente que forma a papila dérmica, gerando uma nova estrutura denominada germe folicular (Estágio 2, E15.5). Os queratinócitos continuam seu crescimento até envolverem completamente a papila dérmica no estágio subsequente de cavilha (Estágio 3, E 16.5-E17.5). A raiz interna do pêlo é então formada e a cerda do pêlo começa a se diferenciar (Schmidt-Ullrich e Paus, 2005). Esses períodos de tempo são relativos para pêlos do tipo guarda; enquanto sovelas e auchenes iniciam seu desenvolvimento por volta de E15.5-E16.5, e os pêlos zigzag iniciam seu desenvolvimento em E17 e terminam somente uma semana depois

do nascimento (Fuchs e Raghavan, 2002).

1.5 Homeostase do tecido adulto e envelhecimento

A renovação celular é um fenômeno complexo que pode ser dividido em três processos: eliminação de células diferenciadas por morte celular programada; substituição destas células através da divisão celular, geralmente envolvendo células-tronco adultas e suas descendentes, e diferenciação de células recém-geradas e sua integração ao tecido pré-existente. A renovação celular é um meio fundamental de homeostase do tecido adulto em muitos órgãos, sendo que defeitos neste processo são responsáveis por muitas doenças na idade adulta, como o câncer e distúrbios degenerativos, podendo contribuir para o envelhecimento (Pellettieri e Sanchez Alvarado, 2007).

1.5.1 Envelhecimento intrínseco *versus* extrínseco

O envelhecimento pode ser dividido em dois processos interrelacionados (Giacomoni e Rein, 2004). O envelhecimento extrínseco ou fotoenvelhecimento da pele, causado por fatores ambientais, dentre os quais a exposição à radiação ultravioleta, leva a mudanças profundas na arquitetura do tecido conjuntivo, expressão alterada de metaloproteinases e colágeno da derme (Jenkins, 2002), as quais estão muito bem caracterizadas, não sendo abordadas no escopo desta tese.

O envelhecimento intrínseco ou cronológico é decorrente apenas das alterações fisiológicas ocasionadas pelo passar do tempo, caracterizando-se principalmente pela diminuição na taxa de proliferação e deficiência no reparo tecidual (Fisher, Kang *et al.*, 2002). Como são as principais responsáveis pela manutenção dos tecidos ao longo da vida dos mamíferos, as células-tronco têm sido relacionadas

com o processo de envelhecimento (Sharpless e Depinho, 2007a).

1.5.2 O papel das células-tronco no envelhecimento tecidual

Recentemente foi sugerido que alguns aspectos do envelhecimento de mamíferos acontecem a partir de um declínio associado à idade na função replicativa das células-tronco tecido específicas uma vez que estas são necessárias para a substituição do tecido ao longo da vida (Figura 6) (Sharpless e Depinho, 2007b).

Evidências suportam o modelo no qual as células-tronco são mantidas num estado quiescente em vários tecidos, mas podem ser induzidas de volta ao ciclo celular em resposta a sinais extracelulares, mesmo após períodos prolongados de dormência. Uma vez estimuladas a se dividir, as células-tronco produzem uma progênie indiferenciada que, por sua vez produz células efetoras diferenciadas através de ciclos subsequentes de proliferação (Sharpless e Depinho, 2004). Em condições de homeostase, há uma demanda proliferativa limitada, por isso estas células se encontram protegidas dos perigos da replicação do DNA na mitose. Além disso, por serem metabolicamente menos ativas no seu estado quiescente, as células-tronco podem ser submetidas a níveis mais baixos de subprodutos do metabolismo aeróbico, tais como as espécies reativas de oxigênio (Rossi, Bryder *et al.*, 2005).

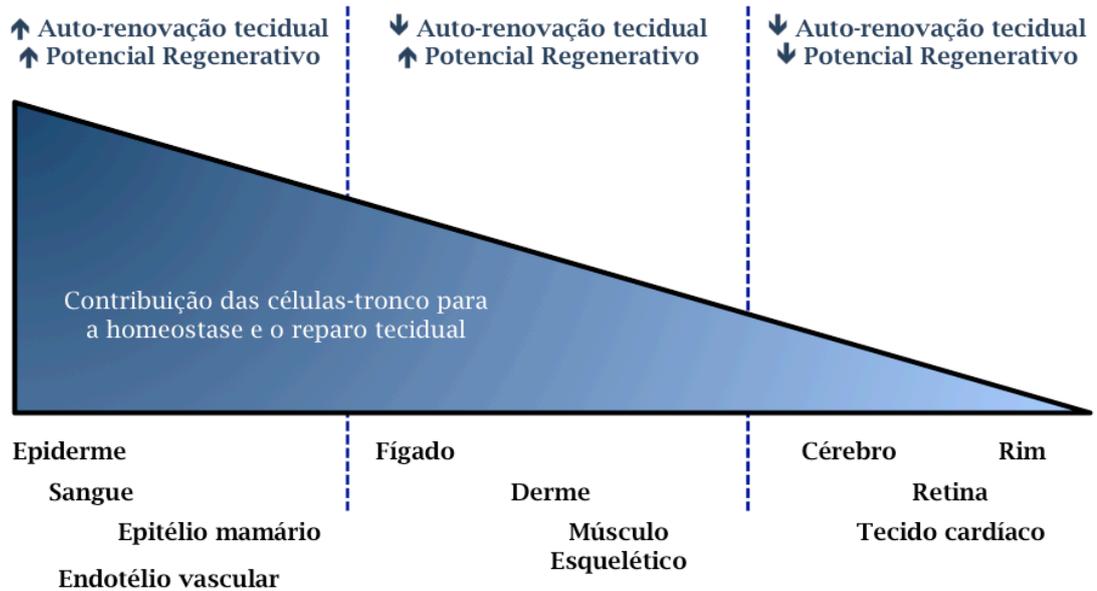


Figura 6: Representação gráfica da contribuição das células-tronco para a homeostase de diversos tecidos. Adaptado de (Sharpless e Depinho, 2007a).

O papel das células-tronco durante o envelhecimento é completamente dependente da dinâmica tecidual, ou seja, se o tecido exibe *turnover* celular elevado ou baixo e se, o potencial de regeneração em resposta ao dano é elevado ou insignificante (Rando, 2006). O papel das células-tronco nestas diferentes classes de tecidos é tão distinto que a extensão com que o envelhecimento é afetado pelo compartimento de células-tronco não pode ser extrapolado.

Ao longo deste espectro, os tecidos geralmente se encaixam em uma de três categorias: (I) Primeiro, os tecidos com altas taxas de auto-renovação (tal como pele, sangue e intestino) têm um compartimento proeminente de células-tronco e, por definição, elevada capacidade regenerativa. Nestes tecidos as células-tronco podem contribuir de modo significativo para o fenótipo do envelhecimento, como no caso do surgimento de cabelo grisalho que foi associado à uma diminuição da manutenção de células-tronco melanocíticas, em associação a um fenótipo de melanoblasto senescente (Nishimura, Granter *et al.*, 2005); (II) Segundo, tecidos com baixas taxas de auto-renovação, mas cujo

potencial regenerativo é alto podem usar estratégias diferentes para garantir reparação eficaz na lesão aguda. No músculo esquelético, por exemplo, miofibrilas diferenciadas não são capazes de proliferar para gerar novo tecido, mas as células-tronco residentes embora contribuam esporadicamente para a auto-renovação tecidual são mobilizadas eficientemente durante o reparo (Morgan e Partridge, 2003). No fígado, aparentemente, os hepatócitos diferenciados podem proliferar de modo suficiente para suprir a homeostase e o reparo normal do tecido (Sigal, Brill *et al.*, 1992), enquanto que as células-tronco são recrutadas apenas para o reparo de injúrias graves (Oh, Hatch *et al.*, 2002); (III) Terceiro, tecidos com baixo *turnover* e potencial regenerativo baixo podem ter células-tronco que medeiam apenas a reparação tecidual de forma limitada, como, por exemplo, no cérebro (Taupin e Gage, 2002) e coração (Leri, Kajstura *et al.*, 2005). Nestes tecidos, nos quais a maioria das células não são substituídas na vida adulta, o fenótipo envelhecido é melhor entendido em termos de alterações nestas células pós-mitóticas do que alterações no compartimento de células-tronco.

1.5.3 Envelhecimento e controle do Ciclo Celular

Como descrito anteriormente, em tecidos governados por altas taxas de reposição celular o envelhecimento tem como principal componente a diminuição da proliferação celular. Este evento se dá através da maquinaria molecular de controle do ciclo celular em mamíferos.

1.6 Controle do Ciclo Celular em Mamíferos

O ciclo celular de mamíferos é controlado por uma subfamília de quinases dependentes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*), cuja atividade é modulada por diversos ativadores (ciclinas) e

inibidores (CDKs, *cyclin-dependent kinases inhibitors*) (Malumbres e Barbacid, 2005). Em pontos de checagem (checkpoints), a célula pode parar ou prosseguir no ciclo, dependendo de certos fatores ambientais e endógenos, portanto o controle sobre a passagem entre G1/S e G2/M é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, por garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte. (Malumbres e Barbacid, 2009) (Figura 7).

Quando a célula permanece durante um período prolongado em G1 (frequentemente referido como G0) e necessita de fatores externos para reentrar no ciclo ela é tida como quiescente (Buczacki, Kemp *et al.*, 2012) ao contrário de uma célula senescente, que mesmo quando estimulada é incapaz de fazê-lo (Shin, Kim *et al.*, 2011).

A atividade das CDKs é dependente da associação com uma subunidade reguladora positiva pertencente à família das ciclinas, formando um complexo catalítico ciclina-CDK ativo (Sherr e Roberts, 1999). Os complexos ativos de ciclina e CDK por sua vez, atuam sobre uma macromolécula central do sistema de controle do ciclo celular, a proteína Rb (Koledova, Kramer *et al.*, 2010). Nas células que estão em G1 ou G0, Rb encontra-se em sua forma hipofosforilada. Nessa forma ativa, Rb seqüestra os fatores de transcrição da família E2F, bloqueando sua atividade sobre os promotores de diversos genes vitais para o prosseguimento de G1 e passagem de G1/S, tais como DNA polimerase e *c-myc* (Arden, 2006). Reprimindo a transcrição desses genes através da inativação de E2F a proteína Rb exerce um forte efeito supressor sobre o ciclo celular. O estímulo mitótico extracelular durante G1 implica na expressão de ciclina D que associa-se às moléculas de CDK4 ou CDK6 já presentes na célula. Uma vez formados, os complexos seqüestram e associam-se a proteína p21CIP1 da família Cip/Kip e à proteína p36, também denominada como PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), esse complexo é então fosforilado tornando-se ativo, quando então é capaz de iniciar a primeira onda de fosforilação da proteína Rb (Pietras, Warr *et al.*, 2011).

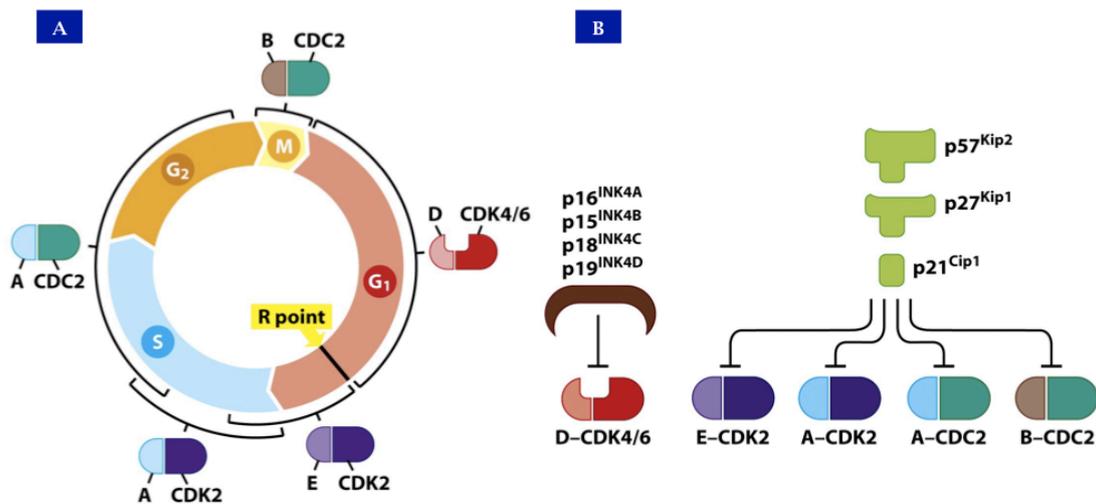


Figura 7: Eventos relacionados ao controle do ciclo celular. (A) Principais ciclinas (A,B,D e E) e quinases dependentes de ciclinas (CDK2,4 e 6) e seu papel regulatório nas diversas etapas de checagem; **(B)** Proteínas inibidoras do complexo ciclina-CDK. Adaptado de “The Biology of Cancer” (Garland Science 2007).

A fosforilação de pRb mediada pelo complexo ciclina D-CDK4/6 durante G₁ reduz sua afinidade pelos fatores de transcrição E2Fs. Isso resulta na liberação de uma onda de E2Fs que, agora livres da ação inibitória de Rb, exercem seu papel de ativadores da transcrição (Arden, 2006). Além de genes que regulam e participam da replicação do DNA, as proteínas E2Fs também induzem a transcrição dos genes das ciclinas A e E. A ciclina E se associa com CDK2 e colabora com os complexos ciclina D-CDK4/6 para fosforilar pRb durante a transição de G₁/S. A autosuficiência do complexo ciclina E-CDK2 em manter a fosforilação de Rb e a independência da atividade de ciclina D-CDK4/6 no processo caracterizam a passagem pelo ponto de restrição, uma vez que a expressão de ciclina E é regulada positivamente pela presença de E2F e não depende da sinalização extracelular, como ocorre com ciclina D. Posteriormente, a ciclina E é degradada e substituída pelas ciclinas A e B, que formarão complexo com CDK2 e CDK1 e serão responsáveis por manter a fosforilação de Rb durante S, G₂ e G₂/M (Conradie, Bruggeman *et al.*, 2010).

Uma vez adquirida a independência dos fatores extracelulares

após a passagem do ponto de restrição, a progressão pelo ciclo será mantida pela formação dos complexos ciclina-CDK e pela conseqüente fosforilação de RB em um sistema de *feedback* positivo, que independe de qualquer estímulo para continuar. Nessa condição, a parada do processo é realizada pela expressão de inibidores das CDKS, os CDKIs. Contrapondo a atividade dos complexos ciclina-CDK, os CDKIs regulam negativamente a continuidade do ciclo celular por impedir a fosforilação de Rb. Os CDKIs são classificados em dois grupos de acordo com os alvos de sua atividade inibitória.

O primeiro grupo, denominado INK4, compreende as proteínas p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c e p19INK4d (p19^{ARF} em camundongos), que inibem especificamente os complexos de ciclina formados com CDK4 e 6. As proteínas INK4 são induzidas quando há necessidade de parada em fases iniciais do ciclo celular, como nos casos de inibição por contato célula-célula, falta de nutrientes e/ou fatores de estímulo mitótico, na presença de TGF- β ou no processo de senescência. Essas proteínas, notadamente p16INK4a, são capazes de associar-se à porção não-catalítica da CDK4 e da CDK6, impedindo a formação de complexos ativos de ciclina D-CDK4/6 e impedindo a fosforilação de Rb durante G1 e G1/S (Campisi e Di Fagagna, 2007).

O segundo grupo de CDKIs, o Cip/Kip, é formado pelos CDKIs não específicos, capazes de inibir a formação de todos os complexos ciclina-CDK. Nesse grupo inclui-se as proteínas p21CIP1, p27KIP1 e p57 KIP2. Essas proteínas, notavelmente p21CIP1, apresentam importante atividade supressora por antagonizarem a atividade dos complexos formados com CDK 2 em S e G2 e com CDK1 em G2/M impedindo a fosforilação de Rb (Arden, 2006).

1.7 Envelhecimento e estresse oxidativo

Recentemente, tornou-se clara a participação de espécies reativas de oxigênio no controle da progressão do ciclo celular em células de mamíferos (Maryanovich e Gross, 2012; Verbon, Post *et al.*,

2012), o que pode ser um elo de ligação entre a teoria do envelhecimento causado por lesões oxidativas e a teoria do envelhecimento mediada pela exaustão tecidual de células progenitoras.

A teoria do envelhecimento mediada por radicais livres (“*Free Radical Theory of Ageing*”) é atualmente a mais aceita teoria sobre o envelhecimento, embora existam diversas outras, muitas vezes com diversos aspectos sobrepostos (revisado em (Kirkwood e Kowald, 2012). Esta teoria afirma que as células acumulam danos oxidativos ao longo do tempo, acumulando lesões em diversas moléculas que conduzem à perda de funcionalidade e à doença com o aumento da idade, levando ao envelhecimento (Hekimi, Lapointe *et al.*, 2011).

1.8 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) – Atuação Fisiológica e Estresse Oxidativo

As EROs são atualmente reconhecidas por desempenharem um papel duplo, podendo atuar tanto de forma benéfica quanto prejudicial aos sistemas vivos (Droge, 2002). Os efeitos fisiológicos das EROs ocorrem em concentrações baixas ou moderadas e estão envolvidos em uma série de vias de sinalização celular além da indução da resposta mitogênica (Valko, Rhodes *et al.*, 2006). O efeito nocivo das EROs, levando a danos biológicos potenciais, é denominado estresse oxidativo (Bergendi, Benes *et al.*, 1999). Isso ocorre em sistemas biológicos quando há uma superprodução de EROS e/ou uma deficiência nos sistemas antioxidantes celulares. A excessiva produção de EROs pode causar danos ao DNA, lipídios e proteínas celulares, inibindo suas funções biológicas (Bergendi, Benes *et al.*, 1999). A oxidação dos grupos tiol em resíduos de cisteína pode causar a formação de dissulfetos intra ou inter-proteínas e resultar em disfunção estrutural ou funcional de proteínas (Dalle-Donne, Scaloni *et al.*, 2005).

1.8.1 Espécies reativas de oxigênio

Durante o transporte de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria, o oxigênio molecular recebe quatro elétrons provenientes do complexo enzimático citocromo oxidase, gerando duas moléculas de água. Todavia, em uma pequena porcentagem das transferências, o O_2 é apenas parcialmente reduzido, o que provoca a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como, radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical livre hidroxila (HO^{\cdot}) (Halliwell e Gutteridge, 2007) (Figura 8).

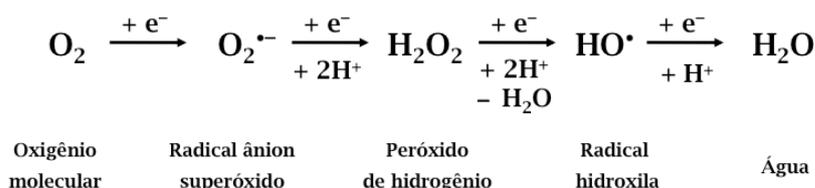


Figura 8 – Etapas da redução do Oxigênio Molecular. Adaptado de (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Durante essa transferência, uma pequena porção de elétrons é perdida em etapas intermediárias na cadeia de transporte de elétrons, principalmente nos complexos citocromo *bc1* (complexo III) e NADH: ubiquinona oxidoredutase sensível à rotenona (complexo I) em mamíferos (Kowaltowski, De Souza-Pinto *et al.*, 2009), levando à redução monoelétrica de O_2 , a qual resulta na formação de ânions de radical superóxido, que podem ser dismutados a H_2O_2 por ação de uma família de metaloenzimas conhecidas por superóxido dismutases (SODs)(Halliwell e Gutteridge, 2007).

Das EROs citadas acima, somente peróxido de hidrogênio não possui elétrons desemparelhados sendo, portanto, uma espécie não-radicalar. O radical livre hidroxila é uma das espécies químicas mais

reativas que se conhece, reagindo rápida e indistintamente com a maioria das biomoléculas. Comparado ao radical hidroxila, o radical ânion superóxido é muito menos reativo, porém, é capaz de lesar diversas enzimas e sua forma protonada pode iniciar a peroxidação de ácidos graxos. É crescente o número de evidências que indicam que a interação de EROs com biomoléculas está envolvida em vários processos patológicos como: arteriosclerose, diabetes, envelhecimento, distrofia muscular, injúria causada por isquemia-reperfusão e câncer (Halliwell e Gutteridge, 2007). Para combater os efeitos nocivos das EROs, os organismos possuem vários mecanismos de defesa antioxidante.

1.8.2 Sistema de defesa antioxidante enzimático

Os sistemas de defesa antioxidante de organismos aeróbicos incluem enzimas que removem EROs (sistema de defesa antioxidante enzimático, Figura 9) e compostos antioxidantes de baixa massa molecular que rapidamente reagem com as EROs (sistema de defesa antioxidante não enzimático).

A superóxido dismutase (SOD) foi uma das primeiras enzimas antioxidantes descritas, atuando especificamente na dismutação do radical ânion superóxido à peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Três diferentes SODs são conhecidas: a SOD de cobre e zinco (CuZnSOD, ou SOD1), presente em maior quantidade em eucariotos no citosol e em pequena quantidade em lisossomos, núcleo e no espaço intermembranas mitocondrial; a manganês SOD (MnSOD, ou SOD2), expressa em bactérias, plantas e mitocôndrias e a ferro SOD (FeSOD), encontrada em alguns tipos de bactérias, algas e plantas (Fridovich, 1995). Peróxido de hidrogênio, por sua vez, é normalmente removido por dois tipos de enzimas: catalases, que catalisam sua decomposição a oxigênio molecular e água; e peroxidases, que o removem com o auxílio de agentes redutores como, por exemplo, a glutathiona, utilizada como agente redutor de peróxido de hidrogênio

pela classe de enzimas das glutathiona peroxidases. Além de peróxido de hidrogênio, as glutathiona peroxidases também catalisam a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos sendo que em todos os casos, o hidroperóxido é reduzido ao álcool correspondente (Halliwell e Gutteridge, 2007). A reciclagem através da redução de GSSG para GSH pela enzima glutathiona redutase, mantêm a relação GSH/GSSG alta através do acoplamento da reação de redução de GSSG à custa da oxidação de NADPH.

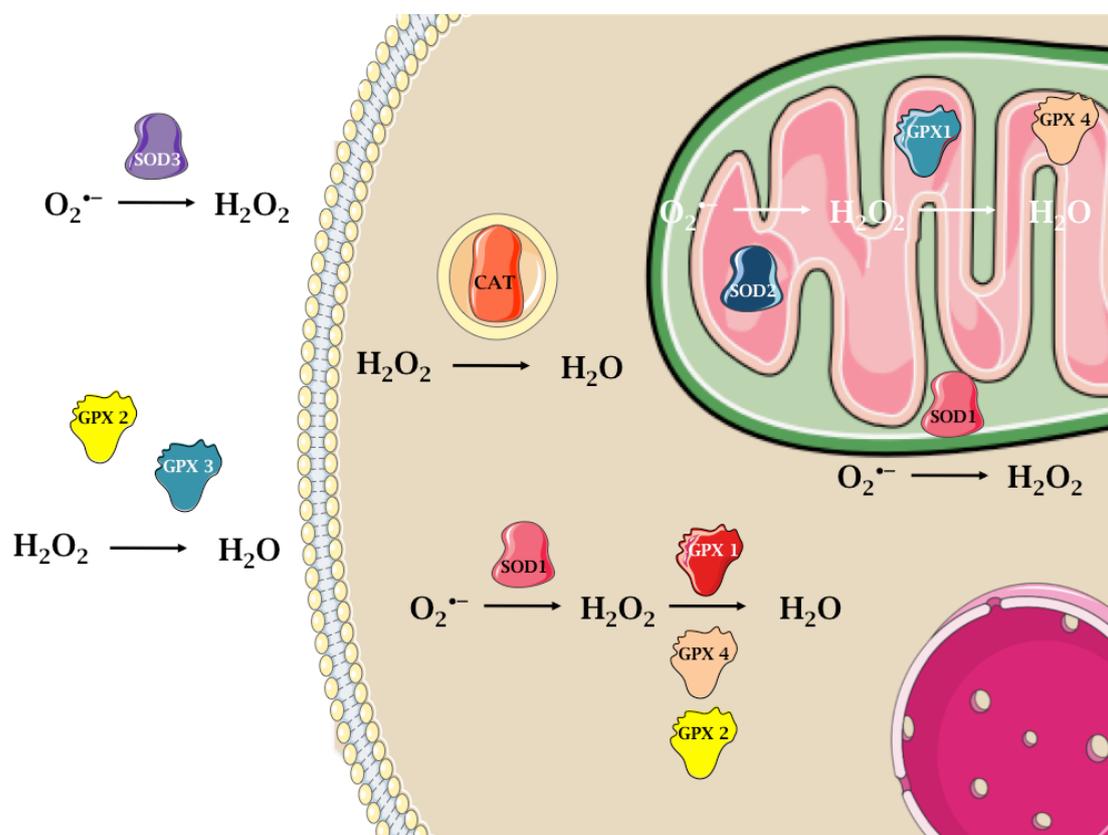


Figura 9: Compartimentalização das principais enzimas do sistema antioxidante em células de mamíferos. Adaptado de (Halliwell e Gutteridge, 2007), sendo que as informações sobre a localização celular das proteínas foram obtidas em Outubro de 2012, no site da UniProtKB/Swiss-Prot (<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>).

Uma outra classe de proteínas denominadas peroxirredoxinas possui capacidade de decompor hidroperóxidos à custa de redutores tiólicos (como tiorredoxina ou outros componentes contendo grupos sulfidríla), apresentando portanto, atividade peroxidase dependente de

tiól. Muitas dessas proteínas utilizam tiorredoxina como agente redutor, por isso, a maioria das proteínas da família das peroxirredoxinas é denominada tiorredoxina peroxidase (Chae e col., 1994c; Park e col., 2000).

1.8.3 Sistema antioxidante não-enzimático

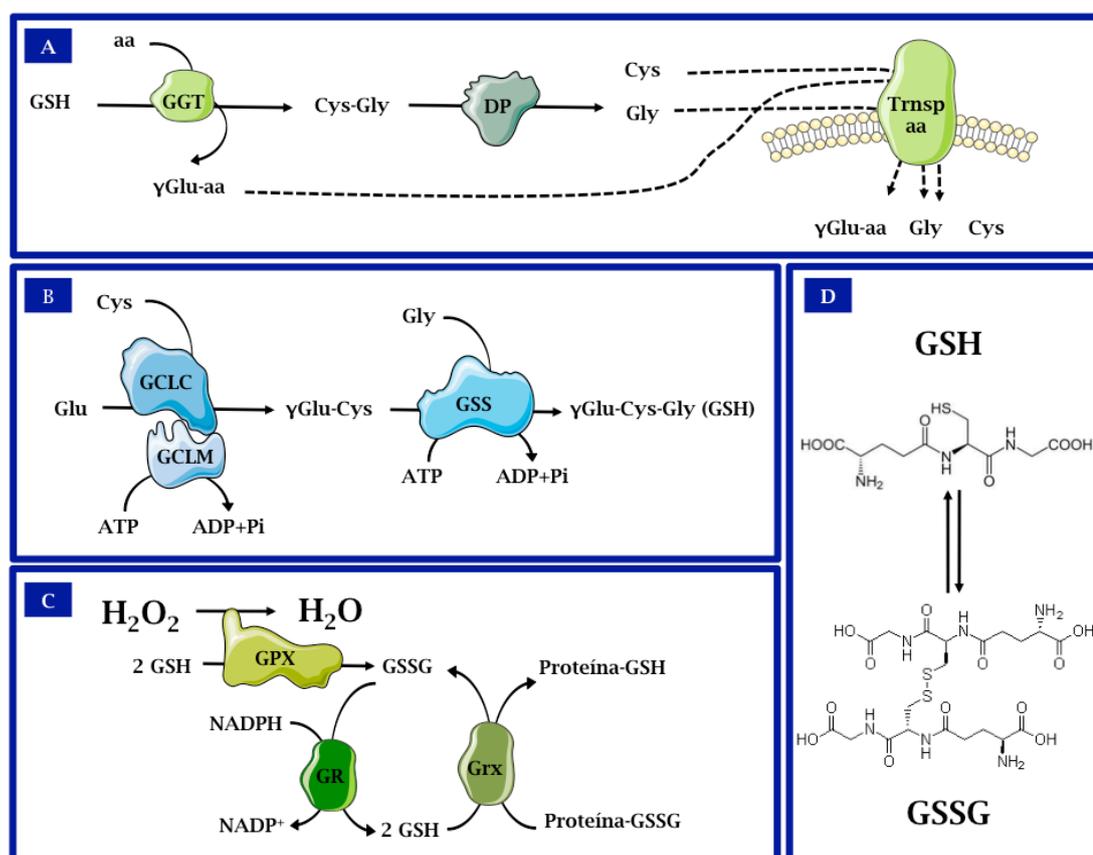
Os antioxidantes não enzimáticos mais representativos são a glutathiona (GSH), tiorredoxina (TRX), ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e ácido úrico, entre outros.

1.8.3.1 Glutathiona

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina que apresenta um grupo sulfidril essencial para a sua função redox, sendo considerado o mais abundante tiol intracelular, podendo atingir concentrações de 1-10 mM em muitos tipos diferentes de células (Will, 2001). Quando oxidada a glutathiona forma uma ligação do tipo ponte dissulfeto, gerando um dímero molecular (GSSG), sendo que a relação GSH/GSSG normalmente excede 10:1 (Griffith, 1999). Devido à sua abundância a GSH serve para proteger as células contra a toxicidade decorrentes da exposição a quantidades excessivas de eletrófilos endógenos e exógenos como, por exemplo, diversas formas de íons de metais pesados tóxicos (Meister, 1991) (Figura10).

Além disso, a GSH pode neutralizar radicais hidroxila e superóxido diretamente, e serve como um co-fator para as isoformas da enzima GPX, bem como de peróxidos lipídicos (Arthur, 2000), podendo também ser conjugada com uma grande variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, resultando na sua eliminação eficiente e segura, através da ação da família de enzimas glutathiona S-transferase (GST) (Rinaldi, Eliasson *et al.*, 2002).

A GSH é considerada não só um importante “tampão” redox celular mas, também, tem sido sugerida como tendo papel chave no destino da célula, sendo capaz de influenciar eventos como a determinação entre proliferação e morte (Jones, 2002; Watson, Chen *et al.*, 2003). A GSH também é capaz de regenerar às suas formas reduzidas outros antioxidantes importantes como as vitaminas C e E. Além de seu papel como um antioxidante importante, GSH foi descrita como sendo participante de outros processos fisiológicos, incluindo o metabolismo de nucleotídeos, a formação de segundos mensageiros lipídicos (Luthman, Eriksson *et al.*, 1979), a regulação da homeostase



do óxido nítrico (Hogg, 2002), e a modificação das atividades de algumas proteínas por modificações pós-traducionais (Pompella, Visvikis *et al.*, 2003).

Figura 10: Principais etapas da Homeostase da Glutathiona nas células de mamíferos – (A) Via de salvação/degradação extracelular de glutathiona; (B) Via de Biossíntese; (C) Principais enzimas antioxidantes que a usam como substrato; (D) Fórmula molecular da glutathiona e sua dimerização em glutathiona dissulfeto. GGT=γ-

glutamil-transpeptidase, **DP**= dipeptidase, **Trnsp aa**= transportador de aminoácidos, **GCLC**= subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase, **GCLM**= subunidade regulatória da glutamato-cisteína ligase, **GSS**= glutathione sintetase, **GPX**= glutathione peroxidase, **GR**= glutathione reductase, **Grx**= glutaredoxina. Adaptado de (Banerjee, 2008).

1.8.3.1.1 Biossíntese e Homeostase da Glutathione

GSH é sintetizada por duas reações enzimáticas sucessivas. A primeira reação condensa glutamato e cisteína, sendo catalisada pela glutamato-cisteína ligase (GCL, EC 6.3.2.2; anteriormente chamada γ -glutamylcysteinyl synthase), resultando na formação de γ -glutamylcysteinyl (γ -GC) (Meister, 1988). A segunda reação de ligação de γ -GC com glicina é catalisada pela Glutathione sintetase (GSS, EC 6.3.2.3) (Figura 10B). Ambas as reações consomem uma molécula de ATP por ciclo catalítico. A formação de γ -GC por GCL é considerado o passo limitante na síntese enzimática de GSH, isto porque γ -GC, o produto de GCL, está presente em concentrações extremamente baixas em células onde GSS está presente. Por esta razão, GCL, em vez de GSS foi o principal alvo de medicamentos destinados a inibir a biossíntese de GSH (Meister, 1991).

GCL tem natureza alostérica, sendo controlada de forma independente em vários níveis (Soltaninassab, Sekhar *et al.*, 2000). Em organismos eucarióticos a GCL na sua forma cataliticamente ativa é um heterodímero composto de uma subunidade catalítica (GCLC) e uma subunidade modificadora (GCLM), cada uma das quais é codificada por genes independentes. Para maior clareza, nesta dissertação, GCL se refere apenas à holoenzima heterodimérica. Como o próprio nome indica, GCLC possui toda a atividade catalítica da GCL e GCLM serve para alterar as características de cinética de GCLC. Relatos de diversas espécies de eucariotos apontam para o fato de que enquanto GCLC é inibida por concentrações fisiológicas de GSH, GCLM é refratária à essa inibição (Yang, Dieter *et al.*, 2002).

O acúmulo de GCLC e GCLM dentro das células é governado, em

grande parte, pela acumulação de seus mRNAs, o que por sua vez, é controlado tanto ao nível de transcrição como ao nível da estabilidade do mRNA (Wild e Mulcahy, 2000).

1.8.3.1.2 Compartimentalização intracelular e degradação da Glutathiona

Os dados disponíveis na literatura indicam que a maioria se não toda a atividade biossintética de GSH reside no citoplasma (Meister, 1982), sendo que a GSH citosólica é ainda distribuída em organelas intracelulares, incluindo retículo endoplasmático, mitocôndrias e núcleo (Soderdahl, Enoksson *et al.*, 2003).

A reação catalisada pela GCL forma uma ligação amida única entre o carbono γ da cadeia lateral do glutamato e o grupo amino da cisteína, resultando em uma ligação γ -glutamil (Figura 10A). Como consequência, GSH não pode ser discriminada por peptidases dentro da célula, mas sim transportada através da membrana plasmática para fora da célula onde é metabolizada pela γ -glutamil transferase (GGT, EC 2.3.2.2) (Meister, 1988).

1.9 Vias de sinalização redox

A razão entre a forma reduzida (GSH) e a forma oxidada (GSSG) da glutathiona é um dos fatores determinantes do estado redox intracelular (Jones, 2002). Recentemente, o estado redox intracelular tem sido considerado como um mediador da atenuação ou exacerbação da resposta de transdução de sinais nas células de mamíferos (Passos e Von Zglinicki, 2006).

Cascatas de transdução de sinal são rápida e reversivelmente ativadas pelos agonistas específicos portanto oxidantes empregados

fisiologicamente em transdução de sinal devem exibir especificidade de substrato e serem capazes de produzir oxidações reversíveis. Espécies altamente reativas, tais como o peroxinitrito e o radical hidroxila, são capazes de oxidar biomoléculas sem preferência ou especificidade sendo, portanto, mediadores improváveis para a sinalização fisiológica, embora as espécies acima mencionadas possam levar a modificações de proteínas e à ativação aberrante de cascatas de transdução de sinal, muitas vezes resultando em quadros patológicos. Já espécies como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico são capazes de elicitar modificações reversíveis em proteínas em resíduos de cisteína, mediando diversas respostas fisiológicas nos organismos biológicos (Janssen-Heininger, Mossman *et al.*, 2008).

As EROs já foram implicadas na transdução de sinal das principais vias celulares como por exemplo MAPK, PI3K e NFκB entre outras (revisado em (Ray, Huang *et al.*, 2012). Um papel proeminente e muito estudado da regulação da sinalização por mecanismos dependentes do potencial redox intracelular é a via da PI3K e sua principal quinase Akt (PKB) e os fatores de transcrição efetores das respostas a elas associadas, principalmente os membros da família de fatores de transcrição FOXO (Filomeni, Rotilio *et al.*, 2002; Leslie, 2006).

1.10 Fatores de transcrição Forkhead homeobox type O (FOXO)

Os fatores FOXO emergiram recentemente na literatura como um ponto de convergência de sinalização em resposta à estimulação por fatores de crescimento e estresse oxidativo (Brunet, Sweeney *et al.*, 2004; Essers, Weijzen *et al.*, 2004), podendo integrar sinais divergentes através de modificações pós-traducionais, tais como a fosforilação, acetilação, e mono/poli-ubiquitinação, resultando em localização subcelular alterada, estabilidade alterada da proteína, propriedades de ligação ao DNA e da atividade transcricional alteradas (Matsuzaki,

Daitoku *et al.*, 2005; Van Der Horst, De Vries-Smits *et al.*, 2006).

Os mamíferos têm quatro isoformas da família dos fatores de transcrição *Forkhead homeobox type O*: FoxO1, FoxO3, FoxO4 e FoxO6 (Salih e Brunet, 2008). As isoformas 1, 3 e 4 são fundamentalmente reguladas por fosforilação dependente de Akt, em resposta a fatores de crescimento, em três resíduos específicos (Thr32, Ser253 e Ser315 para a isoforma humana FOXO3) (Brunet, Bonni *et al.*, 1999; Salih e Brunet, 2008). A fosforilação Akt-dependente promove a saída de FOXO do núcleo para o citoplasma reprimindo, assim, sua função transcricional (Brunet, Kanai *et al.*, 2002) Na isoforma FOXO6 falta uma porção do C-terminal que contém o sítio de fosforilação por Akt sendo assim, predominantemente, nuclear, embora a fosforilação dos dois resíduos restantes Akt-dependentes iniba a atividade de transcrição de FOXO6 (Jacobs, Van Der Heide *et al.*, 2003) (Figura 11).

Uma miríade de genes-alvo foram identificados como alvos para estes fatores envolvidos nos mais diversos processos celulares. Os mais bem definidos genes FOXO-dependentes incluem os inibidores do ciclo celular p27 e p21, os genes de resposta ao estresse oxidativo manganês superóxido dismutase (MnSOD) e o fator proapoptótico BIM (Dijkers, Medema, Lammers *et al.*, 2000; Dijkers, Medema, Pals *et al.*, 2000; Schmoll, Walker *et al.*, 2000; Kops, Dansen *et al.*, 2002).

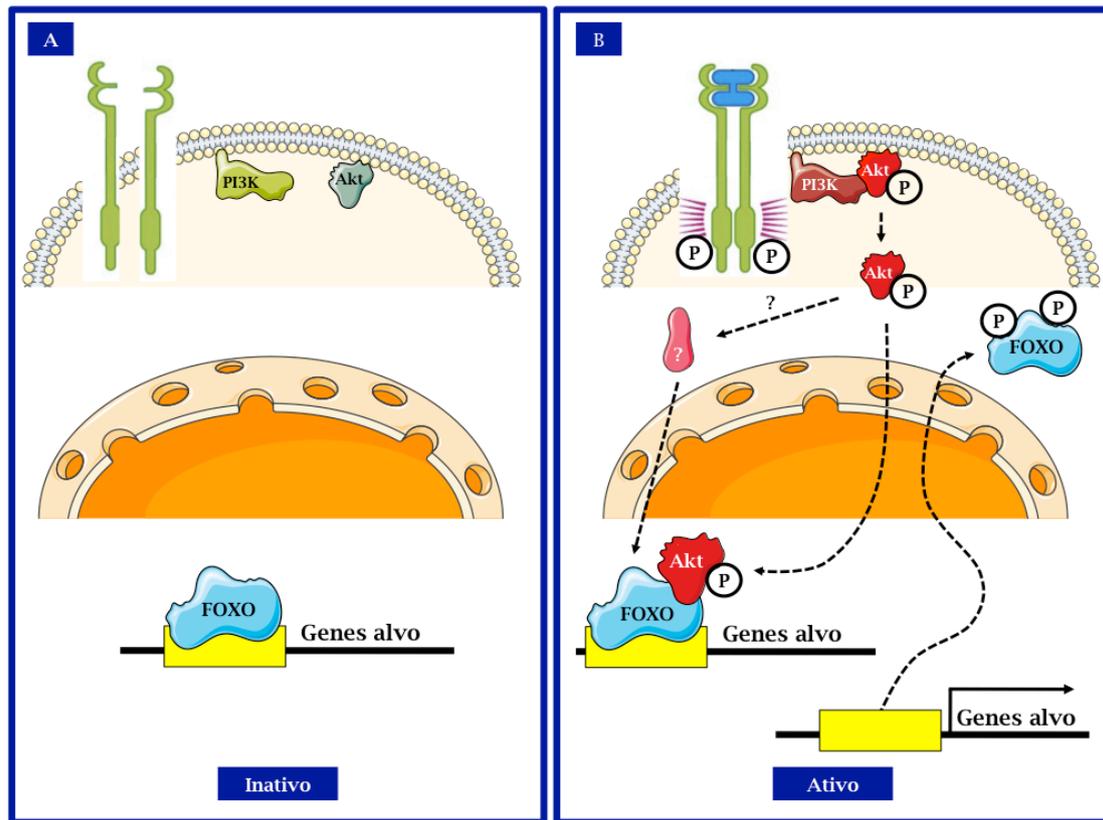


Figura 11: Esquema simplificado do eixo de sinalização PI3k/Akt/FOXO - (A) Quando se encontra ligado ao promotor de genes alvo, o fator de transcrição tem papel predominantemente inibitório da atividade transcricional; (B) Uma vez fosforilado por Akt o mesmo é endereçado para fora do núcleo e ocorre a ativação da transcrição dos genes alvo. Adaptado de (Salih e Brunet, 2008).

Nos mamíferos, os membros da família FOXO tem um padrão de expressão complementar mas que se sobrepõe, tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto numa variedade de tecidos adultos (Furuyama, Nakazawa *et al.*, 2000; Biggs, Cavenee *et al.*, 2001; Hoekman, Jacobs *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento murino, FOXO1 é detectado em níveis mais elevados no tecido adiposo, FOXO3 é mais expresso no fígado, FOXO4 no músculo esquelético e FOXO6 no sistema nervoso central. Em camundongos adultos, FOXO1 é observada em níveis mais altos no tecido adiposo, útero e ovários, com níveis mais baixos na maioria dos outros tecidos, incluindo o músculo esquelético e o baço. O padrão de expressão de FOXO3 é mais ubíquo sendo mais expresso no cérebro, baço, coração, e ovários. FOXO4 é preponderantemente expresso em músculo esquelético, músculo cardíaco e tecido adiposo (Furuyama, Nakazawa *et al.*, 2000; Biggs,

Cavenee *et al.*, 2001). Curiosamente, FOXO6 é expresso quase que exclusivamente no cérebro adulto (Hoekman, Jacobs *et al.*, 2006).

A expressão de FOXO1 e FOXO3 em tecidos humanos é semelhante para os perfis de expressão em murinos (Su, Cooke *et al.*, 2002). Nestes estudos não foi avaliada a expressão desta família de fatores de transcrição na pele (epiderme/derme) durante o desenvolvimento embrionário ou em adultos embora existam alguns poucos relatos da sua expressão em fibroblastos derivados da pele em senescência (Kyoung Kim, Kyoung Kim *et al.*, 2005).

Dependendo do contexto celular, o estresse oxidativo pode levar a um aumento da atividade de Akt ou ainda inibir sua atividade de quinase em diversos substratos (Storz, 2011). Esse papel dual também se reflete na participação de FOXO, havendo relatos de que esses fatores de transcrição podem ser vistos como sensores para estresse oxidativo, uma vez que sua atividade é regulada por H_2O_2 e, dependendo do contexto celular, podem induzir apoptose, resistência ao estresse, ou senescência (Paik, Kollipara *et al.*, 2007a).

Além de regular uma série de respostas em células diferenciadas, os fatores de transcrição da família FOXO também atuam como reguladores importantes de células-tronco em tecidos adultos como por exemplo, na medula óssea (Tothova, Kollipara *et al.*, 2007). A atividade de transcrição mediada por FOXO é atenuada em progenitores e em células tumorais por uma variedade de mecanismos, incluindo: a exclusão nuclear mediada pela fosforilação via PI3K/AKT (Seoane, Le *et al.*, 2004); a associação destes fatores com o repressor transcricional FoxG e a degradação ubiquitina-dependente de fatores FOXO após fosforilação por IKK β ou ERK (Hu, Lee *et al.*, 2004; Yang, Zong *et al.*, 2008).

O papel da família FOXO em outras células-tronco adultas ainda não é conhecido, mas uma possibilidade intrigante é a de que possam contribuir para a manutenção e reparo de tecidos durante o envelhecimento através da manutenção de populações de células-tronco adultas (Salih e Brunet, 2008). Da mesma forma, não é claro

porque existem quatro isoformas de FOXO, embora existam evidências (pelo menos para o sistema vascular) sugerindo que seus papéis não são totalmente sobrepostos (Paik, Kollipara *et al.*, 2007b). Um modelo que emerge é o de que as diferentes isoformas de FOXO se ligam aos promotores dos genes com diferentes afinidades devido a modificações pós-traducionais, embora o papel de alterações induzidas por estresse oxidativo ainda são desconhecidas (Salih e Brunet, 2008).

A partir deste apanhado de resultados disponíveis na literatura pode-se constatar que o papel da homeostase intracelular de glutathiona sobre a potencialidade, diferenciação e o envelhecimento de células-tronco é um tema relativamente inexplorado, em especial se forem focalizados os progenitores provenientes da pele. É ainda obscura a participação deste tiol como um mediador de respostas de transdução de sinal nos eventos supracitados e seu papel na ativação do eixo Akt/FOXO. O mesmo pode ser especulado para seu papel sobre células-tronco durante o envelhecimento.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar as bases moleculares do envelhecimento intrínseco da pele através da análise dos efeitos do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre o comprometimento, potencialidade e diferenciação de células-tronco de pele *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Objetivos Específicos

Estabelecimento de modelo experimental murino e humano

- Isolar três populações de células-tronco de pele murina, estabelecendo assim, um modelo reprodutivo e consistente para os demais objetivos deste trabalho.
- Caracterizar a expressão de marcadores moleculares específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento *in vitro* destas três populações celulares.
- Isolar progenitores de derme humana de doadores pertencentes a três faixas etárias diferentes (jovem, adulto e idoso).
- Caracterizar a expressão de marcadores moleculares específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento *in vitro* dos progenitores dérmicos humanos.
- Padronizar o cultivo desses progenitores em bioreator, visando o aumento da massa de células disponível para a terapia celular. Avaliar os possíveis efeitos deletérios deste processo sobre o potencial de diferenciação e expressão de marcadores.

Objetivos contemplados na seção 4.1 de Resultados.

Avaliação do papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a diferenciação osteogênica de progenitores dermais murinos *in vitro*.

- Comparar o perfil de expressão de componentes do sistema antioxidante enzimático e não-enzimático em precursores mesenquimais de derme e em osteoblastos gerados a partir da diferenciação das mesmas.
- Avaliar o papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada durante o processo de diferenciação osteogênica.
- Avaliar a participação e contribuição das vias de Akt e MAPK durante o processo de diferenciação osteogênica e seu comportamento durante alterações resultantes da mudança do potencial redox ao longo deste processo.

Objetivos contemplados na seção 4.2 de Resultados.

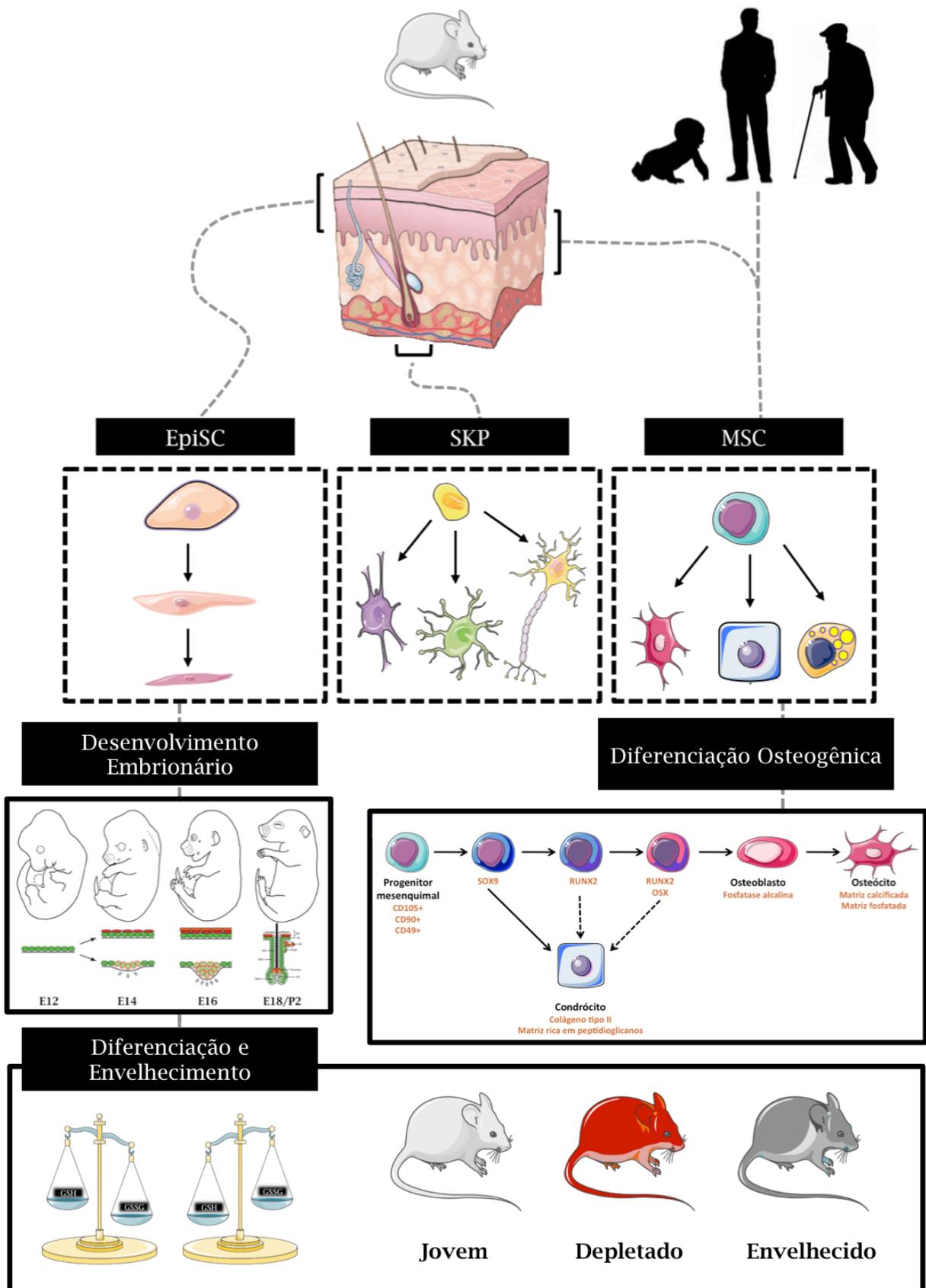
Avaliação do papel do balanço GSH/GSSG ao longo do desenvolvimento embrionário da pele murina e na manutenção da homeostase deste tecido no adulto - possíveis correlações entre o processo de envelhecimento da epiderme e a depleção de glutathiona

- Avaliar o papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada no comprometimento e desenvolvimento de precursores epidermais ao longo da embriogênese.
- Avaliar o papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais murinas adultas *in vivo* e *in vitro*.
- Analisar a participação do estado de fosforilação de Akt e seu impacto sobre o perfil de fosforilação dos constituintes da família de fatores de transcrição FoxO durante esse processo.
- Tentar avaliar o papel da depleção de glutathiona para o fenótipo do envelhecimento, correlacionando eventos compartilhados partilhados por esses dois processos e seus efeitos sobre a

arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais murinas *in vivo*.

- Analisar o *status* e a expressão dos principais componentes do ciclo celular entre estes grupos, na busca de reguladores do ciclo que sejam comuns aos processos de estresse e envelhecimento.

Objetivos contemplados na seção 4.3 de Resultados.



Organograma 1: Seções abordadas neste trabalho.

3. Material e Métodos

3.1 Soluções e meios de cultura para células de mamífero

Meios de cultura:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

CMRL - Meio utilizado para a coleta de explantes murinos e humanos (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), acrescido de Hepes 10mM.

DMEM:F12 1:1 sem vermelho fenol e com glutamina - Meio utilizado para o crescimento em frascos *Spinners* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

KSFM (Keratinocyte Serum Free Medium) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA)

FAD medium (+/- Ca²⁺) - Meio de cultivo baseado em α MEM customizado para células-tronco epidermais (Nowak e Fuchs, 2009).

Soluções:

Solução salina: PBSA (Phosphate Buffered Saline - sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7,2, composta por NaCl 140mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8mM e KH₂PO₄ 1,5mM.

Tripsina: solução 0,1% de tripsina (Life Technologies) em PBSA contendo EDTA 1mM (pH 8,0).

Solução Versene: EDTA 5mM (pH 8,0) em PBSA.

Suplementos:

Soro fetal bovino: SFB (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil).

Soro fetal bovino validado para o cultivo de células-tronco (utilizado nos experimentos de crescimento em frascos *spinners*): Fetal Bovine Serum, Mesenchymal Stem Cell Qualified (Life Technologies, USA)

Ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): Concentração utilizada: 25mg/mL.

Estreptomicina (Sigma-Aldrich): Concentração utilizada: 100mg/mL

4-hidroxi-tamoxifen (4OHT): Concentração utilizada: 100nM.

HICE - hidrocortisona 5mg/mL (Fisher Scientific, USA), insulina 5mg/mL (Sigma, USA), enterotoxina colérica 10uM (Enzo Life Sciences), EGF 20ng/mL (R&D, USA).

BPE (Bovine pituitary extract) - 1x (Gibco, Life Technologies, USA).

B-27 1x (Gibco, Life Technologies, USA).

FGF-b 40ng/mL (R&D, USA).

Mitomicina C 0,4 mg/mL (Sigma, USA).

3.2 Obtenção de culturas primárias celulares

A pele dorsal dos camudongos foi depilada e removida após a eutanásia dos mesmos. Após remoção de gordura e vasculatura associada, o tecido foi incubado em dispase (100 unidades caseinolíticas/mL) por 30min a 37°C sendo, então, realizada a separação da derme e da epiderme. A derme remanescente foi então cortada em pedaços de cerca de 5x5 mm e exposta a uma nova digestão com colagenase (Serva, Heidelberg, Germany) e após a dissociação mecânica em células únicas o material foi lavado 1x com DMEM 10%SFB para neutralizar a enzima e 2x PBSA sendo então separado em dois lotes: um deles foi incubado em DMEM 10%SFB em frascos de cultura aderente na densidade de $1,5 \times 10^3$ células/cm² para o enriquecimento de unidades formadoras de colônias (CFUs) e o outro na densidade de 10^4 células/mL em frascos não aderentes em DMEM: F12 3:1 acrescido de 20ng/ml EGF 40 ng/ml FGF-b (ambos da R&D, USA) e 1% B-27 (Gibco, Life Technologies, USA) (Biernaskie, Mckenzie *et al.*, 2006).

A epiderme remanescente foi também exposta a uma nova digestão com protease neutra por 30min (Serva, Heidelberg, Germany) e depois dissociada mecanicamente sendo a enzima neutralizada com meio KFSM contendo 10% SFB, após 2 lavagens em PBSA para eliminar o soro as células foram ressuspensas em meio KFSM com complementos (EGF e BPE, Gibco, Life Technologies, USA) e plaqueadas em frascos de cultura contendo uma camada prévia de colágeno IV (BD

Biosciences, MA, USA). Alternativamente, estas células foram dispostas em camadas de fibroblastos J2 inativados por mitomicina em meio FAD.

Para obtenção dos precursores de derme humana o procedimento foi ligeiramente diferente: após coleta dos mesmos o material foi limpo de tecidos contaminantes e cortado em pedaços de cerca de 5x5 mm sendo então exposto à colagenase 10ug/mL (Serva, Heidelberg, Germany) e, após a dissociação mecânica em células únicas, o material foi lavado 1x com DMEM 10% SFB para neutralizar a enzima e 2x PBSA para eliminar células rompidas, sendo as células então ressuspensas em DMEM 10% SFB em frascos de cultura aderente na densidade ideal para seleção de CFUs como descrito anteriormente.

Em todos os isolamentos foi feita contagem celular utilizando-se Trypan blue (Gibco, Life Technologies, USA) para excluir as células mortas da contagem total.

3.3 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As culturas celulares foram mantidas em frascos plásticos descartáveis adequados para o cultivo de células. O pH e a temperatura foram mantidos próximos à faixa fisiológica através de incubação em atmosfera de 5% CO₂/95% ar à 37°C. O meio de cultura foi renovado a cada três dias de cultivo. Ao atingirem, aproximadamente 80% da densidade de saturação as culturas celulares foram lavadas com PBSA e subcultivadas utilizando-se solução de tripsina.

As células foram congeladas em solução contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) estéril 10% SFB e 80% meio (com exceção dos precursores dérmicos humanos cujo congelamento se deu em 10% DMSO e 90% SFB) na concentração mínima de 5x10⁵ células/mL. As células, em seus meios de congelamento correspondentes, foram

transferidas para a ampola de congelamento (NUNC) e incubadas por 15min no gelo. Após este período, estas foram armazenadas a -80°C e, posteriormente em reservatórios contendo nitrogênio líquido a -190°C.

Para o descongelamento destas populações celulares, a ampola contendo a cultura de interesse foi retirada do reservatório a -80°C ou -190°C, descongelada e transferida para um tubo contendo 5mL do meio de cultura recomendado. As células foram centrifugadas a 800rpm (centrífuga de Bancada Baby®I, Modelo 206 BL, FANEM, Guarulhos, SP, Brasil) por 5min. Posteriormente, o sobrenadante, contendo DMSO, foi removido, os sedimentos celulares foram ressuspensos no meio de cultivo apropriado e mantidos em estufa com atmosfera de 2% CO₂ e a 37°C.

Todas as culturas celulares utilizadas neste estudo foram testadas quanto à presença de *Mycoplasma spp.*, por reações de PCR e as culturas primárias murinas e humanas utilizadas para os experimentos das seções de diferenciação e estresse oxidativo se encontravam sempre em passagem inferior à P7, exceto quando afirmado o contrário.

Para os precursores da derme humana também foi realizada a análise do cariótipo visando detectar anomalias genéticas, critério que foi determinante na escolha das três populações selecionadas.

3.4 Geração de Células-tronco Epidermais expressando os variantes A2-Akt e Myr-Akt através de transdução retroviral

Para os experimentos de indução condicional da atividade de fosforilação de Akt, foi utilizada a metodologia de expressão de dois construtos com vetores retrovirais. As construções A2AktER e myrAktER, clonadas no vetor retroviral pWZLneo, foram cedidas pelo Prof. Julian Downward (CR-UK, London Research Institute) (Kohn, Barthel *et al.*, 1998).

Foram geradas partículas virais por meio da transfecção da linhagem empacotadora Phoenix-AM12, utilizando-se uma placa de 100mm de diâmetro em confluência de 90-100% mantidas em meio DMEM 10% SFB. O meio de cultura foi então substituído pelo meio de cultura das células-tronco epidermais e, após 24h de condicionamento, o sobrenadante contendo partículas virais foi coletado e filtrado em filtro de 0,22 μ M para remover qualquer contaminante celular. Para a transdução das células-tronco epidermais foram plaqueadas 1×10^4 células/cm² em placas de 35mm de diâmetro e, após a formação de colônias de crescimento (cerca de 2 dias), o meio contendo os vírus foi adicionado durante 3 ciclos com intervalo de 24h. Esta medida se torna necessária uma vez que estas células estão descritas na literatura como uma das mais difíceis de transduzir (Janes, Ofstad *et al.*, 2009). A seleção de células transduzidas foi realizada pela adição de 2 mg/mL de geneticina (G418, Gibco, USA), previamente determinada por meio da exposição das células parentais a diferentes concentrações desta substância (1 a 20 mg/mL). A confirmação da expressão dos construtos se deu pela visualização da presença do receptor de estrógeno por Western blotting.

3.5 Crescimento em microcarregadores e frascos *Spinners*

Para otimização da quantidade de células progenitoras de derme humana foi utilizado o protocolo de crescimento das células em microcarregadores Cytodex III em frascos *Spinner*, que permitiram utilizar um volume de trabalho de 125 ml (Figura 12). Os microcarregadores foram hidratados em PBSA contendo 0,01% Tween 20 por 30min para aumentar a sua biodisponibilidade sendo o detergente completamente removido durante cinco lavagens de 1h, acompanhada por uma lavagem final de 12h, seguida de esterilização em autoclave por 15min à 120°C. As células foram expandidas até a passagem 4 em garrafas T150 até atingirem a concentração de 2×10^6

células por *spinner*, sendo então tripsinizadas e incubadas com os microcarregadores na concentração de 2g/L em meio DMEM:F12 sem vermelho fenol e SFB validado para cultivo de células-tronco (GibcoBRL, MD, USA), em frascos *spinners* previamente siliconizados e esterilizados (Corning, USA). As células foram expostas à rotação branda de 30 rpm em base magnética dentro de estufa à 37°C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade durante 12h para permitir sua adesão ao microcarregador e, posteriormente, a 60 rpm até o final do período de cultivo.

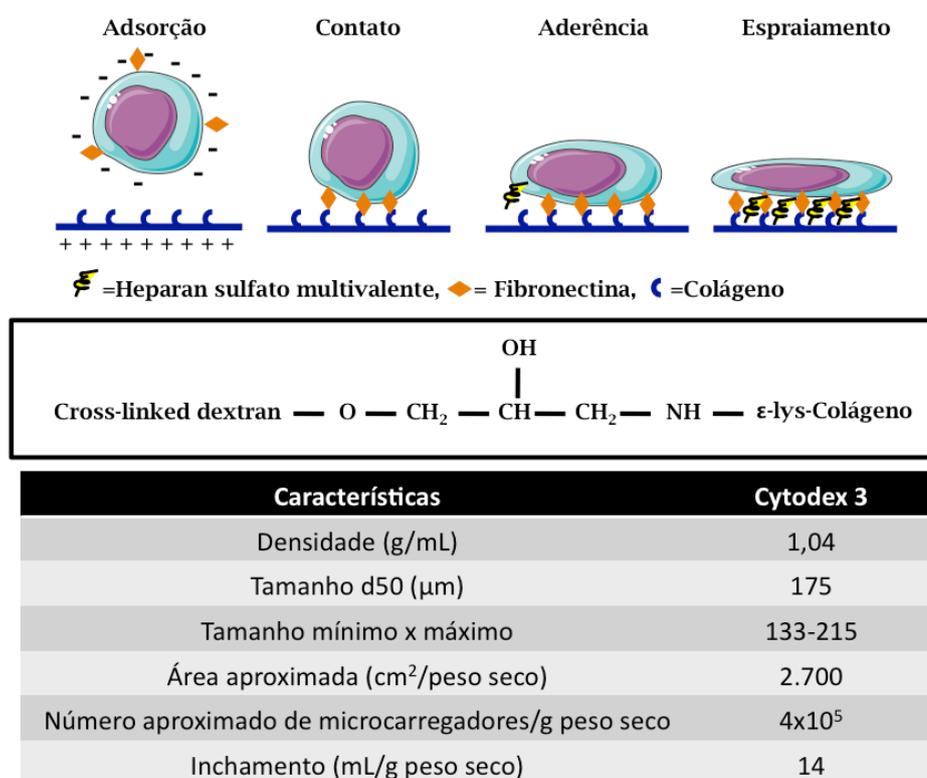


Figura 12: Etapas do processo de adesão de células aos microcarregadores - Principais etapas do processo de adesão aos microcarregadores, estrutura do colágeno ligado à superfície e principais características físico-químicas dos microcarregadores. Adaptado de Microcarrier Cell Culture: Principles and Methods (Handbooks from GE Healthcare).

Alíquotas de meio condicionado foram coletadas e imediatamente congeladas à -20°C, a cada 24h durante 14 dias, para a quantificação de glicose, lactato, glutamina e amônia (Fleury Medicina e Saúde Diagnóstica). Além disso, procedeu-se à contagem celular nos

mesmos períodos retirando-se uma alíquota de 1 mL de microcarregadores e deixando os mesmos em repouso para a decantação. Desprezou-se então 800uL do sobrenadante, que foi repostado com Solução Cristal de Violeta 0,1% em ácido cítrico 0,1mol/L, que rompe as células aderidas aos microcarregadores e colore os núcleos livres em roxo, permitindo sua contagem em Câmara de Neubauer (Mantovani Mda, Da Conceicao *et al.*, 2009). Utilizou-se uma outra alíquota de microcarregadores para efetuar a contagem de preenchimento de microcarregadores através da classificação dos mesmos em vazios, parcialmente recobertos e completamente recobertos. Para melhor visualização, utilizou-se azul de trypan 0,025% contando-se cerca de 10 a 20 microcarregadores por campo em três campos para cada ponto coletado. Análises de microscopia confocal e cultura organotípica foram realizadas ao final do experimento para avaliar o impacto do crescimento em larga escala nas células precursoras de derme humana.

3.6 Indução da diferenciação terminal de precursores epidermais

A indução da diferenciação terminal de células-tronco epidermais foi efetuada através do acréscimo de meio de cultura contendo soro fetal bovino contendo cálcio conforme descrito pelo grupo da Prof^a Fiona Watt (Janes, Ofstad *et al.*, 2009), este tratamento foi escolhido dentre outros como, por exemplo, tratamentos com BMP devido à maior efetividade na indução da diferenciação (Mulder, Wang *et al.*, 2012).

3.7 Indução da diferenciação neuronal e de glia

As esferas de células SKPs foram centrifugadas por 5min a 800rpm e ressuspensas em solução de tripsina 0,1% sendo, então, incubadas à 37°C por 2 a 5 min. Em seguida o material foi dissociado

mecanicamente por pipetagem até a obtenção de células independentes. Às células foi então acrescentado meio DMEM contendo 10% SFB e seguiu-se uma nova centrifugação como a anterior para desprezar o sobrenadante contendo tripsina. As células foram então ressuspensas no mesmo meio contendo SFB e plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células por poço em placas aderentes de 35mm.

3.8 Indução da diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica

Cerca de 1×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 35 mm. Quando as culturas atingiram aproximadamente 90-100% de confluência o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para a diferenciação osteogênica (α MEM, 10% SFB, 100nM dexametasona, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 10 mM β -glicerofosfato), adipogênica (α MEM, 10% SFB, 1 μ M dexametasona, 0,5 mM isobutilmetilxantina, 100mM indometacina e 10 μ g/ml insulina) ou condrogênica (DMEM:F12, 0,5 μ g/ml insulina, 1 μ M dexametasona, 50 μ M ácido ascórbico, 1mM piruvato de sódio e 10 ng/ml de TGF- β 1). Alternativamente, os precursores dérmicos humanos foram induzidos à condrogênese através do método de gotas pendentes, utilizando-se cerca de 2.000 células/gota, sendo transferidos cerca de 10 agregados após dois dias para tubos cônicos de 15 ml e gentilmente centrifugadas à 400g por 10min. As células destes grupos foram mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 7, 14 e 21 dias, sendo o meio trocado duas vezes por semana.

3.9 Tratamento de linhagens celulares com inibidores farmacológicos para as proteínas ERK $\frac{1}{2}$, JNK e PI3k/Akt

Após 24h do plaqueamento em meio completo contendo soro fetal bovino, as células-tronco mesenquimais murinas de derme e epiderme foram carenciadas para soro pela substituição do meio 0,5%

SFB. Após um período de 24h foram utilizados os inibidores químicos PD98059 e SP600125 (todos Sigma Aldrich, USA) para a inibição da atividade das quinases ERK½ e JNK, respectivamente. Também foram utilizados os inibidores LY294002 e Wortmanina para a inibição da ativação de PI3K/Akt (ambos Cell Signalling, Massachusetts, USA). Neste sentido, as células foram pré-tratadas por 1h com 5, 10 ou 20µM dos mesmo, sendo que após este período de tempo, foram iniciados os diversos tratamentos das referidas células (depleção e suplementação de glutathiona, ativação de Akt-4OHT e indução da diferenciação).

3.10 Indução do estresse oxidativo nas culturas celulares através da depleção de glutathiona

Para indução do estresse oxidativo, foi utilizado sulfóxido de butionina (BSO, Sigma Aldrich, USA) em diversas concentrações, variando de 1 mM a 20uM durante dois dias, acrescido ao meio de cultura. Tais concentrações iniciais foram testadas e padronizadas em função da resposta observada através do aumento do peróxido de hidrogênio intracelular através da metodologia de fluorimetria com DCFDA. Para avaliar a toxicidade do tratamento foi utilizado o método de viabilidade celular utilizando-se MTT, sendo que nunca foi utilizada uma concentração capaz de induzir perda da viabilidade celular maior que 10%.

3.11 Determinação da curva de crescimento

As células foram semeadas em placas de 35 mm na densidade de 1×10^3 células/poço, em triplicata. As placas foram mantidas em condições adequadas de cultivo e tiveram seu meio trocado a cada dois dias. Cada ponto da curva foi coletado através da liberação das células com tripsina seguida de fixação em PFA 3,7%. A contagem das

mesmas foi realizada em contador eletrônico modelo CC530 (CELM, Brasil).

3.12 Animais e código de Ética para experimentação animal

Camundongos isogênicos Balb/c machos de 2-4 meses de idade foram utilizados nas seções 1 e 3 deste trabalho para o isolamento de precursores e análise do estresse oxidativo durante a diferenciação óssea. Na seção 2 foram utilizados F1:C57Bl/6 x CB1 devido à eficiência de obtenção de embriões. Nas demais seções 3 (precursores epidermais) e 4 foram utilizados camundongos C57Bl/6 e FVBL para os modelos de depleção e envelhecimento. Todos os animais receberam ração e água *ad libitum*. Todos os preceitos éticos recomendados pelas normas COBEA, pelo Comitê de Ética Institucional do IQ-USP e pelo *Cambridge Local Research Ethics Committee* (LREC) foram adotados durante todos os experimentos.

3.13 Modelo animal de envelhecimento e depleção de glutathiona

A faixa de idade considerada jovem (4-6 meses) e envelhecido (12-14 meses) foi estabelecida em concordância com a recomendação do National Institute of Ageing (Miller e Nadon, 2000)

3.14 Modelo animal de desenvolvimento embrionário

Camundongos C57Bl/6 fêmeas e CBA machos adultos foram utilizados para o acasalamento. As fêmeas gestantes foram sacrificadas de 12 a 18 dias (E12 - E18) após o cruzamento (dia zero estabelecido após a formação do *plug* vaginal) bem como os recém-nascidos de 2 dias de vida (P2). Os tecidos embrionários dos animais

F1 foram dissecados e processados de acordo com os protocolos para análise histológica, imunohistoquímica, imunofluorescência, Real Time PCR e Western blotting.

3.15 Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi mensurada com o reagente 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Possíveis diferenças na viabilidade celular podem ser em decorrência da diminuição da taxa de proliferação ou do aumento de morte celular ou de uma diminuição na taxa metabólica basal (Heo, Park *et al.*, 1990). Resumidamente, 5×10^3 células foram distribuídas em placas de 96 poços em meio contendo 10% SBF. No dia seguinte, o meio foi trocado para 0,5% SFB. Parte das células cultivadas foram tratadas com concentrações crescentes de BSO (utilizou-se peróxido de hidrogênio como controle positivo). Foram realizados no mínimo três experimentos independentes e cada condição foi testada em sextuplicata. Após 48h, adicionou-se 10 μ L do sal de MTT (5 mg/mL) e as células foram novamente incubadas por mais 2h. Em seguida, o meio foi descartado e adicionou-se 100 μ L de uma solução de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram agitadas durante 5min e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de placa (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda de 570 nm.

3.16 Preparação de lâminas histológicas de culturas celulares

As células em suspensão foram dispostas em lâminas através de centrifugação a 400 rpm por 5min (cytospin), enquanto que para cultura aderente foi utilizado o método de crescimento sobre lamínula.

Em seguida, foi realizada a fixação em 4% paraformaldeído por 30min, 3 lavagens de PBSA e em seguida sua utilização.

3.17 Coleta e processamento de secções congeladas e parafinadas de tecidos e embriões

Para as preparações parafinadas os tecidos foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% por 12h, desidratados em soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (70% e 100%), diafanizados em xilol e incluídos em parafina sintética Histosec® (Merck, Darmstedt, Alemanha). Para o processamento dos embriões o tempo de fixação foi estendido para 24h.

Todos os blocos parafinados foram seccionados (10µm) em Micrótopo Leica, e os cortes colocados sobre lâminas de vidro silanizadas Super-Frost Plus® (Erviagas, São Paulo, Brasil).

Para as preparações geladas, os tecidos foram fixados em 4% PFA por 12h, lavados três vezes com PBS (para embriões seguiu-se incubação em solução de sacarose 30% por 12h, à 4°C) e incluídos imediatamente em Tissue-Tek® O.C.T. - Coumpound (4583 - Sakura), congelados em butanol (Merck, Darmstedt, Alemanha) resfriado em nitrogênio líquido, e armazenados à -80°C. Todas os blocos congelados foram seccionados (10 µm) em Criostato Leica e colocados sobre lâminas silanizadas e armazenadas à -80°C. Os embriões microdissecados para isolamento de RNA e proteína tiveram processamento especial, sendo imersos em RNAlater (Invitrogen, CA, USA) por 12h e embebidos, imediatamente, no meio de montagem estéril, em recipiente livre de RNase.

3.18 Preparação tridimensional de epiderme e derme de cauda de camundongo (*wholemout*)

O protocolo utilizado nas preparações tridimensionais foi aquele descrito por Braun e colaboradores (Braun, Niemann *et al.*, 2003). A pele da cauda de camundongos foi cuidadosamente removida com ajuda de pinça e bisturi e incubada em 5mM de EDTA em PBSA a 37°C por 4h. A epiderme e a derme foram então separadas na forma de folhas contínuas de tecido e fixadas em 4% PFA por 2h à temperatura ambiente. Após três lavagens em PBSA por 5min, as camadas isoladas foram mantidas à 4°C.

3.19 Imunofluorescência de tecidos e células de mamífero

Os cortes ou lâminulas foram fixados em paraformaldeído 4%, em PBSA por 10min. O bloqueio de sítios de ligação inespecífica foi efetuado através da incubação das lâminas em PBSA com 5% albumina, Triton X-100 0,3% por 30min. Aplicou-se o anticorpo primário diluído na solução de bloqueio, incubando-se à 37°C em câmara úmida por 45min. Seguiram-se 3 lavagens com PBSA de 10min cada. Aplicou-se o anticorpo secundário nas mesmas condições do primário por 30min. Lavou-se 3 vezes com PBSA novamente e aplicou-se o marcador de núcleo (DAPI) por 15min. As lâminas foram montadas com o kit Prolong Antifade (Molecular Probes), sendo analisadas e tendo imagens capturadas em um microscópio Nikon Eclipse TE 300.

Alguns dos cortes seriados adjacentes aos submetidos à imunofluorescência foram corados com hematoxilina/eosina para permitir a identificação das estruturas anatômicas do tecido.

A relação dos anticorpos primários e secundários utilizados nessa tese podem ser encontrados na tabela 1, disponível como anexo no fim desta tese.

3.20 Histologia e Imunohistoquímica de tecidos e células de mamífero

As secções foram desparafinadas em xilol, reidratadas em soluções de concentrações decrescentes de álcool etílico (100, 95 e 70%). A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em PBS (Merck, Darmstedt, Alemanha) por 45min, recuperação antigênica por calor em tampão citrato-fosfato, pH 6,0 a 93-96°C (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e bloqueio das ligações inespecíficas com solução de leite desnatado a 4% por 20min. Incubação em anticorpo primário seguida de em anticorpo secundário conjugado a complexo Streptoavidina-Biotina/HRP e revelação com cromógeno 3,3´- diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) e contra-coloração com Hematoxilina de Harris.

3.21 Coloração de Von Kossa

Para evidenciar a formação de matriz fosfatada as células tratadas com meio indutor de diferenciação osteogênica foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15min à temperatura ambiente, após esse período foram incubadas em solução de nitrato de prata 0,1% e mantidas diretamente sob a luz ultravioleta por 1h. As culturas foram lavadas com água destilada, recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio 0,5% durante 5min e depois novamente lavadas com água destilada por 3 vezes. Os depósitos de cálcio apresentaram uma coloração marrom/negra e foram visualizados em microscópio invertido.

3.22 Coloração de Vermelho de Alizarina

Para evidenciar a formação de matriz calcificada, as células tratadas com meio indutor de diferenciação osteogênica foram fixadas

com paraformaldeído 4% por 15min à temperatura ambiente, sendo, em seguida lavadas 3 vezes em PBSA e coradas por 15min com a solução de vermelho de Alizarina (2% em água destilada, pH 5,0/hidróxido de amônio). Os depósitos de cálcio produzidos pelas células foram visualizados através da coloração avermelhada intensa.

3.23 Coloração de Oil Red O

Para evidenciar a formação de vesículas lipídicas derivadas da diferenciação adipogênica as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15min à temperatura ambiente, sendo, em seguida lavadas 3 vezes com PBSA e coradas por 15min com a solução de Oil Red O (0,5g Oil Red O em 100 ml de isopropanol seguida de filtração) por 15min à temperatura ambiente. Seguiram-se lavagens com água destilada por 3 vezes a fim de retirar o excesso do corante. Em seguida as placas de cultura foram secas e visualizadas em microscópio invertido. Os acúmulos lipídicos citoplasmáticos foram evidenciados na cor vermelha.

3.24 Coloração com Toluidina Blue

Para evidenciar a formação de matriz rica em proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15min à temperatura ambiente, sendo em seguida lavadas 3 vezes com PBSA e coradas por 30min com a solução de Toluidina (0,1%, filtrada) em temperatura ambiente. Seguiram-se 3 lavagens com água destilada a fim de retirar o excesso do corante. Em seguida as placas de cultura foram secas e visualizadas em microscópio de inversão.

3.25 Citometria de fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em um citômetro FACSAria I/II (BD Bioscience, Califórnia, USA), tendo sido planejados de acordo com as recomendações MIFlowCyt (Lee, Spidlen *et al.*, 2008). A análise e processamento dos resultados foram realizados utilizando-se o programa FlowJo 7.6.3 (Tree Star Inc., USA).

3.26 Citometria de fluxo para imunofenotipagem de marcadores de membrana celular

A caracterização imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo nas células de quarta e vigésima passagem (P4 e P20) para os precursores da derme humana e na passagem 4 para os de derme murina. Para as células-tronco epidermais esse procedimento foi realizado após a primeira confluência de 80% depois do isolamento (em geral P2 ou P3). As células foram liberadas da placa pelo uso de Versene sob agitação, sendo então bloqueadas e expostas ao anticorpo primário acoplado ao fluoróforo (e a anticorpo secundário conjugado, quando necessário). Foram utilizados controles isotípicos de IgG e IgE ligados aos fluorocromos específicos como controle negativo em todos os experimentos. A lista de anticorpos utilizados encontra-se na tabela 1, disponível como anexo no fim desta tese.

3.27 Ensaio de separação celular em citômetro de fluxo (*fluorescence activated cell sorting*)

O processo de separação de células-tronco epidermais baseou-se na expressão de $\beta 1$ integrina⁺/ $\alpha 6$ integrina^{HIGH} e para os precursores da derme CD34⁻/CD105⁺/CD90⁺ foi realizada de acordo com o mesmo protocolo de marcação citado no item anterior, após o qual as células foram submetidas a uma voltagem de 600V nas placas defletoras

sendo separadas do restante da população (Figura 13). A compensação foi realizada antes de cada experimento de separação de maneira automática no próprio programa FACSDiva 6.0. Controles de CST para a estabilidade dos fotomultiplicadores e Drop-delay foram realizados sempre a cada novo experimento e a pureza das preparações foi aferida após o procedimento através da análise de uma alíquota do *pool* de células separadas (foram usadas preparações cuja pureza foi $\geq 96\%$).

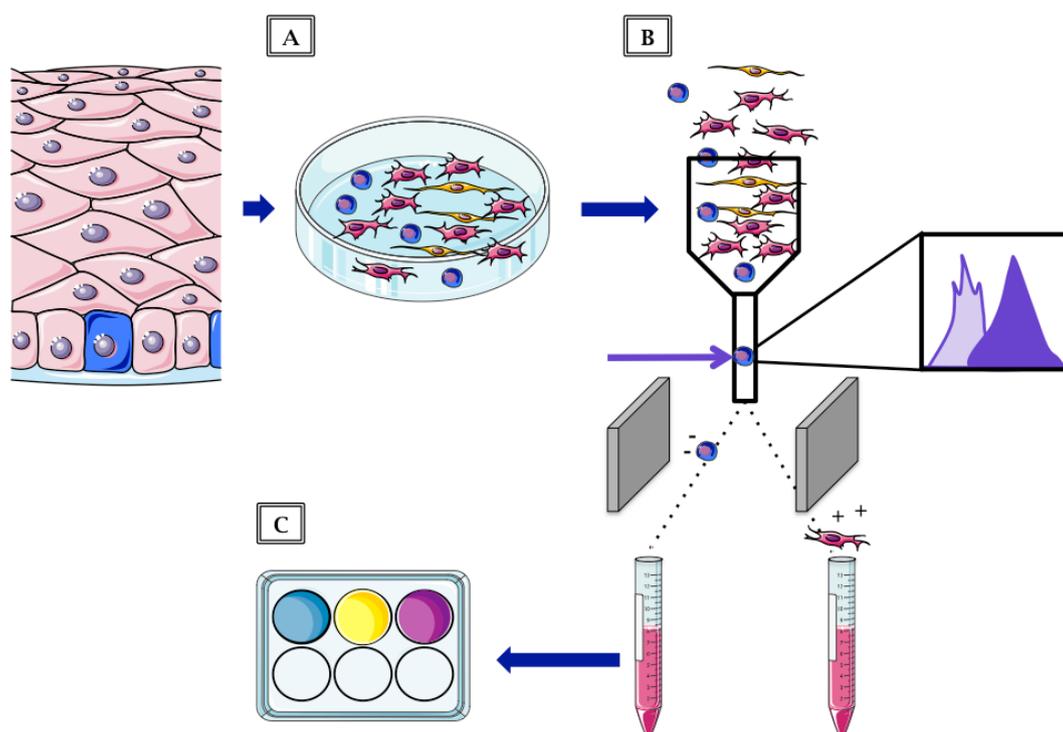


Figura 13: Princípio do isolamento de populações por citometria de fluxo (FACS) – (A) Inicialmente o tecido é dissociado ou células em cultura são liberadas da placa; **(B)** As células marcadas com anticorpo específico são analisadas em citômetro de fluxo e uma carga é aplicada à gota e, após a passagem da mesma pelas placas defletoras, a gota é desviada e recolhida; **(C)** As células selecionadas são então coletadas e utilizadas para coleta de RNA ou cultura.

3.28 Avaliação do ciclo celular através de citometria de fluxo

Para avaliação do ciclo celular as células foram coletadas e, após centrifugação de 5min 800 rpm, foram fixadas em etanol 70% e armazenadas em geladeira por um período mínimo de 4h. Após nova centrifugação, as amostras foram ressuspensas em tampão específico para marcação do ciclo celular (0,1% Triton, 10mg/mL 7-AAD, 0,1mg/mL RNase), incubadas à 37°C por 15min e submetidas à leitura em citômetro de fluxo.

3.29 Avaliação de Fragmentação de DNA

Após a realização dos tratamentos experimentais as culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBSA e destacadas das placas com tripsina. As células foram centrifugadas durante 3min a 1.000 g e tiveram o sobrenadante descartado, sendo, então ressuspensas em tampão hipotônico (pH 7,4, contendo: 50 µL/mL de iodeto de propídeo, 0,1% m/v de citrato de sódio e 0,1% m/v de Triton X-100). A fragmentação do DNA celular foi estimada de acordo com Formichi e colaboradores (Formichi, Radi *et al.*, 2006).

3.30 Avaliação de morte celular (apoptose e necrose) por iodeto de propídeo e anexina-V

As células e o sobrenadante foram lavadas com PBSA e incubadas por 30min à temperatura ambiente com anexina V conjugada com Pacific Blue (Life Technologies, USA), em tampão de ligação (NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, HEPES 10 mM, pH = 7,4) na proporção 1:400, de acordo com as especificações do fabricante, com marcação simultânea com iodeto de propídeo 2,0 µg/mL. Após este

procedimento, as mesmas foram avaliadas em citômetro de fluxo.

3.31 Extração e purificação de RNA total de tecidos e células de mamífero

O RNA total dos tecidos (epiderme, derme e pele total) foi isolado através da metodologia de particionamento com Trizol® (Invitrogen, CA, USA). Neste método a extração é feita através do método de tiocianato de guanidina/fenol/clorofórmio na relação de 1 ml de Trizol® para cada 50 mg de tecido macerado na presença de nitrogênio líquido. Após esta etapa, a amostra é homogeneizada e incubada por 5min à temperatura ambiente. Adiciona-se 200 µl de clorofórmio. Segue-se centrifugação a 14.000 rpm por 15min à 4°C e a fase aquosa é separada. A esta fase adiciona-se 500 µl de álcool isopropílico e após nova centrifugação, o sobrenadante é então removido e descartado. Após remoção do sobrenadante, o precipitado é lavado com etanol 75% e o precipitado resultante é eluído em 30 µl de água DEPC.

O RNA total das linhagens utilizadas neste trabalho foi isolado utilizando-se colunas de sílica e metodologia disponibilizados pelo RNeasy® mini-kit (Qiagen, Hilden, Alemanha). Após os devidos tratamentos, estas células foram lisadas e seu RNA total foi extraído conforme instruções do fabricante.

A concentração do RNA preparado foi determinada através da quantificação em espectrofotômetro. Para tanto, determinou-se a absorvância das preparações a 260nm, considerando-se a correspondência entre uma unidade de absorvância neste comprimento de onda à concentração de 40µg/mL de RNA. O grau de pureza do RNA foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm (contaminação com proteína) e Abs260nm/Abs230nm (contaminação com fenol), tendo-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2,0.

Independentemente do método de extração, todo RNA total foi tratado com DNase I por 20min e no caso do experimento de microarranjos de DNA foi purificado com o kit de purificação de RNA Mini Kit (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

3.32 Síntese de cDNA

Amostras de RNA total, extraídas conforme descrito no item anterior, foram utilizadas como molde para a síntese de cDNA, em reações de transcrição reversa. Alíquotas de 1 μ g de RNA total foram previamente incubadas por 10min à 37°C, com 2 μ L de DNase I (1U/ μ L, Fermentas), em solução contendo 2 μ L de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies) e 0,5 μ L de RNase OUT (40U/ μ L, Life Technologies) em volume final de 10 μ L. Posteriormente, esta enzima foi inativada por aquecimento à 75°C por 10min. A cada amostra de RNA previamente tratado foram adicionados 1 μ L de Oligo dT (0,5 μ g/ μ L, Life Technologies) e 1 μ L de dNTP (10mM, Life Technologies), obtendo-se um volume final de reação de 12 μ L. Em seguida, as amostras foram incubadas à 65°C por 10min, para desnaturação das cadeias, e imediatamente colocadas no gelo. Após alguns minutos foram adicionados 8 μ L de uma solução contendo 2 μ L de tampão 5x de síntese de primeira fita para a enzima Super Script III (Life Technologies), 2 μ L de DTT (0,1M, Life Technologies), 0,5 μ L de RNase OUT (40U/ μ L, Life Technologies), 1 μ L da enzima SuperScript™ III (200U/ μ L, Life Technologies) e 2,5 μ L de água Milli-Q®, para um volume final de reação de 20 μ L. As amostras foram incubadas à 25°C por 10min, para anelamento dos primers e, posteriormente, à 50°C por 2h, para síntese dos cDNAs. Em seguida, a enzima transcriptase reversa foi inativada por meio da incubação das amostras à 72°C por 10min. Para a degradação das moléculas de RNA molde, adicionou-se 1 μ L de RNase H (5U/ μ L, Fermentas). As amostras foram incubadas à 37°C por 30min e, posteriormente, à 72°C por

10min, para inativação da enzima. Posteriormente, as amostras foram diluídas 3 vezes em água Milli-Q®. Na seção 3 deste trabalho, alternativamente, a enzima Improm II (Promega, CA, USA) foi utilizada.

3.33 Desenho e obtenção dos oligos iniciadores

Os primers utilizados para a amplificação dos genes expressos nos experimentos de RT-PCR quantitativo foram inicialmente desenhados com o auxílio do programa computacional Primer Express versão 3.0 (Life Technologies). As principais características dos oligos desenhados por este programa são: amplificação de fragmentos com tamanho entre 50-150bp, quantidade de CG entre 30 e 80%, incapacidade de formação de dímeros ou de estrutura secundária e temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Além disso, a fim de evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico contaminante, os pares de iniciadores foram desenhados em exons diferentes de cada um dos genes analisados. Para a delimitação de éxons e íntrons utilizou-se o programa BLAT (<http://genome.csdb.cn/cgi-bin/hgBlat>). Posteriormente foram utilizadas seqüências de iniciadores provenientes da base de dados PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>), na tentativa de atender às demandas crescentes observadas na literatura quanto à normatização do uso de *primers*, visando a comparação entre diversos estudos. Além disso, na segunda a quarta seção de resultados, realizada durante o período de 4 meses na Universidade de Cambridge, os primers utilizados foram da metodologia TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, California, USA).

Todos os pares de oligos iniciadores, independente de sua origem, foram então analisados com o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para certificação de que eles não amplificariam produtos inespecíficos. As seqüências dos iniciadores utilizados neste estudo estão listadas nas tabelas 2 e 3, disponíveis como anexo no fim desta tese.

3.34 Determinação da concentração final de iniciadores

Previamente aos ensaios de qRT-PCR propriamente ditos, a concentração de cada um dos pares de iniciadores utilizados foi padronizada. Para tanto, reações contendo *primers* em concentrações finais de 200 a 600nM foram realizadas, utilizando-se como molde, uma mistura de cDNAs representativa de todos os grupos experimentais. Desta forma, determinou-se a menor concentração final de iniciadores necessária para a amplificação do produto de interesse, sem que houvesse variação no valor do Ct e do perfil da curva de amplificação gênica, além da mínima ou inexistente formação de dímeros, em relação às obtidas para as maiores concentrações analisadas.

3.35 Determinação da eficiência dos iniciadores

Reações de amplificação, contendo iniciadores numa concentração ideal, foram realizadas utilizando-se como *template* uma mistura de cDNAs representativa de todos os grupos experimentais diluídos em série. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em $y=a.x+b$) que foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos primers, na seguinte fórmula:

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente_angular}}$$

$$Ef(\%) = (Ef - 1) \times 100$$

Todos os iniciadores utilizados tiveram uma eficiência mínima de 80%.

3.36 Reação de RT-PCR quantitativo

Para a quantificação do produto formado durante a reação de RT-PCR quantitativo utilizou-se o corante SYBR® Green Dye (Life Technologies). Este reagente apresenta intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada quando ligado à dupla fita de DNA. Dessa forma, quando livre em solução, o SYBR® Green Dye emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm. Entretanto, ao intercalar-se à dupla fita de DNA, devido à sua afinidade pelo sulco menor do DNA, tem-se um aumento de fluorescência da ordem de 100 vezes, permitindo a detecção do produto do PCR em tempo real.

Como molde, foram utilizados 3µL do cDNA diluído 30 vezes em água Milli-Q®. Além disso, para cada uma das reações de qRT-PCR, adicionou-se 3µL do conjunto de *primers* (*forward* e *reverse*), na concentração final previamente determinada, e 6µl do reagente SYBR® Green Dye. Todas estas reações de PCR foram realizadas em triplicata, no termociclador 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies). As condições das reações foram: 50°C por 2min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase, AmpEraser), 95°C por 10min (etapa de ativação da enzima DNA Polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C de 15seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1min (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon). Para o gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foi utilizado o programa computacional 7300 System Software (Life Technologies).

Alternativamente, para os iniciadores TaqMan® foi utilizada a mesma quantidade de cDNA de acordo com a recomendação do fabricante, sendo que os *primers* utilizados encontram-se indicados na tabela 2, disponível como anexo no fim desta tese.

3.37 Confirmação da expressão diferencial

Dado que o reagente SYBR® Green Dye intercala-se inespecificamente em DNA dupla-fita, tanto a presença de amplificação inespecífica e contaminações, como a formação de dímeros de iniciadores, poderiam interferir na intensidade de fluorescência medida pelo aparelho. Dessa forma, a especificidade do sinal obtido foi confirmada através da análise das curvas de dissociação do produto amplificado e, em alguns casos, através da corrida do produto da reação em gel de poliacrilamida. Sabe-se que, quando a temperatura da amostra atinge a temperatura de desnaturação (T_m) do produto amplificado, o mesmo se desnatura e o corante se dissocia do DNA, diminuindo a intensidade da fluorescência detectada pelo aparelho. Assim sendo, ao término da reação de qRT-PCR, elevou-se gradativamente a temperatura das amostras e mediu-se a intensidade da fluorescência. A partir destes dados, uma curva de dissociação do produto foi gerada. Como produtos de diferentes tamanhos e composição de bases apresentam diferentes T_m s, esta curva possibilita a distinção entre diferentes produtos amplificados na reação, a presença de amplificação no controle negativo e a formação de dímeros de *primers*.

Na análise inicial dos dados, realizada através do programa GeneAmp 5700, definiu-se um *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que foi estabelecido o *threshold*, a partir da intersecção deste com a curva de amplificação, obteve-se o Ct da amostra (*Threshold cycle*, ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do *background*). Desta forma, para determinação do Ct de cada reação foi determinado manualmente um ponto de corte (*threshold*) para cada iniciador.

Em experimentos de qRT-PCR deve-se considerar a possibilidade da variação da concentração inicial de cDNA na análise dos dados provenientes de duas ou mais amostras. Desta forma, para

que os dados possam ser comparados, é necessário que estes sejam previamente normalizados. Assim, para cada amostra de cDNA analisada, foram realizadas duas reações, sendo uma utilizando primers para o gene-alvo e, a outra, utilizando *primers* para um gene de expressão constitutiva, o qual atuou como controle interno da quantidade de cDNA utilizada nas reações. Por fim, a expressão do gene-alvo foi determinada em função da expressão do gene-controle.

De posse dos Cts, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das triplicatas. Dado que a expressão do gene é analisada em relação à uma amostra tomada como referência, calculou-se, então, a diferença entre a Média dos Cts da amostra referência e a Média dos Cts da amostra estudada. Esta diferença foi definida como ΔC_p . O cálculo do ΔC_p foi realizado para os dados do gene-alvo e para os dados do gene de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos genes entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos primers utilizados não é de 100%, é dada por:

$$Ratio = \frac{Ef_{gene_alvo}^{\Delta C_p_{gene_alvo}}}{Ef_{controle_endógeno}^{\Delta C_p_{controle_endógeno}}}$$

Essa fórmula faz parte do programa de análise qBASE^{PLUS} (Pattyn, Robbrecht *et al.*, 2006; Hellemans, Mortier *et al.*, 2007) (Biogazelle, Zwijnaarde, Bélgica) utilizado para as seções 2 a 4 de resultados (na primeira seção foi utilizado apenas o programa GeNorm gratuito (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002)).

3.38 Ensaio de Western Blot

3.39 Obtenção do lisado protéico total de tecidos e células de mamífero

As linhagens celulares foram lavadas duas vezes com PBSA gelado, coletadas com o auxílio de um “policial” e centrifugadas a 2.400g por 5min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em 1mL de PBSA gelado, sendo novamente centrifugadas, agora a 20.800g por 1min e tendo seu sobrenadante descartado. Alternativamente, para os tecidos, cerca de 50mg de material foi macerado e pulverizado através da maceração em cadinho com pistilo e nitrogênio líquido. Tanto o material proveniente de linhagem quanto o de tecidos foi ressuspendido em 500µL de solução de lise (50mM Tris HCl pH 7,5; 5mM EDTA pH 8,0; 300mM NaCl e 1% NP-40) acrescido de inibidores de proteases e fosfatases específicos (GE HeathCare, Little Chalfont, Reino Unido). A seguir, o lisado foi passado de 5 a 10 vezes em seringa com agulha de 22G, para lise completa. Posteriormente, o material foi mantido no gelo por 10min e centrifugado a 20.800g por 30min, para clarificação do sobrenadante por meio da retirada dos “debris” celulares.

3.40 Fracionamento de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida e transferência para membrana de nitrocelulose

A concentração das proteínas nos extratos foi determinada pelo método de Bradford (Kit Bio Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina). As amostras quantificadas foram submetidas ao fracionamento em gel vertical contendo de 8 à 15% poliacrilamida - SDS, à uma voltagem constante de 50 a 100V, durante 3 a 4 horas. Em seguida, as amostras fracionadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose por

transferência úmida (300mA por 2h) em tampão de transferência (0,3% de Tris; 1,44% de glicina; 0,1% de SDS e 20% metanol).

3.41 Incubação das membranas com antisoros específicos e revelação utilizando conjugado IgG-Peroxidase

Para inibição da marcação de sítios inespecíficos, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em tampão TBST (50mM TrisCl pH 7,5, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20), por 16h, à 4°C. Posteriormente, a membrana foi submetida a três lavagens com TBST, à temperatura ambiente, por 10min. A incubação com o anticorpo primário de interesse, diluído adequadamente em TBST 5% leite, foi realizada à temperatura ambiente ou 4°C, por 2h ou 16h, dependendo do anticorpo. A membrana foi lavada três vezes com TBST, à temperatura ambiente por 10min, e, em seguida, esta foi incubada com o anticorpo secundário, anti-IgG conjugado com peroxidase (diluído em TBST 5% leite) à temperatura ambiente por 1h. A membrana foi novamente lavada três vezes com TBST, à temperatura ambiente por 10min, e a marcação foi obtida utilizando-se o Kit ECLTM para detecção de proteínas por quimioluminescência, seguindo-se as recomendações do fabricante (GE HealthCare). As imagens das bandas foram quantificadas por densitometria, por meio da utilização do programa computacional ImageQuant 5.2 (GE HealthCare).

3.42 Quantificação das formas reduzida e oxidada da glutathiona

As células ou tecidos foram lisados em tampão de lise gelado contendo 0,1% Triton-X e 0,6% ácido sulfosalicílico em KPE e sonicadas por 5min. Após centrifugação à 4°C e 10.000 rpm durante 15min o sobrenadante foi imediatamente utilizado para as quantificações de glutathiona/glutathiona dissulfeto conforme descrito em (Rahman, Kode *et al.*, 2006).

3.43 Medida da atividade de enzimas do Sistema Antioxidante

Após a tripsinização, as células foram centrifugadas por 5min a 1.000 rpm em meio de cultura sem soro. O *pellet* foi ressuspendido em tampão fosfato 50 mM (pH = 7,8), contendo inibidor de protease (Sigma-Aldrich), diluído 1.000 vezes, os tubos foram colocados no gelo e as células sofreram sonicação em equipamento Sonics VibraCell, com amplitude de 20%, em intervalos de 15s, contabilizando um minuto no total. Os homogenatos foram centrifugados por 40min a 35.000 g e o sobrenadante aliquoteado em amostras de 200 uL e estocado a -20°C até a análise. As análises para todas as enzimas antioxidantes foram realizadas em espectrofotômetro SpectraMax, Molecular Devices. Para esta metodologia, todos os tampões foram tratados com Chelex. Em todos os experimentos de medida de atividade enzimática a concentração total de proteína nos lisados foi medida pelo método de Bradford.

3.44 Medida da atividade total da Superóxido Dismutase (CuZnSOD + MnSOD)

A atividade total da SOD foi medida pelo monitoramento da redução do ferricitocromo c na presença de xantina/xantina oxidase como fonte de superóxido, segundo (Mccord e Fridovich, 1969). O meio reacional foi preparado com 25 mL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,8, contendo 0,10 mM de ácido dietileno triamino pentaacético (DTPA), 10 mL de solução 10 mM de NaOH, 0,76 mg de xantina e 6,2 mg de ferricitocromo c. Preparou-se, à parte, uma solução 0,50 U/mL de xantina oxidase (25 U/mL). Como esta enzima degrada muito facilmente, é necessário, primeiramente, verificar a sua atividade. Para tanto, adicionam-se volumes diferentes da solução descrita de xantina oxidase a 700 µL de meio de reação e monitora-se a variação da absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3min. O volume de xantina oxidase que se deve utilizar no ensaio é aquele que fornece uma reta de coeficiente angular em torno de 0,025 min⁻¹. O volume final foi sempre de 1,0 mL. O ensaio de SOD é efetuado adicionando-se a uma cubeta, contendo 700 µL de meio reacional e 50 µL de amostra, o volume de xantina oxidase encontrado no teste anterior. O volume final foi sempre 1,0 mL. Monitorou-se a absorbância em 550 nm, a 25°C, por 3min. A atividade de SOD foi obtida através da determinação das inclinações das retas na presença ou ausência da amostra. Calculou-se a inibição percentual através da relação $100^{(1-k_{inb}/k)}$ e, finalmente, determinou-se a atividade de SOD através do valor em 50% de inibição, multiplicando-se pelo fator de diluição do homogenato. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade necessária para inibir a redução do ferricitocromo c em 50 % (Flohe e Otting, 1984).

3.45 Medida da atividade de Catalase

A atividade de catalase foi avaliada pelo monitoramento do

consumo de H_2O_2 a 240 nm, durante 1min a 25°C. O meio reacional constitui-se de tampão fosfato 100 mM, pH 7,4, com DTPA 0,50 mM. Utilizou-se $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para calcular a concentração de H_2O_2 (Beers e Sizer, 1952; Aebi, 1984).

3.46 Medida da atividade de Glutathiona Redutase

A atividade da GSR foi realizada em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,6 com DTPA 0,5 mM. Primeiro, durante 10min à 30°C, preparou-se o meio de reação, que contém glutathiona oxidada (GSSG) 1,0 mM e NADPH 0,10 mM em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,6. O meio de reação (900 μL) foi então pipetado em uma cubeta de quartzo juntamente com 100 μL de lisado de células. O consumo do NADPH na redução da GSSG a GSH, catalisada pela GSR, foi medido a 340 nm a 30°C (Carlberg e Mannervik, 1975).

3.47 Medida da atividade de Glutathiona Peroxidase

A atividade de glutathiona peroxidase (GPx) foi medida em tampão fosfato 0,10 M, pH 7,0, contendo DTPA 1,0 mM. Durante 10min e a 37°C, incubou-se a mistura de reação: 500 μL de tampão fosfato 0,10 M, pH 7,0, 100 μL de lisado de células, GSR 0,24 U/mL e GSH 1,0 mM. Depois, adicionou-se NADPH 0,15 mM preparado em solução de NaHCO_3 0,10% m/v ao meio de reação. Esta mistura foi transferida para uma cubeta de quartzo e durante 2,5min verificou-se se havia decaimento do NADPH a 340 nm e a 37°C. Permanecendo estável, adicionava-se então o oxidante terc-butil hidroperóxido 1,2 mM. A atividade da GPx é calculada do consumo de NADPH medido a 340 nm, gasto na redução da GSSG catalisada pela GSR, gerando mais GSH para a reação da GPx. Os cálculos para a obtenção da atividade da enzima foram os utilizados (Flohe e Gunzler, 1984).

3.48 Análise de Fluorescência de Diclorofluoresceína Diacetato (DCF-DA)

Imediatamente antes do estímulo o meio de cultura foi substituído por tampão HBSS acrescido de HEPES 10mM e diclorofluoresceína diacetato (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Após 30min de incubação em estufa à 37°C sob proteção da luz o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas 2x para eliminar qualquer vestígio do corante não internalizado. Após adição de tampão fresco a fluorescência foi avaliada em leitor de placa de fluorescência (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm. Após o estímulo leituras adicionais foram realizadas a cada 5min.

3.49 Análise estatística dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística realizada com auxílio do programa computacional GraphPad Prism versão 4.0. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão. Para variáveis quantitativas, utilizou-se teste t de Student quando foram analisadas apenas duas populações de dados. Para as comparações múltiplas, foram realizadas análise de variância ANOVA seguida de teste *a posteriori* de Tuckey-Kramer. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

4.1 Seção 1 de Resultados - Estabelecimento de modelo experimental murino e Humano

4.1.1 Estabelecimento de modelo experimental murino - Isolamento simultâneo de três populações de células-tronco de pele murina.

O estabelecimento do modelo experimental se deu utilizando-se camundongos Balb/c machos, isogênicos de 4 a 6 meses de idade, tendo como principal objetivo desenvolver um protocolo rápido e reprodutível que aproveitasse o mesmo tecido para o isolamento simultâneo de EpiSCs, MSCs e SKPs, uma vez que todos os protocolos de que se tem conhecimento na literatura o fazem de forma individual o que seria ineficiente para fins de possíveis usos futuros na terapia celular. Após o isolamento, cada tipo celular foi caracterizado quanto à presença de marcadores específicos e capacidade de diferenciação, sendo as células isoladas utilizadas nas partes subsequentes deste trabalho.

4.1.2 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação e comportamento *in vitro* de EpiSC murinas.

As células-tronco epidermais foram selecionadas e cultivadas sobre camada de colágeno IV. Estas células possuem morfologia típica de queratinócitos, com a diferença de serem capazes de formar colônias holoclônicas (colônias grandes e de bordas regulares), enquanto queratinócitos diferenciados são capazes de gerar apenas colônias menores, com capacidade proliferativa limitada, ditas meroclones ou paraclones. O aspecto de uma colônia holoclônica pode ser observado na figura 14A. O fato de neste protocolo a epiderme ser previamente separada da derme evita que a contaminação por este compartimento na forma de fibroblastos seja drasticamente diminuída.

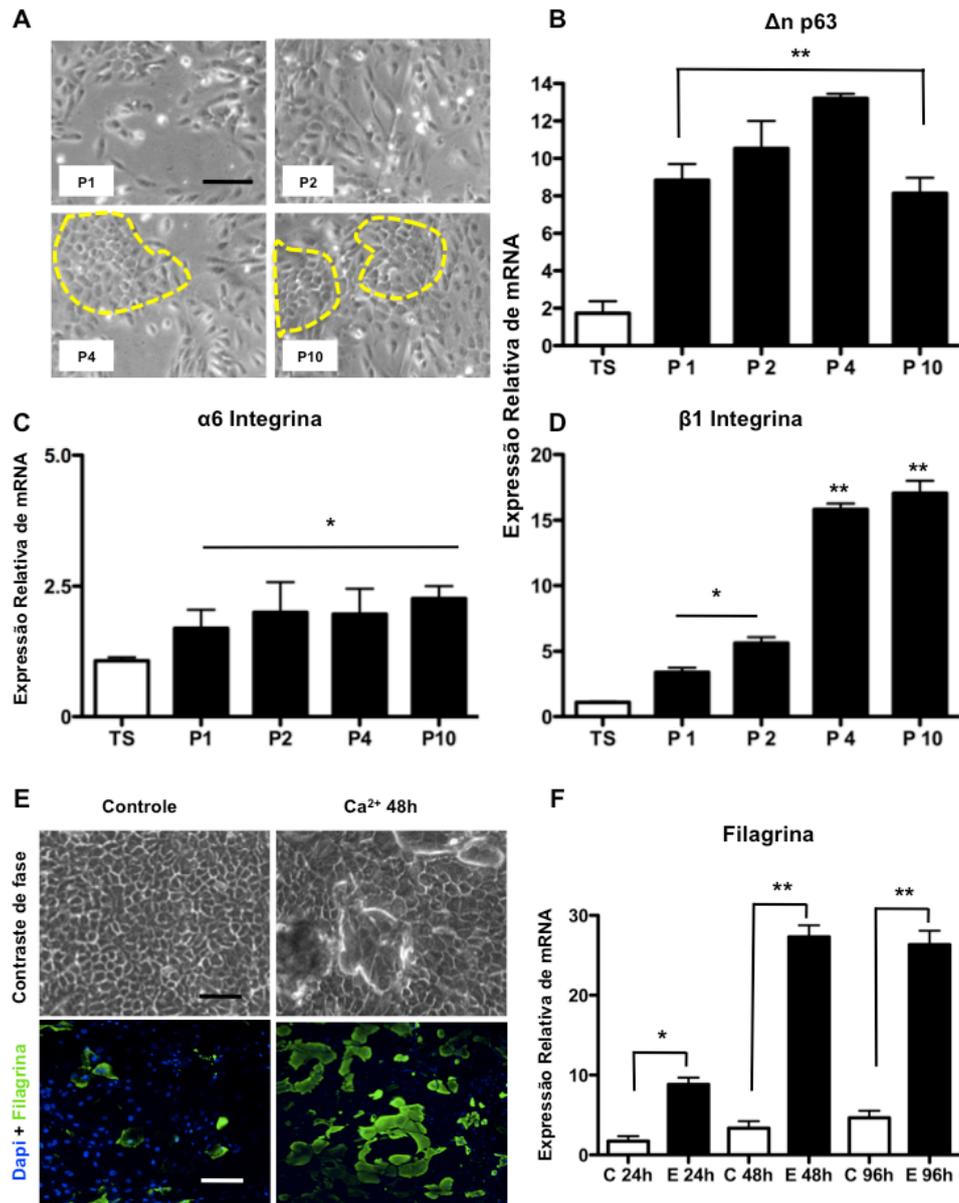


Figura 14: Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco epidermais murinas. As células-tronco epidermais foram isoladas simultaneamente às outras duas populações e selecionadas por sua habilidade de aderir em colágeno IV. (A) Micrografia onde podem ser observadas colônias holoclônicas já na quarta passagem de subcultivo, sendo que as mesmas se mantêm até a décima passagem. Os níveis de mRNA de marcadores destas células-tronco foram avaliados através de q-RT-PCR: (B) Δn p63; (C) $\alpha 6$ integrina; (D) $\beta 1$ integrina. O fator de normalização foi calculado pelo programa computacional GeNorm, a partir dos níveis de expressão gênica de HPRT, GAPDH e HMBS, sendo utilizado como controle endógeno. As células após atingirem a quarta passagem foram induzidas à diferenciação através do aumento de cálcio/soro. Para aferir a eficiência deste processo, foram aferidos os níveis de proteína (E) e mRNA (F) do marcador de diferenciação filagrina. Barra=50uM. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o controle (ou no caso dos marcadores de células-tronco em relação à epiderme total, TS=total skin=epiderme total), ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Para confirmar se o cultivo sobre colágeno IV realmente era um fator de seleção para EpiSCs, as células foram expandidas mantendo-se constante a proporção de células por área de placa e analisadas nas passagens 1 a 4 (P1-P4) e 10 (P10) de subcultivo quanto ao perfil de expressão de mRNA de marcadores específicos das mesmas, ou seja, as integrinas $\alpha 6$ e $\beta 1$ e a isoforma do mRNA truncado para o fator de transcrição Δn p63.

As amostras de RNA total extraídas das culturas primárias em diferentes passagens, sempre respeitando a confluência celular de 80%, foram extraídas conforme descrito em Material e Métodos. Os ensaios de RT-PCR quantitativos foram realizados utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genes de interesse (Tabela 2). As eficiências e concentrações ótimas de amplificação desses iniciadores, determinadas de acordo com Material e Métodos, são apresentadas na tabela 4, disponível como anexo.

Os resultados de qRT-PCR representam os valores médios obtidos em triplicata, correspondentes a pelo menos três experimentos independentes realizados (quando o número for superior a este a indicação será dada na figura). Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se epiderme total como referência para a expressão de marcadores específicos de células-tronco e células indiferenciadas para o estudo da diferenciação. Os níveis de expressão relativa correspondentes aos genes GAPDH, HPRT, HMBS e ACT foram submetidos ao programa computacional GeNorm para determinação do melhor controle endógeno (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002). Os níveis dos genes classificados como menos estáveis foram excluídos, e utilizou-se sempre para o cálculo do Fator de Normalização os valores de expressão gênica de pelo menos dois genes normalizadores. Todos os resultados de expressão gênica relativa apresentados neste trabalho utilizam este Fator de Normalização como controle endógeno das reações de qRT-PCR.

Os níveis de expressão relativa de todos os marcadores positivos mostram-se aumentados ao longo dos sucessivos subcultivos, quando comparados com o *pool* inicial de células isoladas da epiderme total (Figura 14 B, C e D). Os níveis do transcrito de Δn p63 mostram-se aumentados significativamente já na primeira passagem ($p \leq 0,001$), seguido de um acréscimo constante que atinge um pico em P4 e decai ligeiramente em P10, embora não existam diferenças significativas entre os níveis de expressão quando são comparados P1 versus P10. A expressão gênica de $\alpha 6$ integrina mostrou-se levemente aumentada a partir da P1 e mantém-se constante até o último ponto analisado, entretanto esse aumento não se mostrou estatisticamente significativo (Figura 14 C). Já para a integrina $\beta 1$ (Figura 14, D) pode ser observado um aumento significativo ($p \leq 0,05$) a partir da segunda passagem, atingindo níveis quase vinte vezes maiores do que a população de células inicial na décima passagem ($p \leq 0,001$).

Quando induzidas a se diferenciarem (P4), essas células iniciam um processo de estratificação típico da epiderme, com células cuja razão citoplasma/núcleo se encontra progressivamente aumentada, e cujo crescimento se dá por empacotamento (Figura 14 E), ou seja, as células crescem umas por sobre as outras e iniciam um programa de diferenciação celular que envolve a expressão de diversas proteínas que formam o arcabouço da escama cornificada. Nesse aspecto, já em 48h, podemos observar níveis significativamente aumentados da proteína de filamento intermediário filagrina (Figura 15 E), embora os níveis de mRNA para a mesma já se encontrem aumentados a partir de 24h (Figura 14 F, $p \leq 0,05$), atingindo seus níveis máximos após 96h de exposição ao agente de diferenciação (Figura 14 F, $p \leq 0,001$).

Em conjunto, estes resultados sugerem que há um aumento dos níveis de expressão de marcadores positivos de EpiSCs ao longo do subcultivo sobre colágeno IV de culturas primárias de epiderme murina, sugerindo um enriquecimento significativo desta fração de células, que pode ser corroborado pela presença de colônias holoclônicas e pelo sucesso na indução de diferenciação das mesmas

em queratinócitos terminalmente diferenciados, positivos para filagrina.

4.1.3 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento *in vitro* de SKPs murinas.

As células-tronco precursoras de pele foram selecionadas através da cultura em suspensão na ausência de soro, conforme recomendado por (Fernandes, McKenzie *et al.*, 2004). Nestas condições, os precursores da crista neural que podem crescer independente de substrato, formam aglomerados de células, enquanto as demais células presentes no tecido aderem ao fundo da garrafa, sendo desprezadas ao longo dos sucessivos subcultivos, como pode ser observado na Figura 15A. Para confirmar este enriquecimento, as células foram expandidas mantendo-se constante a proporção de células por volume de meio no mesmo tipo de garrafa e analisadas nas passagens 1 a 4 (P1-P4) e 10 (P10) de subcultivo quanto ao perfil de expressão de mRNA de marcadores específicos das mesmas comparados com o *pool* inicial de células isoladas da derme total, ou seja, os marcadores positivos nestina e fibronectina e o marcador negativo vimentina (Fig 15 B,C e D).

Tanto os níveis relativos do mRNA quanto da proteína vimentina, um marcador de fibroblastos diferenciados, mostram-se diminuídos significativamente já na primeira passagem ($p \leq 0,05$), seguido de um comportamento constante que é estável até a P2. Assim, a partir da P4 e P10 os níveis de proteína deste marcador de contaminação com populações diferenciadas praticamente não é detectado por *Western blotting*, embora níveis de mRNA residuais ainda sejam detectados (Fig 15B). Ambas as expressões gênicas e protéicas dos marcadores positivos nestina e fibronectina mostraram-se aumentados a partir da P1 e mantêm-se em aumento constante até o último ponto analisado, entretanto esse aumento é de pelo menos

meia ordem de grandeza maior para nestina quando comparada com a fibronectina (Figura 15 C,D $p \leq 0,001$). O imageamento de colônias inteiras (Fig 15 E) através de microscopia de fluorescência permitiu evidenciar que as células que expressam mais intensamente os marcadores positivos encontram-se no interior do esferóide, o que é comumente observado para neurosféricas. A detecção de algumas células vimentina-positivas permite afirmar que o sistema não está completamente livre de contaminação por fibroblastos, como os dados de *Western blotting* poderiam sugerir ou talvez que na própria estrutura do *cluster* flutuante algumas células sofrem diferenciação.

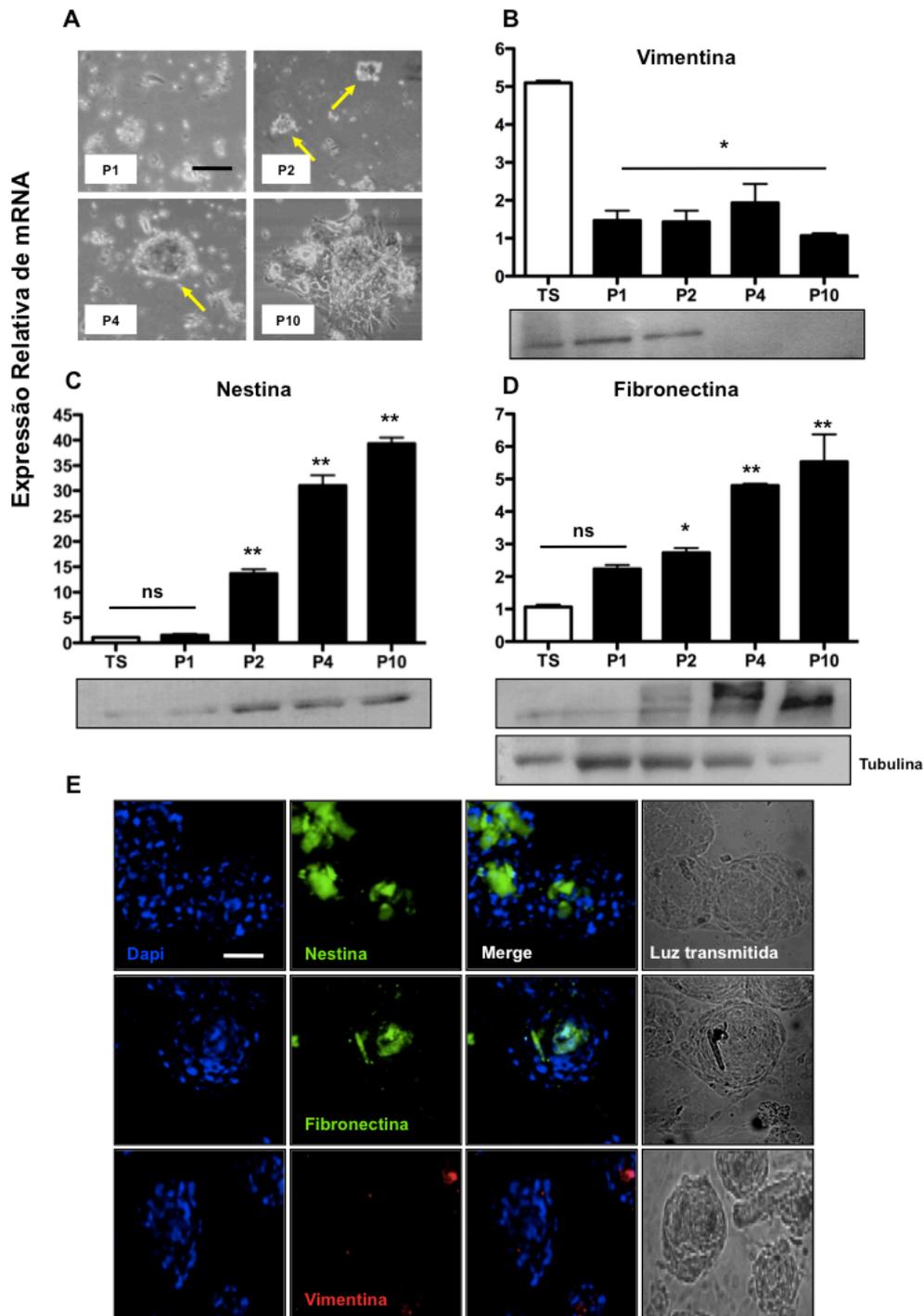


Figura 15: Isolamento e caracterização de células-tronco precursoras da pele (SKP) murinas. As SKPs foram selecionadas através do cultivo livre de soro em suspensão, quando geram agregados celulares, como pode ser observado na micrografia em (A). Para aferir o sucesso da seleção foram analisados os níveis de mRNA e proteína de marcadores negativos (B) Vimentina, e positivos (C) Nestina e (D) Fibronectina através de q-RT-PCR e *Western blotting*. Os mesmos marcadores foram observados em microscopia de fluorescência para evidenciar a distribuição das células-tronco na massa dos agregados (E), barra=50uM. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o controle (no caso dos marcadores de células-tronco em relação à derme total, TS=total skin=derme total), ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Quando induzidas a se diferenciarem (P4), essas células são desassociadas em células independentes e semeadas em placas aderentes em confluência baixa (cerca de 50%) e iniciam um programa de ramificação típico de componentes da crista neural, com células que apresentam prolongamentos e ramificações (expansões citoplasmáticas) conforme observado na Figura 16A. A identidade das células geradas foi aferida através da expressão de mRNA para marcadores de neurônios (β III tubulina) e glia (GFAP e CNPase). Nesse aspecto, já em sete dias podemos observar níveis significativamente aumentados de mRNA para o marcador de astrócitos GFAP (Figura 15 D), que se mantém praticamente constantes após 14 e 21 dias (mais de cinquenta vezes aumentado, $p \leq 0,001$). Um padrão semelhante pode ser observado para a fosfodiesterase típica de oligodendrócitos, CNPase, que se encontra progressivamente mais expressa, culminando num aumento de mais de 30x após 21 dias de diferenciação ($p \leq 0,001$) como observado na Figura 15 E. O mesmo perfil de expressão foi observado para o marcador de neurônios β III tubulina (Figura 15 F, $p \leq 0,001$) indicando um aumento da representação dos mesmos entre a prole diferenciada, embora nada possa ser afirmado sobre a funcionalidade dos mesmos, uma vez que ensaios funcionais de resposta de despolarização frente a estímulo não tenham sido realizados. Os marcadores β III tubulina e CNPase foram aferidos também através de microscopia de fluorescência, conforme pode ser observado na Figura 15G.

Em conjunto, estes resultados sugerem que o método de isolamento celular aqui desenvolvido permitiu obter populações de SKPs praticamente sem contaminantes já na segunda passagem e que estas células são capazes de gerar neurônios e glia *in vitro* quando expostos ao estímulo de ambiente de cultura aderente e soro no meio de cultura, conforme previamente descrito na literatura.

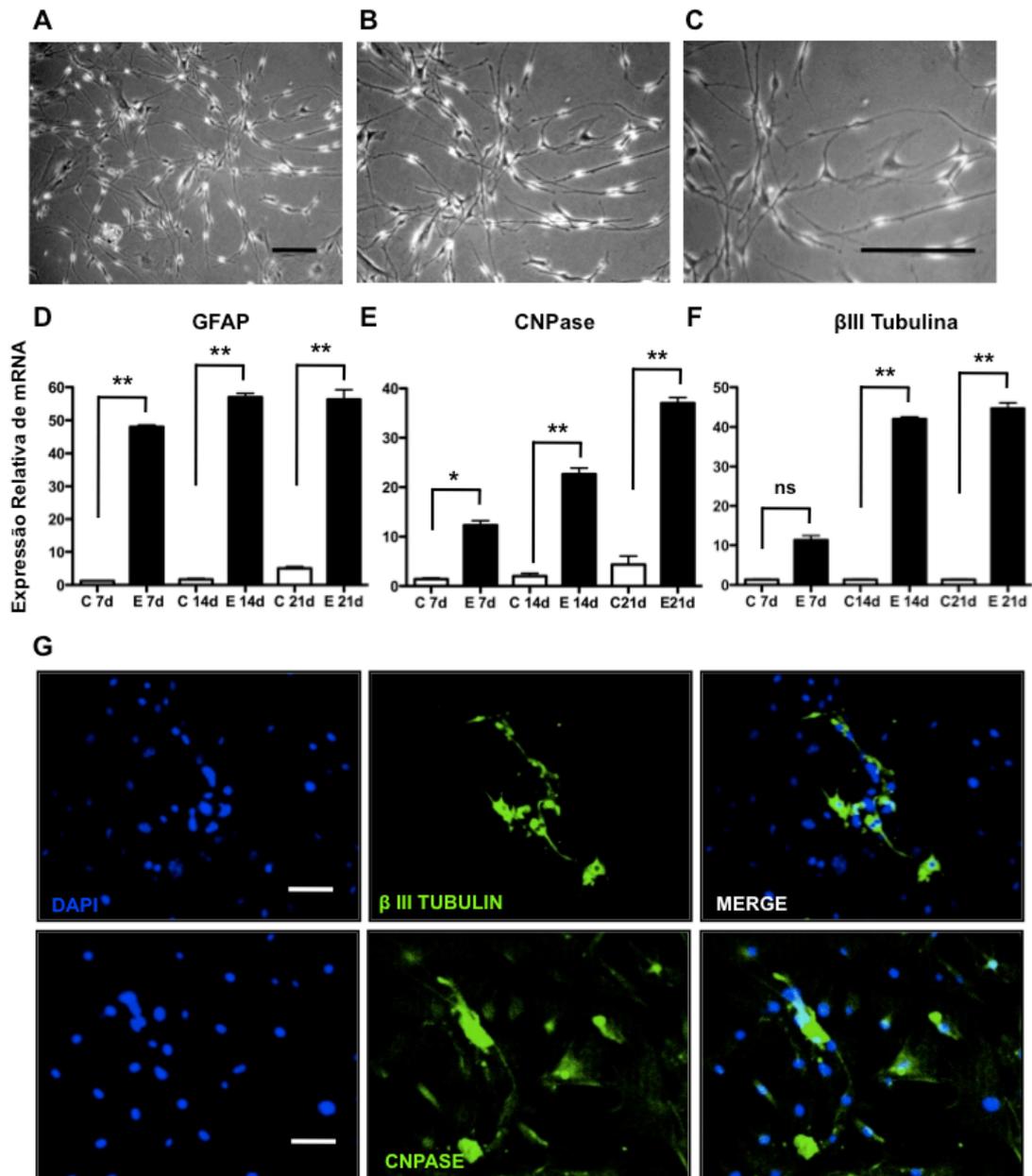


Figura 16: Diferenciação de células-tronco precursoras da pele (SKP) Murinas. As SKPs foram induzidas à diferenciação através da dissociação dos agregados celulares em células únicas e como pode ser observado nas micrografias após 7 dias (A), 14 dias (B) e 21 dias (C) apresentaram formato alongado com diversos prolongamentos. Os níveis de mRNA de marcadores de astrócitos (D) GFAP; oligodendrócitos (E) CNPase; e neurônios (F) βIII tubulina foram aferidos através de q-RT-PCR e validados quanto ao conteúdo de proteína (G) através de microscopia de imunofluorescência, barra=50uM. Os resultados são apresentados como a média ± desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o controle não diferenciado no menor tempo de diferenciação, ns=não significativo; *p≤0,05; **p≤0,001.

4.1.4 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento *in vitro* de MSCs murinas.

As células-tronco mesenquimais murinas foram selecionadas através de sua capacidade de quando semeada em condições de muito baixa densidade (clonal) crescer e formar uma colônias celulares, as quais depois de algum tempo crescem e se unem umas às outras, em detrimento dos fibroblastos diferenciados que não são capazes de o fazer (Figura 17A). Essas células são subcultivadas sempre que atingem a confluência de 80%, mantendo-se a proporção de número de células por área de crescimento. Dessa forma, as mesmas foram expandidas até a décima passagem, mantendo sua morfologia fusiforme típica ao longo do subcultivo, como pode ser observado na figura 17B. Na quarta passagem essas células foram aferidas quanto ao seu fenótipo de proteínas de membrana para marcadores negativos e positivos de células-tronco estromais (Fig 17 C). Os marcadores negativos CD31 (endotélio), CD34 e CD45 apresentaram marcações praticamente inexistente ou muito fraca, enquanto que os marcadores positivos mostraram-se expressos em diferentes graus de intensidade desde pouco expressos (CD29 e CD44) até moderada a altamente expressos (CD90 e CD105).

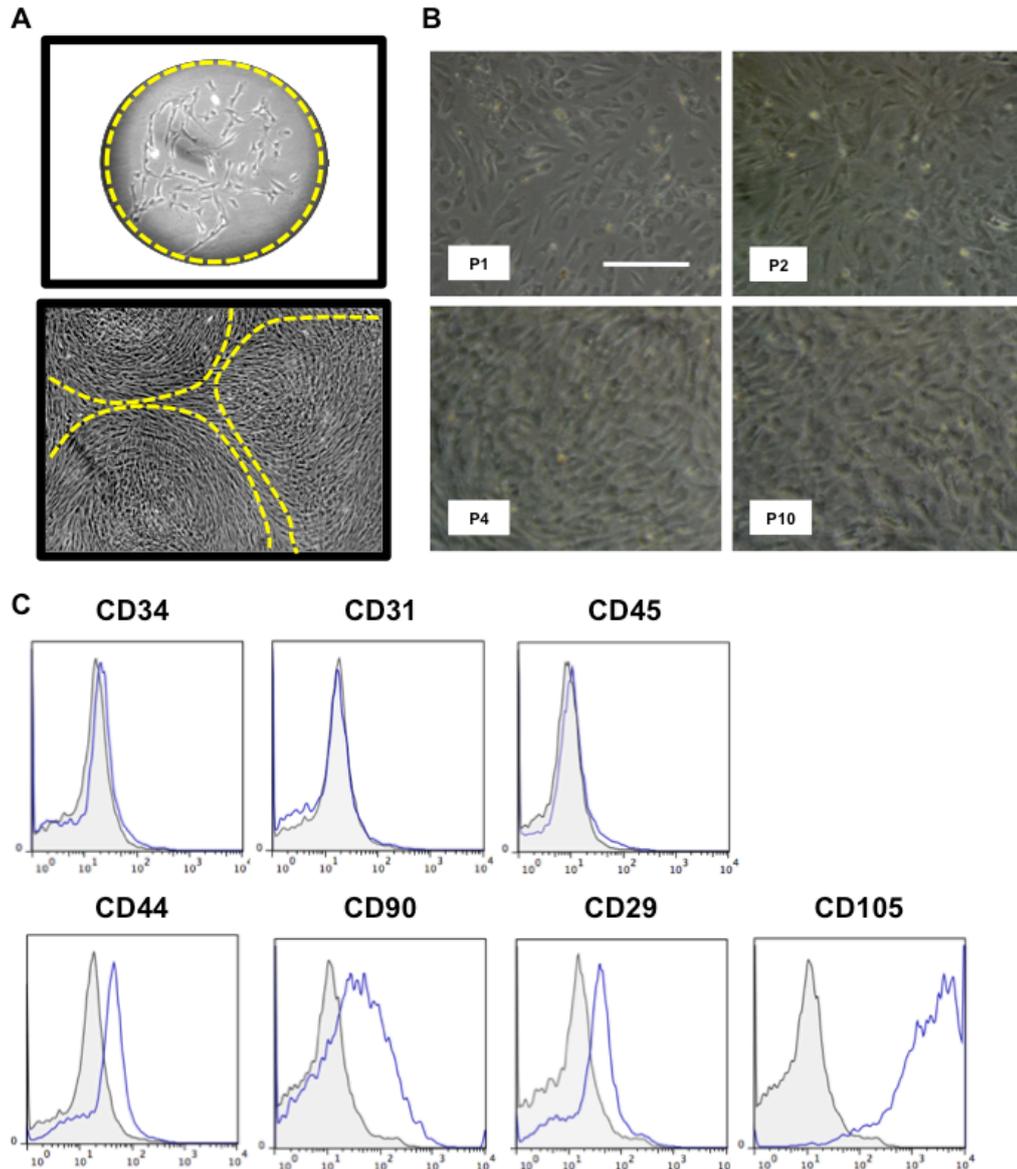


Figura 17: Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais estromais de derme murina. As células-tronco mesenquimais murinas de derme foram selecionadas por sua capacidade de formar colônias (CFU), como pode ser observado na micrografia (A). As mesmas crescem e se unem até formarem um tapete confluyente que denominamos P0, como pode ser observado em (A). Essas células são então subcultivadas sempre que atingem confluência de 80% e expandidas até a passagem 10 (B). Amostras das mesmas em P4 foram interrogadas quanto à presença de marcadores positivos e negativos de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo (C). Todos os grupos marcados com anticorpo conjugado (linha azul) foram comparados com seus respectivos controles (linha cinza preenchida). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados para análise. Os resultados são representativos daqueles obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Quando induzidas a se diferenciarem (P4), ou seja, quando expostas a meios contendo agentes de diferenciação que induzem as mesmas a se diferenciarem em adipócitos, osteoblastos e condrócitos,

a mudança fenotípica associada é marcante, podendo ser observada já em micrografias obtidas ao microscópio invertido (Fig 18 A e B). As células induzidas à diferenciação adipogênica acumulam em seu citoplasma vesículas com conteúdo lipídico, as quais são evidenciadas através da coloração de histoquímica com Oil Red O, que cora tais compartimentos em vermelho, como observado na Figura 18B. Como confirmação do observado os níveis de expressão de mRNA de leptina, que é produzida preferencialmente por adipócitos, encontram-se aumentados mais de 60x após 21 dias de indução ($p \leq 0,001$) como pode ser observado na Figura 18C.

A diferenciação osteogênica confere às células um aspecto arredondado, em detrimento do aspecto fusiforme observado no controle, mas é melhor visualizado através da coloração com vermelho de alizarina, que identifica focos de matriz calcificada produzidos durante esse processo. A identidade das células diferenciadas foi também corroborada através da expressão de mRNA de fosfatase alcalina, um mediador bem descrito do processo de produção da matriz calcificada, sendo que o mesmo encontra-se aumentado de maneira significativa ($p \leq 0,001$) já a partir do sétimo dia da diferenciação (Figura 18 B e D).

Na condrogênese as principais alterações fenotípicas são a presença de um formato cubóide, com o núcleo aparente e a formação de matriz rica em proteoglicanos, corada com azul de toluidina. Um padrão semelhante de aumento pode ser observado para o colágeno do tipo II, típico de cartilagem hialina, cujos níveis de mRNA encontram-se progressivamente aumentados, culminando num aumento de mais de 40x após 21 dias de diferenciação ($p \leq 0,001$) como observado na Figura 18 B e E.

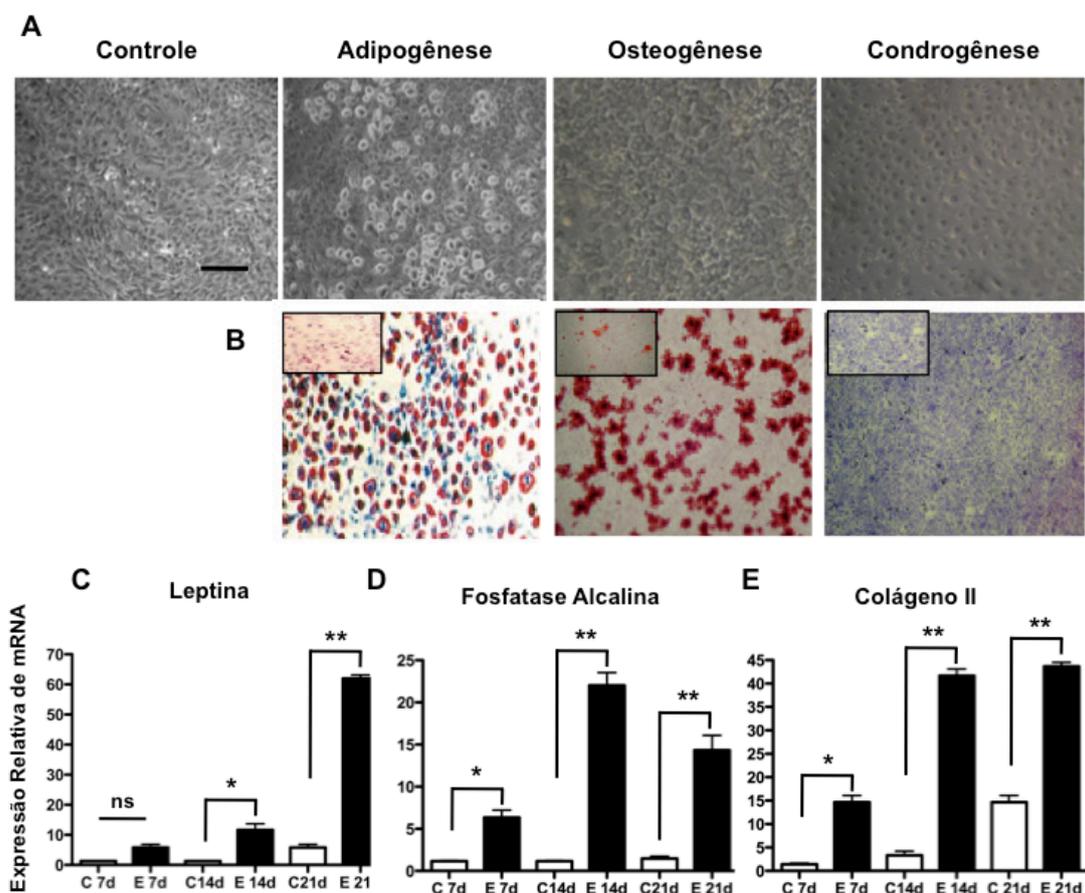


Figura 18: Diferenciação de células-tronco mesenquimais estromais de derme murina. Células-tronco mesenquimais na quarta passagem foram estimuladas a se diferenciarem através da exposição das mesmas a meios de cultura indutores de adipogênese, osteogênese e condrogênese. Amostras foram coletadas em 7, 14 e 21 dias. Alterações morfológicas importantes podem ser observadas nas micrografias obtidas ao microscópio invertido após 21 dias (A), barra=50uM. As mesmas se refletem numa maior produção de gotículas lipídicas (adipogênese), matrix calcificada (osteogênese) e rica em glicosaminoglicanos (condrogênese) como pode ser observado através de imunohistoquímica (B), temos nos insertos o grupo controle, todos ao 21º. dia após indução. Os níveis de expressão relativa de mRNA para marcadores específicos destes respectivos processos podem ser aferidos em (C) Leptina; (D) Fosfatase Alcalina; (E) Colágeno II. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o controle não diferenciado no menor tempo de diferenciação, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

4.1.5 Estabelecimento de modelo experimental humano - Expansão de células em microcarregadores para uso em terapia celular

O estabelecimento de linhagens de células-tronco mesenquimais humanas se deu através da coleta de pele de diversos doadores com

etnias, sexo, idade e local de coleta diferentes. Foram geradas culturas primárias e separadas por “sorting” subpopulações enriquecidas para marcadores específicos de células-tronco mesenquimais estromais. Após o isolamento, cada cultura celular derivada foi caracterizada quanto à presença de marcadores específicos e capacidade de diferenciação, sendo as culturas escalonadas em *spinners* e disponibilizadas para os grupos que compreendem a Rede Nacional de Terapia Celular.

4.1.6 Isolamento de progenitores de derme humana de doadores de diversas faixas etárias (jovem, adulto e idoso).

Para o âmbito desta tese, foram selecionadas três linhagens de doadores do sexo masculino, com local de coleta semelhante e diversas categorias de idade diferentes: criança (0-5 anos), adulto (20-30 anos) e idoso (+60 anos). A opção foi de utilizar um número reduzido de doadores por faixa etária em detrimento do uso de diversas linhagens de uma faixa etária exclusiva. Essa escolha se baseou no fato de considerarmos os experimentos aqui apresentados como uma prova de princípio para a aplicação futura deste protocolo em terapia celular, o que requer que o mesmo seja aplicável às diversas faixas etárias.

4.1.7 Caracterização da expressão de marcadores específicos, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens e comportamento *in vitro* de progenitores dérmicos.

As culturas primárias mistas obtidas dos diferentes doadores foram submetidas à seleção através do processo de separação (*sorting*) utilizando-se os marcadores CD34, CD90 e CD105, conforme pode ser observado através da figura 19 A. Após a seleção, as mesmas foram aferidas quanto ao perfil de marcadores recomendado pela *The International Society for Cellular Therapy* (Dominici, Le Blanc et al.,

2006) e apresentaram o perfil típico de células-tronco mesenquimais, ou seja, mostraram um perfil de moléculas de superfície negativo para CD14,CD34,CD31 e CD45 e positivo para CD105, CD90, CD44 e CD29 (Figura 19 B).

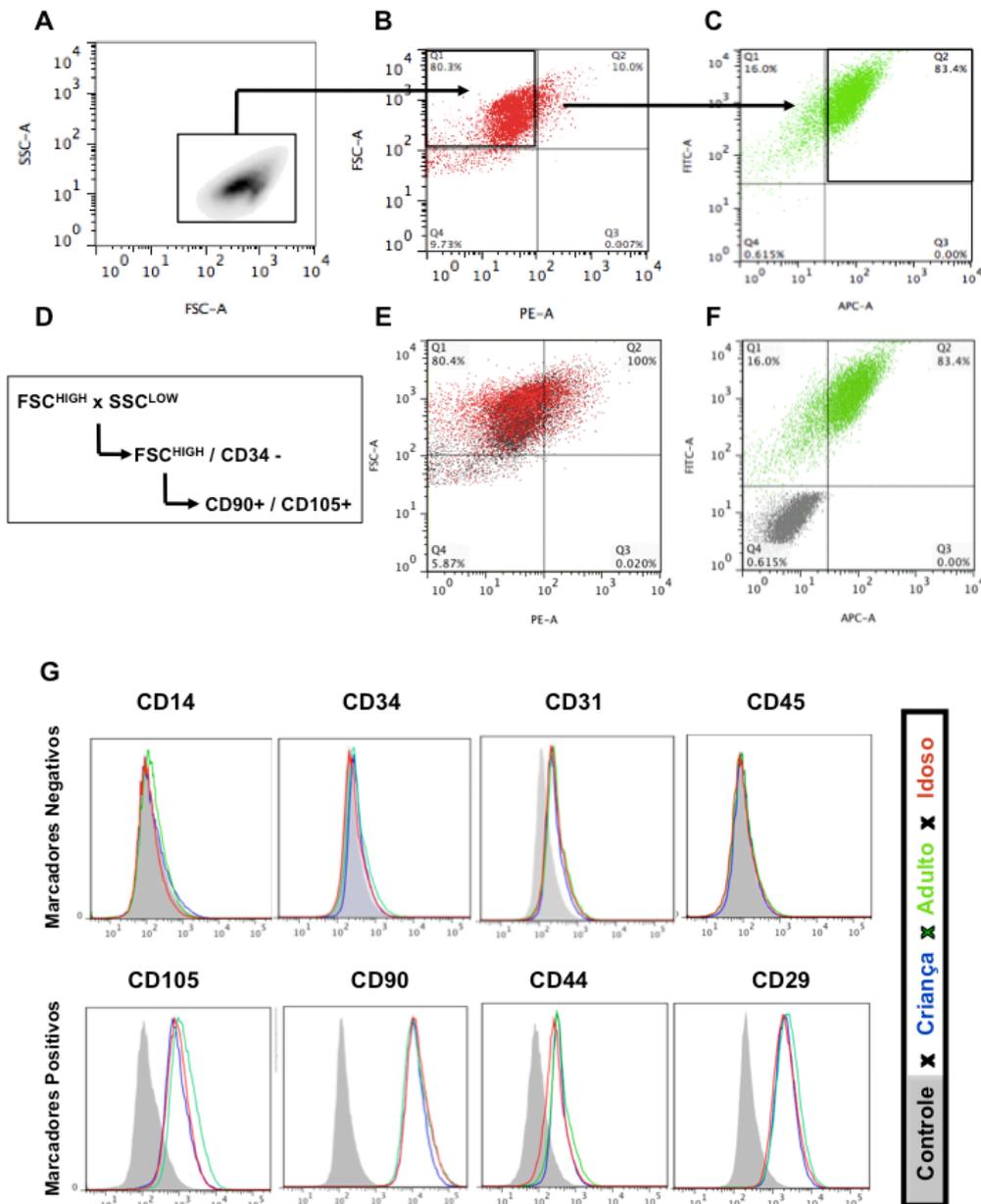


Figura 19: Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana. Para o isolamento de precursores da derme humana, pedaços de tecido foram digeridos enzimaticamente até a obtenção de células únicas e após formarem uma monocamada foram inquiridos quanto à presença de marcadores de células-tronco mesenquimais. A população inicial excluída de fragmentos e particulados (A) foi selecionada a partir da falta de expressão para CD34 (B) e pela dupla expressão de CD105 e CD90 (C), todos através da adoção de “gates” condicionais como pode ser observado em (D), a estratégia de “sorting”. Como referência mostramos as populações marcadas e seus respectivos controles (cinza) em (E) e (F). Para confirmar a estabilidade da seleção, amostras das mesmas em P4 foram interrogadas quanto à presença de marcadores positivos e negativos de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo (G). Todos os grupos marcados com anticorpo conjugado (linha azul=criança, verde=adulto e idoso=vermelho) foram comparados com um “pool” dos seus respectivos controles (linha cinza preenchida), pelo menos 50.000 eventos foram coletados para análise. Os resultados são representativos daqueles obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata.

Quando induzidas a se diferenciarem (P4), as células induzidas à diferenciação adipogênica acumulam em seu citoplasma vesículas com conteúdo lipídico que são evidenciadas através da coloração de histoquímica com Oil Red O, como observado na Figura 20A, sendo que não há diferença aparente entre o número de focos de diferenciação entre os três grupos experimentais.

O mesmo padrão pode ser observado na diferenciação osteogênica (Figura 20 B) e na condrogênese (Figura 20C).

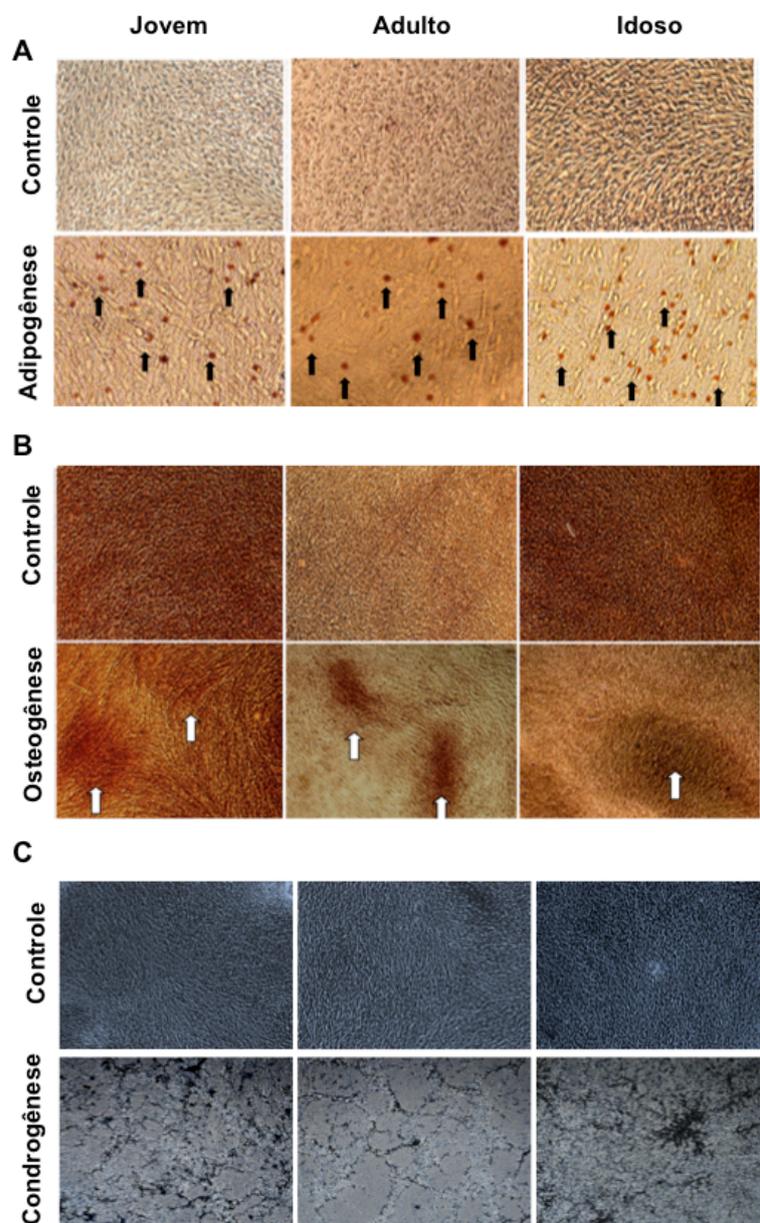


Figura 20: Diferenciação de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana. Células-tronco mesenquimais humanas na quarta passagem foram estimuladas a se diferenciarem através da exposição das mesmas a meios de cultura indutores de adipogênese, osteogênese e condrogênese. Amostras foram coletadas após 21 dias de estímulo. Alterações morfológicas importantes podem ser observadas nas micrografias obtidas por histoquímica após 21 dias (A) Adipogênese, coloração com Oil Red O; (B) Osteogênese, coloração com Alizarin Red; (C) Condrogênese, coloração com azul de toluidina. Os resultados apresentados são representativos dos obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata.

As células-tronco mesenquimais humanas foram avaliadas quanto à sua capacidade de manter o perfil de expressão de marcadores positivos e negativos ao longo do subcultivo *in vitro* como teste para o crescimento em microcarregadores que leva a um aumento considerável do número de dobramentos populacionais sofridos pela célula. Na quarta passagem essas células foram aferidas quanto ao seu fenótipo de proteínas de membrana para marcadores negativos e positivos de células-tronco estromais (Fig 17 C). Os marcadores negativos CD31, CD14 CD34 e CD45 apresentaram marcações praticamente inexistente ou muito fraca nos três grupos experimentais, independente da passagem celular, indicando que uma vez selecionadas através de sorting, estas populações mantinham-se puras, como esperado (Fig 21A, B e C). Já o padrão fenotípico dos marcadores positivos mostraram-se expressos em diferentes graus de intensidade dentro dos grupos experimentais em função do tempo de subcultivo. Para os marcadores expressos em alta abundância como CD90 e CD150 aparentemente há uma tendência de variação entre os grupos de criança e idoso, mas nas células dos adultos o mesmo se encontra inalterado (Fig 21A, B e C). Já para os marcadores pouco expressos (CD29 e CD44) não ocorre mudança significativa entre os grupos.

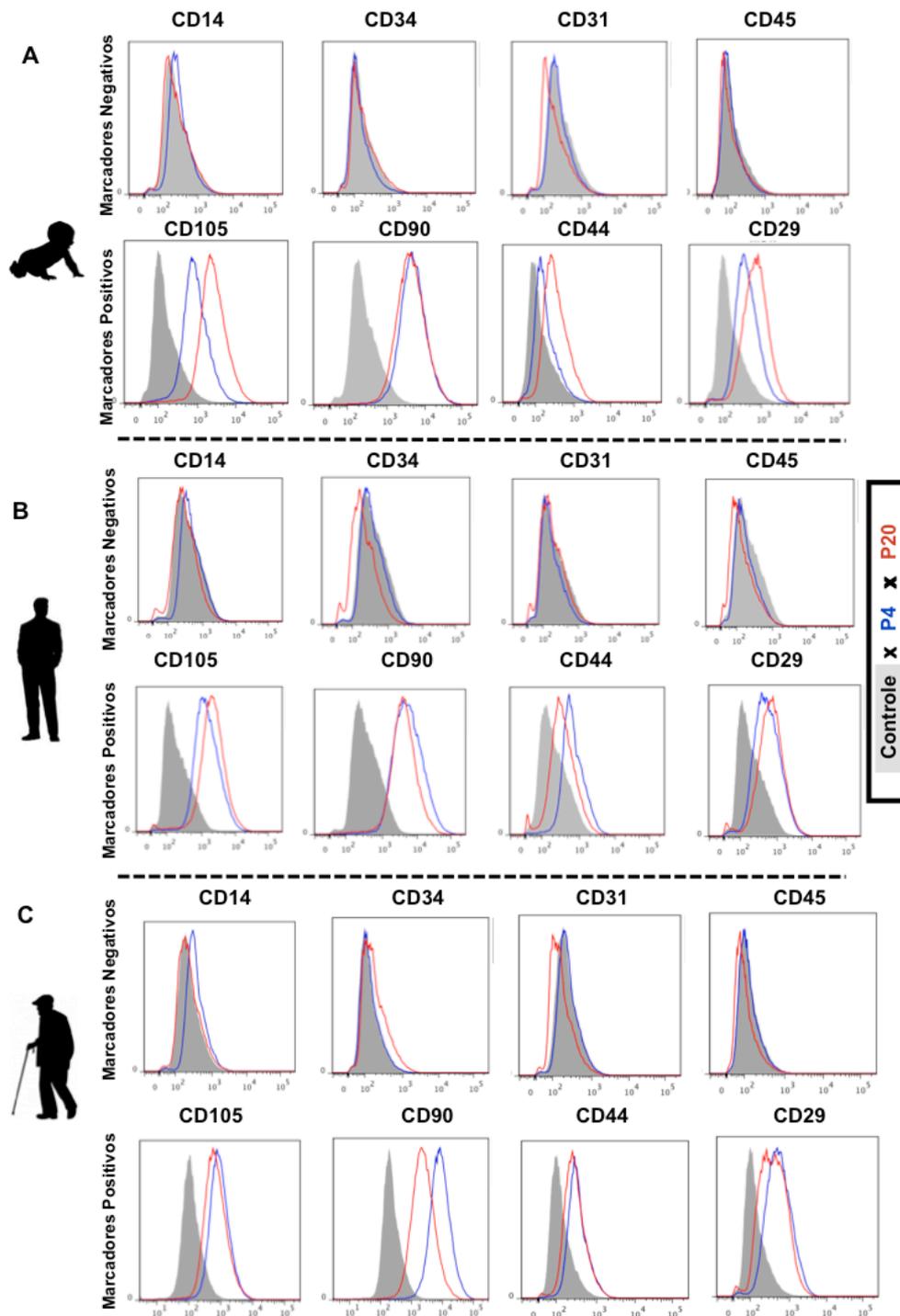


Figura 21: Comparação do efeito do subcultivo *in vitro* sobre o fenótipo de marcadores de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana. Células-tronco mesenquimais de derme humana foram avaliadas quanto à sua capacidade de manter o perfil de expressão de marcadores positivos e negativos ao longo do subcultivo *in vitro* como teste para o crescimento em microcarregadores que leva a um aumento considerável do número de dobramentos populacionais sofridos pela célula. Para tanto células em passagem 4 foram comparadas com células na vigésima passagem quanto ao seu perfil imunofenotípico em função das diversas idades coletadas (A) Criança, (B) Adulto, (C) Idoso (em cinza preenchido o “pool” do controle, em azul P4 e vermelho P20). Pelo menos 50.000 eventos foram coletados para análise. Os resultados são representativos daqueles obtidos em quatro experimentos independentes, realizados em duplicata.

Apesar do padrão de marcadores de superfície celular se mostrar aparentemente inalterado nos três grupos experimentais em função do tempo de subcultivo *in vitro*, o mesmo não pode ser apreendido sobre a dinâmica de proliferação celular nessa situação. A taxa de proliferação na quarta passagem, como pode ser observado na Figura 22 A, é maior para todos os grupos quando comparada com a passagem 20 (Figura 22 B). Esse fato fica ainda mais evidente quando observamos os dados reunidos em um só gráfico (Figura 22 C) e constatamos que já no quinto dia do experimento há uma forte inflexão nos grupos de maior tempo de subcultivo na faixa de crescimento exponencial, levando-nos a postular que, apesar de apresentarem todo o perfil de marcadores associados com o compartimento de células-tronco mesenquimais, estas células talvez percam seu potencial proliferativo de maneira significativa.

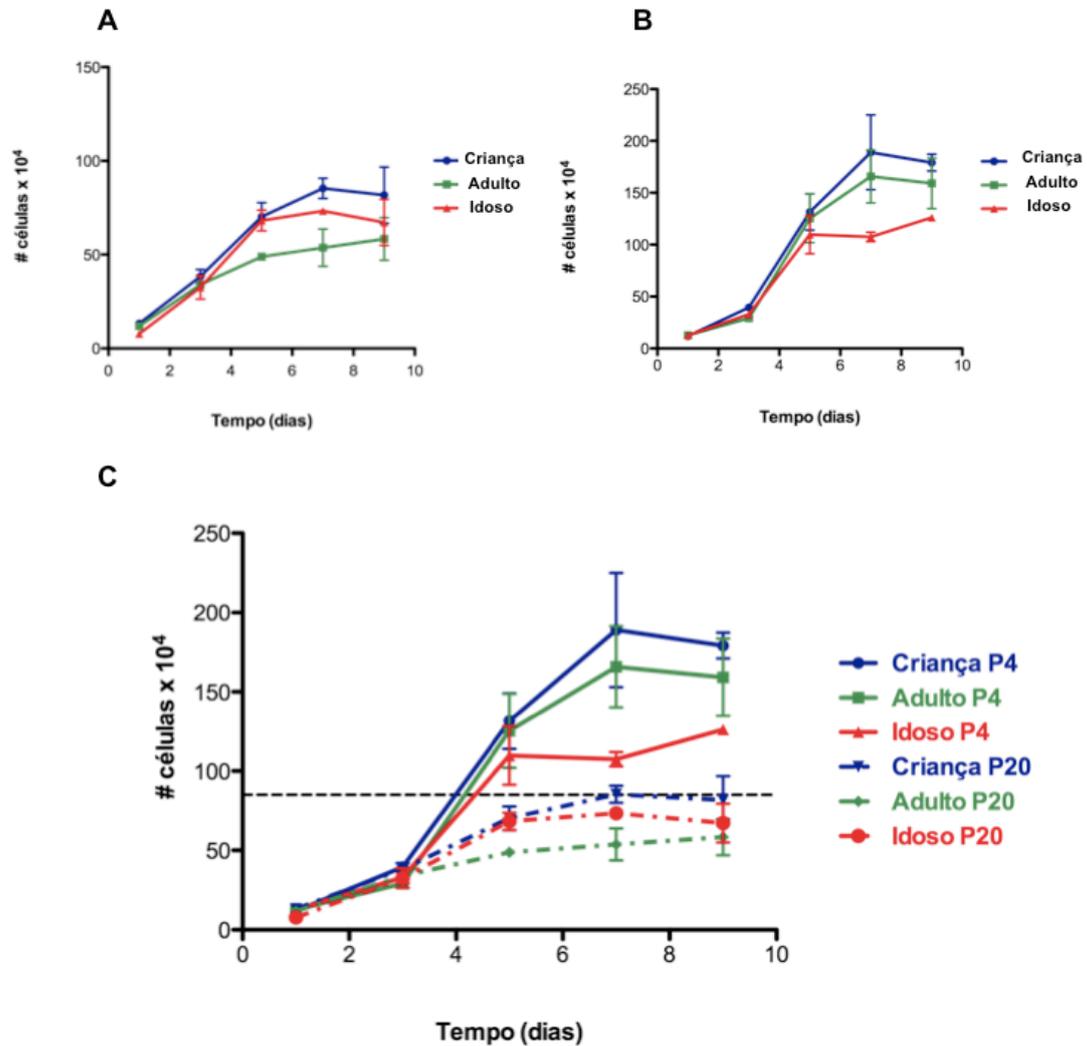


Figura 22: Comparação do efeito do subcultivo *in vitro* sobre a taxa de proliferação de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana. Células-tronco mesenquimais de derme humana foram avaliadas quanto à sua capacidade de manter o potencial proliferativo ao longo do subcultivo *in vitro* como teste para o crescimento em microcarregadores, que leva a um aumento considerável do número de dobramentos populacionais sofridos pela célula. Para tanto, células em passagem 4 (A) foram comparadas com células na vigésima passagem (B) quanto à sua taxa de proliferação. Para tanto, ensaios de curva de crescimento foram realizados sendo as amostras coletadas após 1,3,5,7 e 9 dias de crescimento. A comparação das duas condições pode ser observada em (C). Os resultados apresentados são representativos dos obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata.

4.1.8 Padronização do cultivo em bioreator de progenitores dérmicos humanos e avaliação dos possíveis efeitos deletérios deste processo sobre o potencial proliferativo.

O protocolo de inoculação dos *spinners* foi adaptado de (Mantovani Mda, Da Conceicao *et al.*, 2009) com algumas modificações. O inóculo inicial de células foi de 2×10^6 porque após os dados coletados na seção anterior quanto à menor taxa de proliferação celular após grande quantidade de passagens durante o subcultivo, a necessidade de se utilizar a menor passagem possível foi levada em conta. Como o número mínimo recomendado de células por carregador recomendado pelo fabricante só foi obtido na quarta passagem, adotamos a densidade de microcarregadores de 1g/L .

Após obter uma suspensão inicial de células na densidade correta, as mesmas foram transferidas para os frascos *spinner* e inoculadas com os microcarregadores previamente hidratados e esterilizados a uma rotação de 30 rpm por 12h para maximizar a adesão celular. A dinâmica de preenchimento dos microcarregadores foi acompanhada diariamente, sendo que aqui apresentamos apenas o dia inicial e final do experimento. Como pode ser observado na figura representativa e seu respectivo gráfico, as células do doador criança e adulto são capazes de aderir com maior efetividade ao colágeno dos microcarregadores levando a uma proporção maior de beads parcialmente cobertas já no início do experimento (Figura 23 A), enquanto que as células do doador idoso o fazem em menor proporção, levando a um grande número inicial de microcarregadores vazios de partida. Esse fato tem um impacto claro ao final do experimento, uma vez que apenas no grupo jovem obtem-se um número expressivo de microcarregadores completamente preenchidos, enquanto que para o grupo adulto e idoso a maior parte dos microcarregadores se encontra parcialmente recoberta (Figura 23 A).

O fato das células do grupo idoso serem menos aptas a aderirem no início do experimento é também refletido na curva de crescimento

que tem sua inclinação (velocidade de dobramento) bem inferior quando comparada à do grupo adulto e jovem, outro fator observado que pode ter gerado este comportamento foi a maior presença neste grupo, de células no meio de cultura ao longo do tempo total do experimento, uma indicação de que apesar de proliferarem as mesmas não apresentavam a tendência de se manterem aderidas aos microcarregadores (Figura 23 B).

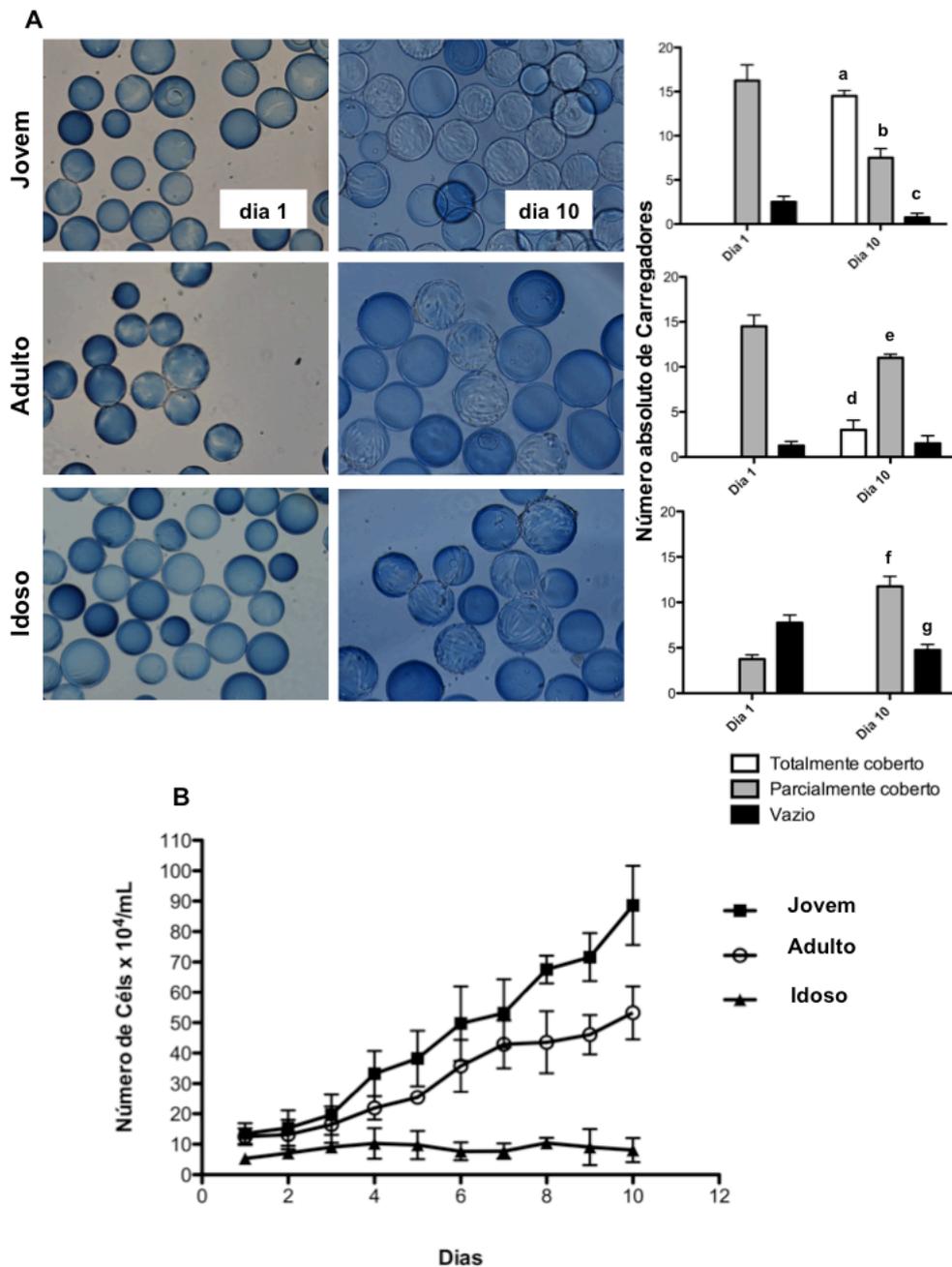


Figura 23: Crescimento em biorreator de células-tronco mesenquimais estromais de derme humana - Parâmetros de proliferação celular. Células-tronco mesenquimais de derme humana em P4 foram inoculadas em microcarregadores no sistema de frascos *spinner* e após 24h, período de adesão, foram mantidas durante 10 dias para escalonamento da população visando a terapia celular. O preenchimento dos microcarregadores pode ser visualizado em (A), as figuras são representativas para as coletas dos dias 1 e 10. Também foram contabilizados os microcarregadores em número absoluto que se encaixassem numa das seguintes classes: totalmente e parcialmente cobertos e vazios, sendo os gráficos apresentados ao lado das micrografias. Diariamente, foram feitas coletas para a curva de crescimento (B). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se teste de variância ANOVA seguido de teste T. Todos os grupos foram aferidos *versus* seus correspondentes no dia 1; c,d,g = $p \leq 0,05$; a,b,e,f = $p \leq 0,001$; ns=todos os demais grupos em dia 10 não nomeados.

Os níveis de glicose e lactato são bons indicativos do metabolismo aeróbico e aparentemente não apresentam diferenças entre os grupos experimentais (Figura 24 A), quando comparados em função da sua concentração total no meio de cultivo. Mas, se for levado em consideração o fato de que a densidade celular dos grupos jovem e adulto é muito maior (Fig 23 B) do que o grupo idoso podemos constatar que estas células estão produzindo muito mais lactato para a mesma quantidade de glicose consumida pelos grupos mais novos, o que nos leva a supor que o metabolismo energético utilizado é preferencialmente glicolítico/fermentativo neste grupo.

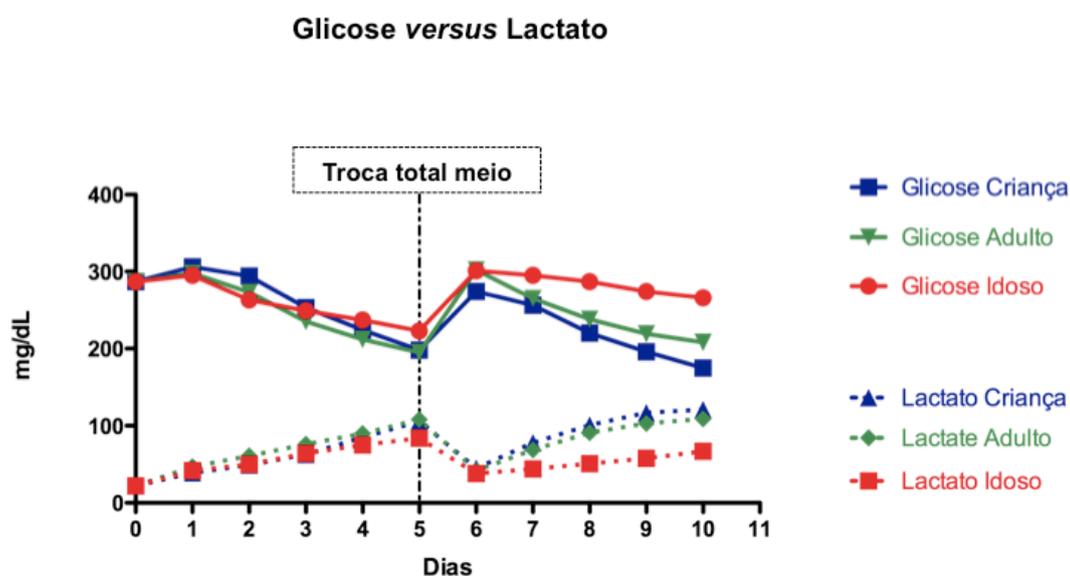


Figura 24: Crescimento em Biorreator de Células-tronco mesenquimais estromais de derme humana - Parâmetros bioquímicos. Células-tronco mesenquimais de derme humana em P4 foram inoculadas em microcarregadores no sistema de frascos *spinner* e após 24h de tempo para adesão mantidas durante 10 dias para escalonamento da população visando à terapia celular. A concentração de glicose e lactato no meio de cultura foi aferida diariamente. Os resultados são representativos de um dos três experimentos independentes, sendo as medidas realizadas em triplicata.

4.2 Seção 2 de Resultados – Papel da homeostase de glutathiona durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais de derme murina.

Tendo estabelecido um modelo celular robusto para análise da diferenciação de células-tronco da pele na primeira seção, deu-se seguimento à análise do papel do estresse oxidativo durante este processo. Para tanto, o primeiro passo foi definir se existiam diferenças entre os desafios para manutenção do *status* redox entre as células-tronco e sua progênie diferenciada. Para tanto utilizou-se a abordagem de avaliar o perfil de expressão de componentes do sistema antioxidante enzimático canônico e aquele relacionado à glutathiona, na tentativa de encontrar inferências que permitissem avaliar a participação e importância da glutathiona nestas células.

4.2.1 Comparação do perfil de expressão de componentes do sistema antioxidante enzimático em precursores mesenquimais de derme e em osteoblastos gerados a partir da diferenciação dos mesmos.

Para comparar o perfil de expressão dos genes codificadores das enzimas do sistema antioxidante canônico e relacionado à glutathiona, as células-tronco mesenquimais murinas derivadas da derme foram expostas ao meio de indução da osteogênese por diferentes períodos de tempo (7, 14 e 21 dias) correspondentes à fase de diferenciação terminal em osteoblastos. Estes períodos de tempo experimentais foram validados na seção 4.1 de Resultados. Após a coleta do mRNA, os níveis de expressão relativa de transcritos associados à resposta antioxidante canônica foram aferidos. Os níveis relativos de catalase mostraram-se diferencialmente expressos no décimo quarto dia, estando significativamente mais altos no período final da avaliação (21 dias, mais de 3x, $p \leq 0,05$), conforme pode ser observado na figura 26A. O mesmo se reflete na atividade enzimática, mas esta encontra-se

aumentada apenas no período no qual a diferenciação está completa (Fig 26 D, $p \leq 0,05$), no entanto deve ser ressaltado que ambos os grupos apresentam atividades consideradas baixas quando comparadas com outros tecidos. Também foram analisados os níveis de expressão das superóxido dismutases CuZn (Fig 26B) e Mn (Fig 26C). De forma geral os níveis de mRNA para essas enzimas encontram-se diminuídos nas células diferenciadas, em relação às progenitoras, sendo que a atividade enzimática total correspondente a essas duas isoformas se encontra diminuída também (Fig 26E, $p \leq 0,001$).

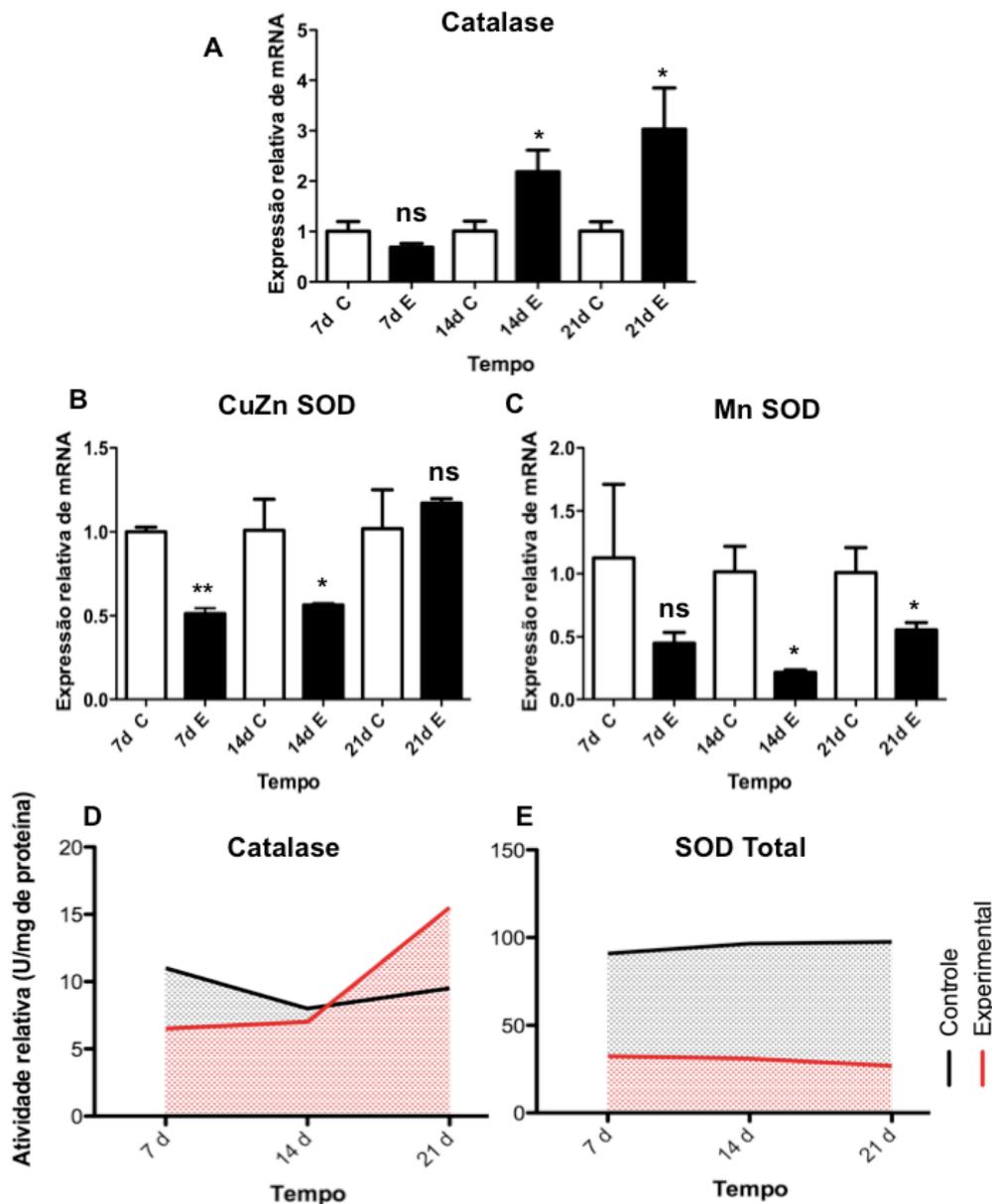


Figura 26: Padrão de expressão e atividade de enzimas do sistema antioxidante canônico durante a diferenciação terminal de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais murinas derivadas da derme foram expostas ao meio de indução da osteogênese por diferentes períodos de tempo (7,14 e 21 dias) correspondentes à fase de diferenciação terminal em osteoblastos. Os níveis de mRNA dos transcritos codificantes para catalase (A), Cu/Zn superóxido dismutase (B) e Mn superóxido dismutase (C) foram avaliados através de q-RT-PCR. Como controle foram utilizadas células mantidas pelo mesmo período de tempo em meio de crescimento. Nos mesmos períodos foram coletadas amostras para a quantificação da atividade enzimática de catalase (D) e superóxido dismutase total (E), que corresponde à soma das atividades de todas as isoformas. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste *a posteriori* de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle do mesmo tempo de coleta, ns=não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Os níveis de mRNA da enzima glutathiona redutase também foram mensurados e mostraram-se significativamente aumentados apenas no vigésimo primeiro dia da diferenciação (Fig 27A, $p \leq 0,001$). Para a família das glutathiona peroxidases foram avaliadas as isoformas 1, 2 e 3. Enquanto a GPX-1 não mostrou níveis alterados estatisticamente significantes, apenas uma pequena queda em 7 dias (Fig 27B), a GPX-2 mostrou-se aumentada (Fig 27 C, $p \leq 0,001$) após a diferenciação terminal estar completa. Já para a isoforma número 3, desde os períodos precoces de diferenciação, seus níveis mostraram-se consideravelmente aumentados, mais de 100x no sétimo dia, culminando com um aumento de mais de 400x no período correspondente à diferenciação terminal final, como pode ser observado na figura 27 D ($p \leq 0,001$). Os níveis de atividade enzimática, tanto da GSR (27E) quanto da GPX total (27F), encontram-se aumentados nas células diferenciadas de uma forma tempo-dependente, ou seja, os maiores níveis de atividade são atingidos nos períodos finais da diferenciação. No caso da GSR as altas taxas de atividade enzimática nos osteoblastos provavelmente se devem à maior estabilidade protéica desta enzima, uma vez que os níveis de mRNA para a mesma só atingem níveis aumentados após 21 dias de diferenciação (Figura 27A).

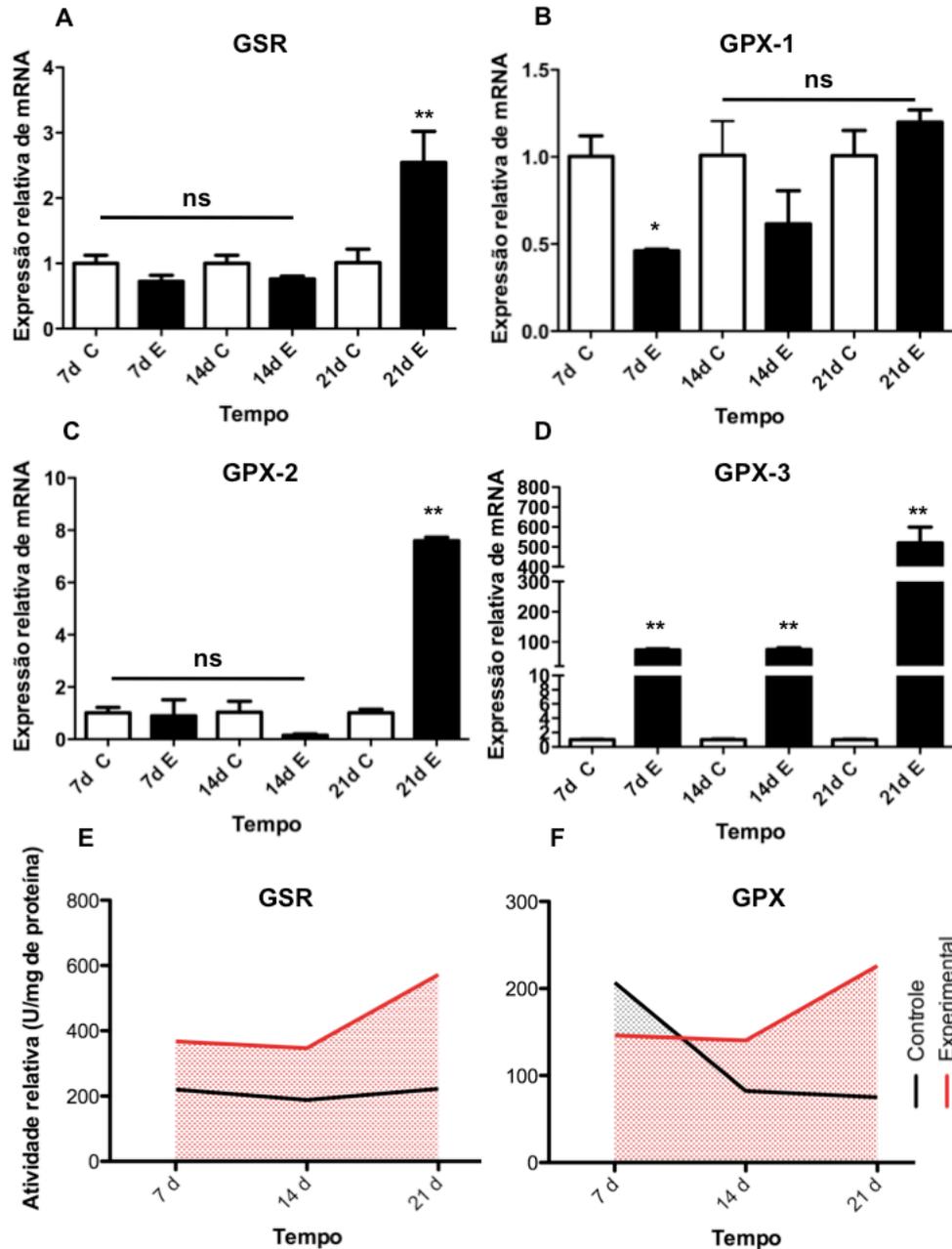


Figura 27: Padrão de expressão e atividade de enzimas do sistema antioxidante relacionado à glutatona durante a diferenciação terminal de células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais murinas derivadas da derme foram expostas ao meio de indução da osteogênese por diferentes períodos de tempo (7,14 e 21 dias) correspondentes à fase de diferenciação terminal em osteoblastos. Os níveis de mRNA dos transcritos codificantes para (A) glutatona redutase, (B) glutatona peroxidase 1, (C) glutatona peroxidase 2 e (D) glutatona peroxidase 3 foram avaliados através de q-RT-PCR. Como controle foram utilizadas culturas celulares mantidas pelo mesmo período de tempo em meio de crescimento. Nos mesmos períodos foram coletadas amostras para a quantificação da atividade enzimática de glutatona redutase (E) e glutatona peroxidase total (F), que corresponde à soma das atividades de todas as isoformas. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste *a posteriori* de

Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle do mesmo tempo de coleta, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Os níveis de expressão de mRNA mensageiro das três isoformas de peroxirredoxinas também foram averiguados. Todas as isoformas encontram-se aumentadas na diferenciação terminal quando comparadas com o controle não diferenciado (Fig 28 A, $p \leq 0,05$; B, $p \leq 0,001$; e C, $p \leq 0,05$). O mesmo padrão pôde ser observado para a isoforma 1 da tiorredoxina redutase (Fig 28 D, $p \leq 0,001$).

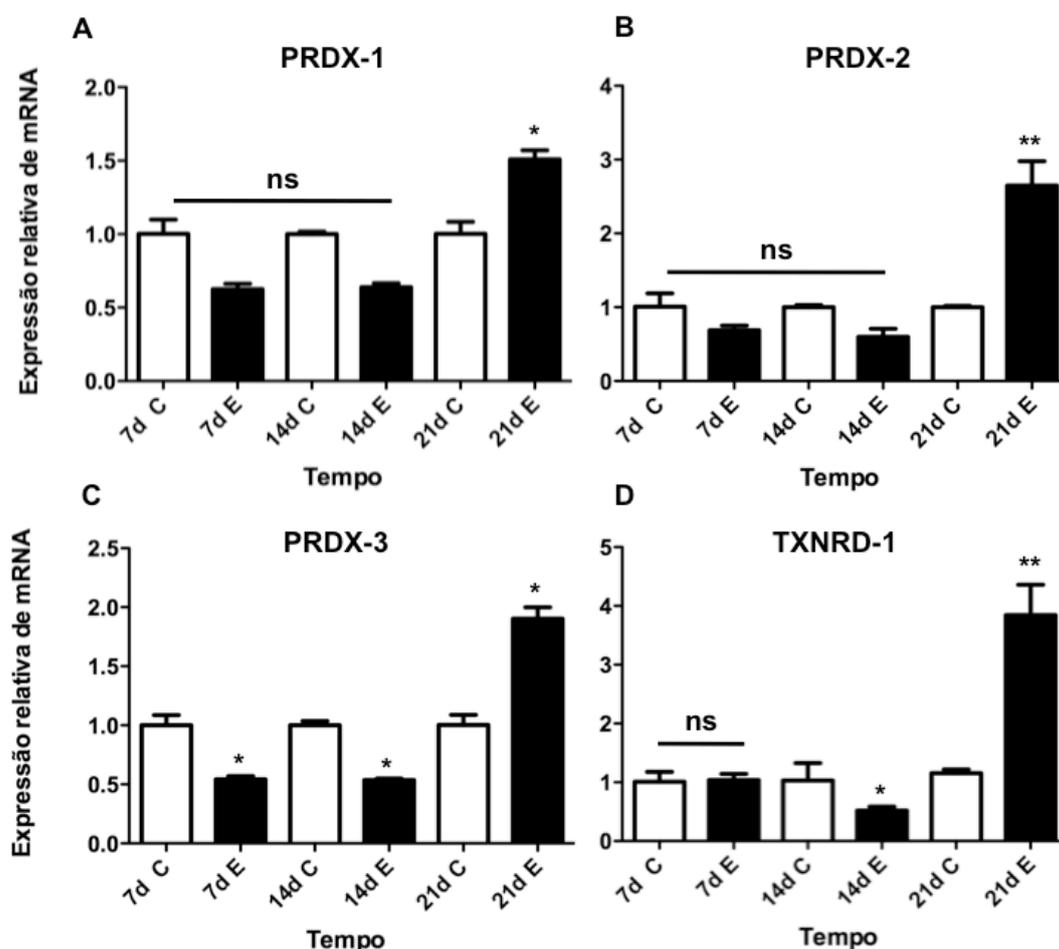


Figura 28: Padrão de expressão de peroxirredoxinas e tiorredoxina durante a diferenciação terminal de MSCs em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais murinas derivadas da derme foram expostas ao meio de indução da osteogênese por diferentes períodos de tempo (7,14 e 21 dias) correspondentes à fase de diferenciação terminal em osteoblastos. Os níveis de mRNA dos transcritos codificantes para (A) peroxirredoxina 1, (B) peroxirredoxina 2, (C) peroxirredoxina 3 e (D) tiorredoxina redutase 1 foram avaliados através de q-RT-PCR. Como controle foram utilizadas células mantidas pelo mesmo período de tempo em meio de crescimento. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle do mesmo tempo de coleta, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

4.2.2 Papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada durante o processo de diferenciação osteogênica.

Após a obtenção do perfil de expressão e atividade destas enzimas representativas, postulou-se que as maiores alterações observadas estavam associadas ao sistema antioxidante relacionado à glutathiona. Para avaliar se os níveis relativos entre as formas oxidada e reduzida da glutathiona estariam sendo alterados entre os precursores e sua progênie indiferenciada quantificou-se estes níveis e foi observado que a relação da glutathiona *versus* glutathiona dissulfeto era significativamente maior (mais do que o dobro, $p \leq 0,001$) nos osteoblastos diferenciados do que nas células-tronco indiferenciadas (Figura 29). Como controle para os experimentos de depleção do *pool* de glutathiona, utilizou-se como controle interno, os níveis obtidos na presença de 50 μM de BSO, um inibidor da síntese de glutathiona. A concentração deste inibidor de síntese da GSH foi definida experimentalmente como aquela que gerava maior depleção nos níveis totais de glutathiona sendo que a viabilidade celular (determinada por ensaio de MTT) não fosse diminuída em mais de 10%.

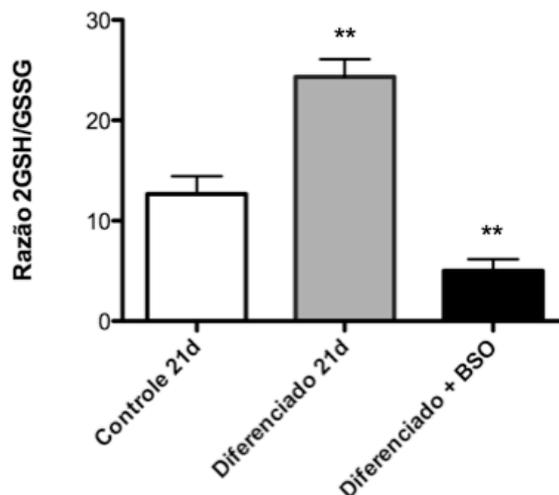


Figura 29: Homeostase da glutatona durante a diferenciação terminal de MSCs em osteoblastos. Células-tronco mesenquimais murinas derivadas da derme foram expostas ao meio controle e ao meio de indução da osteogênese na presença e na ausência de BSO, por 21 dias o que corresponde à fase de diferenciação terminal em osteoblastos. Após este período o conteúdo de GSH e GSSG foram medidos espectrofotometricamente conforme descrito em material e métodos. O controle de viabilidade celular foi realizado através de ensaio de MTT. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes, realizados em quadruplicata. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Após constatar que havia uma diferença significativa entre os níveis relativos deste tiol entre estes grupos, perguntou-se se essa mudança no perfil de expressão de intermediários do sistema antioxidante canônico e associado à glutatona também se daria num momento inicial, de comprometimento destas células com a osteogênese. Para avaliar se esse era o caso, avaliou-se os níveis relativos de mRNA para todos os genes estudados anteriormente, na busca daqueles que tivessem seus níveis alterados nas primeiras 24h de diferenciação. No painel de genes avaliados pudemos constatar níveis significativamente mais altos de GPX-1, 2 e 3 (Fig 30 D, E e F), GSR (Fig 30 G), PRDX-1 e 2 (Fig 30 H e I) e TXNRD1(Fig 30J).

De posse deste resultado selecionou-se esses genes para uma avaliação das possíveis vias de controle e transdução de sinal envolvidas com este processo. Inicialmente foram obtidas as sequências referentes aos promotores dos genes que se mostraram

diferencialmente regulados em até 24h de indução de osteogênese, ou seja: GPX-1, 2 e 3, PRDX1 e 2 e TXNRD1. Utilizou-se a ferramenta Promoter Retrival da base de dados Transcriptional Regulatory Element Database (TRED) mantida pelo Cold Spring Harbour Laboratory (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>) (Zhao, Xuan *et al.*, 2005; Jiang, Xuan *et al.*, 2007). No tocante à glutathione redutase (GSR), apesar de estar diferencialmente regulada, o banco de dados utilizado não possuía nenhuma sequência consenso, apenas previsões, o que levou à sua exclusão da análise. Utilizando uma outra ferramenta para alinhamento de promotores disponível no EMBL-EBI (PromoterWise, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/promoterwise/>), as sequências dos promotores foram alinhadas e todas as regiões consenso de cada par de genes foram submetidas ao programa Jaspar (<http://jaspar.genereg.net/>), que avalia os possíveis fatores de transcrição envolvidos na regulação de cada um dos genes selecionados (Sandelin, Alkema *et al.*, 2004; Portales-Casamar, Thongjuea *et al.*, 2010). A partir da combinação do perfil dos TFs obtidos, foi realizada uma busca na base de dados de sítios de fosforilação Phosphosite, uma busca por quinases capazes de fosforilar os fatores de transcrição observados (<http://www.phosphosite.org/homeAction.do>) sendo que foram encontradas como possíveis quinases reguladoras do processo as MAPK e Akt (Hornbeck, Kornhauser *et al.*, 2012).

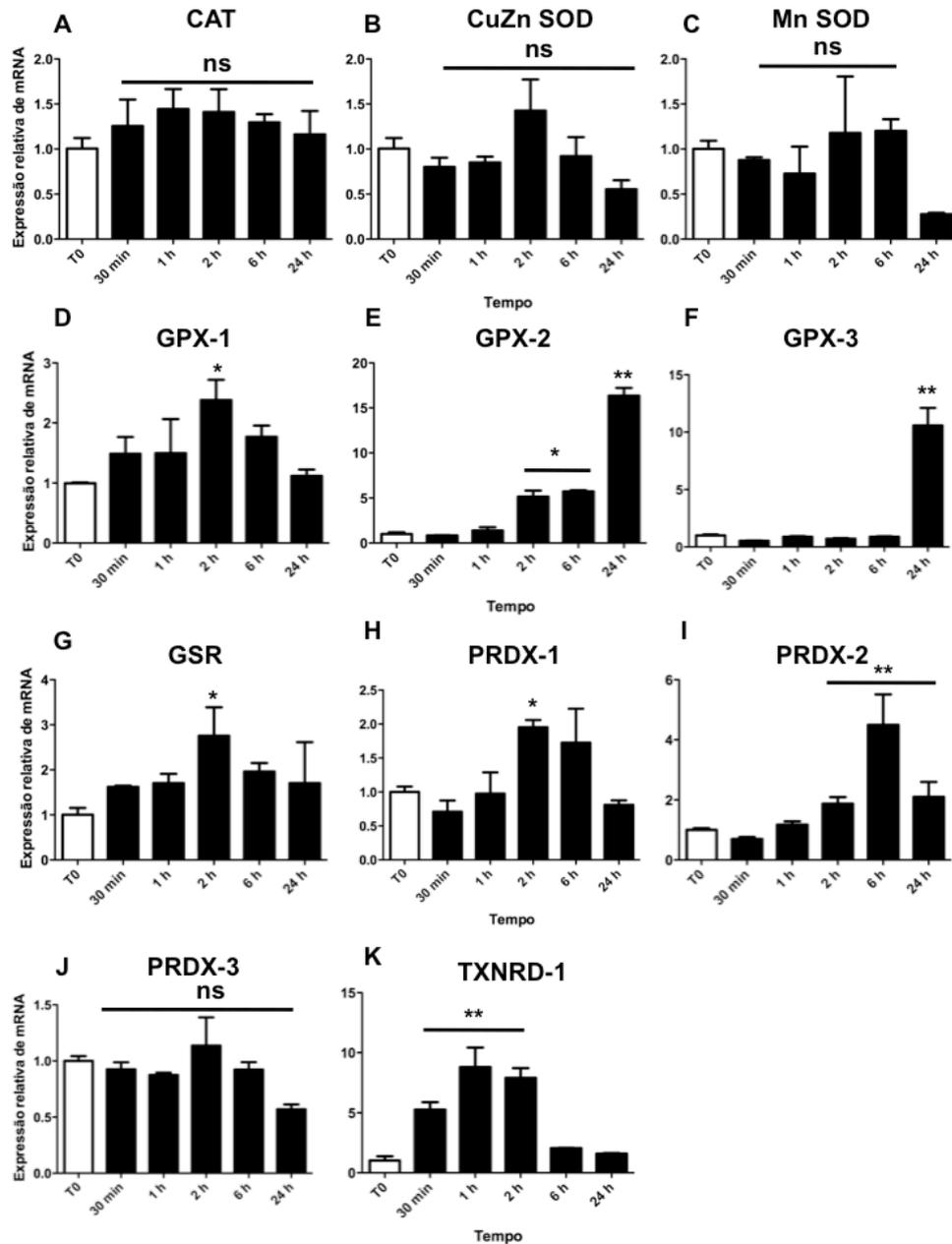


Figura 30: Padrão de expressão de genes codificadores das enzimas do sistema antioxidante canônico e relacionado à glutatona durante o comprometimento de células-tronco mesenquimais com a osteogênese. Os precursores mesenquimais foram expostos ao meio de diferenciação por diferentes períodos de tempo correspondentes ao processo de comprometimento celular mais dois pontos de períodos curtos (0=T0, 30min, 1h, 2h, 6h e 24h). Os níveis de mRNA dos transcritos codificantes para: (A) catalase, (B) CuZn superóxido dismutase, (C) Manganês superóxido dismutase, (D) glutatona peroxidase 1, (E) glutatona peroxidase 2, (F) glutatona peroxidase 3, (G) glutatona redutase, (H) peroxirredoxina 1, (I) peroxirredoxina 2, (J) peroxirredoxina 3 e (K) tiorredoxina redutase foram avaliados através de q-RT-PCR. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste *a posteriori* de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle não tratado em T0=tempo zero, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

4.2.3 Participação da via de MAPK durante o processo de diferenciação osteogênica e sua contribuição para as alterações resultantes da mudança do potencial redox ao longo deste processo.

Foi avaliada a participação das quinases ERK $\frac{1}{2}$, p38, JNK e Akt no mecanismo de regulação da diferenciação dos precursores mesenquimais murinos, dada a implicação destas vias no processo de osteogênese sugerida pela análise de Bioinformática. Neste sentido, foram inicialmente aferidos os padrões de fosforilação das mesmas em períodos de tempo relativamente curtos, relacionados com as etapas iniciais de comprometimento destas células com o destino de osteoblastos. Para determinar o momento do comprometimento destes progenitores com o destino de osteoblasto, foram realizados ensaios de fosfoproteoma pelo ex-aluno de doutorado Erik Halcsik, que estabeleceu como sendo de duas horas o período-chave, no qual as células irão se diferenciar, mesmo se o estímulo do meio indutor for removido (Halcsik, Forni *et al.*, submitted).

Para tanto, estratos protéicos totais de precursores expostos ao meio de diferenciação osteogênica por diferentes períodos de tempo (10min, 30min, 1h e 2h) foram utilizados em ensaios de *Western blotting*. Anticorpos específicos para as formas fosforilada e total de cada uma destas proteínas foram utilizados. Calculou-se as razões entre as formas fosforiladas e total destas proteínas ao longo desta cinética e os resultados são apresentados utilizando-se as células do grupo controle no início do experimento (T0, tempo zero) como referência.

A quinase ERK $\frac{1}{2}$ mostrou níveis de fosforilação mais de 60x aumentados já em 10 min de exposição ao meio indutor de osteogênese (Fig 31 A, $p \leq 0,001$), sendo que seus níveis de fosforilação decrescem, permanecendo, entretanto, maiores que o controle, mesmo após 2h de estímulo de diferenciação. Como pode ser observado na figura 31B, o comprometimento com a diferenciação osteogênica leva a dois picos temporalmente separados de JNK, após 10 min e 1h de

tratamento ($p \leq 0,001$), sendo seus níveis de fosforilação diminuídos para valores próximos ao do controle após 2h. Os níveis de fosforilação de Akt (Fig 31C, $p \leq 0,001$) e p38 (Fig 31D, $p \leq 0,05$) encontram-se ambos diminuídos durante o período de comprometimento com o destino osteoblástico.

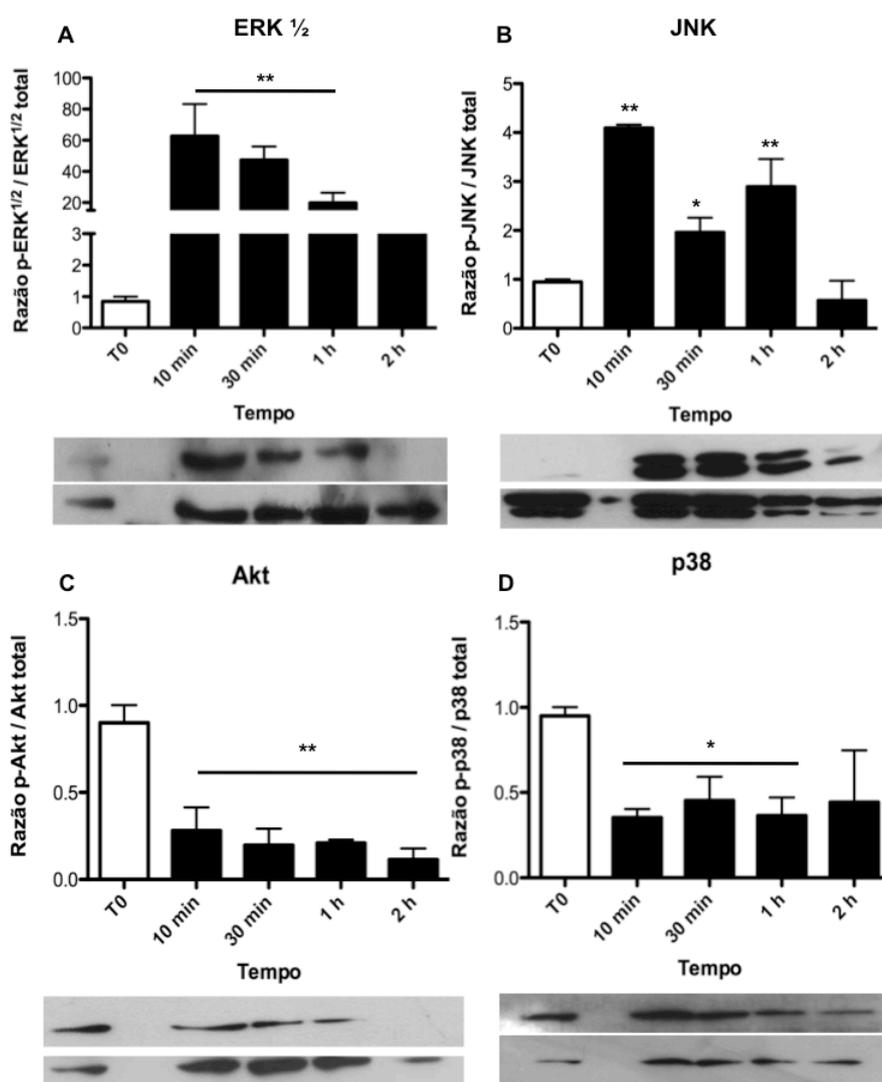


Figura 31: Cinética de fosforilação de MAPKs e Akt em precursores mesenquimais murinos induzidos à diferenciação osteogênica. Os precursores mesenquimais murinos foram expostos ao meio de diferenciação por diferentes períodos de tempo correspondentes ao processo de comprometimento celular (0, 10min, 30min, 1h e 2h). Extratos protéicos totais obtidos a partir destas condições experimentais foram utilizados para análise dos níveis de abundância das formas totais e fosforiladas das diferentes quinases: (A) JNK, (B) Erk $\frac{1}{2}$, (C) Akt e (D) p38. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As imagens de *Western blotting* são representativas dos resultados obtidos em um experimento. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle não tratado em T0=tempo zero, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Para avaliar a contribuição das vias de sinalização mediadas por ERK $\frac{1}{2}$ e JNK no processo de comprometimento osteogênico, juntamente com a disponibilidade de glutathiona, avaliou-se o perfil de diferenciação destes precursores murinos após 21 dias na presença de inibidores da via de ERK $\frac{1}{2}$ (PD98059, 20 μ M), e JNK (SP600125, 10 μ M) e na ausência (BSO) e presença (GSH_éster) de glutathiona.

Os inibidores utilizados foram testados nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 μ M por um período de quatro dias no meio de cultura celular, sem indução de diferenciação. Durante esta padronização foram escolhidas as concentrações capazes de inibir em pelo menos 80% a fosforilação da quinase de interesse após estímulo (10min estímulo osteogênico). Na escolha da concentração também foi levado em consideração a viabilidade celular, ou seja, não foram utilizadas concentrações que diminuíssem em mais de 10% a viabilidade celular.

Observou-se níveis diminuídos de formação de colônias contendo fosfato de cálcio (Fig 32 A) para todos os tratamentos, com efeito sinérgico dos inibidores quando associados à depleção de glutathiona. No caso da glutathiona-éster, observou-se um padrão de aumento dos depósitos de matrix mineralizada mas com um diâmetro diminuto em relação aos focos de diferenciação dos demais grupos, embora esse evento não tenha sido explorado em profundidade. Para confirmar que esta inibição estava relacionada ao comprometimento dos precursores, foram avaliados os níveis de expressão relativa de mRNA dos principais fatores de transcrição aumentados durante a diferenciação óssea. Como pode ser observado na Figura 32, itens B, C e D, todos encontram-se diminuídos, em diferentes graus. A única exceção foi para o fator de transcrição DLX-5 (Figura 32E), que não mostrou padrão significativo algum em nenhum dos grupos analisados. Esses resultados nos levaram a acreditar que a diferenciação óssea, como um todo, estava sendo inibida, sendo o mecanismo envolvido dependente dos níveis reduzidos de glutathiona e da sinalização via MAPK.

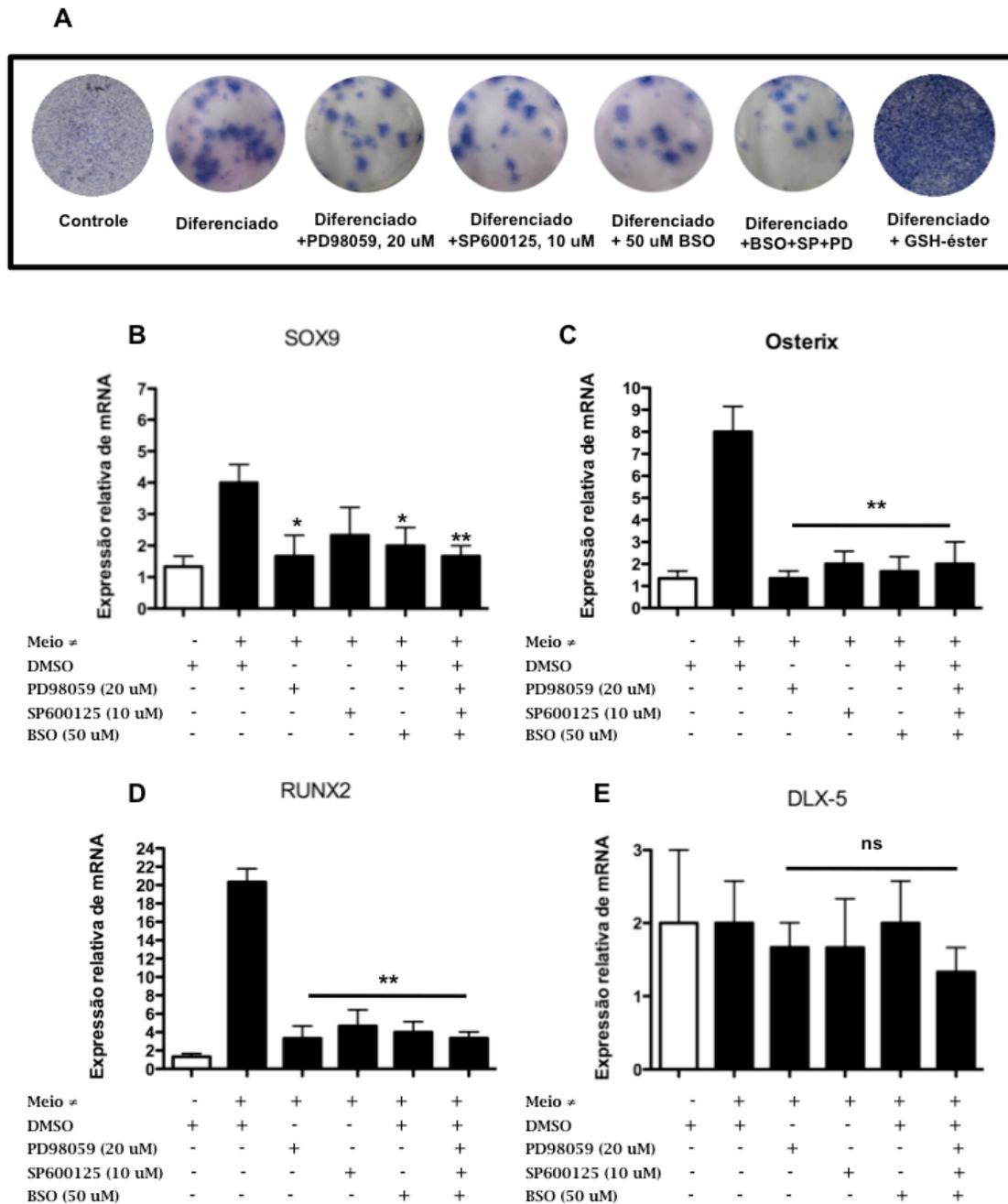


Figura 32: Contribuição sinérgica do balanço de glutatona intracelular e da fosforilação de MAPKs para o comprometimento de células-tronco mesenquimais com a osteogênese. Os precursores mesenquimais murinos foram expostos ao meio de diferenciação por 21 dias, período correspondente ao processo de diferenciação terminal. Para comparação, foram realizados tratamentos pelo mesmo período com meio controle, ou meio de diferenciação acrescido de inibidores, BSO ou GSH-éster. Após este período, as células foram coradas pela metodologia de Von Kossa, conforme visualizado em (A). Alternativamente, as células mesenquimais foram tratadas da mesma forma por 24h e o RNA total foi coletado para a análise da expressão gênica de marcadores específicos da diferenciação óssea, conforme visualizado em (B) SOX9, (C) RUNX2, (D) Osterix e (E) DLX5. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o grupo diferenciado por 21 dias, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

4.2.4 A depleção de glutathiona leva a um “*adipogenic switch*” ao longo da osteogênese em precursores dérmicos murinos.

Como observou-se alterações marcantes na derme de animais tratados com BSO durante 30 dias (Fig 33A), com um aumento significativo da produção de adipócitos por diferenciação de precursores da derme, foi aventada a possibilidade de estar ocorrendo, durante a inibição da diferenciação óssea *in vitro*, um evento semelhante àquele observado *in vivo* pelo tratamento com BSO, ou seja, um “*adipogenic switch*” mediado pela depleção da glutathiona. Durante este evento, associado ao envelhecimento da medula óssea e alguns outros tecidos, há formação exacerbada de adipócitos às custas da diferenciação de progenitores teciduais, os quais, na homeostase, seriam endereçados a diferentes destinos. Para aventar tal possibilidade, foram medidos os níveis de mRNA de dois fatores de transcrição que regulam a diferenciação adipogênica: CEBP α e PPAR γ . Como pode ser observado na figura 33 itens B e C, verificou-se que os níveis destes dois fatores de transcrição encontram-se inalterados quando comparamos o controle com a indução da diferenciação óssea. Porém, na presença dos dois inibidores, e de forma sinérgica, na presença de inibidores acompanhada da depleção de glutathiona, seus níveis aumentam de maneira significativa ($p \leq 0,001$), indicando que a adipogênese está sendo estimulada.

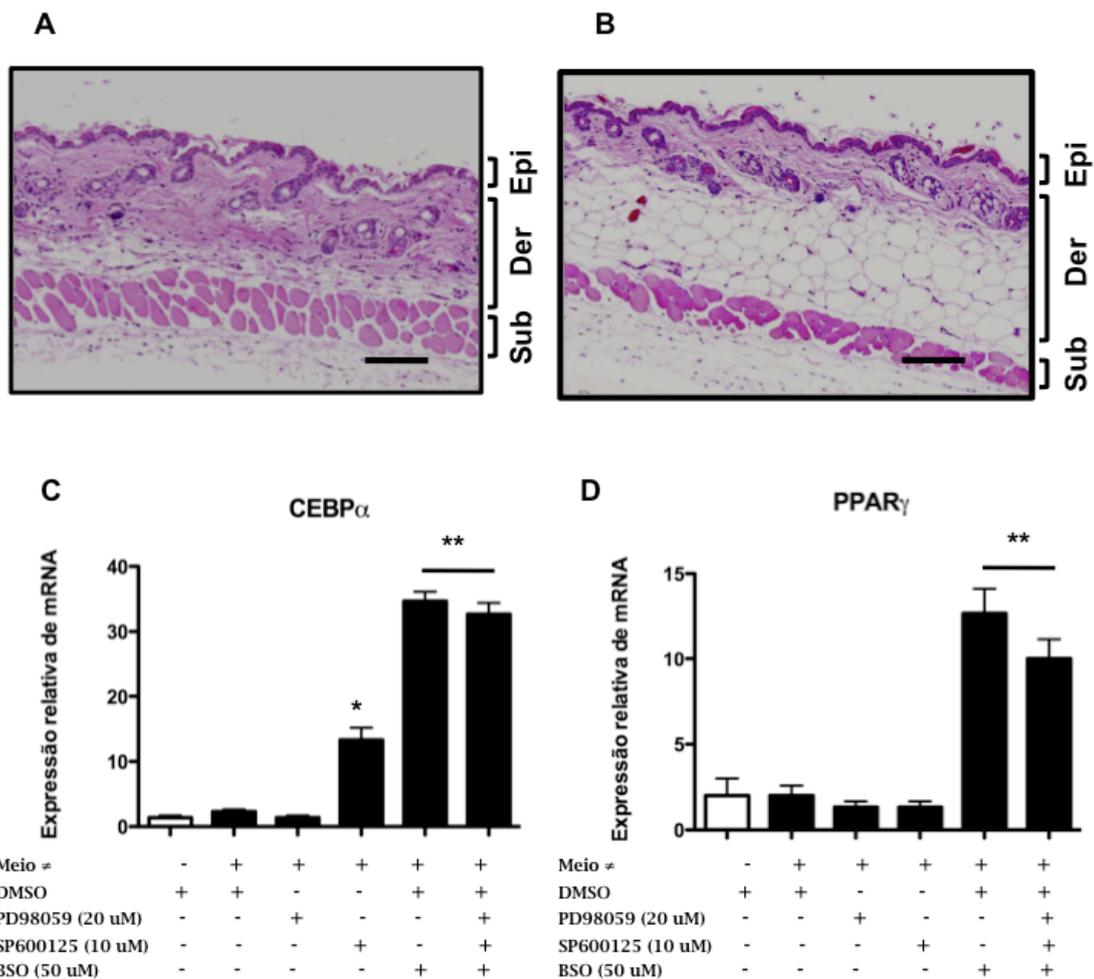


Figura 33: A depleção de glutatona leva a um “adipogenic switch” durante a diferenciação osteogênica de precursores mesenquimais de pele murina. Camundongos foram tratados durante 30 dias com injeções intraperitoneais de (A) salina ou (B) BSO, que leva à depleção sistêmica dos níveis de glutatona, o que leva a uma diferenciação generalizada dos precursores dérmicos em adipócitos como observado por histoquímica em coloração de hematoxilina e eosina. Epi=epiderme, Der=derme, Sub=tecido subcutâneo, no caso músculo. Barra= 100uM. Para avaliar os perfis de mRNA de fatores de transcrição associados à adipogênese a mesma estratégia experimental de induzir a diferenciação na presença de inibidores e BSO utilizada na figura 32 foi utilizado e foram aferidos os níveis relativos de (C) CEBP α e (D) PPAR γ . Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em três experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste *a posteriori* de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos *versus* o grupo diferenciado por 21 dias, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

A partir destes resultados, foi possível sugerir que o balanço entre GSH/GSSG é diferente entre os progenitores dermais murinos e sua progênie diferenciada. Além disso, o padrão de expressão e atividade de membros do sistema antioxidante canônico e relacionado à glutathiona parece ser bem diferente entre essas células, sugerindo que os desafios oxidativos experimentados por estas populações são distintos entre si. A lista de enzimas antioxidantes diferencialmente reguladas em períodos curtos de diferenciação também nos permitiu inferir, através de análise de Bioinformática *in silico*, o envolvimento da via das MAPKs neste processo, o que foi validado experimentalmente. Também pudemos observar que o balanço entre glutathiona em suas formas reduzida e oxidada é também importante para o processo de comprometimento celular com o destino de osteoblasto, sendo que a depleção deste tiol parece levar a uma mudança na determinação destes progenitores para a adipogênese, evento este sinergisticamente exacerbado pela inibição de ERK ½ e JNK.

4.3 Seção 3 de Resultados - Avaliação do papel do balanço GSH/GSSG ao longo do desenvolvimento embrionário da pele murina e na manutenção da homeostase deste tecido no adulto - possíveis correlações entre o processo de envelhecimento da epiderme e a depleção de glutathiona

Um outro aspecto que decidimos abordar experimentalmente nesta trabalho foi o do impacto do balanço GSH/GSSG sobre o compartimento epidermal. As células-tronco da epiderme são primeiro especificadas durante a embriogênese deste tecido, e para avaliar o papel da depleção deste tiol neste tecido começamos por esta etapa do desenvolvimento murino.

4.3.1 Avaliação do papel do balanço entre glutathiona reduzida e oxidada no comprometimento e desenvolvimento de precursores epidermais ao longo da embriogênese.

Para avaliar quais seriam as consequências de um desbalanço na homeostase da glutathiona para a especificação das EpiCTs durante o desenvolvimento embrionário o primeiro passo foi estabelecer um protocolo de depleção de glutathiona durante a gestação que não envolvesse nem a morte da genitora nem dos embriões. Para tanto foi testado o mesmo protocolo de depleção empregado nos animais adultos (injeção intraperitoneal de 500mM/kg de BSO), com a diferença que as injeções foram administradas apenas durante dois dias, E16 e E17, os mesmos que antecedem o início da diferenciação e estratificação do epitélio epidermal. Um primeiro experimento foi realizado como exigência do Comitê de Ética em Pesquisa Animal, no qual as injeções foram aplicadas e as fêmeas prenhas acompanhadas até o momento do nascimento dos camundongos, para verificar riscos de aborto ou morte da fêmea grávida. Não houveram maiores intercorrências e apesar de nascerem menores e com a pele mais frágil os animais gerados por fêmeas depletadas de GSH se recuperaram em

termos de crescimento em menos de um mês. Sendo o protocolo então liberado para implementação.

Durante os experimentos que se seguiram foram coletados embriões nos estágios de desenvolvimento E14, E16, E18 e P2 para serem usados como controles do processo de desenvolvimento. Os embriões originados de fêmeas tratadas em E16/17 foram coletados em E18 e em P2 (sendo que estes grupos nos animais controle tiveram a injeção de salina estéril no lugar do BSO).

Podemos observar uma marcante diferença na ultraestrutura tecidual da epiderme entre os grupos controle e depletado (Figura 34 A e B). A fragilidade da camada cornificada epidermal se deve principalmente ao seu espessamento, o que ocasiona ruptura durante a criosecção. Também podem ser observados focus hiperproliferativos na epiderme (Figura 34 B, 1). Um outro aspecto interessante, entretanto não abordado, foi a formação de tecido ósseo com menor deposição de matriz, com aspecto osteoporótico, que também não resiste aos processos de secção, mostrando-se fragmentado na histoquímica (Figura 34 B, 2). A área de superfície ocupada pela camada basal nos animais depletados é significativamente maior do que nos controles, corroborando o fenótipo de aumento de proliferação (Figura 34 C, $p \leq 0,001$). Índícios obtidos através de dotblots de tecido microdissecado nos embriões que foram expostos ao desbalanço de GSH, levaram à suposição de que talvez a fosforilação de Akt e de seus alvos a jusante FOXO1 e 4 estivessem envolvidas na determinação deste fenótipo (Figura 34 D). A fosforilação diferencial de FOXO1 foi confirmada através de microscopia confocal, onde pode ser observado que a depleção de GSH leva a um aumento nos níveis de p-FOXO1 precoce (E18) em comparação com os animais controle, onde este evento só ocorre em P2 (Figura 34 E).

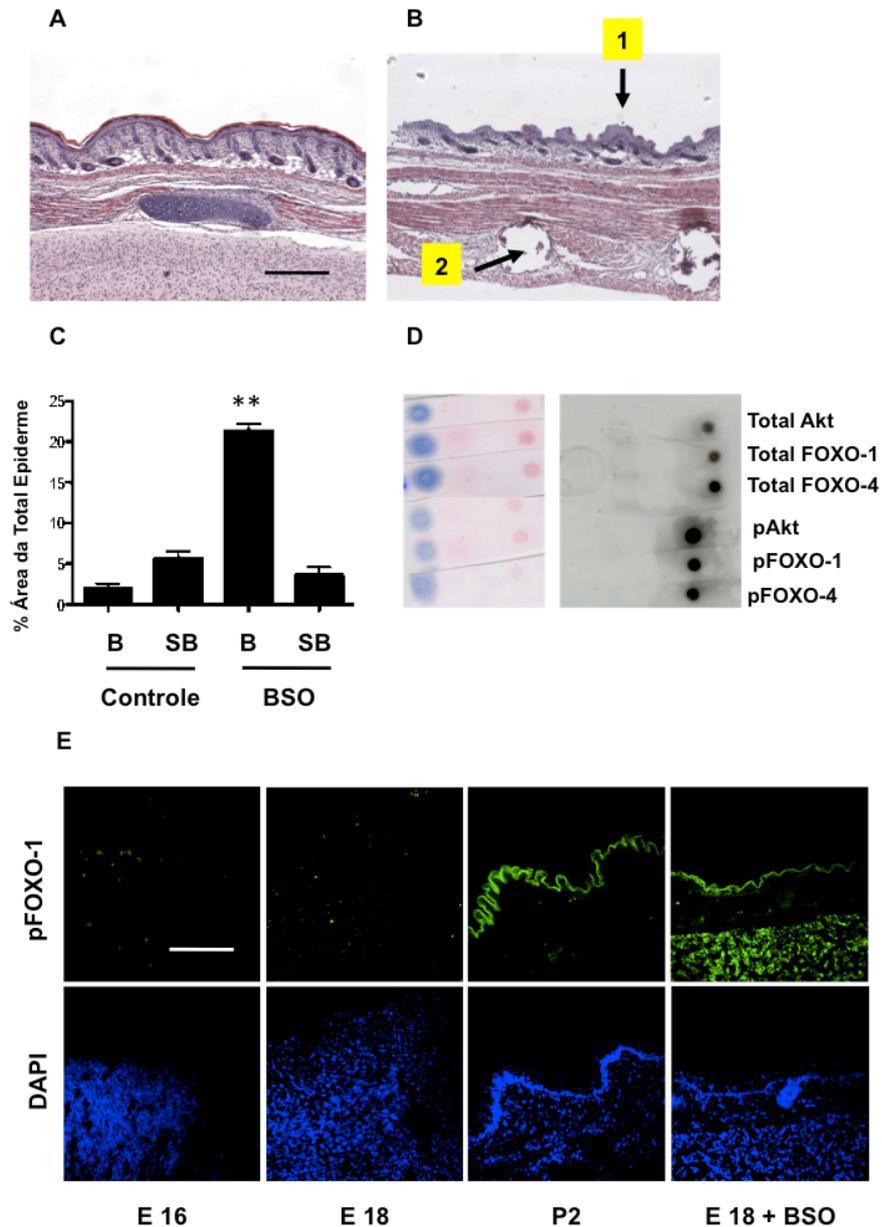


Figura 34: A depleção de glutathiona durante o desenvolvimento embrionário da epiderme – resposta hiperproliferativa e de ativação do programa de diferenciação celular. Camundongos foram tratados durante 2 dias (correspondentes a E16 e E17) com injeções intraperitoneais de (A) salina ou (B) BSO, sendo sacrificadas e tendo seus embriões coletados em E18. Podemos observar que o tratamento com BSO leva a uma depleção sistêmica dos níveis de glutathiona, o que leva a uma generalizada proliferação dos precursores epidérmicos como observado por histoquímica em coloração de hematoxilina e eosina. 1= foco hiperproliferativo na epiderme, 2=fragilidade do tecido ósseo. Barra= 100uM. A quantificação da área ocupada pelo estrato basal (B) e suprabasal (SP) nos dois grupos pode ser observada em (C). A epiderme foi microdissecada e os níveis de fosforilação de componentes do eixo Akt/FOXO foram avaliados por dotblot (D). Secções de embriões foram avaliadas quanto à fosforilação de FOXO1 de uma maneira tempo dependente (E). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 embriões. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste T. Todos os grupos foram aferidos versus o estrato equivalente do grupo controle, ** $p \leq 0,001$.

4.3.2 Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais murinas adultas *in vivo* e *in vitro*.

Para avaliar, agora em tecido adulto, o impacto da depleção deste tiol, a epiderme de camundongos foi coletada e separada da derme para quantificação da glutathiona e do dissulfeto de glutathiona. Essa avaliação visou comparar os níveis relativos de 2GSH/GSSG entre a pele de camundongos jovens (4-6 meses), idosos (12-14 meses) e animais jovens depletados por 1 mês com injeções intraperitoneais diárias de BSO. Podemos observar pela Figura 35 que a razão tende para uma maior abundância da forma reduzida nos animais jovens, quando comparados com os idosos ($p \leq 0,001$). Já os animais depletados possuíam um balanço significativamente menor ($p \leq 0,001$) do que o do grupo controle, mas apesar da assiduidade diária do protocolo, os níveis de depleção são semelhantes, embora maiores aos observados em animais idosos.

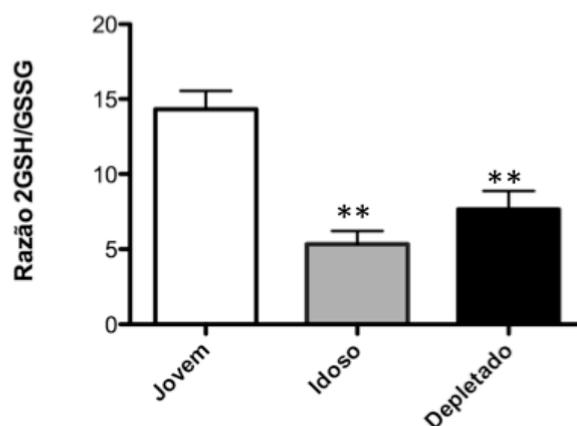


Figura 35: Homeostase da glutathiona em epidermes de animais jovens, idosos e depletados de glutathiona. A epiderme de camundongos jovens (4-6 meses), idosos (12-14 meses) e jovens depletados por 1 mês com injeções intraperitoneais de BSO foi coletada e separada da derme. O conteúdo de GSH e GSSG foi aferido espectrofotometricamente conforme descrito em material e métodos. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais. As análises estatísticas foram realizadas usando-se teste de variância ANOVA seguido de teste a posteriori de Tukey-Kramer. Todos os grupos foram aferidos versus o controle, ns=não significativo; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$.

Após constatar que a depleção induzida estava sendo efetiva, foram avaliadas a arquitetura tecidual da pele dorsal nos mesmos grupos, utilizando-se como controle adicional animais injetados com NAC, que é metabolizada pelo fígado e leva a um aumento da biossíntese sistêmica de glutathione (Yim, Hibbs *et al.*, 1994). A ultraestrutura tecidual da pele dorsal e suas alterações morfológicas podem ser observadas através da coloração com hematoxilina/eosina. Quando comparados, os grupos jovem e idoso (Fig 36 A e B) ficam claras as alterações associadas ao envelhecimento tecidual, ou seja, a epiderme apresenta menor espessura enquanto que um acúmulo moderado de gordura na derme é observado. Já para o grupo depletado, uma consistente alteração fenotípica pôde ser observada. Assim como o evidenciado durante a embriogênese, ocorre uma resposta hiperproliferativa epidermal consistente, acompanhada de espessamento da camada cornificada (Fig 36 E, 5 e 6) acompanhada de um aumento no número de adipócitos (descrito anteriormente na seção 4.2 de resultados). Nenhuma alteração morfológica consistente pôde ser observada nos grupos tratados com NAC, exceto uma tendência a se corar fortemente pela eosina.

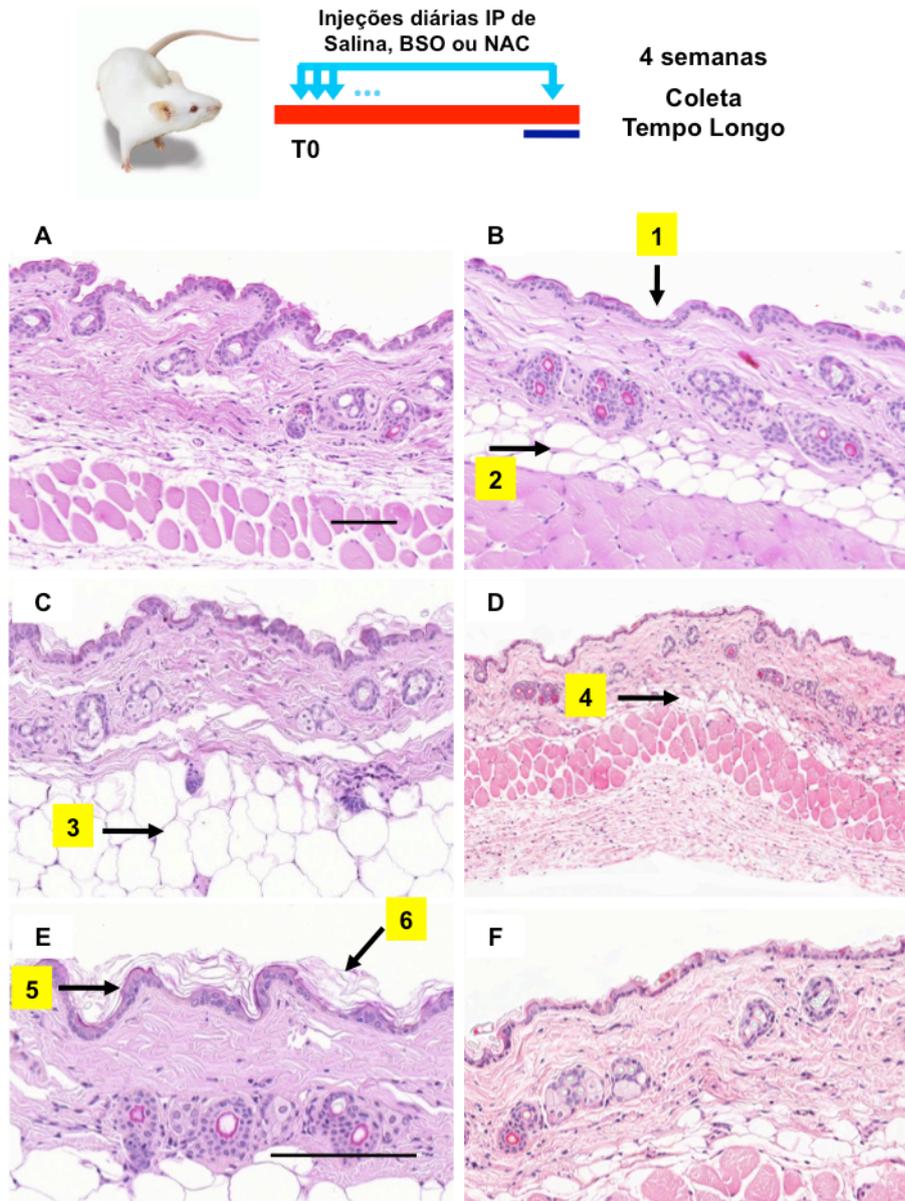


Figura 36: Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidérmicas dorsais murinos *in vivo*. Para os experimentos de tratamento de indução de tempo longo *in vivo* temos quatro grupos: (A) Camundongos jovens (4-6 meses) e (B) idosos (12-14 meses), ambos injetados diariamente com salina. Camundongos cuja GSH foi depletada (C=100x e E=200x) através de injeções intraperitoneais diárias de BSO (500mM/kg) e suplementados com NAC (200mM/kg) (D=100x e F=200x) também através de injeções intraperitoneais diárias. A ultraestrutura tecidual da pele dorsal e suas alterações morfológicas podem ser observadas através da coloração com hematoxilina/eosina. 1= epiderme de menor espessura e 2= acúmulo moderado de gordura, características associadas à pele envelhecida. 3= acúmulo de adipócitos, 5= resposta hiperproliferativa epidermal e 6= resposta de diferenciação e produção exacerbada de camada cornificada, respostas consistentemente encontradas nos animais depletados. 5= pouco acúmulo de adipócitos e nenhuma alteração morfológica consistente, obtida nos grupos tratados com NAC. Os resultados são representativos dos obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais. Barra= 100uM.

Para averiguar o efeito da depleção de glutatona sobre a epiderme de regiões com características distintas foram avaliadas as regiões da orelha (Figura 37 A a D), na qual a hiperproliferação da epiderme é ainda mais explícita. Já na cauda (Figura 37 E a G), a observação da epiderme removida de forma a preservar a estrutura dos folículos (whole mount), permite observar que as tríades de folículos encontram-se alongadas nos grupos depletados um sinal de anagênese que pode levar futuramente à perda do folículo por entrada induzida em telogênese (Stenn e Paus, 2001).

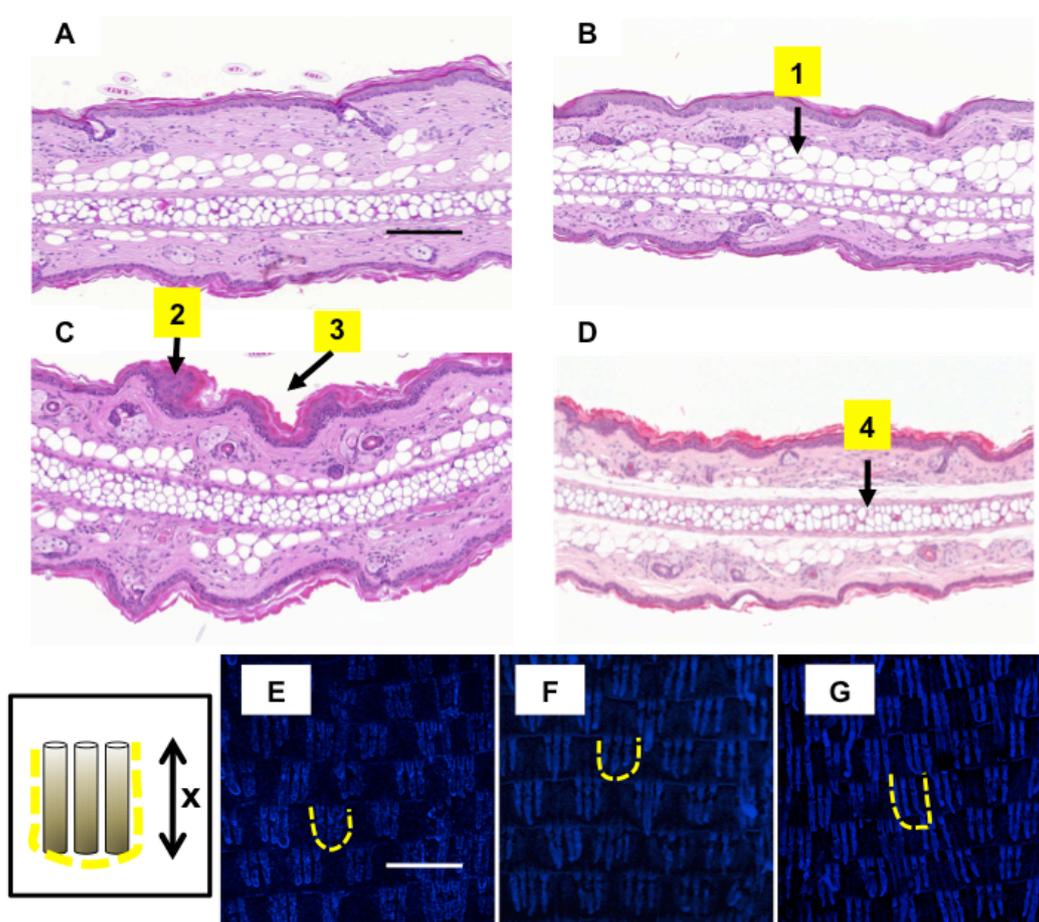


Figura 37: Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutatona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais da orelha e cauda murinos *in vivo*. A ultraestrutura tecidual da pele da orelha e da cauda e suas alterações morfológicas podem ser observadas através da coloração com hematoxilina/eosina. 1= acúmulo de adipócitos 2=resposta hiperproliferativa epidermal e 3= espessamento da camada cornificada. (A) camundongos jovens, orelha; (B) camundongos idosos, orelha; (C) camundongos jovens depletados, orelha; (D) camundongos jovens suplementados, orelha; Todos em corte transversal da estrutura total, podendo-se notar o feixe de cartilagem no meio da estrutura (4). A quantificação da área da camada basal em relação ao controle pode ser observada em (H). Os mesmos animais tiveram a epiderme da cauda removida de forma a

preservar a estrutura dos folículos (whole mount), que foram imageados por microscopia confocal com DAPI, podendo ser observadas as tríades de folículos. (E) camundongos jovens (F) suplementados com NAC e (G) depletados com BSO. Pode ser observada em (I) a quantificação de tamanho relativo ao controle da tríade de folículos. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais. Barra= 100uM.

4.3.3 Papel da depleção de glutathiona sobre a homeostase de células-tronco epidermais murinas - Morte Celular.

Uma vez que os níveis de proliferação encontram-se aumentados, e a depleção de GSH configura uma situação de estresse, uma vez que já é bem aceito na literatura que os níveis de peróxido de hidrogênio aumentam em tal situação, foi aventada a possibilidade de que uma parcela das células, em decorrência do grande aumento na proliferação, estaria sendo eliminada do tecido através de morte celular (quer fosse por apoptose ou necrose). Para testar esta possibilidade, de uma resposta citotóxica aguda à depleção de GSH estar levando a níveis aumentados de morte tecidual, observamos numa cinética de tempos curtos a ativação da via da apoptose através da observação in situ de caspase -3-clivada, que se encontra ativa quando ocorre a apoptose. Para nossa surpresa, a marcação se restringiu (Figura 38 A) à glândula sebácea. Para avaliar a dinâmica de morte celular em tempos de depleção longos, os animais jovens, idosos e depletados tiveram seus níveis de mRNA mensageiro avaliados para uma proteína anti-apoptótica e uma pró-apoptótica (BCL-2 e BAX, Figura 38 B). Podemos observar nestes resultados uma tendência dos grupos jovem e depletado de possuírem maior expressão de mRNA para o transcrito da proteína anti-apoptótica e menor da pró-apoptótica, ao contrário da epiderme do grupo idoso. Para descartar completamente o envolvimento de morte tecidual analisamos epidermes dissociadas através de citometria de fluxo e pudemos constatar que no comprometimento de células ainda não diferenciadas (filagrina negativa), a morte celular total é de cerca de $6 \pm 0,5\%$ ($p \leq 0,05$) maior no grupo depletado, sendo que estas células são

eliminadas do tecido preferencialmente por morte necrótica (Figura 38 C). Estes níveis de remoção celular não são suficientes para manter a homeostase tecidual, e uma vez que estas células não estão sendo endereçadas a um destino de morte, aventamos a hipótese de que na verdade o que estaria acontecendo é uma maior taxa de diferenciação celular, fato este sugerido pela observação da ultra-estrutura tecidual.

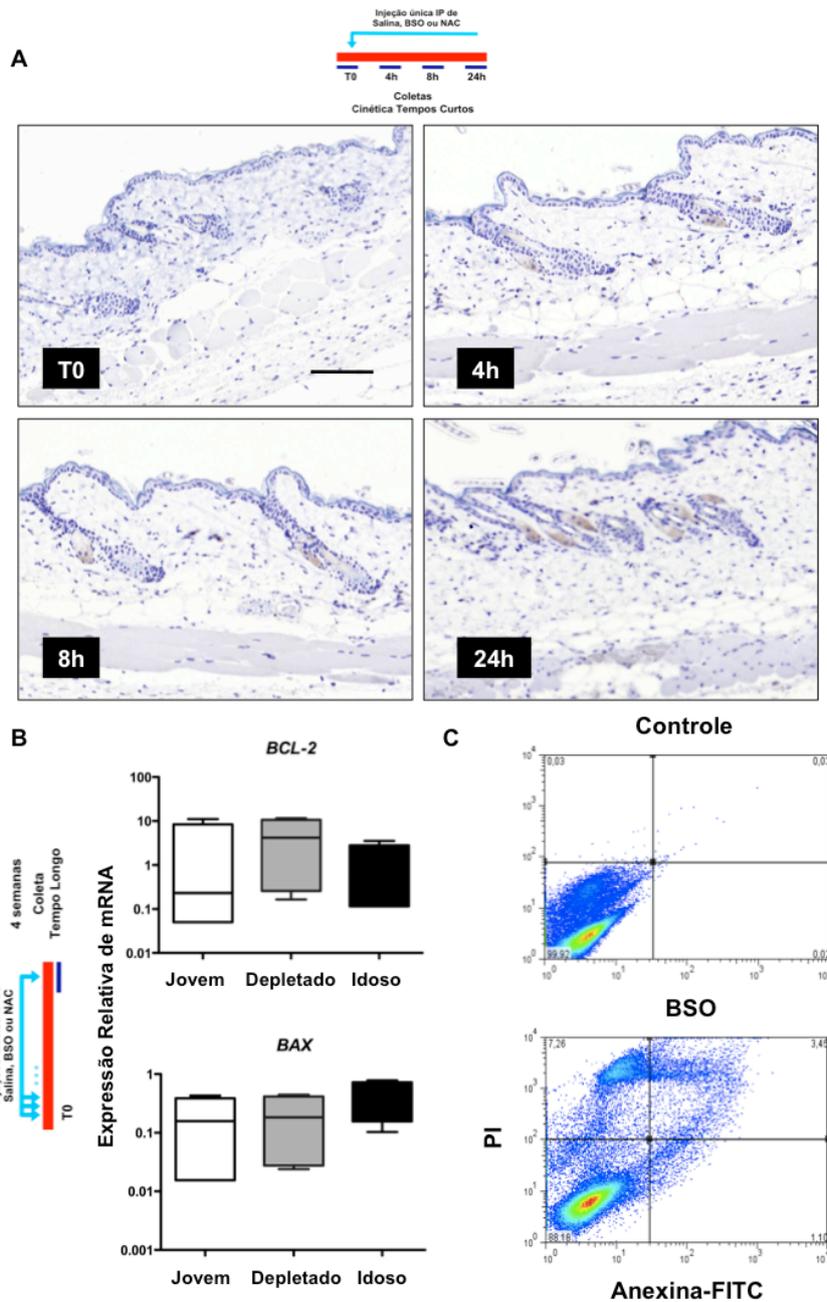


Figura 38: Papel da depleção de glutatona sobre a morte celular de células-tronco epidermais da pele dorsal murina *in vivo*. Para avaliar a resposta aguda à depleção de glutatona, camundongos jovens receberam uma injeção intraperitoneal única de BSO (500mM/kg) e foram sacrificados logo em seguida (tempo 0, T0) e após 4, 8 e 24h. Os resultados são representativos dos obtidos em dois experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais. Podemos observar a marcação restrita à glândula sebácea para caspase-3-clivada (A). Barra= 100µM. Para avaliar a dinâmica de morte celular em tempos de depleção longos, os animais jovens, idosos e depletados por tempos longos (1 mês) tiveram o RNA da epiderme isolado e foi aferido por q-RT-PCR os níveis de transcrito para os genes BAX e BCL-2 (B). Os mesmos animais tiveram sua epiderme dissociada e avaliada por citometria de fluxo para morte celular, usando apenas a população filagrina negativa, para excluir células diferenciadas, que seriam falso positivas (C). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais.

4.3.4 Análise da participação do estado de fosforilação de Akt e seu impacto sobre o perfil de fosforilação dos constituintes da família de fatores de transcrição FOXO durante esse processo.

Inicialmente a possibilidade de aumento na diferenciação nos pareceu mais difícil de conciliar com os dados descritos na literatura sobre o padrão oposto observado entre células que se encontram em proliferação em contraponto daquelas que estão se diferenciando. É atualmente aceito na literatura que estes processos são opostos (REF), mas nos indagamos se talvez eles não estivessem acontecendo temporalmente dissociados. Ou seja, quando a depleção de GSH atinge as células progenitoras da epiderme, ocorre inicialmente diversos ciclos de proliferação que acabam por induzir a perda de contato com a membrana basal, um forte indutor da diferenciação de EpiSCs mediado pela fosforilação de Akt. Se este for o caso, então devemos observar níveis aumentados de p-Akt, que é, de fato, o que foi observado durante a depleção aguda (Figura 39 A).

Para confirmar o envolvimento da fosforilação de fatores de transcrição da família FOXO com este evento elicitado por Akt em função da depleção de GSH, utilizamos células transduzidas com proteínas induzíveis de Akt ativa (Myr-Akt, endereçada à membrana plasmática) e inativa (A2-Akt, citoplasmática). Assim, pôde ser observado um aumento dos níveis citoplasmáticos de pFOXO-1 após indução com tamoxifen (4OHT, indutor dos construtos), que é mediado, portanto, pela ativação de Akt. De forma ainda mais interessante, a intensidade/área celular que apresenta FOXO-1 fosforilado sendo endereçado no citoplasma é claramente maior na presença do agente depletor dos níveis de glutathiona, sugerindo um papel para este o balanço deste tiol neste evento.

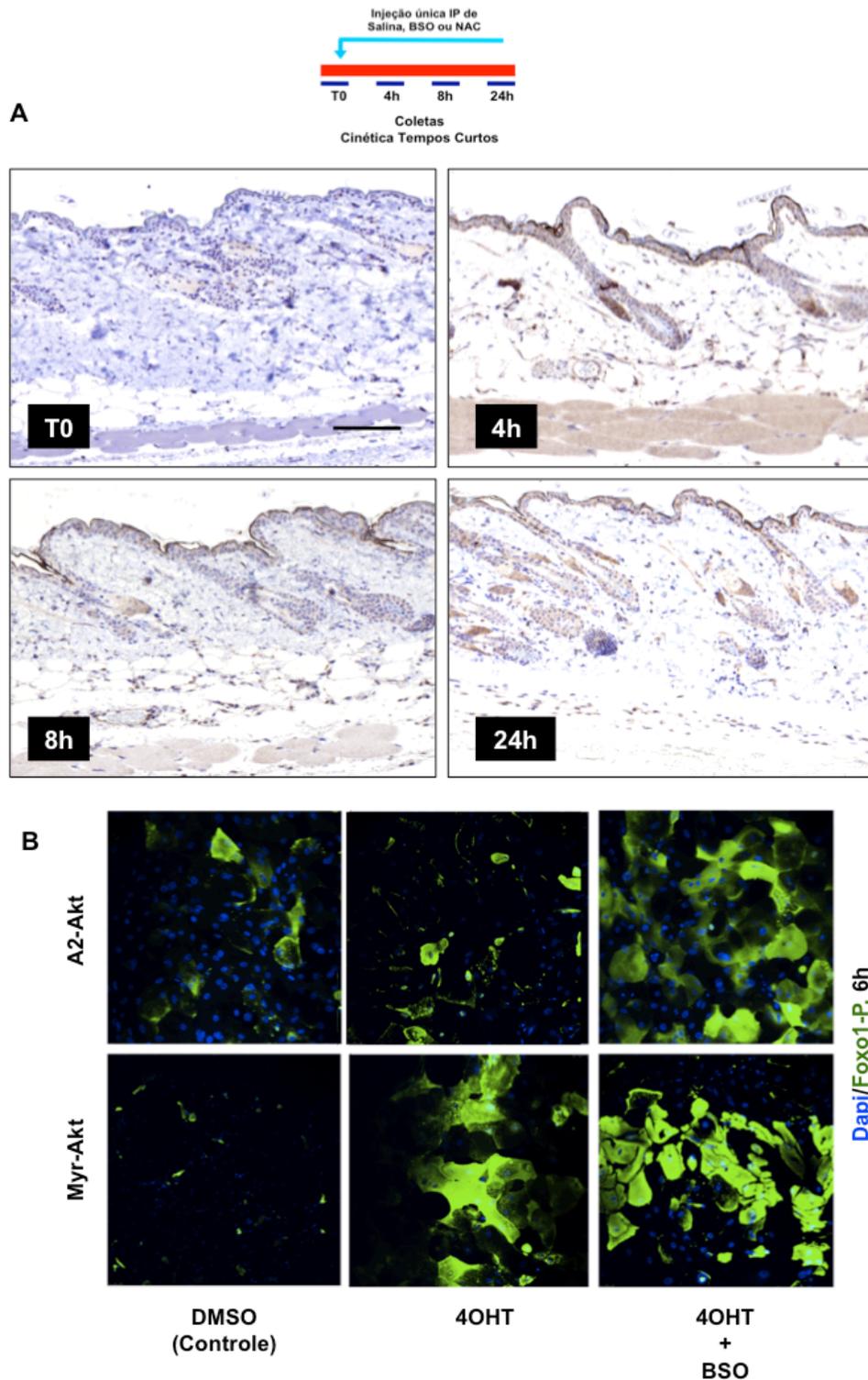


Figura 39: Papel da depleção de glutatona sobre a fosforilação de Akt na epiderme dorsal murina *in vivo*.

Para avaliar a resposta aguda à depleção de glutatona, camundongos jovens receberam uma injeção intraperitoneal única de BSO (500mM/kg) e foram sacrificados logo em seguida (tempo 0, T0) e após 4, 8 e 24h. Os resultados são representativos dos obtidos em dois experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais. Podemos observar a marcação para p-Akt inicialmente restrita à camada suprabasal de células em TA passa a ser observada na epiderme como um todo gerando uma resposta de diferenciação exacerbada. Barra= 100uM.

4.3.5 Análise do status e expressão dos principais componentes do ciclo celular compartilhados pelo processo de envelhecimento e depleção de glutatona: busca de reguladores do ciclo que sejam comuns aos processos de estresse e envelhecimento.

Para melhor elucidar qual seria o compartimento celular (células tronco *versus* diferenciadas) que é induzido à entrada no ciclo celular, avaliamos a distribuição tecidual, entre os grupos previamente utilizados como modelo experimental, de Ki67, uma proteína nuclear associada à proliferação. Na figura 40 (A a E) podemos observar que o aumento de células com núcleos positivos se dá próximo à membrana basal, ou seja, nas progenitoras epidermais em detrimento da sua progênie diferenciada. É curioso observar também que em camundongos idosos depletados por períodos longos o aumento de proliferação não ocorre com a mesma intensidade, como pode ser observado no item F. Para averiguar se esta incapacidade de responder seria mediada pelo aumento na expressão de inibidores do ciclo celular durante a depleção de glutatona, avaliamos a expressão de três membros da família de inibidores do ciclo celular INK4/ARF: p19 (Figura 40 G), p15 (Figura 40 H) e p16 (Figura 40, I) e todos se encontram aumentados durante a depleção de GSH, levando-nos a pensar a possibilidade de que estes ciclos prolongados de proliferação levam à exaustão dos progenitores da epiderme, através da senescência mediada por estes inibidores. Um resultado importante para validar esta hipótese, e que ainda não foi obtido, é o que mostraria os níveis relativos de mRNA destes inibidores no grupo idoso exposto ao BSO.

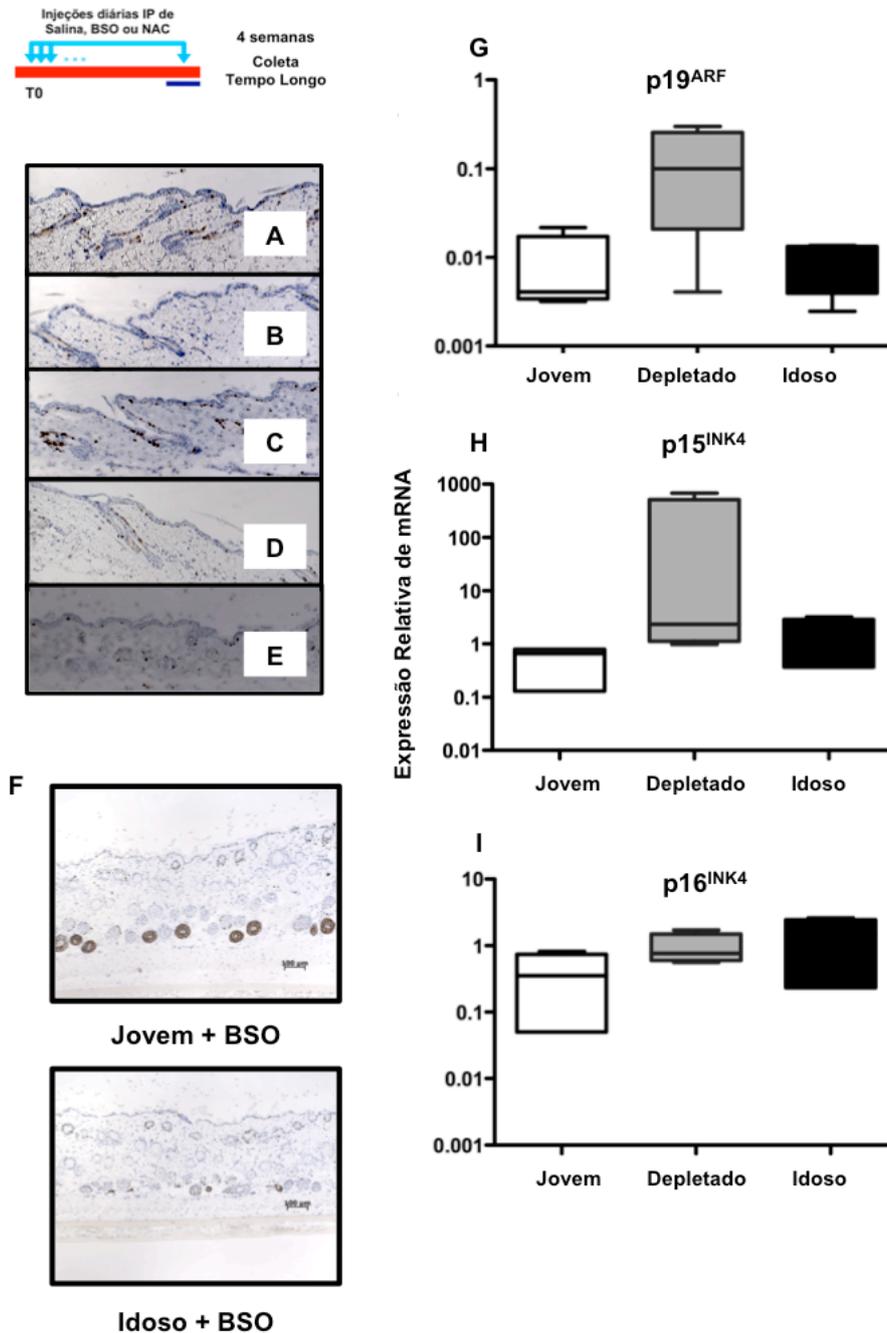


Figura 40: Papel da depleção de glutathione sobre a proliferação de células-tronco epidermais da pele dorsal murina *in vivo*. Podemos observar por imunohistoquímica a marcação nuclear para células em proliferação (Ki67) em epiderme de (A) camundongos jovens (4-6 meses), (B) idosos (12-14 meses), ambos injetados diariamente com salina. Camundongos jovens (C) e idosos (D) cuja GSH foi depletada através de injeções intraperitoneais diárias de BSO (500mM/kg) e (E) jovens suplementados com NAC (200mM/kg) também através de injeções intraperitoneais diárias. Os grupos experimentais jovem com salina (controle), jovem depletado e idoso tiveram a epiderme isolada e seu mRNA isolado para ensaios de q-RT-PCR para avaliar a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em quatro experimentos independentes, sendo cada um deles com 5 animais.

Como confirmação de que são as células-tronco epidermais e não sua progênie diferenciada, as células que sofrem a entrada forçada no ciclo, utilizamos células-tronco epidermais da pele dorsal, isoladas de camundongos jovens através da metodologia de “sorting”. Essas células foram, então, carenciadas de soro e EGF por 12h e expostas ao estímulo de depleção de glutathiona por diversos períodos de tempo, quando então seu perfil no ciclo celular foi determinado utilizando-se citometria de fluxo (Figura 41 A). Podemos observar um aumento expressivo de células que entram em G2/M, atingindo níveis de mais de 60% da população após 96h. Nestas mesmas condições os níveis relativos de mRNA para efetadores do ciclo celular são aumentados de forma significativa (Figura 41, B a E). Os mesmos experimentos foram realizados com a porção de células complementar à estratégia do *gate* para as células-tronco e não foram observados aumentos estatisticamente significativos.

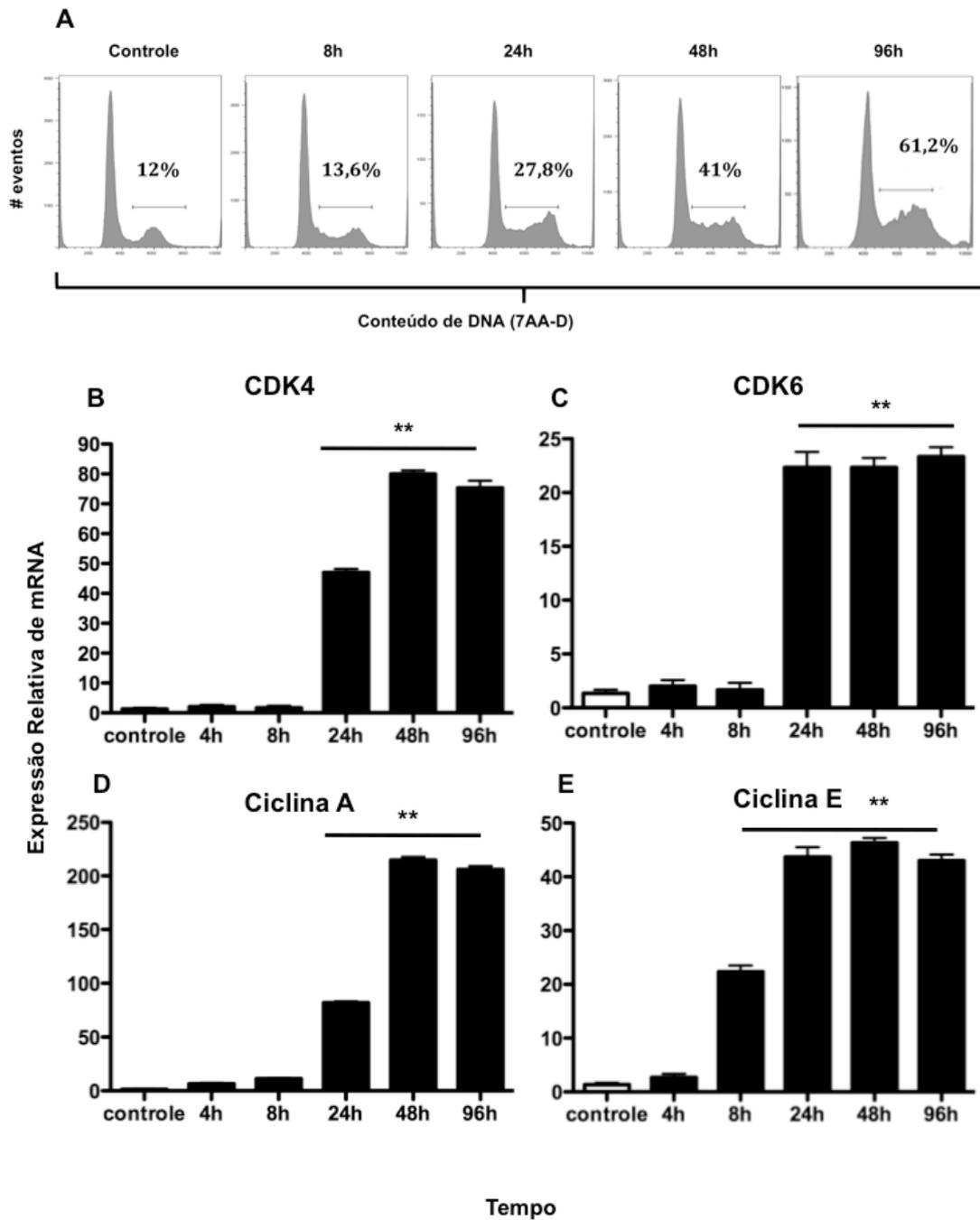


Figura 41: Papel da depleção de glutatona sobre a proliferação de células-tronco epidermais da pele dorsal murina *in vitro*. Células-tronco epidermais da pele dorsal foram isoladas de camundongos jovens através da metodologia de “*sorting*” descrita em material e métodos. Essas células foram carenciadas de soro e EGF por 12h e expostas a diferentes estímulos (A) por 24h, quando então seu perfil no ciclo celular foi determinado utilizando-se citometria de fluxo. Foram coletados pelo menos 50.000 eventos, sendo que os dados apresentados são representativos de um dos 3 experimentos realizados em triplicata. Simultaneamente o RNA destas células foi isolado e foi aferido por q-RT-PCR os níveis de transcrito para os genes (B) CDK4, (C) CDK6, (D) ciclina A e (E) ciclina E.

Este conjunto de resultados nos permite sugerir que o papel da glutathione durante o envelhecimento da epiderme talvez seja o de um intermediário que causa proliferação. Em um cenário no qual a homeostase seja alcançada rapidamente, isto não representa nenhuma ameaça à integridade das células-tronco residentes. Entretanto, quando a depleção é crônica, estes progenitores são recrutados em ciclos de proliferação e diferenciação inúteis que podem levar à sua exaustão, acompanhada da entrada em senescência mediada por inibidores do ciclo celular, caracterizando um tecido com menor resposta à injúria e auto-renovação, ou seja, envelhecido.

6. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitiram concluir que:

- a. É possível realizar o isolamento simultâneo de três populações de células-tronco de pele murina a partir de um único explante. Isso foi possível graças ao desenvolvimento de um novo método que se utiliza de estratégias como: a separação dos principais compartimentos da pele para evitar contaminação cruzada e enriquecimento de subpopulações específicas através de cultura seletiva.
- b. O isolamento de precursores mesenquimais de pele humana de doadores pertencentes a grupos etários distintos é factível, assim como seu escalonamento visando sua utilização em terapia celular. Porém, uma série maior de estudos são requeridos para adequar o mesmo protocolo para doadores idosos, os quais mostram baixa estabilidade celular quando comparados aos grupos mais jovens.
- c. O perfil de expressão das enzimas do sistema antioxidante canônico e daquele relacionado à glutatona é diferente entre células-tronco mesenquimais murinas e sua progênie diferenciada.
- d. O processo de comprometimento com a diferenciação osteogênica é influenciado pelo balanço intracelular de GSH/GSSG, sendo sinalizado através da via das MAPKs. Quando os níveis deste tiol são diminuídos, aparentemente ocorre uma mudança na determinação celular, favorecendo a adipogênese em detrimento da osteogênese.

- e. A depleção de glutathiona durante o desenvolvimento embrionário da epiderme leva a uma resposta hiperproliferativa que é acompanhada de aumento na diferenciação celular mediada pelo eixo sinalizatório Akt/FOXO.
- f. O mesmo parece acontecer com a epiderme adulta, num ciclo contínuo, que leva à exaustão das células progenitoras deste tecido, através do aumento da expressão tardia de inibidores do ciclo celular.
- g. Este mecanismo de exaustão de células progenitoras aparentemente está envolvido com o envelhecimento epidermal, uma vez que em animais idosos essa resposta hiperproliferativa não ocorre, levando à suposição de que, neste tecido, a exaustão de precursores já ocorreu, uma vez que os níveis de GSH/GSSG são significativamente menores do que em animais jovens.

7. Perspectivas

***Perspectivas da seção 4.1 de Resultados* - Estabelecimento de modelo experimental murino e humano:**

- Aplicar as células-tronco mesenquimais humanas em diversas terapias celulares.
- Distribuir as MSCs humanas para os grupos que compreendem a Rede Nacional de Terapia Celular Nacional (RNTC).
- Gerar pele organotípica a partir das células-tronco mesenquimais humanas escalonadas (experimento parcialmente finalizado, dados em análise).

***Perspectivas da seção 4.2 de Resultados* - Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a diferenciação osteogênica:**

- Avaliar a contribuição do eixo de sinalização Akt/FOXO4 para o evento de “*adipogenic switch*” induzido pela depleção de glutathiona durante a diferenciação óssea.
- Avaliar a morfogênese óssea durante o desenvolvimento em embriões cujas genitoras foram desprovidas de um balanço homeostático de glutathiona.

***Perspectivas da seção 4.3 de Resultados* - Papel do estresse oxidativo mediado pela depleção de glutathiona sobre a arquitetura tecidual e homeostase de células-tronco epidermais: possíveis correlações entre o processo de envelhecimento da pele e a depleção de glutathiona.**

- Analisar, em larga escala, o perfil de expressão de mRNA em amostras de epiderme jovem, envelhecida e depletada de glutathiona, utilizando microarranjos de DNA do tipo ExonArray,

para identificar possíveis eventos de *splicing* alternativo que sejam compartilhados pelo processo de envelhecimento e depleção de glutathione (experimento finalizado, dados em análise).

- Avaliar se existe uma tendência quantificável para o aumento/diminuição no número de isoformas de cada gene em função do envelhecimento, como indicativo de uma alteração global da taxa/tipo de *splicing alternativo*. Correlacionar os dados obtidos com depleção de glutathione (experimento finalizado, dados em análise).

8. Referências Bibliográficas

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* [S.I.], v. 105, p. 121-6, 1984.
- AKIYAMA, H. *et al.* Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 102, n. 41, p. 14665-70, Oct 11 2005.
- AMBROGINI, E. *et al.* FoxO-mediated defense against oxidative stress in osteoblasts is indispensable for skeletal homeostasis in mice. *Cell metabolism* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 136-46, Feb 3 2010.
- ARDEN, N. *Apoptosis and Cell Cycle Regulation of Mammalian Cell Cultures*. Johns Hopkins University, 2006.
- ARTHUR, J. R. The glutathione peroxidases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* [S.I.], v. 57, n. 13-14, p. 1825-35, Dec 2000.
- ARWERT, E. N. *et al.* Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature reviews. Cancer* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 170-80, Mar 2012.
- AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* [S.I.], v. 76, n. 6, p. 899-910, 1998.
- BANERJEE, R. *Redox Biochemistry*. Wiley Interscience, 2008.
- BEERS, R. F., JR.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 195, n. 1, p. 133-40, Mar 1952.
- BENITAH, S. A.; FRYE, M. Stem cells in ectodermal development. *Journal of molecular medicine* [S.I.], v. 90, n. 7, p. 783-90, Jul 2012.
- BERGENDI, L. *et al.* Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life sciences* [S.I.], v. 65, n. 18-19, p. 1865-74, 1999.
- BIERNASKIE, J. *et al.* SKPs derive from hair follicle precursors and exhibit properties of adult dermal stem cells. *Cell Stem Cell* [S.I.], v. 5, n. 6, p. 610-23, Dec 4 2009.
- BIERNASKIE, J. A. *et al.* Isolation of skin-derived precursors (SKPs) and differentiation and enrichment of their Schwann cell progeny. *Nature protocols* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 2803-12, 2006.
- BIGGS, W. H., 3RD *et al.* Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* [S.I.], v. 12, n. 6, p. 416-25, Jun 2001.
- BOUCHARD, C. *et al.* FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. *Genes & Development* [S.I.], v. 21, n. 21, p. 2775-2787, Nov 1 2007.
- BRAUN, K. M. *et al.* Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development* [S.I.], v. 130, n. 21, p. 5241-55, Nov 2003.
- BRUNET, A. *et al.* Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* [S.I.], v. 96, n. 6, p. 857-68, Mar 19 1999.

BRUNET, A. *et al.* 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *The Journal of cell biology* [S.I.], v. 156, n. 5, p. 817-28, Mar 4 2002.

BRUNET, A. *et al.* Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* [S.I.], v. 303, n. 5666, p. 2011-5, Mar 26 2004.

BUCZACKI, S. *et al.* Characterisation of quiescent intestinal stem and cancer stem cells. *British Journal of Surgery* [S.I.], v. 99, p. 38-39, Apr 2012.

CAMPISI, J.; DI FAGAGNA, F. D. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [S.I.], v. 8, n. 9, p. 729-740, Sep 2007.

CANDI, E. *et al.* The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology* [S.I.], v. 6, n. 4, p. 328-40, Apr 2005.

CAPLAN, A. I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue engineering* [S.I.], v. 11, n. 7-8, p. 1198-211, Jul-Aug 2005.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 250, n. 14, p. 5475-80, Jul 25 1975.

CONRADIE, R. *et al.* Restriction point control of the mammalian cell cycle via the cyclin E/Cdk2:p27 complex. *The FEBS journal* [S.I.], v. 277, n. 2, p. 357-67, Jan 2010.

COTSARELIS, G. *et al.* Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* [S.I.], v. 61, n. 7, p. 1329-37, Jun 29 1990.

DA SILVA MEIRELLES, L. *et al.* Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* [S.I.], v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, Jun 1 2006.

DALLE-DONNE, I. *et al.* Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass spectrometry reviews* [S.I.], v. 24, n. 1, p. 55-99, Jan-Feb 2005.

DENNERY, P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* [S.I.], v. 81, n. 3, p. 155-62, Sep 2007.

DIJKERS, P. F. *et al.* Expression of the pro-apoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Current Biology* [S.I.], v. 10, n. 19, p. 1201-1204, Oct 5 2000.

DIJKERS, P. F. *et al.* Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Molecular and Cellular Biology* [S.I.], v. 20, n. 24, p. 9138-9148, Dec 2000.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [S.I.], v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOTTO, G. P. Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 442-57, 1999.

- DRISKELL, R. R. *et al.* Hair follicle dermal papilla cells at a glance. *Journal of cell science* [S.I.], v. 124, n. Pt 8, p. 1179-82, Apr 15 2011.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* [S.I.], v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.
- DUCY, P. *et al.* A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes & Development* [S.I.], v. 13, n. 8, p. 1025-36, Apr 15 1999.
- ESCALONA, E. *et al.* [Fundamentals of clinical diagnosis in dermatology]. *La Prensa medica mexicana* [S.I.], v. 25, p. 239-43, Mar-Apr 1960.
- ESSERS, M. A. *et al.* FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO journal* [S.I.], v. 23, n. 24, p. 4802-12, Dec 8 2004.
- FERNANDES, K. J. *et al.* Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. *Experimental neurology* [S.I.], v. 201, n. 1, p. 32-48, Sep 2006.
- FERNANDES, K. J. *et al.* A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 6, n. 11, p. 1082-93, Nov 2004.
- FILOMENI, G. *et al.* Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical pharmacology* [S.I.], v. 64, n. 5-6, p. 1057-64, Sep 2002.
- FISHER, G. J. *et al.* Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of dermatology* [S.I.], v. 138, n. 11, p. 1462-70, Nov 2002.
- FLOHE, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* [S.I.], v. 105, p. 114-21, 1984.
- FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. *Methods in enzymology* [S.I.], v. 105, p. 93-104, 1984.
- FORMICHI, P. *et al.* Human fibroblasts undergo oxidative stress-induced apoptosis without internucleosomal DNA fragmentation. *Journal of cellular physiology* [S.I.], v. 208, n. 2, p. 289-97, Aug 2006.
- FORNI, M. F. *et al.* Stem cells in embryonic skin development. *Biological Research* [S.I.], v. 45, n. 3, p. 15-22, 2012.
- FUCHS, E.; GREEN, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* [S.I.], v. 19, n. 4, p. 1033-42, Apr 1980.
- FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 3, n. 3, p. 199-209, Mar 2002.
- FURUYAMA, T. *et al.* Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical journal* [S.I.], v. 349, n. Pt 2, p. 629-34, Jul 15 2000.
- GHEZZI, P. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free radical research* [S.I.], v. 39, n. 6, p. 573-80, Jun 2005.
- GIACOMONI, P. U.; REIN, G. A mechanistic model for the aging of human skin. *Micron* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 179-84, 2004.

- GILBERT, H. F. Thiol/disulfide exchange equilibria and disulfide bond stability. *Methods in enzymology* [S.I.], v. 251, p. 8-28, 1995.
- GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free radical biology & medicine* [S.I.], v. 27, n. 9-10, p. 922-35, Nov 1999.
- GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 76, n. 11, p. 5606-10, Nov 1979.
- GROVES, A. R.; BROWN, R. F. Histochemistry of the burned dermis. *British journal of experimental pathology* [S.I.], v. 53, n. 6, p. 648-51, Dec 1972.
- HALCSIK, E. *et al.* Novel players in osteogenic differentiation revealed by mass spectrometric assessment of phosphorylated substrates in murine skin mesenchymal cells., submitted.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 2007.
- HEKIMI, S. *et al.* Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends in cell biology* [S.I.], v. 21, n. 10, p. 569-76, Oct 2011.
- HELLEMANS, J. *et al.* qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology* [S.I.], v. 8, n. 2, p. R19, 2007.
- HENDRIX, S. *et al.* Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Experimental Dermatology* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 214-27, Mar 2008.
- HEO, D. S. *et al.* Evaluation of tetrazolium-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer research* [S.I.], v. 50, n. 12, p. 3681-90, Jun 15 1990.
- HOEKMAN, M. F. *et al.* Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain. *Gene expression patterns : GEP* [S.I.], v. 6, n. 2, p. 134-40, Jan 2006.
- HOGG, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. *Annual review of pharmacology and toxicology* [S.I.], v. 42, p. 585-600, 2002.
- HORNBECK, P. V. *et al.* PhosphoSitePlus: a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 40, n. Database issue, p. D261-70, Jan 2012.
- HRIBAL, M. L. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *Journal of Cell Biology* [S.I.], v. 162, n. 4, p. 535-541, Aug 18 2003.
- HSIEH, E. A. *et al.* Dynamics of keratinocytes in vivo using HO labeling: a sensitive marker of epidermal proliferation state. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 123, n. 3, p. 530-6, Sep 2004.
- HU, M. C. T. *et al.* I kappa B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* [S.I.], v. 117, n. 2, p. 225-237, Apr 16 2004.

HUNT, D. P. *et al.* A highly enriched niche of precursor cells with neuronal and glial potential within the hair follicle dermal papilla of adult skin. *Stem cells* [S.I.], v. 26, n. 1, p. 163-72, Jan 2008.

ITO, K. *et al.* Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nature Medicine* [S.I.], v. 12, n. 4, p. 446-451, Apr 2006.

JACOBS, F. M. *et al.* FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 278, n. 38, p. 35959-67, Sep 19 2003.

JAISWAL, N. *et al.* Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry* [S.I.], v. 64, n. 2, p. 295-312, Feb 1997.

JAKIC-RAZUMOVIC, J. *et al.* Proliferation rates in epidermis of patients with graft-versus-host disease, non-specific inflammation and normal skin. *Bone marrow transplantation* [S.I.], v. 10, n. 1, p. 27-31, Jul 1992.

JAKS, V. *et al.* Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nature genetics* [S.I.], v. 40, n. 11, p. 1291-9, Nov 2008.

JANES, S. M. *et al.* PI3-kinase-dependent activation of apoptotic machinery occurs on commitment of epidermal keratinocytes to terminal differentiation. *Cell research* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 328-39, Mar 2009.

JANSSEN-HEININGER, Y. M. *et al.* Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free radical biology & medicine* [S.I.], v. 45, n. 1, p. 1-17, Jul 1 2008.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of ageing and development* [S.I.], v. 123, n. 7, p. 801-10, Apr 2002.

JIANG, C. *et al.* TRED: a transcriptional regulatory element database, new entries and other development. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 35, n. Database issue, p. D137-40, Jan 2007.

JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods in enzymology* [S.I.], v. 348, p. 93-112, 2002.

KAWASE, Y. *et al.* Characterization of multipotent adult stem cells from the skin: transforming growth factor-beta (TGF-beta) facilitates cell growth. *Experimental cell research* [S.I.], v. 295, n. 1, p. 194-203, Apr 15 2004.

KENNEDY, W. R. *et al.* Rodent Eccrine Sweat Glands - a Case of Multiple Efferent Innervation. *Neuroscience* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 741-&, 1984.

KIRKWOOD, T. B.; KOWALD, A. The free-radical theory of ageing--older, wiser and still alive: modelling positional effects of the primary targets of ROS reveals new support. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [S.I.], v. 34, n. 8, p. 692-700, Aug 2012.

KOHN, A. D. *et al.* Construction and characterization of a conditionally active version of the serine/threonine kinase Akt. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 273, n. 19, p. 11937-43, May 8 1998.

KOLEDOVA, Z. *et al.* Cell-cycle regulation in embryonic stem cells: centrosomal decisions on self-renewal. *Stem cells and development* [S.I.], v. 19, n. 11, p. 1663-78, Nov 2010.

- KOMORI, T. *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* [S.I.], v. 89, n. 5, p. 755-64, May 30 1997.
- KOPS, G. J. P. L. *et al.* Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature* [S.I.], v. 419, n. 6904, p. 316-321, Sep 19 2002.
- KOSTER, M. I.; ROOP, D. R. Mechanisms regulating epithelial stratification. *Annual review of cell and developmental biology* [S.I.], v. 23, p. 93-113, 2007.
- KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* [S.I.], v. 47, n. 4, p. 333-43, Aug 15 2009.
- KYOUNG KIM, H. *et al.* Down-regulation of a forkhead transcription factor, FOXO3a, accelerates cellular senescence in human dermal fibroblasts. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* [S.I.], v. 60, n. 1, p. 4-9, Jan 2005.
- LE BLANC, K.; PITTENGER, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 36-45, 2005.
- LEE, J. A. *et al.* MIFlowCyt: the minimum information about a Flow Cytometry Experiment. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* [S.I.], v. 73, n. 10, p. 926-30, Oct 2008.
- LEE, M. H. *et al.* *Dlx5* specifically regulates *Runx2* type II expression by binding to homeodomain-response elements in the *Runx2* distal promoter. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 280, n. 42, p. 35579-87, Oct 21 2005.
- LERI, A. *et al.* Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiological reviews* [S.I.], v. 85, n. 4, p. 1373-1416, Oct 2005.
- LESLIE, N. R. The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxidants & redox signaling* [S.I.], v. 8, n. 9-10, p. 1765-74, Sep-Oct 2006.
- LI, J. *et al.* Enrichment of putative human epidermal stem cells based on cell size and collagen type IV adhesiveness. *Cell research* [S.I.], v. 18, n. 3, p. 360-71, Mar 2008.
- LI, X. *et al.* GSH is required to recycle ascorbic acid in cultured liver cell lines. *Antioxidants & redox signaling* [S.I.], v. 3, n. 6, p. 1089-1097, Dec 2001.
- LIANG, L. *et al.* As epidermal stem cells age they do not substantially change their characteristics. *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 229-37, Sep 2004.
- LIEBERMAN, M. W. *et al.* Growth retardation and cysteine deficiency in gamma-glutamyl transpeptidase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 93, n. 15, p. 7923-6, Jul 23 1996.
- LONG, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews. Molecular cell biology* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 27-38, Jan 2012.
- LUTHMAN, M. *et al.* Glutathione-dependent hydrogen donor system for calf thymus ribonucleoside-diphosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 76, n. 5, p. 2158-62, May 1979.

- M'BONEKO, V.; MERKER, H. J. Development and morphology of the periderm of mouse embryos (days 9-12 of gestation). *Acta anatomica* [S.I.], v. 133, n. 4, p. 325-36, 1988.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* [S.I.], v. 30, n. 11, p. 630-641, Nov 2005.
- _____. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews Cancer* [S.I.], v. 9, n. 3, p. 153-166, Mar 2009.
- MANTOVANI MDA, C. *et al.* Immobilization of primary cultures of insulin-releasing human pancreatic cells. *Islets* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 224-31, Nov-Dec 2009.
- MARKOVIC, J. *et al.* Glutathione is recruited into the nucleus in early phases of cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 282, n. 28, p. 20416-20424, Jul 13 2007.
- MARYANOVICH, M.; GROSS, A. A ROS rheostat for cell fate regulation. *Trends in cell biology* [S.I.], Oct 29 2012.
- MATOLTSY, A. G.; ODLAND, G. F. Investigation of the structure of the cornified epithelium of the human skin. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* [S.I.], v. 1, n. 3, p. 191-6, May 25 1955.
- MATSUZAKI, H. *et al.* Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 102, n. 32, p. 11278-11283, Aug 9 2005.
- MATTHIAS, N. *et al.* Multiple cystic sweat gland tumors in transgenic mice. *Comparative medicine* [S.I.], v. 62, n. 1, p. 27-30, Feb 2012.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 25 1969.
- MEISTER, A. Metabolism and function of glutathione: an overview. *Biochemical Society transactions* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 78-9, Apr 1982.
- _____. Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 263, n. 33, p. 17205-8, Nov 25 1988.
- _____. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacology & therapeutics* [S.I.], v. 51, n. 2, p. 155-94, 1991.
- MILL, P. *et al.* Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes & Development* [S.I.], v. 17, n. 2, p. 282-94, Jan 15 2003.
- MILLAR, S. E. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 118, n. 2, p. 216-25, Feb 2002.
- MILLER, R. A.; NADON, N. L. Principles of animal use for gerontological research. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* [S.I.], v. 55, n. 3, p. B117-23, Mar 2000.
- MIYAMOTO, K. *et al.* Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 101-112, Jul 2007.

MORGAN, J. E.; PARTRIDGE, T. A. Muscle satellite cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* [S.I.], v. 35, n. 8, p. 1151-6, Aug 2003.

MORIKAWA, S. *et al.* Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *The Journal of experimental medicine* [S.I.], v. 206, n. 11, p. 2483-96, Oct 26 2009.

MULDER, K. W. *et al.* Diverse epigenetic strategies interact to control epidermal differentiation. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 14, n. 7, p. 753-63, Jul 2012.

MULLER-ROVER, S. *et al.* A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 3-15, Jul 2001.

MURATA, H. *et al.* Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 278, n. 50, p. 50226-33, Dec 12 2003.

NAKAE, J. *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Developmental Cell* [S.I.], v. 4, n. 1, p. 119-129, Jan 2003.

NAKASHIMA, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* [S.I.], v. 108, n. 1, p. 17-29, Jan 11 2002.

NGO, M. A. *et al.* Oxygen-dependent differentiation of human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 127, n. 2, p. 354-61, Feb 2007.

NIEMANN, C.; WATT, F. M. Designer skin: lineage commitment in postnatal epidermis. *Trends in cell biology* [S.I.], v. 12, n. 4, p. 185-92, Apr 2002.

NISHIMURA, E. K. *et al.* Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science* [S.I.], v. 307, n. 5710, p. 720-4, Feb 4 2005.

NOWAK, J. A.; FUCHS, E. Isolation and culture of epithelial stem cells. *Methods in molecular biology* [S.I.], v. 482, p. 215-32, 2009.

OH, S. H. *et al.* Hepatic oval 'stem' cell in liver regeneration. *Seminars in cell & developmental biology* [S.I.], v. 13, n. 6, p. 405-9, Dec 2002.

OPPERMAN, L. A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* [S.I.], v. 219, n. 4, p. 472-85, Dec 2000.

ORCIANI, M. *et al.* Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. *Free radical biology & medicine* [S.I.], v. 49, n. 5, p. 830-8, Sep 1 2010.

ORNITZ, D. M.; MARIE, P. J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes & Development* [S.I.], v. 16, n. 12, p. 1446-65, Jun 15 2002.

PAIK, J. H. *et al.* FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. *Cell* [S.I.], v. 128, n. 2, p. 309-323, Jan 26 2007.

PALLARDO, F. V. *et al.* Role of nuclear glutathione as a key regulator of cell proliferation. *Molecular Aspects of Medicine* [S.I.], v. 30, n. 1-2, p. 77-85, Feb-Apr 2009.

PASSOS, J. F.; VON ZGLINICKI, T. Oxygen free radicals in cell senescence: are they signal transducers? *Free radical research* [S.I.], v. 40, n. 12, p. 1277-83, Dec 2006.

PATTYN, F. *et al.* RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database, major update 2006. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 34, n. Database issue, p. D684-8, Jan 1 2006.

PELLETTIERI, J.; SANCHEZ ALVARADO, A. Cell turnover and adult tissue homeostasis: from humans to planarians. *Annual review of genetics* [S.I.], v. 41, p. 83-105, 2007.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 29, n. 9, p. e45, May 1 2001.

PIETRAS, E. M. *et al.* Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *The Journal of cell biology* [S.I.], v. 195, n. 5, p. 709-20, Nov 28 2011.

POMPELLA, A. *et al.* The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical pharmacology* [S.I.], v. 66, n. 8, p. 1499-503, Oct 15 2003.

PORTALES-CASAMAR, E. *et al.* JASPAR 2010: the greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 38, n. Database issue, p. D105-10, Jan 2010.

PRASAD, M.; SHIL, M. Histopathology of Skin of the Catfish, *Heteropneustes-Fossilis* - Short-Term Effects of Mercuric-Chloride. *Journal of Fish Diseases* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 143-147, Mar 1993.

RACHED, M. T. *et al.* FoxO1 is a positive regulator of bone formation by favoring protein synthesis and resistance to oxidative stress in osteoblasts. *Cell metabolism* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 147-60, Feb 3 2010.

RAHMAN, I. *et al.* Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 3159-65, 2006.

RANDO, T. A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* [S.I.], v. 441, n. 7097, p. 1080-6, Jun 29 2006.

RAY, P. D. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 981-90, May 2012.

REBRIN, I.; SOHAL, R. S. Pro-oxidant shift in glutathione redox state during aging. *Advanced Drug Delivery Reviews* [S.I.], v. 60, n. 13-14, p. 1545-1552, Oct-Nov 2008.

RINALDI, R. *et al.* Reactive intermediates and the dynamics of glutathione transferases. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* [S.I.], v. 30, n. 10, p. 1053-8, Oct 2002.

ROSSI, D. J. *et al.* Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 102, n. 26, p. 9194-9, Jun 28 2005.

SALIH, D. A.; BRUNET, A. FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 126-36, Apr 2008.

SANDELIN, A. *et al.* JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 32, n. Database issue, p. D91-4, Jan 1 2004.

SCHMIDT-ULLRICH, R.; PAUS, R. Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [S.I.], v. 27, n. 3, p. 247-61, Mar 2005.

SCHMOLL, D. *et al.* Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B alpha and the forkhead transcription factor FKHR - Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *Journal of Biological Chemistry* [S.I.], v. 275, n. 46, p. 36324-36333, Nov 17 2000.

SCHNEIDER, M. R. *et al.* The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Current biology : CB* [S.I.], v. 19, n. 3, p. R132-42, Feb 10 2009.

SEOANE, J. *et al.* Integration of Smad and Forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* [S.I.], v. 117, n. 2, p. 211-223, Apr 16 2004.

SHARPLESS, N. E.; DEPINHO, R. A. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *The Journal of clinical investigation* [S.I.], v. 113, n. 2, p. 160-8, Jan 2004.

----- How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews. Molecular cell biology* [S.I.], v. 8, n. 9, p. 703-13, Sep 2007.

SHAW, M. *et al.* The activation of protein kinase B by H₂O₂ or heat shock is mediated by phosphoinositide 3-kinase and not by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-2. *The Biochemical journal* [S.I.], v. 336 (Pt 1), p. 241-6, Nov 15 1998.

SHI, Z. Z. *et al.* Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 97, n. 10, p. 5101-6, May 9 2000.

SHIN, J. *et al.* Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* [S.I.], Sep 20 2011.

SHINDO, Y. *et al.* Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 102, n. 1, p. 122-4, Jan 1994.

SIGAL, S. H. *et al.* The Liver as a Stem-Cell and Lineage System. *American Journal of Physiology* [S.I.], v. 263, n. 2, p. G139-G148, Aug 1992.

SODERDAHL, T. *et al.* Visualization of the compartmentalization of glutathione and protein-glutathione mixed disulfides in cultured cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [S.I.], v. 17, n. 1, p. 124-6, Jan 2003.

SOLTANINASSAB, S. R. *et al.* Multi-faceted regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal of cellular physiology* [S.I.], v. 182, n. 2, p. 163-70, Feb 2000.

STENN, K. S.; PAUS, R. Controls of hair follicle cycling. *Physiological reviews* [S.I.], v. 81, n. 1, p. 449-494, Jan 2001.

STORZ, P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 593-605, Feb 15 2011.

STRAUSS, J. S. Sebaceous Glands. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 291, n. 1, p. 46-47, 1974.

SU, A. I. *et al.* Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 99, n. 7, p. 4465-70, Apr 2 2002.

SUNDBERG, J. P.; KING, L. E. Mouse models for the study of human hair loss. *Dermatologic Clinics* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 619-&, Oct 1996.

TAUPIN, P.; GAGE, F. H. Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *Journal of neuroscience research* [S.I.], v. 69, n. 6, p. 745-749, Sep 15 2002.

TOMA, J. G. *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 778-84, Sep 2001.

TOTHOVA, Z. *et al.* FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell* [S.I.], v. 128, n. 2, p. 325-39, Jan 26 2007.

TREMPUS, C. S. *et al.* CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice. *Cancer research* [S.I.], v. 67, n. 9, p. 4173-81, May 1 2007.

TUMBAR, T. *et al.* Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* [S.I.], v. 303, n. 5656, p. 359-63, Jan 16 2004.

VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions* [S.I.], v. 160, n. 1, p. 1-40, Mar 10 2006.

VAN DER HORST, A. *et al.* FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 1064-U40, Oct 2006.

VAN DER KAAY, J. *et al.* Distinct phosphatidylinositol 3-kinase lipid products accumulate upon oxidative and osmotic stress and lead to different cellular responses. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 274, n. 50, p. 35963-8, Dec 10 1999.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* [S.I.], v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002.

VERBON, E. H. *et al.* The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* [S.I.], v. 511, n. 1, p. 1-6, Dec 10 2012.

WANG, J. *et al.* Glutaredoxin mediates Akt and eNOS activation by flow in a glutathione reductase-dependent manner. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [S.I.], v. 27, n. 6, p. 1283-8, Jun 2007.

WATSON, W. H. *et al.* Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *BioFactors* [S.I.], v. 17, n. 1-4, p. 307-14, 2003.

WATT, F. M. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *The Journal of investigative dermatology* [S.I.], v. 81, n. 1 Suppl, p. 100s-3s, Jul 1983.

----- Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 1, n. 6, p. 1107-15, Dec 1989.

----- Cell culture models of differentiation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* [S.I.], v. 5, n. 3, p. 287-94, Mar 1 1991.

----- Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* [S.I.], v. 353, n. 1370, p. 831-7, Jun 29 1998.

----- Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Current opinion in genetics & development* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 410-7, Aug 2001.

----- Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The EMBO journal* [S.I.], v. 21, n. 15, p. 3919-26, Aug 1 2002a.

----- The stem cell compartment in human interfollicular epidermis. *Journal of dermatological science* [S.I.], v. 28, n. 3, p. 173-80, Apr 2002b.

WATT, F. M. *et al.* Epidermal stem cells: an update. *Current opinion in genetics & development* [S.I.], v. 16, n. 5, p. 518-24, Oct 2006.

WILD, A. C.; MULCAHY, R. T. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression: insights into transcriptional control of antioxidant defenses. *Free radical research* [S.I.], v. 32, n. 4, p. 281-301, Apr 2000.

WILL, Y. Overview of glutathione function and metabolism. *Current protocols in toxicology / editorial board, Mahin D. Maines* [S.I.], v. Chapter 6, p. Unit6 1, May 2001.

WONG, C. E. *et al.* Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *The Journal of cell biology* [S.I.], v. 175, n. 6, p. 1005-15, Dec 18 2006.

YANG, J. Y. *et al.* ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 138-U22, Feb 2008.

YANG, Y. *et al.* Initial characterization of the glutamate-cysteine ligase modifier subunit Gclm(-/-) knockout mouse. Novel model system for a severely compromised oxidative stress response. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 277, n. 51, p. 49446-52, Dec 20 2002.

YIM, C. Y. *et al.* Use of N-acetyl cysteine to increase intracellular glutathione during the induction of antitumor responses by IL-2. *Journal of immunology* [S.I.], v. 152, n. 12, p. 5796-805, Jun 15 1994.

YOUSSEF, K. K. *et al.* Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature Cell Biology* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 299-305, Mar 2010.

ZHAO, F. *et al.* TRED: a Transcriptional Regulatory Element Database and a platform for in silico gene regulation studies. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 33, n. Database issue, p. D103-7, Jan 1 2005.

ZOUBOULIS, C. C. Sebaceous gland in human skin - The fantastic future of a skin appendage. *Journal of Investigative Dermatology* [S.I.], v. 120, n. 6, p. Xiv-Xv, Jun 2003.

CURRICULUM VITAE

Maria Fernanda Pereira de Araújo Demonte Forni

Dados Pessoais

Data e Local de nascimento: 12 de Novembro de 1980 (32 anos), Paulo de Faria, São Paulo, Brasil

Endereço comercial:

Laboratório de Biologia Celular e Molecular

Departamento de Bioquímica

NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular)

Instituto de Química

Universidade de São Paulo (USP)

Av. Lineu Prestes 748, Bloco 9, Sala 964, Butantã (05508-900), São Paulo-SP, Brasil

Tel./Fax: 55-11-3091-9047

e-mail: mafeforni@gmail.com

Web page: <http://www.iq.usp.br/wwwdocentes/mcsoga/>

Educação – Experiência Profissional

1. Graduação em Ciências Biológicas

a. Bacharelado, 2000-2004, Biologia, Universidade de São Paulo, Brasil.

b. Licenciatura, 2004-2006 Biologia, Universidade de São Paulo, Brasil.

- **2001-2002:** Treinamento de Iniciação Científica no Laboratório de Pesquisa Experimental do Câncer, Departamento de Patologia, FMVZ-USP. São Paulo, Brasil. Bolsa da FAPESP (2001/10624-4) EXPRESSÃO DE E-CADERINA E CONEXINA 43 EM CÉLULAS DO TUMOR DE "EHRlich" EM SUAS FORMAS ASCÍTICA E SÓLIDA.
- **2003-2005:** Treinamento de Iniciação Científica no Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, IB-USP. São Paulo, Brasil.
- **2006-2007:** Técnica da empresa biotecnológica Allergisa Pesquisa Dermatocossmética Ltda., junto ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular do IQ-USP/ NUCEL. USP. São Paulo, Brasil.

2. Doutoramento (Direto) em andamento, com término previsto para fevereiro/março de 2013

Projeto de doutorado direto: BASES MOLECULARES DO EFEITO DE ESTRESSE OXIDATIVO NA POTENCIALIDADE E SENESCÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO DA PELE. Supervisora: **Profa Mari Cleide Sogayar**. Bolsa FAPESP (2006/59199-7)

- **2008 a 2010:** Aluna encarregada da operação e manutenção do citômetro de fluxo (BD FACS Aria I e II) do NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular).
- **Agosto a Dezembro 2010:** Treinamento no Wellcome Trust Institute for Stem Cell Research, Centre for Stem Cell Research (CSCR), University of Cambridge and Cancer Research Institute (CRI). Supervisora: **Profa. Fiona Mary Watt**. Bolsa Sanduíche da CAPES (BEX-1284-10-0).
- **Agosto de 2012 até o presente:** Técnica encarregada da operação e manutenção do citômetro de fluxo (BD FACS Aria II) do NUCEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular).

Experiência Técnica

- Cultura celular, isolamento de diversos tipos celulares (células tumorais, células-tronco, cultura primária tecidual, fração mononuclear sanguínea).
- Citometria de fluxo: preparação do experimento, operação do aparelho (FACS Ária, BD), análise e isolamento de subpopulações através de “cell sorting”.
- Manipulação de animais (ratos e camundongos, inclusive manipulação de embriões, além de procedimentos de rotina).
- Coleta e processamento de tecidos para microscopia (incluindo obtenção de secções e separação de camadas de tecido, além de imunofluorescência e imunohistoquímica de tecidos e células, além de “living cell staining”).
- Ensaios enzimáticos (fluorimétricos and colorimétricos).
- Análise de dados de Microarray (platforma Affimetrix), PCR, PCR em tempo real (inclusive análise de dados de expressão relativa).
- Western blotting (células e tecidos, coleta de frações de proteína total ou frações nucleares e citoplasmáticas).
- Outros: ensaios de toxicidade como MTT, manipulação e preparação de estoques bacterianos.

Cursos extracurriculares

- Treinamento Teórico-Prático para Operadores no Citômetro de Fluxo BD FACS Aria™
São Paulo, SP
2007, 26 a 29 de novembro
Carga horária: 24 horas
- BD FACS Aria™ Operator Course
Milpitas/San Jose, California, USA
2008, 09 a 13 de junho
Carga horária: 40 horas
- Treinamento Teórico-Prático para Operadores no Citômetro de Fluxo BD FACS Aria™ (Curso de reciclagem)
São Paulo, SP
2012, 10 a 14 de agosto
Carga horária: 20 horas

PUBLICAÇÕES

Manuscritos Publicados

1. Sartori A, Garay-Malpartida, **Forni MF**, Schumacher R, Dutra F, Sogayar MC, Bechara E. Aminoacetone, a Putative Endogenous Source of Methylglyoxal, Causes Oxidative Stress and Death to Insulin-Producing RINm5f Cells. *Chem Res Toxicol.* (2008) Vol 21 (9), pp 1841-1850.
2. Tatiana C. Carneiro-Lobo, Andréa Mariano-Oliveira, Sandra Konig, **Maria Fernanda Forni**, José M. C. Ribeiro, Ivo M.B. Francischetti, Mari C. Sogayar, and Robson Q. Monteiro IXOLARIS, a potent exogenous inhibitor of factor VIIa/Tissue Factor complex blocks primary tumor growth in a glioblastoma model. *J Thromb Haemost.* (2009) Vol 7(11) pp1855-64.
3. **Forni MF**, Loureiro RR, Cristovam PC, Bonatti JA, Gomes JAP, Sogayar MC. Comparison between different biomaterial scaffolds for human limbal derived stem cells growth and enrichment. *Current Eye Research.* 2012 Oct 10. [Epub ahead of print]

4. Lobba ARM, **Forni MF**, Carreira ACO, Sogayar MC. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. *Cytometry Part A*. (2012) Vol 81(12) pages:1084-91.
5. **Forni MF**, Lima MT, Sogayar MC. Stem cells in embryonic skin development. *Biological Research*. (2012) Vol 45 (3) pages:15-22.

Manuscritos Submetidos

- **Forni MF**, Maia AR, Ferreira AHP, Sogayar MC. Simultaneous isolation of three stem populations from murine skin. *Submetido à revista Stem Cells and Development*.
- Halcsik E, **Forni MF**, Fujita A, Jensen ON, Sogayar MC. Novel players in osteogenic differentiation by mass spectrometric assessment of phosphorylated substrates in murine skin mesenchymal cells. *Em fase final de submissão ao Journal of Proteomics Research*.

Manuscritos em Preparo

- **Forni MF**, Schreiner A, Trombetta-Lima M, Driskell R, Paiva K, Quist S, Ocegüera F, Watt FM, Sogayar MC. Glutathione depletion in epidermal skin stem cells leads to abnormal differentiation and hyperproliferative response during skin embryonic development and adult homeostasis: a role for FOXO transcription factors.
- **Forni MF**, Mantovani MC, Antonini G, de Alcântara PSM, Otoch-Pinhata J, Yamamoto F, Sogayar MC. Isolation, characterization and bioreactor expansion of mesenchymal skin stem cells for cell therapy.
- **Forni MF**, Sartori A, Halcsik E, Polizel LS, Bechara E, Sogayar MC. Oxidative stress mediated adipogenic switch during osteogenic differentiation of mesenchymal skin stem cells is glutathione dependent.

Prêmios

1. 14° SIICUSP (Simpósio de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo), Menção honrosa por melhor trabalho, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, 2007.
2. Prêmio de melhor pôster - XXXVII Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society and XI Congress of the Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology, 2008 (2nd author).

3. Forni MF, Maia AR, Polizel LS, Halcsik E, Sogayar MC. Proliferation, Senescence and Death of Skin Stem Cells Induced by Hydrogen Peroxide. 1º. Encontro da Pós-Graduação do Instituto de Química - USP (13 a 14 agosto, 2009). São Paulo, SP, Brasil.★ Melhor trabalho apresentado - Seção Bioquímica.
4. BSRT PhD Symposium Stem Cells: Hopes, Fears and reality. (1 a 3 de dezembro, 2010) Título: Murine skin as a source of multipotent Stem Cells. Melhor trabalho da seção Cell Therapy/Isolation and Manipulation of Stem Cells , também indicado para apresentação oral.
5. Prêmio de melhor pôster - XL Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011 (2nd author).
6. Prêmio viagem para: South American Group of the Society for Free Radical Biology and Medicine (2011). Em: VII Meeting of South American Group of the SFRBM. São Pedro, SP, Brasil.
7. Prêmio viagem do Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil. Para: Annual meeting of the International Society for Stem Cell Research (2012), Yokohama, Japão.
8. Prêmio da ISSCR. To: Annual meeting of the International Society for Stem Cell Research (2012), Yokohama, Japão.

Apresentações Orais em Conferências

1. ***Células-tronco tumorais.*** Em: Molecular Biology of the Malignant Transformation (2007) Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil.
2. ***Papel do Estresse Oxidativo na Diferenciação de Células-tronco Mesenquimais de Pele*** Em: Molecular Biology of the Malignant Transformation. (2009) Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil.
3. ***Isolamento e Caracterização de Células-tronco de Pele.*** Em: Simpósio Conjunto de Proteômica (2009) Natura-NUCEL, Cajamar, São Paulo, Brasil.
4. ***Proliferation, Senescence and Death of Skin Stem Cells.*** Em: Encontro Internacional sobre Células-Tronco (Seção: Células-Tronco Adultas II) (2009) IncoR/British Council, Centro Braileiro Britânico, São Paulo, SP, Brasil
5. ***Murine skin as a source of multipotent stem cells.*** Em: Stem Cells: Hopes, Fears and Reality (Section: Isolation and Manipulation of Stem Cells) (2010) Berlin Brandenburg School of Regenerative Medicine. Berlin, Germany.
6. ***Homeostase de Células-tronco durante o Desenvolvimento Embrionário: Papel do Estresse Oxidativo.*** Em: Molecular Biology of the Malignant Transformation. (2011) Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, São Paulo, Brasil.

7.Forkhead-Homeobox-type-O (FOXO) Driven epidermal Embryonic Morphogenesis and Epidermal Stem Cell Differentiation is Glutathione Dependent and occurs through the PI3/Akt pathway. In: VII Meeting of South American Group of the SFRBM (2011) São Pedro, SP, Brasil.

Sociedades Científicas

Membro da The Society for Free Radical Biology and Medicine (desde agosto 2011).

Membro da International Society for Stem Cell Research (desde janeiro 2012)

Comitês

Representante discente

Comissão Coordenadora do Programa de Bioquímica

09/12/2008 to 08/12/2009

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

Trabalhos apresentados em congressos

23 abstracts relacionados com células-tronco e estresse oxidativo em congressos nacionais e 12 em congressos internacionais, dentre os quais se destacam:

Isolation, Characterization and Differentiation of Three Different Skin Stem Cells

Forni MF, Maia AR, Polizel LS, Sogayar MC

Stem Cells

Jolly Beach Resort, Antigua

2009, 19/22 Novembro

Oxidative Stress Mediated Senescence of Skin Stem Cells

Forni MF, Polizel LS, Lobba ARM, Lima MT, Halcsik E, Sogayar MC

Keystone Symposia: New Insights into Healthspan and Diseases of Aging: From Molecular to Functiona Senescence

Granlibakken Resort, California, EUA

2010, 31 Janeiro a 02 de Fevereiro

Forkhead-Homeobox-type-O (FOXO) Driven epidermal Embryonic Morphogenesis and Epidermal Stem Cell Differentiation is Glutathione Dependent and occurs through the PI3/Akt pathway

Forni MF, Polizel LS, Watt FM Sogayar MC

VII Meeting of South American Group of the SFRBM

São Pedro, SP, Brasil

2011, 17/21 Agosto ★ Seleccionada para apresentação oral

The Osteogenic Differentiation of Dermis Mesenchymal Stem Cells is Dependent on Glutathione Homeostasis

Forni MF, Polizel LS, Sartori A, Ganini D, Bechara EJH, Sogayar MC

10th Annual Meeting International Society for Stem Cell Research

Pacifico Yokohama, Yokohama, Japão

2012, 13/16 Junho, ★ Prêmio viagem ISSCR + Prêmio viagem do Programa de Bioquímica - IQ-USP

Experiência como Supervisora/Mentoria

1. Supervisão de aluno de graduação: Laura de Souza Polizel. Agosto 2008 - Junho 2011. Bolsista do CNPq (181182/2009-2). Bolsista da FAPESP (2010/09278-3). Título do projeto: Papel do estresse oxidativo e de FOXO na diferenciação de células-tronco de pele.

★ Escrevi e apliquei o projeto para a agência financiadora, ensinei técnicas de biologia celular e molecular, supervisionei experimentos e redação de relatórios, ensinei a escrever abstracts de congresso, pôsteres e apresentações orais. Ensinei como manipular camundongos e ratos.

2. Supervisão de aluno de graduação: Gabriel Antonini. Fevereiro 2009 - Junho 2011. Bolsista do CNPq (520022/2010-06). Título do projeto: Células-tronco mesenquimais de pele humana como uma nova fonte para terapia celular.

★ Escrevi e apliquei o projeto para a agência financiadora, ensinei técnicas de biologia celular e molecular, supervisionei experimentos e redação de relatórios, ensinei a escrever abstracts de congresso, pôsteres e apresentações orais. Ensinei como coletar e processar tecidos humanos.

3. *Estudante de pós-graduação Lato sensus*: Rafaela Muniz de Queiroz. Fevereiro a Dezembro de 2010 Título da dissertação: **Oxidative stress and ageing correlates with male spermatogonial stem cell depletion.**

Experiência Letiva

Cursos como professora

- **Curso Prático/Workshop: A caminho da Biotecnologia.** Fundamental II grade. 2011. See-Saw Panamby Bilingual School and Chemistry Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brasil .
- **Stem Cells in Pancreas: Development and Differentiation.** In: Developmental Biology and Stem Cells. 2007. Department of Pathology, Veterinary Medicine Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brasil (aula para curso de especialização).
- **Metodologia de Citometria de Fluxo e suas aplicações em Células-tronco e na Tumorigênese**
Grupo de estudos de Oncologia Molecular/Curso de Medicina. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. 2010.(aula para graduação).
- **Mini-curso: Células-tronco: uso *in natura* ou como fonte de células especializadas.**
11th Encontro Regional de Bioedicina. UNESP, Botucatu, São Paulo, SP. 2008

Cursos como Monitora

Cursos como monitora para a graduação

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE)

QBQ213-Química de Biomoléculas (Nutrição). Docente responsável: Robert Ivan Schumacher 1st semester, 2008 . USP.

QBQ126-Biologia Molecular (Medicina Veterinária). Docente responsável: Mari Cleide Sogayar 2nd semester, 2008 .USP.

QBQ2452- Biologia Metabólica (Química). Docente responsável: Maurício da Silva Baptista 2nd semester, 2009 .USP.

QBQ0313 – Bioquímica (Nutrição). Docente responsável: Robert Ivan Schumacher 1st semester, 2012 .USP.

VI Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular

Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP

2009. Janeiro 2012. USP.

Cursos como monitora para a pós-graduação

- **QBQ5717 (IQ-USP)** - Biologia Molecular da Transformação Maligna. **2007, 2009 e 2011.** Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil (**Aula + curso prático: western blotting, imunofluorescência, imunohistoquímica, citometria de fluxo, morte celular, diferenciação de células-tronco**).

- **IV Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular**
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP. **Módulo de citometria de fluxo.**
2009, 20/31 Julho

- **VI Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular**
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP. **Módulo de citometria de fluxo.**
2011, 04/15 Junho



São Paulo, 27 de abril de 2007.

Ilmo(a). Sr(a).

Profª. Dra. Mari Cleide Sogayar

Departamento de Bioquímica

Instituto de Química

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Projeto de Pesquisa** "*Bases moleculares do efeito do estresse oxidativo na potencialidade e senescência de células tronco de pele*" - **Co-Autor(es)**: Alexandre Hamilton Ferreira Pereira, Maria Fernanda P. A. D. Forni - **Registro CEP-HU/USP**: 730/07 - **SISNEP/CAAE**: 0021.0.198.000-07

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 13 de abril de 2007, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**, bem como, seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final, em função da duração da pesquisa), de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório está previsto para 13 de abril de 2008.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP



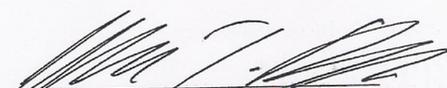
Universidade de São Paulo
Instituto de Química

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Bases Moleculares do Efeito do Estresse Oxidativo sobre a Potencialidade e Senescência de Células Tronco de Pele” desenvolvido sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Cuidados e Uso Animal (CECUA) do IQ-USP em 22/03/07.

We attest that the project entitled “Bases Moleculares do Efeito do Estresse Oxidativo sobre a Potencialidade e Senescência de Células Tronco de Pele” developed under the responsibility of Dr. Mari Cleide Sogayar is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and has been approved by the Internal Animal Care and Use Committee of the Institute of Chemistry, University of São Paulo, on 03/22/07.

São Paulo, 22/03/07.



Prof. Dra. Alciana Juliana Kowaltowski
Coordenador CECUA