

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de Doutorado

**DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O PROCESSO DE ENGENHARIA
TECIDUAL DO SISTEMA URINÁRIO**

Joelson Tomedi

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Ilma Simoni Brum

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Nádyá Pesce da Silveira

Porto Alegre, Junho de 2016.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de Doutorado

**DIFERENCIAÇÃO CELULAR E O PROCESSO DE ENGENHARIA
TECIDUAL DO SISTEMA URINÁRIO**

Joelson Tomedi

Tese realizada sob a orientação da Profª. Drª. Ilma Simoni Brum da Silva, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisiologia.

Porto Alegre

2016

AGRADECIMENTOS:

Durante o desenvolvimento deste trabalho, fui agraciado com o apoio abnegado de várias pessoas talentosas e diligentes. Dentre elas, gostaria de agradecer às professoras Ilma Simoni Brum e Nádyá Pesce da Silveira por terem a coragem de orientar um projeto tão audacioso. Obrigado por seus ensinamentos e amizade.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por disponibilizar a sua estrutura e subsidiar parte do projeto. Aos membros do Serviço de Urologia, representados pelos professores Milton Berger e Brasil Silva Neto, por viabilizarem a coleta de células. Ao Laboratório de Patologia Experimental, principalmente à técnica Flávia Giusti, pelo auxílio na preparação das lâminas histológicas.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-Tronco, especialmente à Prof^a. Patricia Helena Lucas Pranke e à aluna Daniela Pavulack, pela assistência no ensaio de diferenciação mesenquimal. Ao pesquisador Pedro Chagastelles por sua ajuda na execução da citometria de fluxo.

Como nota pessoal, agradeço à minha família por tornar todo este esforço significativo.

*Através de várias sortes, através de todas as vicissitudes,
nós fizemos o nosso caminho...*

Eneida

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. ABSTRACT	5
3. LISTA DE TABELAS	6
4. LISTA DE FIGURAS	6
5. LISTA DE ABREVIATURAS	7
6. INTRODUÇÃO	8
7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
7.1. UROTÉLIO	10
Marcadores uroteliais	12
Diferenciação	14
7.2. MÚSCULO LISO	16
Marcadores do músculo liso	18
Mecanismos de diferenciação	22
7.3. ENGENHARIA DE TECIDOS URINÁRIOS	25
8. OBJETIVOS	28
8.1. GERAL	28
8.2. ESPECÍFICOS	28
9. METODOLOGIA	1
9.1. DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM	1
9.2. CULTURA CELULAR	2
Isolamento dos tipos celulares	2
Desenvolvimento das culturas	3
9.3. IMUNOCITOQUÍMICA	3
9.4. CITOMETRIA DE FLUXO	5
Perfil imunofenotípico	6
9.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	6
9.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR	7
9.7. RT-qPCR	8
9.8. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA	9
9.9. ANÁLISE DE DADOS E DESFECHOS	10
Análise estatística	11
10. RESULTADOS	12
10.1. CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS	12
10.2. EXPANSÃO DO UROTÉLIO	16
Expressão do gene KRT5	17
Proliferação do urotélio	17

Morte celular	18
10.3. EXPANSÃO DO MÚSCULO LISO	21
Proliferação do músculo liso	22
Morte celular	23
10.4. COMPARAÇÃO ENTRE MSC E MÚSCULO LISO	26
11. DISCUSSÃO	29
11.1. UROTÉLIO	29
11.2. MÚSCULO LISO	32
12. METODOLOGIA	69
12.1. DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM	69
12.2. MANUFATURA DE MATRIZES TEMPORÁRIAS	70
12.3. CULTURA DOS NEOTECIDOS	70
12.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA	71
12.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA	72
12.6. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO	73
12.7. ANÁLISE DE DADOS E DESFECHOS	73
Comparação entre MSC e músculo liso	74
Cocultura	75
13. RESULTADOS	76
13.1. CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES	76
13.2. MATRIZ TEMPORÁRIA	76
13.3. FORMAÇÃO DE ESTROMA	77
13.4. COCULTURA	78
14. DISCUSSÃO	82
15. CONCLUSÃO	87
16. BIBLIOGRAFIA	88
17. SUPLEMENTO	98

1. RESUMO

A questão central para a engenharia tecidual é induzir as células a recapitularem o seu fenótipo normal quando integradas a um arcabouço manufaturado. O objetivo deste trabalho foi examinar as variações na diferenciação celular do músculo liso e urotélio durante as etapas de produção de tecidos urinários *in vitro*. Quinze espécimes cirúrgicos geraram as culturas analisadas e os fenótipos das populações foram verificados por citometria de fluxo, imunofluorescência e expressão gênica. Houve uma associação entre o cultivo em superfícies plásticas e alterações no fenótipo de ambos os tipos celulares, os quais foram restaurados, em alguma extensão, após sua semeadura em matrizes temporárias. Enquanto o músculo liso recuperou o seu marcador contrátil, o urotélio apresentou atributos de uma camada basal. O estudo destacou como a perda da diferenciação secundária à expansão *in vitro* representa um desafio para a formação de neotecidos funcionais.

2. ABSTRACT

The key issue of tissue engineering is how to induce cells to recapitulate their normal phenotype when placed within a scaffold. The aim of this work was to examine the smooth muscle and urothelium differentiation changes during the steps of urinary tissue production *in vitro*. Fifteen surgical specimens generated the analyzed cultures and phenotypes of cell populations were monitored by flow cytometer, immunofluorescence and gene expression. For both cellular types, there was an association of cell culture on plastic with phenotypic changes, but they were regained to some extent after cell seeding onto scaffolds. Smooth muscle cells restored their contractile marker, while urothelium showed attributes of a basal layer. The study highlights how the loss of differentiation due to propagation of cells *in vitro* represents a challenge to development of full functional neotissue.

3. LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos indivíduos doadores de tecidos urinários	13
Tabela 2. Comparação entre os perfis imunofenotípicos do músculo liso e MSCs	27
Tabela 3. Características das culturas amostradas	76

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da pesquisa com as culturas uroteliais	14
Figura 2. Fluxograma da pesquisa com as culturas musculares lisas	15
Figura 3. Perfil populacional das células uroteliais	16
Figura 4. Expressão média normalizada do gene KRT5	17
Figura 5. Taxa de proliferação dos diferentes fenótipos uroteliais in vitro	18
Figura 6. Expressão de queratinas no urotélio ureteral	19
Figura 7. Seguimento da população K7 in vitro	19
Figura 8. Seguimento da subpopulação K5 in vitro	20
Figura 9. Seguimento da subpopulação K20 in vitro	20
Figura 10. Ensaio de TUNEL na subpopulação K5	21
Figura 11. Ensaio de TUNEL na subpopulação K20	21
Figura 12. Perfil populacional do músculo liso	22
Figura 13. Taxas de proliferação entre os fenótipos do músculo liso	23
Figura 14. Expressão dos marcadores de músculo liso no ureter	24
Figura 15. Seguimento da população muscular lisa que expressava α -actina in vitro	24
Figura 16. Seguimento da população muscular lisa que expressava miosina-HC in vitro	25
Figura 17. Expressão de vimentina no músculo liso em P1	25
Figura 18. Ensaio de TUNEL em culturas musculares lisas	25
Figura 19. Citometria de fluxo das células musculares lisas e MSCs	27
Figura 20. Características das células-tronco derivadas de tecidos periureterais	27
Figura 21. Expressão de CD90 nas células musculares lisas	28
Figura 22. Ensaio de diferenciação nas MSCs	28
Figura 23. Ensaio de diferenciação nas células musculares lisas	28
Figura 24. Caracterização da matriz manufaturada	79
Figura 25. Imunohistoquímica de estroma formado por células musculares lisas	79

Figura 26. Imunohistoquímica de estroma formado por MSCs	79
Figura 27. Fotomicrografia do estroma formado por MSCs corado com HE	79
Figura 28. Fotomicrografia do estroma formado por células musculares lisas corado com HE	80
Figura 29. Caracterização das regiões heterogêneas do estroma muscular liso	80
Figura 30. Imunohistoquímica para fibronectina	80
Figura 31. Secção de cocultura urotélio-músculo liso corada com HE	81
Figura 32. Proliferação das células uroteliais na matriz temporária	81
Figura 33. Expressão de queratinas pelas células uroteliais cultivadas sobre a matriz temporária	81
Figura 34. Proliferação das células musculares lisas na matriz temporária	82

5. LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	alpha-modified Eagle's medium	K	queratina
ATP	trifosfato de adenosina	KLF	Kruppel-like transcription factors
bHLH	basic helix-loop-helix	MRTF	myocardin-related transcription factor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	MSC	mesenchymal stem cell
dNTP	trifosfato de desoxinucleotídeo	\bar{M}_w	média ponderal da massa molar
DP	desvio padrão	NA	abertura numérica
DTT	ditiotreitól	PDGF	platelet-derived growth factor
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético	Shh	Sonic hedgehog
EdU	5-etinil 2'-desoxiuridina	SRF	serum response factor
ETS	família E-twenty six	TCE	TGF- β control element
gl	graus de liberdade	TGF β_1	transforming growth factor β_1
HE	hematoxilina e eosina	TUNEL	desoxinucleotidil transferase terminal
IC	intervalo de confiança	Upk	uroplaquina

6. INTRODUÇÃO

Por toda a história, relatos de lesões irreversíveis no sistema urinário foram sempre associados à tragédia. Fosse em decorrência de malformações congênitas, trauma ou doenças diversas, o comprometimento da estrutura e função dos órgãos urinários, quando não conduzia o indivíduo a desfechos funestos, invariavelmente restringia-o a uma vida marcada pela enfermidade. Tentativas de reparo são tão antigas quanto as próprias narrativas dos infortúnios, mas na maioria das vezes esbarravam na falta de conhecimento ou tecnologia para concretizá-lo¹.

Em nosso tempo, embora o aprimoramento de técnicas que permitem o transplante de órgãos tenha revolucionado a terapia da insuficiência renal², o manejo dos danos nos demais órgãos uroteliais ainda é insatisfatório. A experiência com estratégias de reconstrução fundamentadas no implante de tecidos não-urinários ou materiais manufaturados é desapontadora, pois geralmente fracassam em decorrência de problemas funcionais ou de biocompatibilidade^{3,4}. Com efeito, a análise sistemática de seus resultados apenas reforça o axioma: “substituir tecidos urinários com os próprios tecidos urinários”.

Curiosamente, o mesmo adágio serviu como conceito para o desenvolvimento de uma inovação tecnológica promissora, a gênese de neotecidos *ex vivo*. Identificada pelo termo engenharia tecidual⁵, ela abrange um conjunto de técnicas que visam a produzir substitutos biológicos em laboratório via integração de células a um arcabouço, denominado matriz temporária ou *scaffold*. Conquanto a complexidade do processo torne a sua execução restrita a poucos centros, já existem evidências de que o seu implante constitui uma alternativa factível para reconstruir segmentos de órgãos uroteliais danificados.

Os exemplos mais bem-sucedidos de engenharia de tecidos do sistema urinário envolveram a formação do substituto com uma combinação de células uroteliais e musculares lisas^{6,7}. Devido à escassez inerente de sítios doadores, obter um número suficiente de cada

tipo celular demanda sua expansão em culturas individuais. Ao utilizar esse expediente, o fabricante expõe a população original a um ambiente artificial, o qual modifica o fenótipo celular. Realmente, pesquisas já demonstraram que a expressão gênica das células em cultivo tradicional difere significativamente do seu padrão tecidual⁸. No entanto, as evidências sobre a reversibilidade das alterações após a sua integração à matriz temporária ainda são limitadas.

Na maioria das pesquisas, o hábito de rastrear a população celular com marcadores genéricos suscita interpretações superficiais, e muitas vezes conflitantes, sobre o grau de diferenciação que pode ser atingido *ex vivo*. Por essa razão, o presente trabalho desenvolveu um método de produção de tecidos com o objetivo de observar as variações da diferenciação celular em cada etapa do processo. Nele, verificou-se o estado de maturação das células uroteliais e musculares lisas nos tecidos originais, durante o período de expansão *in vitro* e três semanas após sua integração a matrizes temporárias. Para o fim de praticidade, dividiu-se a análise em duas partes: a primeira, referente a expansão celular; seguida pela avaliação dos neotecidos.

7. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A maior demanda funcional dos órgãos uroteliais é contrapor uma das leis dominantes no universo: a difusão. Para antagonizá-la, dotou-se o sistema urinário de dois elementos que lhe permitem conduzir e armazenar a urina com mínima alteração da sua composição. O primeiro, um epitélio especializado em impedir o trânsito de íons e moléculas independentemente das variações de sua superfície. O segundo, uma camada muscular que lhe confere a capacidade de expandir e contrair a pressões relativamente baixas, reduzindo, assim, o efeito da força convectiva sobre a barreira. Logo, por exercerem papéis essenciais na fisiologia urinária, os aspectos relevantes para o estudo da diferenciação e cultivo de ambos os tipos celulares serão comentados antes das considerações sobre a engenharia tecidual.

7.1. UROTÉLIO

Constituir a barreira epitelial mais impermeável do organismo é a característica que melhor representa a importância deste tecido⁹. Graças a sua existência, o sistema urinário pode suportar, incólume, amplas variações de osmolaridade da urina e impedir trocas não reguladas de substâncias entre o conteúdo luminal e o sangue que, de outra forma, comprometeriam a homeostasia^{9,10}. Embora o controle da permeabilidade seja sua função primordial, sabe-se que ele também age como um órgão sensorial, exerce um papel fundamental na acomodação da urina e atua como um importante componente da imunidade inata^{9,11,12}.

Histologicamente, características distintas dos seus elementos permitem dividi-lo em três estratos¹². Células pequenas e cuboides formam a camada basal, sobre a qual se assenta o estrato intermediário constituído por tipos celulares algo piramidais. Junto ao lúmen, identifica-se uma camada única de células superficiais com forma achatada, uni ou multinucleadas, as quais representam o ápice da diferenciação urotelial. Apesar de ser um fenómeno complexo, a função de barreira é primariamente associada a atributos encontrados nas células superficiais^{12,13}.

A base estrutural para a sua alta resistência à difusão provém de especializações exibidas pela membrana plasmática apical em concerto com a presença de zonas de oclusão no espaço paracelular. Adaptada para impedir o fluxo transcelular, a membrana apical possui composição semelhante à mielina e exhibe um conjunto de proteínas, denominadas uroplaquinas, as quais tornam a sua face luminal duas vezes mais espessa que a citoplasmática*¹². A adição de junções fechadas (*tight junctions*) extremamente desenvolvidas na membrana lateral garante que toda superfície epitelial seja altamente impermeável à água e pequenos solutos^{10,14}.

No entanto, a sua complexidade vai muito além de uma barreira passiva. A descrição de canais de sódio e sistemas de transporte moduláveis são um indicativo que o urotélio pode regular a sua permeabilidade de acordo com as condições do organismo^{11,15}. Além disso, ele detém a habilidade de modificar sua superfície em resposta ao estiramento. Durante incrementos no volume de urina, células intermediárias deslizam horizontalmente, enquanto as superficiais podem aumentar sua área em mais de 50% via incorporação de vesículas discoides à membrana apical¹⁶. Esta característica lhes confere a capacidade de cobrir várias células subjacentes, razão pela qual são designadas células *umbrella*.

De modo similar ao conhecimento da sua fisiologia, o cultivo *in vitro* de células uroteliais possui um histórico relativamente recente. Os primeiros relatos de culturas bem-sucedidas ocorreram há cerca de 40 anos via explantes (*explants*) retirados do sistema

* Também reconhecida pelo termo unidade assimétrica de membrana.

urinário de mamíferos¹⁷. Por ser um tecido epitelial naturalmente quiescente, logo percebeu-se que suas culturas primárias eram propensas à falência em decorrência da falta de interação com células estromais^{18,19}. Assim, a competência para expandir o urotélio eficientemente sobre superfícies plásticas só foi adquirida após o aperfeiçoamento dos seus métodos de cultivo, um processo que consumiu duas décadas de pesquisa¹⁹⁻²¹.

O marco fundamental para esse feito foi o desenvolvimento de meios de cultura livres de soro fetal e com baixa concentração de cálcio, os quais deslocam o equilíbrio dos estímulos de estratificação para proliferação^{19,22}. Desde então, demonstrou-se a factibilidade de cultivar células uroteliais por 6 a 11 passagens antes que atinjam o estado de senescência ou alterem seu padrão cromossômico²³. A habilidade de multiplicá-lo exponencialmente a partir de pequenas amostras não apenas tornou possível a produção de tecidos uroteliais *ex vivo*, mas também gerou uma série de questões sobre a sua biologia. Duas delas, indispensáveis para a discussão deste trabalho, serão detalhadas a seguir.

Marcadores uroteliais

Por apresentarem arquitetura peculiar, a completa caracterização dos epitélios estratificados envolve tanto a sua distinção como tecido, quanto a verificação da diferenciação de suas camadas constituintes. Ao analisar o urotélio, observa-se que somente o estrato superficial possui marcadores suficientemente específicos para discriminá-lo de outros epitélios²⁴. Para as células das demais camadas, embora possam apresentar uma organização singular, não há um gene identificado capaz de segregá-las de modo inequívoco. Por esse motivo, definir a camada de procedência de uma célula urotelial é, como regra, uma tarefa mais simples do que ratificar a sua linhagem.

Mesmo que a acessibilidade à dissecação do urotélio facilite seu isolamento, provar a origem das células cultivadas é essencial para a confiabilidade de qualquer estudo. Consequentemente, a falta de um gene seletivo que identifique todas as células uroteliais

causa uma dificuldade adicional na caracterização de suas culturas primárias. Como, em sua maioria, elas expressam um conteúdo proteico comum a outros epitélios e a expansão sobre o plástico destrói o seu arranjo histológico, a utilização de um único marcador para confirmar a natureza da cultura não exclui o viés de seleção. Contudo, pode-se reduzir sua probabilidade com a demonstração das populações que o constituem²⁵.

Dentre os marcadores uroteliais, os mais restritos pertencem a uma classe de cinco proteínas transmembrana agrupadas sob o termo uroplaquinas (Upk): a saber Ia, Ib, II, IIIa e IIIb²⁶. Com configuração conservada entre os mamíferos, elas são arranjadas em uma trama cristalina hexagonal e constituem a base estrutural das placas uroteliais, um dos componentes responsáveis pela função de barreira da membrana plasmática apical^{27,28}. Embora todas estejam associadas ao urotélio, a comparação do transcriptoma de vários tecidos humanos classificou as uroplaquinas Ia, II e IIIb como as mais seletivas²⁴. Porém, somente ao gene *UPK2* pôde-se creditar exclusividade de expressão.

Se a seletividade lhes confere um importante papel na identificação do urotélio, há particularidades que limitam a sua utilização em algumas circunstâncias. Em primeiro lugar, a variabilidade dos seus conteúdos, tanto entre as camadas uroteliais de diferentes espécies, quanto entre órgãos urinários, influencia a generalização dos dados obtidos. Enquanto no homem, com exceção da unidade Ib, a produção de uroplaquinas é restrita às células superficiais, no camundongo elas podem ser detectadas já na camada intermediária⁹. Ademais, sua concentração, como grupo, é dez vezes menor no epitélio ureteral que no vesical²⁹.

Em segundo lugar, a supressão da síntese de uroplaquinas durante o cultivo reduz a sua importância na identificação de células *in vitro*²⁹. Por essas razões, é comum que o escrutínio das células uroteliais seja feito com o auxílio de um catálogo de queratinas (K). Presente no citoesqueleto da maioria dos epitélios, onde forma filamentos intermediários, essa classe de proteínas participa várias funções celulares, as quais abrangem desde a resistência mecânica e polaridade, até processos de transporte e sinalização³⁰. Como norma,

os tecidos epiteliais contêm composições de queratinas que correspondem ao seu arranjo histológico³¹. No entanto, é importante ressaltar que os seus perfis de expressão refletem o estado de diferenciação, não a origem do tecido. Portanto, eles podem ser inválidos em situações patológicas.

O conjunto de queratinas expresso pelo urotélio normal forma um padrão peculiar, o qual é útil para sua distinção de outros tecidos³¹⁻³³. Nele, observa-se que tipos característicos de epitélios simples, particularmente K7, K8, K18 e K19, possuem distribuição ubíqua entre as células uroteliais. Por outro lado, há queratinas restritas a epitélios estratificados que podem identificar camadas do urotélio: enquanto a K5 marca as células basais, os tipos K13 e K17 caracterizam os estratos basal-intermediário. Considerada o marcador final da diferenciação urotelial³⁴, a K20 possui expressão limitada às células superficiais. Como um sinal da heterogeneidade urotelial, sua presença é contínua na bexiga, intermitente no ureter e rara na pelve renal.

Diferenciação

Devido a sua estrutura estratificada, por muitos anos acreditou-se que a diferenciação do urotélio ocorria em uma sequência linear, na qual as células basais K5⁺ gerariam as intermediárias e superficiais³⁵. Embora desprovida de uma evidência direta que comprovasse a localização das células progenitoras, a ideia de um modelo de estratificação hierárquico encontrava suporte na observação de intensa proliferação nas camadas basais durante o reparo de lesões uroteliais induzidas³⁶.

A esse facto, somava-se a detecção imunohistoquímica em gradiente do fator transcricional p63, presente nos estratos basal-intermediário e ausente no superficial, a qual guardava semelhanças com o padrão exibido por outros epitélios³⁷⁻³⁹. Porque ele desempenha um papel crítico na diferenciação e autorrenovação de células-tronco epiteliais, o seu perfil de

expressão induzia a conclusão que o processo de diferenciação seguiria uma regra geral^{37,38,40}. Com efeito, demonstrou-se que todas as células uroteliais derivam de um progenitor embrionário comum, o qual expressa p63³⁸.

Apesar dessa associação, a uniformidade da sua marcação não possibilitava a discriminação de um subtipo análogo no tecido maduro³⁷. Na falta de um marcador específico, imputava-se o papel de progenitor a espécimes com ciclo celular lento localizados nas camadas basais do epitélio, os quais eram capazes de gerar colônias *in vitro*³⁵. Porém, o conceito original da diferenciação sequencial começou a ser revisto após a demonstração de que a população com capacidade regenerativa do urotélio adulto expressava o fator morfogênico Shh (*Sonic hedgehog*), alvo transcricional do p63^{41,42}. Ao correlacioná-lo com as células progenitoras, constatou-se que os nichos a elas atribuíveis estavam tanto na camada basal, quanto na intermediária^{38,42}.

Inicialmente, a explicação para esse achado aproximava a estratificação urotelial àquela exibida pela epiderme. Para conservar o conceito de diferenciação sequencial, conferiu-se às células K5 o papel progenitor verdadeiro, enquanto especulou-se que as intermediárias seriam “amplificadoras de trânsito”, ou seja, células com potencial proliferativo limitado destinadas a suprir rapidamente as eventuais demandas da camada superficial^{35,43}. Contudo, as tentativas de estabelecer um elo entre as células K5 e o progenitor embrionário acabaram por suscitar interpretações conflitantes à plausibilidade desse modelo hierárquico^{15,43}.

Ao rastrear o gene *Shh* durante o desenvolvimento da bexiga de camundongos transgênicos, pesquisadores descreveram o perfil fenotípico da célula endodérmica indiferenciada como Shh⁺ p63⁺ Foxa2⁺ Upk⁻ K5⁻. A seguir, observaram que dela descendia uma célula progenitora (P) (Shh⁺ p63⁺ Foxa2⁺ Upk⁺ K5⁻), a qual formava transitoriamente o epitélio primitivo e terminava por desaparecer após originar um tipo celular com fenótipo intermediário (Shh⁺ p63⁺ Foxa2⁻ Upk⁺ K5⁻). De modo surpreendente, constatou-se que as

células basais (Shh^+ $p63^+$ $Foxa2^-$ Upk^- $K5^+$) surgiam após esse processo e, embora sua origem fosse endodérmica, não eram derivadas das células P ou intermediárias⁴⁴.

Coincidentemente, o seguimento do gene *Krt5* excluiu uma ligação entre as células basais e os descendentes das intermediárias⁴⁴. Diante desses resultados, os autores concluíram ser improvável a hipótese das células $K5^+$ constituírem a população progenitora durante o desenvolvimento do urotélio. Todavia, a dúvida se essa secessão persistiria no epitélio adulto levou-os a verificar o processo de estratificação no período pós-natal. Nesse estado, o rastreamento dos genes *Shh* e *Krt5* apontou o estrato intermediário como origem das células superficiais (Shh^- $p63^-$ $Foxa2^-$ Upk^+ $K5^-$) e novamente afastou uma relação hierárquica demonstrável entre estas e as células basais.

A mesma percepção pôde ser contemplada em um estudo de carcinogênese urotelial⁴⁵. Nele, a indução de neoplasias no urotélio vesical de camundongos, cujos genes *Krt5* e *Upk2* possuíam repórteres, permitiu relacionar a origem de carcinomas *in situ* e invasivos às células $K5$, enquanto tumores papilares às intermediárias. Assim, o conjunto de evidências disponível aponta para uma segregação entre as linhagens basal e intermediária no urotélio. Embora a função das últimas seja gerar as células superficiais, o propósito das células $K5$ permanece desconhecido.

7.2. MÚSCULO LISO

No seu estado diferenciado, o músculo liso é uma célula especializada na contração e regulação do tônus da parede de diversos órgãos. Apesar de o efetor final da sua contratilidade - a interação actina-miosina com hidrólise de ATP - e o seu respectivo sistema de ativação - fosforilação da serina na posição 19 da cadeia leve regulatória da miosina pela sua cinase ativada pelo complexo cálcio-calmodulina - não lhe serem exclusivos, o conjunto

de proteínas contráteis, canais iônicos e moléculas de sinalização por ele expressos lhe conferem atributos únicos⁴⁶.

Desde a primeira descrição do seu cultivo há um século, ele se tornou um dos tipos celulares mais extensivamente escrutinizados pela ciência⁴⁷. Vários aspectos de sua biologia são fascinantes, como a capacidade de autorregular o padrão de contração e a sensibilidade ao cálcio, além de gerar tanta força por área seccional quanto o músculo esquelético, mesmo possuindo um quinto do conteúdo de miosina deste^{46,48-53}. Contudo, o corpo de evidências reunido nos últimos 50 anos sugere que a sua face mais surpreendente é uma habilidade singular para modificar o seu fenótipo quando exposto a diferentes condições ambientais⁵⁴.

O conceito de modulação fenotípica surgiu a partir da observação sistemática de suas culturas primárias *in vitro*. Nelas, identificou-se a conversão de células contráteis, representativas do músculo diferenciado, em análogas ao músculo imaturo, um fenótipo denominado sintético⁴⁷. No período de uma semana pós-isolamento, pesquisadores narravam a transição de um tipo celular caracterizado por citoplasma repleto de miofilamentos e poucas organelas deslocadas para regiões justanucleares ou periféricas em outro que exibia aumento da razão nucleocitoplasmática, paucidade de filamentos contráteis e incremento no número de organelas - sobretudo retículo endoplasmático rugoso, ribossomas livres, mitocôndrias e complexo de Golgi.

Tal fenômeno ocorria independentemente do método de isolamento ou origem anatômica e as alterações morfológicas eram correlacionáveis a mudanças no comportamento celular. Enquanto o estado diferenciado era descrito como quiescente, o sintético mostrava grande capacidade de proliferação, migração e síntese. Com o tempo, as semelhanças entre o estado sintético e o músculo liso embrionário induziram a proposição que o mesmo processo de modulação seria a causa do conjunto de doenças degenerativas mais prevalente na humanidade. Proposições à parte, os pontos de sua biologia mais significativos para o debate sobre os resultados deste trabalho serão apresentados abaixo.

Marcadores do músculo liso

Validar a identificação celular é uma tarefa das mais complexas para a maioria dos estudos que envolvem o músculo liso. Embora exista um repertório considerável de marcadores seletivos ou restritos ao tecido maduro, como norma, as suas fiabilidades para distinguir o estado de diferenciação são maiores que para confirmar a linhagem muscular lisa. De facto, interpretações equivocadas provêm do desconhecimento que virtualmente todos eles também podem ser expressos por outros tipos celulares, ao menos de forma transitória, durante o desenvolvimento embrionário ou em resposta a processos fisiopatológicos⁵⁴.

Tradicionalmente, considera-se que os marcadores mais seletivos correspondem aos genes e proteínas responsáveis pela função contrátil (*e.g.*, α e γ -actinas do músculo liso, cadeias pesadas e leves da miosina do músculo liso, h1-calponina e α -tropomiosina) ou importantes para a formação do citoesqueleto e regulação da contração (*e.g.*, SM22 α , telokina, h-caldesmon, β -vinculina, smoothelina e desmina)⁵⁵. Devido às diferenças de seletividade entre eles, uma revisão de suas características é necessária para reconhecer as consequências que cada escolha acarreta às conclusões de um estudo.

Dentre as proteínas contráteis restritas às células musculares lisas, as mais abundantes pertencem a duas isoformas de actina tecido-específicas, denominadas α e γ -actinas do músculo liso^{† 56,57}. Conquanto suas configurações compartilhem grande homologia, a distribuição tecidual e a origem genética de cada uma são distintas^{56,58}. A α -actina do músculo liso é o primeiro gene seletivo a ser transcrito durante o processo de diferenciação e, em circunstâncias normais, possui uma ótima correlação com o tecido muscular liso^{59,60}.

[†] Doravante, as denominações α e γ -actina corresponderão às formas do músculo liso.

Contudo, mesmo sendo o marcador mais utilizado para a caracterização dessa linhagem, a sua detecção não é suficiente para ratificá-la de forma definitiva^{54,61}. Pesquisas demonstraram que outras células com capacidade contrátil - como pericitos⁶², células mioepiteliais⁶³ e miofibroblastos⁶⁴ - habitualmente não expressam α -actina como parte do seu aparato miofilamentar. Além disso, constatou-se que ela também é expressa transitoriamente pelos músculos esquelético e cardíaco durante o desenvolvimento embrionário; por cardiomiócitos e células endoteliais em situações patológicas; e por algumas neoplasias^{‡ 54,57,61}.

Em contraste, o advento da γ -actina do músculo liso ocorre em fases mais avançadas do processo de maturação e, diferentemente da α -actina, não é expressa pelos mioblastos esquelético e cardíaco⁶⁵. Sua seletividade é alta, pois, com exceção de espermatozoides pós-meióticos, não existem relatos convincentes de sua presença em outras células adultas⁶⁶. No entanto, a distribuição heterogênea dessa proteína constitui a principal limitação do seu uso como marcador. Enquanto se verifica elevada expressão no músculo liso do sistema digestório, ela é pequena no vascular e respiratório^{57,58}. Entre os órgãos genitourinários, há relatos de alto conteúdo na bexiga e ducto deferente, mas baixo no ureter proximal e útero não-gravídico⁶⁵.

Do mesmo modo que a γ -actina, há dois marcadores cujo conteúdo é nitidamente circunscrito a grupos de células musculares lisas. O primeiro, denominado telokina, consiste em um peptídeo idêntico à região carboxi terminal da cinase da cadeia leve da miosina e atua no processo de dessensibilização ao cálcio. É considerado um marcador específico para o músculo liso visceral, mas praticamente não é expresso no vascular⁶⁷. Similarmente, a desmina representa um importante filamento intermediário dos tecidos musculares, mas é pouco expressa na camada média dos grandes vasos^{46,68}.

Duas outras proteínas que compartilham homologia parcial, a h1-calponina e o SM22 α (ou transgelina), ocorrem em todos os tecidos musculares lisos dos vertebrados, onde

‡ Sobretudo o rabdomiossarcoma.

atuam como inibidores da contratilidade^{69,70}. O SM22 α é um marcador precoce da diferenciação muscular lisa e possui um padrão de expressão semelhante à α -actina⁷¹⁻⁷³. Comparativamente, a h1-calponina é uma proteína de apresentação um pouco mais tardia e restrita^{74,75}. Durante a ontogenia, descreveu-se sua presença transitória apenas em cardiomiócitos embrionários⁷⁰. Já nos tecidos adultos, há relatos que miofibroblastos e algumas linhagens de células neoplásicas também são capazes de expressá-la^{54,70}.

No que se refere à maturação do músculo liso, quatro marcadores assinalam o estágio final da diferenciação contrátil. Três deles, h-caldesmon, β -vinculina e α -tropomiosina, são isoformas produzidas por *splicing* alternativo⁵⁴. Embora sejam representantes restritos às células maduras, eles são rapidamente convertidos em seus correspondentes ubíquos caso haja um processo de modulação fenotípica^{76,77}. Por sua vez, a smoothelina, um componente do citoesqueleto aparentemente confinado ao músculo liso diferenciado, pode ser expressa como dois isotranscritos principais⁷⁸⁻⁸⁰. Gerados via promotores alternativos, eles se correlacionam com o modo contrátil exibido pela célula muscular lisa. O isotipo A predomina nas células com padrão de contração fásico, enquanto o B naquelas com padrão tônico⁸¹.

Finalmente, a maior parte dos pesquisadores considera a cadeia pesada da miosina do músculo liso o marcador mais específico para o tecido muscular liso descrito até o momento^{55,82}. Mesmo que ainda haja um debate sobre a exclusividade da sua expressão, o rastreamento do seu gene do período embrionário até o pós-natal em camundongos transgênicos mostrou completa especificidade à linhagem muscular lisa, com exceção de uma pequena população de células no átrio direito durante a fase inicial do desenvolvimento cardíaco^{§ 54,83}.

Além das questões relativas à especificidade, a acurácia dos marcadores é igualmente comprometida no reconhecimento de células musculares lisas que sofreram modulação fenotípica. Em resposta a lesões, doenças ou cultivo tradicional, verifica-se redução geral,

[§] Supõe-se que ela possa corresponder à origem das artérias coronárias.

mas não uniforme, na expressão de seus genes seletivos. Mesmo que haja variabilidade nas descrições dos fenótipos, quantidades consideráveis de α -actina, SM22 α e h1-calponina ainda podem ser detectadas por períodos relativamente longos após o início do processo. Em oposição, smoothelina, cadeia pesada da miosina e variantes proteicas restritas por *splicing* alternativo são rapidamente suprimidas^{80,83}.

Assim, a identificação celular torna-se um desafio formidável nessas situações, já que os marcadores mais resistentes ao silenciamento não comprovam de modo inequívoco a linhagem muscular lisa e a ausência dos mais específicos também não a descarta completamente. Na tentativa de encontrar uma solução para esse dilema, estudos mais recentes compararam o transcriptoma da camada muscular lisa de alguns órgãos com o pertencente a tecidos circunjacentes. Houve relatos de 50 a 86 genes candidatos a marcadores, entre eles canais iônicos e transportadores, porém constatou-se que os mais específicos continuam sendo os tradicionalmente usados^{84,85}.

Ante os factos expostos, vários autores preferem ratificar a identidade do músculo liso com a utilização de um conjunto de marcadores. Os critérios para escolha da combinação dependem da questão a ser pesquisada, mais especificamente, se há interesse em rastrear a maturação ou provar a origem das células em análise. Com essa abordagem, o risco de interpretações equivocadas é reduzido, embora não seja possível abolir a incerteza inferencial em todas as circunstâncias.

Recentemente, a caracterização de alterações epigenéticas incorporadas a histonas abriu uma nova perspectiva na busca de um marcador definitivo para este tipo celular. Ao analisar células musculares lisas vasculares, pesquisadores constataram que modificações nas histonas de seus genes seletivos adquiridas durante a diferenciação, notadamente nos genes α -actina (*ACTA2*) e cadeia pesada da miosina (*MYH11*), não encontravam correlação em outros tipos celulares - incluindo fibroblastos, endotélio e células-tronco⁸⁶. Enquanto as primeiras eram relacionadas ao relaxamento da cromatina e ativação gênica - como

dimetilação na quarta lisina da histona 3 (H3K4), e acetilações H3 e H4 -, as últimas - representadas por dimetilação H3K27 e H4K20 - prediziam os seus silenciamentos.

De modo inusitado, a indução do processo de modulação fenotípica *in vitro* resultou no desaparecimento das modificações facilitadoras da transcrição nos referidos genes, com exceção da dimetilação H3K4, a qual permaneceu estável e restrita ao músculo liso. Conquanto a explicação seja conjectural, admite-se que esta “memória de linhagem” permitiria às células musculares lisas reativar o seu fenótipo contrátil após a cessão do estímulo proliferativo. Posteriormente, um modelo de aterosclerose *in vivo* confirmou a persistência da dimetilação H3K4 no locus do gene *Myh11* após a supressão da sua expressão, facto que validaria a utilidade de tal combinação na identificação do músculo liso modulado⁸⁷. Todavia, a sua estabilidade em outras situações ainda não está determinada.

Mecanismos de diferenciação

A despeito da significativa evolução do conhecimento, os processos que induzem e mantêm o estado diferenciado do músculo liso são o componente mais enigmático da sua biologia. Uma das questões mais intrigantes é explicar como um tipo celular maduro consegue exibir comportamentos de células sem diferenciação terminal⁵⁴. Com efeito, a visão tradicional de células eminentemente contráteis - com diferenciação estável, pequena capacidade de proliferação e síntese -, há muito tempo é desafiada por observações que descrevem vários fenótipos alternativos a elas atribuídos.

Dados obtidos de culturas *in vitro*^{47,88}, modelos animais⁸⁹⁻⁹² e doenças associadas a alterações na camada muscular de órgãos - como obstrução infravesical⁹⁰, hipertensão arterial^{93,94}, aterosclerose⁹⁵, asma⁹⁶ e divertículos intestinais⁹⁷ - sugerem que as células musculares lisas adultas são capazes de mudanças profundas e, geralmente, reversíveis no seu fenótipo em resposta a sinais ambientais⁵⁴. As referências vão desde trocas entre os padrões de contração fásico e tônico até a redução na expressão de genes marcadores,

aumento da proliferação, migração, síntese de componentes da matriz extracelular e atividade imunológica^{48,55}.

Pesquisas indicam que a chave para a compreensão dessa capacidade está nas regiões reguladoras dos genes que determinam a diferenciação muscular lisa. Experimentos de mutagênese sítio-específicas em camundongos transgênicos demonstraram que a expressão de praticamente todos eles é subordinada à ligação do fator de transcrição SRF (*serum response factor*) a elementos CArG (*i.e.*, sequências CC(AT)₆GG) localizados nas suas regiões promotoras ou intrônicas^{54,72,98,99}.

Descobriu-se que o SRF liga-se ao elemento CArG como um dímero, mas a seletividade da ligação depende do recrutamento de cofatores¹⁰⁰. De maneira resumida, duas classes modulam a expressão dos genes controlados por esse sistema transcricional¹⁰⁰. A primeira, representada por membros da família ETS (*e.g.*, ELK-1 e ELK-4/SAP-1), ocorre ubiquamente e leva à ativação de genes responsivos a fatores de crescimento (*e.g.*, *c-fos* e *Egr-1*)¹⁰⁰⁻¹⁰². Por outro lado, há cofatores tecido-específicos, como miocardina e MRTF (*myocardin-related transcription factor*), os quais possuem um forte efeito coativador sobre aqueles relacionados com a diferenciação celular^{100,103}.

Seguindo esse raciocínio, o tipo de cofator determinaria a atuação do SRF na proliferação ou na maturação celular¹⁰⁴. Realmente, comprovou-se que a formação do complexo miocardina-SRF é essencial para a diferenciação do músculo liso^{67,105,106}. Mutações homozigotas que levam à perda da sua expressão foram relacionadas com uma marcada diminuição no número de células musculares lisas maduras em modelos murinos embrionários¹⁰⁷. Ademais, o aumento da atividade de cofatores que competem pelo sítio de ligação do SRF, como o ELK-1 e o inibidor transcricional HERP1, claramente resulta na supressão dos genes seletivos ao músculo liso^{101,102,108}.

Entretanto, a ação isolada de cofatores não explica a grande diferença de estabilidade entre os programas de expressão gênica controlados pelo sistema CArG-SRF no músculo liso e em outros tecidos. Investigações subsequentes propuseram um modelo no qual a

modulação fenotípica observada não depende de um único fator, mas é o resultado de uma combinação singular de mecanismos múltiplos de controle transcricional^{55,109}. Ele afirma que a maior suscetibilidade a sinais ambientais decorre de elementos CARG peculiares, associados a um conjunto adicional de reguladores de transcrição⁵⁵.

Ao contrário do gene típico regulado por SRF, cuja região promotora contém apenas um elemento CARG, os genes seletivos ao músculo liso necessitam da ativação de dois ou mais deles para serem transcritos^{55,72,98,99}. A adaptação a essa forma de regulação seriada torna-se evidente com a demonstração de que a manipulação do número de elementos ou do espaçamento entre eles reduz a expressão do gene alterado¹⁰⁹. Adicionalmente, a existência de sequências de bases exclusivas nos flancos do elemento CARG dos genes marcadores do músculo liso esclarece porque o complexo SRF-miocardina é capaz de ativar eficazmente a região promotora da telokina, a única exceção ao padrão de múltiplos elementos, mas não os genes ubíquos regulados pelo SRF⁶⁷.

Além do maior número de elementos, a clonagem do gene da α -actina mostrou que suas sequências CARG na região promotora abrigam uma curiosa mutação que é altamente conservada entre as espécies. Constatou-se que há a substituição de uma única base na região central, rica em A/T, por C ou G⁸⁴. Tal modificação provoca uma grande redução na afinidade ao SRF e torna a transcrição do gene mais dependente da presença de cofatores¹¹⁰. Com efeito, a troca das referidas bases C/G por A/T impediu a redução habitual na expressão de α -actina durante o reparo de lesões vasculares¹¹⁰.

Embora haja evidências suficientes para considerar o sistema CARG-SRF como crítico para a transcrição dos genes marcadores do músculo liso, estudos demonstraram que processo de diferenciação sofre a influência de outros agentes reguladores⁵⁴. Nas regiões promotoras de alguns deles, como α -actina, SM22 α e cadeia pesada da miosina, foram descritos dois elementos regulatórios adicionais: a sequência C(A/C)GT(T/G)GG(T/G)GA, denominada TCE (*i.e., TGF- β control element*) e o E-box (*i.e.,* sequência CANNTG). Descobriu-se que eles são, respectivamente, os sítios de ligação de proteínas da família KLF

(*Kruppel-like transcription factors*) e bHLH (*basic helix-loop-helix*)^{111,112}. Devido à variabilidade de ligantes, suas ações podem ser sinérgicas ou inibitórias à ativação do CArG^{111,112}.

Não obstante à existência de mecanismos reguladores nas regiões promotoras, a ação pós-transcricional de microRNAs também exerce ingerência sobre a diferenciação leiomiogênica¹¹³. Ao estudar o processo de maturação cardiovascular em um modelo murino, pesquisadores observaram que o incremento seletivo de dois microRNAs, denominados miR143 e miR145, precedia o aparecimento de proteínas contráteis nas células precursoras do músculo liso¹¹⁴. Descobriu-se que as suas supressões não inibem completamente a diferenciação, mas são associadas com redução da espessura e do tônus da camada muscular.

7.3. ENGENHARIA DE TECIDOS URINÁRIOS

Por muitos anos, o uso de tecidos autólogos e materiais processados representaram as únicas opções de reconstrução para as perdas teciduais dos órgãos uroteliais¹¹⁵. Embora eles ofereçam a possibilidade de refazer a estrutura do órgão, seu emprego geralmente resulta em complicações decorrentes da falta de funcionalidade, contração do enxerto ou reações de corpo estranho³. A dificuldade para substituir os tecidos uroteliais explica porque o implante de segmentos intestinais vascularizados permanece como sua técnica de reconstrução padrão, mesmo que o contato da mucosa intestinal com a urina implique morbidade ao indivíduo¹¹⁶.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de neotecidos em laboratório abriu uma nova perspectiva para o tratamento desse tipo de lesão^{117,118}. A ideia de reconstruir os órgãos danificados via implante de um substituto vivo, funcional e livre de reações de rejeição, inegavelmente revolucionaria o manejo de várias situações atualmente tratadas de modo

paliativo. No entanto, a melhor maneira para realizá-la ainda não está totalmente validada pela ciência. Com efeito, uma metanálise de estudos pré-clínicos confirmou a eficácia da engenharia de tecidos na restauração da capacidade vesical em várias espécies de animais, porém não conseguiu identificar uma diferença significativa entre os constructos celulares e acelulares nesse quesito¹¹⁹.

Evidências de que a escolha da população-alvo pode influenciar nos resultados do estudo justificam cautela ao se considerar confiável o desfecho alcançado em determinados modelos animais. Experimentos de reconstrução pós cistectomia subtotal em ratos demonstraram a alta capacidade regenerativa de suas bexigas, as quais recuperavam o volume inicial mesmo sem qualquer implante¹²⁰. Nesse aspecto, pesquisas com espécies de maior porte, como cães e porcos, parecem oferecer um modelo mais preditivo do efeito reparador gerado por neotecidos no organismo humano¹¹⁹. Mesmo assim, a extrapolação de resultados obtidos em animais saudáveis para situações clínicas também é questionável, pois podem superestimar a eficiência do reparo em um órgão doente¹²¹.

Ressalvas apresentadas, há indícios de que a estratégia de produção do neotecido *ex vivo* traz vantagens para a regeneração do órgão danificado. Ao compararem três métodos de reconstrução em cães submetidos à cistectomia subtotal, pesquisadores relataram diferenças marcantes na função e estrutura das bexigas entre os diferentes grupos experimentais¹²². Onze meses após a cirurgia, a capacidade vesical, complacência e características histológicas foram consideradas normais no grupo tratado com o implante de uma neobexiga formada por células uroteliais e musculares lisas autólogas. Em contraste, houve perda significativa de função e alterações morfológicas naquelas submetidas a fechamento primário ou reconstrução com matriz polimérica acelular.

A experiência bem-sucedida com cães serviu de estímulo para estender o mesmo modelo de reconstrução a seres humanos. Estudos fase I envolvendo indivíduos com lesões complexas de uretra ou necessidade de cistoplastia mostraram que o reparo de órgãos urinários com neotecidos é uma tarefa viável, embora o seu real benefício ainda não esteja

determinado. Dentre eles, o relato de cinco casos submetidos a uretroplastia posterior via implante de matrizes tubularizadas semeadas com células uroteliais e musculares lisas constitui o melhor exemplo publicado do potencial reparador da engenharia tecidual⁷. Após seguimentos de 36 a 76 meses, aferiu-se que todos os pacientes apresentavam completa resolução dos defeitos uretrais e as biópsias do segmento substituído exibiam características histológicas normais.

O primeiro estudo piloto de ampliação vesical com neotecidos incluiu sete pacientes pediátricos portadores de complicações urinárias decorrentes de meningocele⁶. Em resumo, não houve relato de complicações pós-operatórias importantes e, após um seguimento médio de 46 meses, a inspeção cistoscópica e características histológicas sugeriam a regeneração de todas as camadas da bexiga. Contudo, a melhora dos parâmetros urodinâmicos ocorreu somente nos casos em que o implante foi envolto por omento.

Os resultados promissores encorajaram a execução de um estudo fase II com o objetivo de avaliar a eficácia dessa abordagem como alternativa terapêutica¹²³. De maneira inusitada, a mesma técnica de reconstrução utilizada em uma população com atributos semelhantes falhou em proporcionar qualquer benefício à capacidade ou complacência vesicais. Ao contrário, houve a descrição de complicações graves, como ruptura da bexiga, obstrução intestinal e abscesso pélvico. As razões para tamanha discrepância ainda são desconhecidas, embora questões sobre a composição da matriz, o grau de maturação dos neotecidos antes do implante e a redução na capacidade regenerativa de órgãos doentes possam estar relacionadas aos desfechos.

8. OBJETIVOS

8.1. GERAL

- Descrever as variações na diferenciação celular do músculo liso e urotélio durante o processo de engenharia de tecidos do sistema urinário

8.2. ESPECÍFICOS

- Rastrear mudanças de fenótipo durante a expansão celular *in vitro*
- Validar um método de produção de tecidos do sistema urinário *ex vivo*
- Avaliar as características dos neotecidos formados

PARTE I

Isolamento e expansão

9. METODOLOGIA

9.1. DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM

Este é um estudo planejado para avaliar a influência do processo de cultivo *in vitro* sobre a diferenciação de células humanas provenientes de tecidos urinários. Nele, duas coortes, constituídas por culturas primárias de urotélio e músculo liso, foram analisadas das passagens 0 (P0) a 3 (P3). Investigou-se os fenótipos predominantes em cada cultura, os seus padrões de proliferação e o desaparecimento de determinados tipos celulares. Adicionalmente, estudou-se a plasticidade das células musculares lisas e das células-tronco mesenquimais derivadas da camada adiposa do sistema urinário.

A população disponível para o estudo continha indivíduos submetidos à nefrectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Utilizou-se a técnica de amostragem por conveniência. Adotou-se como critério de seleção a possibilidade de coletar um segmento de ureter do rim excisado. Para serem elegíveis, os ureteres não deveriam apresentar processos patológicos, à exceção de obstrução benigna. Além disso, não poderia haver infecção urinária ativa no momento da cirurgia, neoplasia maligna metastática e histórico de tratamento com imunossupressores (exceto corticosteroides), quimioterapia ou radioterapia abdominal.

De acordo com as diretrizes internacionais de boa prática, o estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os participantes receberam a garantia de sigilo em relação às informações pessoais obtidas e o uso do material coletado foi absolutamente restrito para o fim de pesquisa científica.

9.2. CULTURA CELULAR

Isolamento dos tipos celulares

Os segmentos de ureter coletados haviam um comprimento médio entre 2 cm e 4 cm. No bloco cirúrgico, eles foram dissecados de maneira asséptica para a remoção de áreas danificadas durante a nefrectomia. A seguir, os espécimes foram colocados em meio de transporte - DMEM suplementado com antibiótico 1% (penicilina G + kanamicina) (v:v) e anfotericina B 0,25% (v:v) - e conservados a 5°C. O seu processamento ocorreu entre 2 h e 48 h após a coleta.

No laboratório, eles foram submetidos a um pré-tratamento com uma mistura de tampão de Hank e colagenase tipo I (0,8 mg/mL) por 12 horas a 5°C. Em seguida, procedeu-se a uma minuciosa dissecação a fim de separar completamente a camada adventícia da muscular própria. Logo após, pequenas fatias de tecido muscular foram cuidadosamente extraídas da mucosa ureteral e esta foi imersa em uma solução removedora de epitélio - EDTA 0,2% (m:v) - por 4 h a 5°C.

A adventícia e tecido adiposo periureteral foram a fonte das células-tronco mesenquimais utilizadas neste estudo. Esses tecidos foram cortados em pequenos pedaços e submetidos à digestão enzimática em uma mistura de tampão de Hank e colagenase tipo I (1 mg/mL) por 30 minutos a 37°C. Após esse período, a dispersão foi centrifugada e o precipitado resultante foi suspenso em meio de cultura DMEM (*low glucose*) suplementado com soro fetal bovino 10% e antibiótico 1% (v:v). No final, procedeu-se a semeadura em garrafas de cultivo celular.

O procedimento para o isolamento das células musculares lisas consistiu na colocação das fatias de tecido muscular em uma mistura de tampão de Hank com colagenases tipo I (1,5 mg/mL) e tipo IV (0,2 mg/mL). Essa mistura permaneceu em regime de agitação por 2 h a

37°C. Após esta etapa, a dispersão foi centrifugada e o precipitado de células foi suspenso em meio de cultura F12 suplementado com soro fetal bovino 5% (v:v) e antibiótico 1% (v:v). Procedeu-se a semeadura em garrafas próprias para o cultivo celular.

O isolamento do urotélio se baseou em seu descolamento mecânico do estroma associado à desagregação dos aglomerados epiteliais em uma mistura de Tampão de Hank e colagenase tipo IV (0,6 mg/mL) por 20 minutos a 37°C. O precipitado celular resultante do processo de centrifugação foi, então, suspenso em meio de cultura para queratinócitos suplementado com fator de crescimento epitelial, extrato de pituitária bovina e antibiótico 1% (v:v) e semeado em garrafas de cultivo.

Desenvolvimento das culturas

O cultivo de todos os tipos celulares ocorreu em estufa com atmosfera controlada: CO₂ 5%, temperatura 37°C e umidade relativa 95%. Determinou-se a frequência de troca dos respectivos meios de cultura em intervalos de dois dias. A cada troca, as células eram examinadas via microscópio óptico para avaliar o grau de expansão das culturas e a possibilidade de contaminação por micro-organismos. Estabeleciam-se subculturas quando a cultura precedente atingia uma confluência superior a 70%. No processo de passagem, utilizava-se o método de tripsina e EDTA para o descolamento das células. Durante a divisão das subculturas, metade da população era destinada a ensaios.

9.3. IMUNOCITOQUÍMICA

Amostras das populações dos tipos celulares estudados foram cultivadas sobre lamínulas com área de 1,76 cm², com o intuito de pesquisar os fenótipos de diferenciação, padrões de proliferação e morte celular. Estabeleceu-se que a amostragem seria seriada.

Para as células uroteliais e musculares lisas, ela ocorreu após o isolamento - como representante de P0 - e durante a divisão das subculturas, de P1 a P3. As células-tronco mesenquimais foram avaliadas apenas em P3. A densidade adotada para semeadura foi de, aproximadamente, $9,1 \cdot 10^3$ células.cm⁻². As condições de cultivo de cada amostra foram idênticas as da respectiva população alvo.

O procedimento de preparação das lâminas citológicas se baseou em um protocolo que incluía a fixação das células com formaldeído 4% (v:v) tamponado, seguido de permeabilização com Triton X 0,4% (v:v) e bloqueio com uma mistura de albumina 1% (m:v) e leite em pó desnatado 2% (m:v). A seguir, procedeu-se a incubação com anticorpos primários. Em todas as etapas, utilizou-se tampão fosfato 4% (m:v) como solvente.

O fenótipo das células uroteliais foi investigado com os anticorpos monoclonais antiqueratina 5 (K5), 7 (K7) e 20 (K20). Por outro lado, a análise das células-tronco mesenquimais e musculares lisas consistiu na sua marcação com anticorpos primários monoclonais antivimentina, antialfa-actina do músculo liso (α -actina)** e anticadeia pesada da miosina do músculo liso (miosina-HC)††.

Com exceção à análise da vimentina, cujo anticorpo primário já possuía o fluoróforo Alexa Fluor® 594 incorporado, optou-se pela fluorescência indireta como método de detecção. Os anticorpos secundários eram ligados aos fluoróforos Alexa Fluor® 488 ou 660. Utilizou-se o corante de DNA Hoechst 33342® como marcador de núcleo celular. Padronizou-se a diluição dos anticorpos em 1:300 (v:v), exceto para vimentina, cuja diluição foi 1:200 (v:v).

As fotomicrografias foram obtidas nos microscópios confocais Olympus® FV1000 e Leica® SP5. Utilizou-se o modo sequencial de excitação e ajustou-se o espectro de detecção para que o sinal registrado fosse exclusivo a cada fluoróforo. A padronização dos anticorpos ocorreu em cortes histológicos de ureter normal, considerados como controles positivos. Adotou-se como controle negativo a citologia não incubada com anticorpos primários. A

** Smooth muscle α -actin

†† Smooth muscle myosin heavy chain

descrição completa das especificações dos anticorpos encontra-se listada na tabela suplementar S1.

9.4. CITOMETRIA DE FLUXO

O estudo das culturas via citômetro de fluxo teve o objetivo de investigar os seus perfis populacionais de diferenciação e proliferação *in vitro*. O método de preparação das amostras consistiu na sua fixação com paraformaldeído 4% (v:v), sucedido por uma etapa de permeabilização e bloqueio com uma mistura de Triton X 0,2% (v:v) e albumina 2% (m:v). Durante todo o processo, as células permaneceram dispersas em tampão fosfato 4% (m:v).

O fenótipo das células uroteliais foi testado com os anticorpos primários monoclonais K5, K7 e K20 e das células musculares lisas com anti α -actina, antimiosina-HC e antivimentina. Determinou-se que a diluição dos anticorpos seria de 1:80 (v:v). O tempo mínimo de incubação foi de 1 hora a 5°C. O anticorpo secundário escolhido estava ligado ao fluoróforo Alexa Fluor® 488. Nos casos onde houve segunda marcação, utilizou-se o fluoróforo Alexa Fluor® 647 ou 660. Amostras incubadas apenas com os anticorpos secundários serviram como controles negativos.

As células foram examinadas no citômetro de fluxo FACS Aria III® (BD Biosciences). Os lasers de excitação tinham os comprimentos de onda 488 nm e 633 nm. Os fotodetectores selecionados cobriam os intervalos de 533 \pm 30 nm e 660 \pm 20 nm. Procedimentos de compensação não foram necessários, já que os espectros das combinações de fluoróforos não apresentam sobreposição. Estabeleceu-se a contagem mínima de 1.10⁴ eventos como representativa da população epitelial e 5.10³ eventos da muscular lisa. Utilizaram-se os *softwares* FACS Diva® (BD Biosciences) e FlowJo® X (Tree Star, Inc.) para analisar os resultados.

Perfil imunofenotípico

Procedeu-se a caracterização imunofenotípica das subculturas de células-tronco mesenquimais e musculares lisas derivadas dos mesmos ureteres na passagem 3. As amostras foram mantidas em uma mistura de tampão fosfato 4% (m:v) com albumina 1% (m:v) e incubadas com uma combinação de anticorpos monoclonais ligados a fluoróforos por 1 hora. Alíquotas incubadas com anticorpos isotípicos serviram como controles negativos. Células mortas, as quais apresentavam positividade para 7-aminoactinomicina D, foram excluídas da análise.

A coleta de dados ocorreu no citômetro de fluxo FACS Aria III® (BD Biosciences). Os fotodetectores compreendiam os intervalos de 533 ± 30 nm, 585 ± 42 nm e 660 ± 20 nm. Utilizaram-se procedimentos de compensação para excluir as regiões de sobreposição espectral entre fluoróforos. Adotou-se a contagem de 1.10^4 eventos como representativa da população.

9.5. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A capacidade de proliferação das culturas foi mensurada pelo teste de síntese ativa de DNA com 5-etinil 2'-desoxiuridina (EdU) (Thermo Scientific). Este nucleosídeo é incorporado ao DNA como um análogo da desoxitimidina durante a fase S do ciclo celular. A marcação se baseia na reação química entre o nucleosídeo e um fluoróforo, o qual torna fluorescente o núcleo das células em processo de divisão.

As amostras das culturas foram expostas à concentração de 10 µg/mL de desoxiuridina pelo período de 8 horas. A avaliação pós-isolamento ocorreu em 24 horas para o urotélio e para o músculo liso. Entre P1 e P3, ela acontecia quando as subculturas atingiam 50% a 60% de confluência. O estudo das células-tronco ocorreu em P3, com a mesma metodologia.

O protocolo da reação de detecção seguiu as instruções do fabricante¹²⁴ e o fluoróforo escolhido foi Alexa Fluor® 647. Essencialmente, a ligação do fluoróforo ocorre no grupamento etinil e a reação é catalisada por CuSO₄. O teste das células uroteliais envolveu a marcação conjunta para K5, K7 ou K20. No músculo liso e células-tronco mesenquimais, ele foi associado à α -actina, miosina-HC ou vimentina. O anticorpo secundário era ligado à molécula de Alexa Fluor® 488. Os dados foram coletados via citometria de fluxo e imunocitoquímica.

9.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR

A ocorrência de morte celular programada em determinados fenótipos foi avaliada com o ensaio da desoxinucleotidil transferase terminal (TUNEL) (Thermo Scientific). Essa enzima incorpora nucleotídeos trifosfato de 2'-desoxiuridina modificados a sítios 3' terminais do DNA nuclear fragmentado, presentes no processo de apoptose. Por meio de uma reação química específica, promove-se a ligação de um fluoróforo à desoxiuridina modificada, o qual permite a identificação do evento.

Amostras das culturas do urotélio e músculo liso, mantidas nas mesmas condições das respectivas populações alvo, foram analisadas por imunocitoquímica no quarto dia após a semeadura. O protocolo da reação de detecção seguiu as instruções do fabricante¹²⁵ e o fluoróforo escolhido foi Alexa Fluor® 488. Realizou-se a marcação conjunta com K5 e K20 no exame das células epiteliais e miosina-HC na avaliação das células musculares lisas. Os anticorpos secundários eram ligados à molécula Alexa Fluor® 660.

9.7. RT-qPCR

A quantificação da expressão do gene humano da queratina 5 (*KRT5*) ocorreu via reação em cadeia da polimerase em tempo real por transcrição reversa (RT-qPCR). Imediatamente após a remoção do meio de cultivo, instilou-se 1 mL do reagente TRIzol® (Thermo Fisher Scientific) para extrair o RNA de culturas uroteliais situadas em poços com superfície de, aproximadamente, 8 cm². A separação da fase contendo o RNA ocorreu pela adição de 0,2 mL de clorofórmio à mistura, sucedida por centrifugação a 4°C.

Os procedimentos de isolamento seguiram um protocolo já publicado¹²⁶. Em resumo, o RNA foi precipitado em isopropanol, lavado em etanol 75% gelado, purificado pelo processo Illustra® RNA isolation kit (GE Healthcare Life Sciences)¹²⁷, redissolvido em água livre de RNase e estocado a -80°C. O RNA total resultante foi quantificado com um espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific) e a sua pureza verificada pela razão de absorbâncias 260 nm e 280 nm. Consideraram-se aceitáveis as amostras cujas razões A_{260}/A_{280} foram superiores a 1,8.

Procedeu-se a síntese de cDNA via transcrição reversa de 0,5 µg de RNA total. A cada amostra foram adicionados dNTPmix 1 µL e OligodT 1 µL (SuperScript First Strand®, Thermo Fisher Scientific) e seguiu-se o processo de desnaturação a 65°C. Após esta etapa, acrescentaram-se à mistura tampão da reação 2 µL, MgCl₂ (25mM) 4 µL, DTT (0,1M) 2 µL, inibidor da RNase 1 µL e transcriptase reversa SuperScript III 1 µL (Thermo Fisher Scientific). A reação ocorreu por 50 min a 50°C. A seguir, ela foi inativada a 70°C e o RNA não transcrito foi destruído pela adição de RNase H (SuperScript First Strand®, Thermo Fisher Scientific). Armazenou-se o cDNA de cada amostra a -20°C.

O par de *primers* (*sense* e *antisense*) foi desenhado com o auxílio do software Primer-BLAST®¹²⁸ a partir do gene *KRT5* humano. A descrição das suas características e

especificidade está na figura suplementar S1. Utilizou-se o equipamento StepOne® plus (BD Biosciences) para processar a reação em cadeia da polimerase e o software StepOne® Software (v2.2.2) para a análise dos dados. Determinou-se que a regressão linear padrão seria gerada do *pool* de amostras diluído em série pelo denominador 5^n , sendo $0 \leq n \leq 3$.

A mistura de cada reação continha H₂O ultra pura 3,85 µL, SybrGreen® 6,25 µL (Thermo Fisher Scientific), Rox® (carboxil-rodamina) 1 µL, 0,2 µL de cada *primer* (*sense* e *antisense*) e 1 µL de cDNA diluído 1:5 (v:v). Adotou-se o gene da β2-microglobulina como normalizador. Ajustou-se a temperatura de *annealing* em 60°C para ambos os genes. Definiu-se o número total de ciclos em 40 e o ciclo limiar (C_t) no terceiro desvio-padrão acima da linha de base das curvas de amplificação. A amplitude da curva de dissociação (*melting*) variou de 56°C a 96°C e ajustou-se o padrão de incremento da temperatura em 0,5°C a cada 10 s. Todas as amostras foram amplificadas em duplicata.

9.8. ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO MESODÉRMICA

Investigou-se a plasticidade das células-tronco e musculares lisas originadas dos mesmos ureteres pelo ensaio de diferenciação em linhagens mesenquimais *in vitro*. Amostras de ambos os tipos celulares foram expandidas em poços individuais até atingirem, aproximadamente, 70% de confluência e, então, cultivadas com meios indutores de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica.

A fórmula do meio de diferenciação adipogênica consistiu em α-MEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v:v), dexametasona 1 mM, insulina 10 µg/mL, isobutilmetilxantina 0,5 mM e indometacina 5 µM. O meio de diferenciação osteogênica continha α-MEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v:v), dexametasona 0,1 mM, β-glicerofosfato 10 mM

e ácido ascórbico 200 mM. Para a diferenciação condrogênica, utilizou-se α -MEM acrescido de soro fetal bovino 10% (v:v), TGF- β 10 ng/mL e ácido ascórbico 200 mM. O período de indução variou entre 3 e 5 semanas.

Após a etapa de indução, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% (m:v) e cada diferenciação foi avaliada com colorações especiais. Verificou-se a formação de adipócitos com Oil Red O, matriz óssea com Alizarin Red e matriz cartilaginosa com Alcian Blue. Células mantidas em α -MEM suplementado com soro fetal bovino 10% (v:v) serviram como controles negativos.

9.9. ANÁLISE DE DADOS E DESFECHOS

Com o objetivo de determinar se o processo de expansão *in vitro* está associado com alterações na diferenciação celular, considerou-se como desfecho principal a mudança no perfil populacional das culturas ao longo das passagens. O critério usado para a separação das subpopulações foi a expressão de diferentes tipos de queratina, entre as células uroteliais, e α -actina e miosina-HC, entre as musculares lisas. Estabeleceu-se que as características pré-exposição seriam representadas pela proporção de cada subpopulação observada em cortes histológicos de ureteres normais que originaram três das culturas.

Os dados foram coletados via citometria de fluxo e imunocitoquímica. No exame pós-isolamento (P0) do urotélio, a verificação foi imunocitoquímica para os três fenótipos e via citometria de fluxo para K5 e K7. No caso do músculo liso, ela foi unicamente imunocitoquímica. A amostragem citológica consistiu na aquisição de uma imagem em cada quadrante da lamínula. Consideram-se como representativos os dados obtidos por citometria de fluxo, permanecendo a imunocitoquímica como teste ratificador.

Explorou-se a variabilidade temporal da população que expressava K5 com uma análise de subgrupo. Dividiram-se células uroteliais recém-isoladas em três poços de cultura para a obtenção de dados seriados referentes à expressão do gene *KRT5* no primeiro, quarto e sétimo dia de cultivo. As células alocadas nessa análise não geraram subculturas, portanto, a sua avaliação ocorreu apenas em P0. Estimou-se quantidade de genes transcritos em cada amostra pela equação da sua regressão linear padrão. O valor normalizado do gene *KRT5* foi calculado pela divisão da sua quantidade estimada pela correspondente ao gene β 2-microglobulina (*B2M*).

Os ensaios de proliferação e morte celulares foram avaliados como desfechos secundários. No caso da proliferação, a obtenção dos dados foi idêntica à adotada no estudo de diferenciação e os resultados foram descritos como a proporção entre o número de células a proliferar e o total de células examinadas. A amostragem do ensaio de TUNEL consistiu na aquisição de uma imagem em cada quadrante acrescida de outra no centro da lamínula. Os resultados representam a proporção entre o número de eventos e o total de células observadas. No caso específico do músculo liso, estimou-se as implicações de uma possível contaminação por células de tecidos periureterais sobre os resultados pela comparação do perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação mesodérmica de ambas as culturas.

Análise estatística

O número de ureteres coletados durante o período do estudo determinou o tamanho da amostra. Os dados das culturas que sofreram perda de seguimento foram considerados válidos até o momento da interrupção e censurados após. Realizou-se um estudo piloto, o qual envolveu 3 culturas de cada tipo celular, com o objetivo de padronizar os ensaios e testar a integração das células com matrizes temporárias. Esses dados não entraram na análise final.

A utilização de diferentes métodos de aferição e o número de observações desemparelhado ao longo da série temporal originaram dados com distribuição não-normal e heterocedasticidade. Assim, optou-se pelo uso de um modelo linear misto para analisar as mudanças no perfil de diferenciação celular ao longo das passagens. Nele, estabeleceu-se que os fatores passagem e fenótipo corresponderiam a efeitos fixos - variáveis independentes - e que a variabilidade interculturais seria um efeito aleatório - sem relação com a exposição. Além do efeito individual de cada variável independente, a suscetibilidade da mudança do perfil populacional à interação entre elas também foi verificada.

Os resultados dos ensaios de proliferação e expressão do gene *KRT5* foram apresentados como média aritmética simples e desvio padrão (DP). Aqueles referentes à imunofenotipagem e ensaio de diferenciação foram descritivos. No ensaio de morte celular, utilizou-se o teste χ^2 ou o teste exato de Fisher para a comparação entre a proporção de eventos ocorridos em cada fenótipo. Adotou-se o nível de significância estatística de $P < 0,05$.

10. RESULTADOS

10.1. CARACTERÍSTICAS DAS CULTURAS

Entre setembro de 2013 e julho de 2015, procedeu-se a coleta de 15 segmentos ureterais que preenchiam os critérios de seleção do estudo. As características dos pacientes estão impressas na tabela 1. Aproximadamente 25% dos espécimes apresentavam sinais de uropatia obstrutiva. Nesses casos, observou-se um maior rendimento no número de células isoladas quando comparado àquele de ureteres sem dilatação.

Tabela 1. Características dos indivíduos doadores de tecidos urinários

	Média	Mín-Máx
Sexo (%)		
Masculino	6 (40%)	
Feminino	9 (60%)	
Idade (anos)	48	(15-69)
Diagnóstico (%)		
Transplante renal		9 (60%)
Exclusão renal		5 (33%)
Carcinoma de céls renais		1 (7%)
Condição do ureter (%)		
Obstrução		4 (27%)

Ocorreram três perdas entre as culturas de urotélio e cinco entre as musculares lisas, a maior parte devido à contaminação por micro-organismos. Como as perdas foram precoces, não houve coleta de dados e elas foram excluídas da análise. Assim, efetivamente, os resultados descritos representam as observações de 7 culturas de músculo liso e 9 de células uroteliais. Houve quatro tentativas de isolamento de células-tronco derivadas de tecidos periureterais, das quais resultaram três culturas bem-sucedidas e uma excluída por falha na adesão. Os fluxogramas com as informações sobre os estágios do estudo encontram-se impressos nas figuras 1 e 2.

Cinco culturas uroteliais e uma de músculo liso foram estudadas apenas em P0. Elas se originaram de um paciente com diagnóstico de carcinoma de células renais - ambos os tipos celulares -, 2 pacientes com exclusão renal e 2 espécimes coletados de transplantes renais. O intervalo de tempo requerido para o estabelecimento das primeiras subculturas (P1) variou entre 6 e 7 dias, para as células uroteliais, e entre 16 e 21 dias para o músculo liso. A partir da primeira passagem, a progressão para novas subculturas ocorria a cada 7 dias. Assim, os períodos médios de seguimento foram de 4 e 6 semanas, respectivamente, para as células epiteliais e musculares lisas.

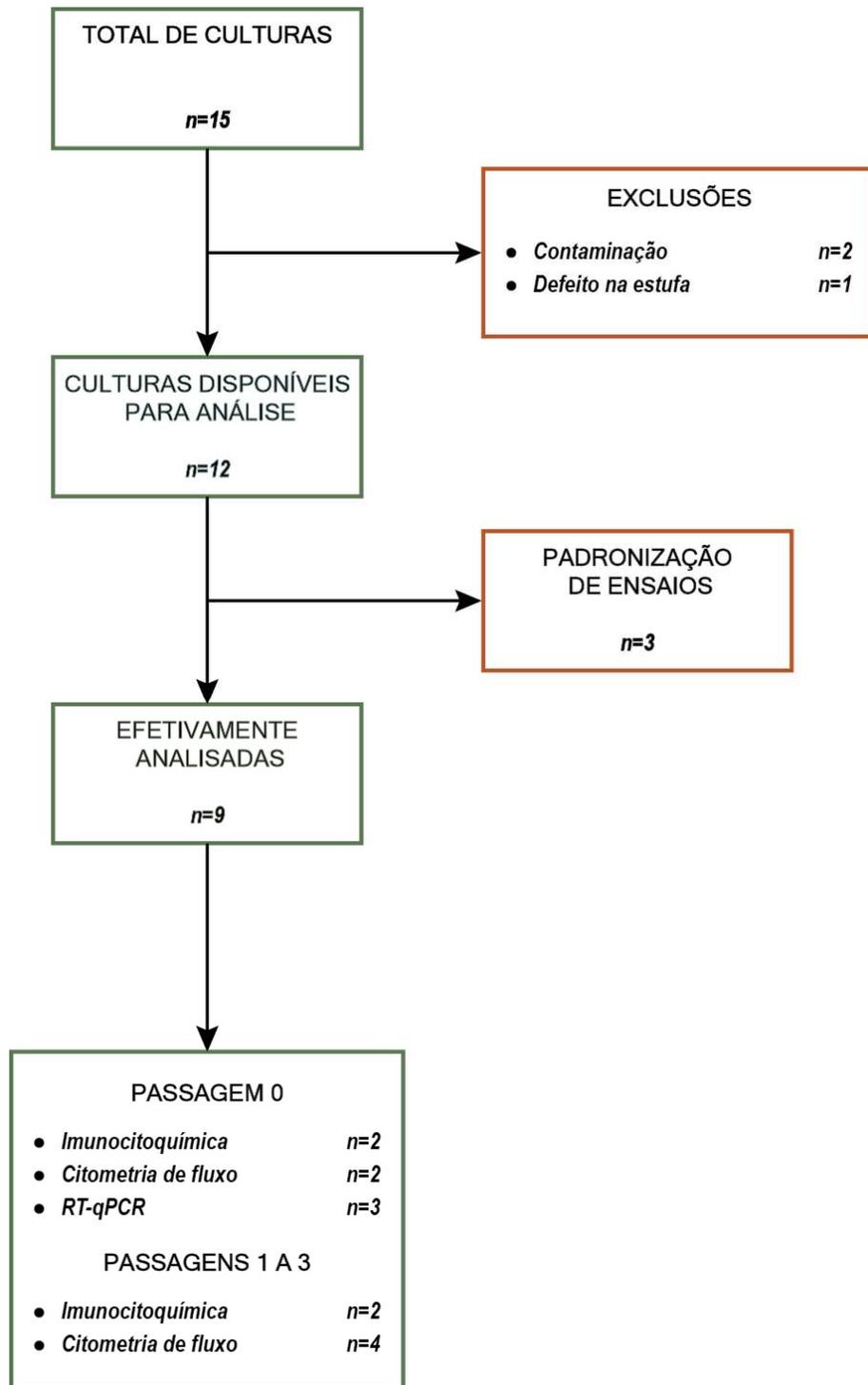


Figura 1. Fluxograma da pesquisa com as culturas uroteliais.

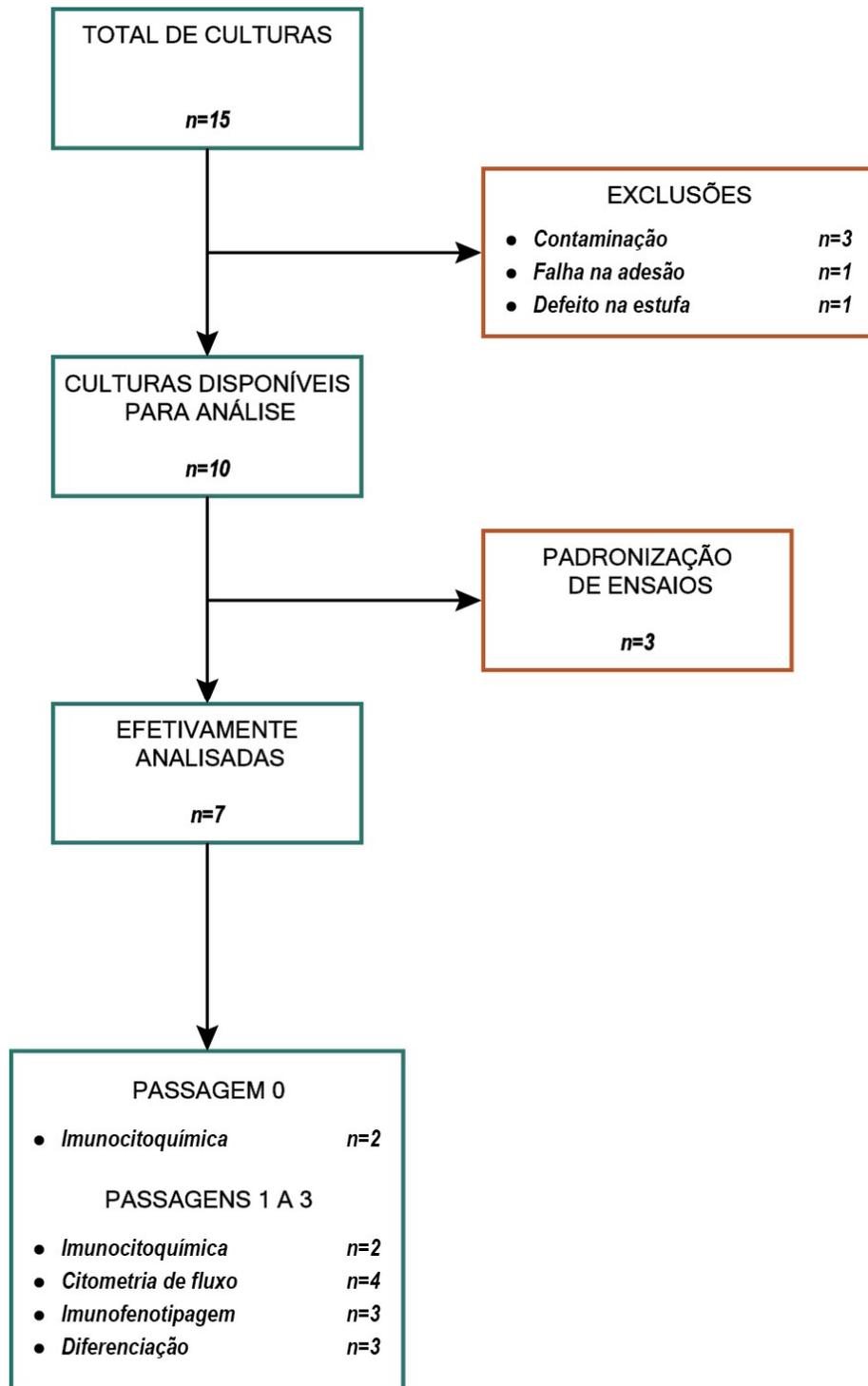


Figura 2. Fluxograma da pesquisa com as culturas musculares lisas.

10.2. EXPANSÃO DO UROTÉLIO

A partir do exame imunohistoquímico de ureteres normais, estimou-se a distribuição populacional dos fenótipos uroteliais. A aferição da K7 mostrou que, embora a amplitude de sua expressão possa variar entre os estratos, ela está presente em todas as células do urotélio. Do mesmo modo, o estudo da expressão de K5 e K20 revelou que as suas respectivas subpopulações correspondiam, em média, a 34,6% (DP 13,3) e 6,3% (DP 0,8) das células desse epitélio (Fig.6).

Durante o período de cultivo *in vitro*, observou-se uma acentuada mudança nessa distribuição (Fig.3). As medidas 24 horas após o isolamento, que representam P0, mostraram que 68,3% (DP 2,0) das células aderidas expressavam K7, 65,2% (DP 1,3) K5 e 2,1% (DP 0,4) K20. Ao atingirem P1, 99% (DP 0,4) marcavam para K7, 4,8% (DP 2,8) K5 e 0,9% (DP 0,5) K20. Esse facto produziu uma redução de 93% na população K5 e 67% na K20. O desaparecimento dos fenótipos K5 e K20 após a segunda passagem produziu culturas que expressavam apenas K7. Após o ajuste do efeito aleatório, identificou-se uma interação significativa entre os diferentes fenótipos e o fator passagem de cultura ($F=734,4$, gl 8;30, $P<0,001$) (Fig.7 a 9).

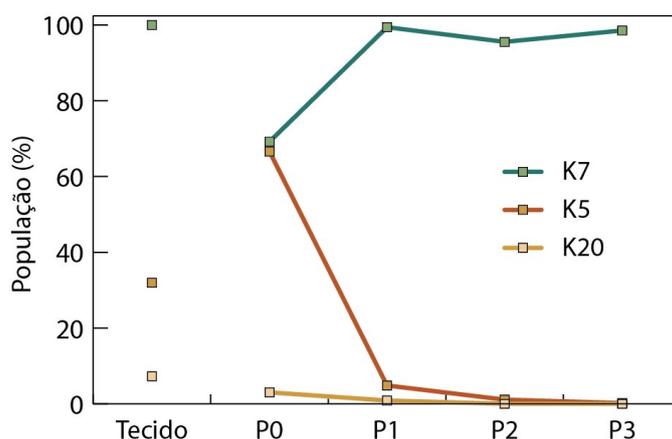


Figura 3. Perfil populacional das células uroteliais. Proporção média de cada fenótipo durante o período de seguimento.

Expressão do gene *KRT5*

Conforme planejado, todas as três culturas uroteliais geraram dados para a análise de subgrupo. Com base nas suas respectivas regressões lineares padrão, estimou-se a eficiência das reações de amplificação do gene *KRT5* entre 91% e 95%. Para o gene β 2-microglobulina ela variou entre 100% e 107%. Após o procedimento de normalização, as expressões médias do mRNA *KRT5* no primeiro e sétimo dia após a semeadura foram de, respectivamente, 0,869 (DP 0,158) e 0,308 (DP 0,234). Calculou-se uma redução média de 64% na sua expressão durante o período de seguimento (Fig.4).

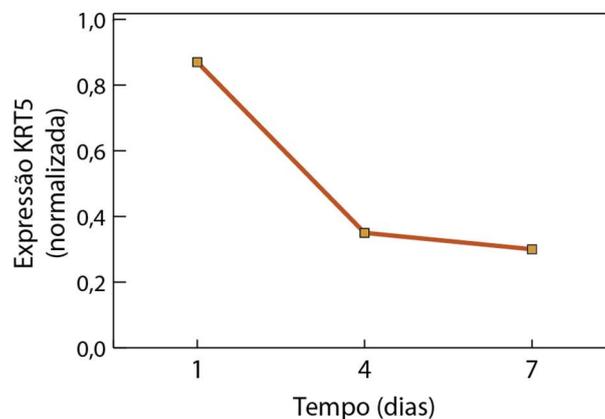


Figura 4. Expressão média normalizada do gene *KRT5*.

Proliferação do urotélio

Excetuando-se as medidas 24 horas pós-isolamento, cujas taxas foram de 2% (DP 1,1), observou-se que a expansão das células que expressam K7 variou entre 48% e 65% de P1 a P3. A subpopulação K5 apresentou taxas de proliferação de 2,9% (DP 1,4) em P0 e 52% (DP 6,2) em P1, com um declínio gradual nas passagens subsequentes (Fig.5). Houve evidência de alguma proliferação das células K20 no teste por citometria, especialmente em P1. No entanto, assumiu-se que a taxa foi insignificante por não haver confirmação citológica (Fig.9).

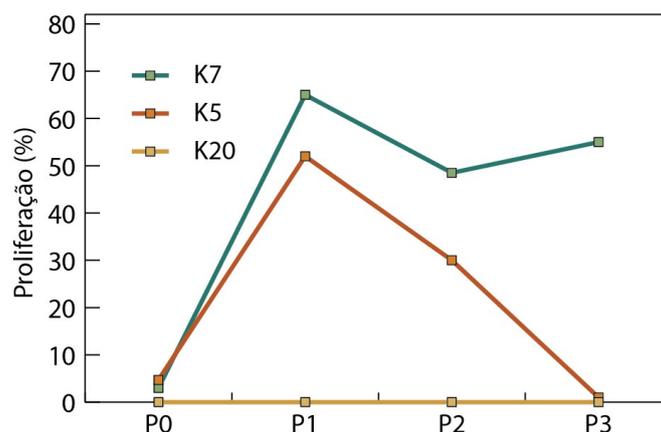


Figura 5. Taxa de proliferação dos diferentes fenótipos uroteliais *in vitro*. Média dos resultados a cada aferição.

Morte celular

Utilizou-se o ensaio de TUNEL para investigar o desaparecimento dos fenótipos K5 e K20. No quarto dia após a semeadura, observou-se que a proporção de mortes nas células K5 foi 7,4% (9/122) contra 3,5% (11/316) naquelas que não a expressavam (Fig.10). A diferença de proporções não atingiu significância estatística χ^2 (gl 1, $P=0,080$). Por sua vez, computou-se uma taxa de mortes de 20% (1/5) entre as células K20 e 4,2% (9/215) entre aquelas que não a expressavam (Fig. 11). A análise pelo teste exato de Fisher não demonstrou uma diferença estatisticamente significativa (gl 1, $P=0,209$).

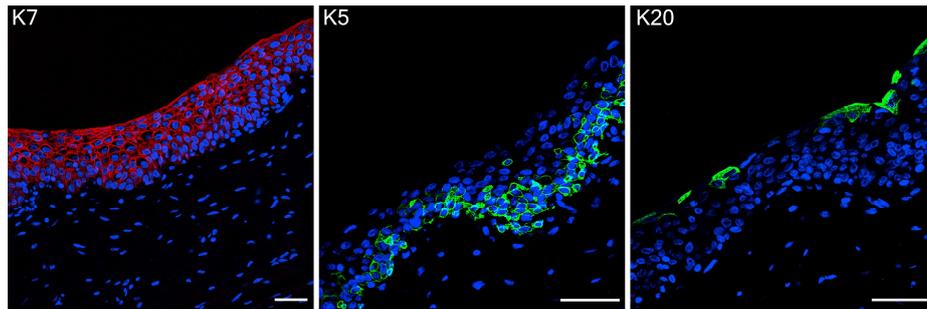


Figura 6. Expressão de queratinas no urotélio ureteral. (K7) Queratina 7 (rubro). (K5) Queratina 5 (verde). (K20) Queratina 20 (verde). Núcleos marcados com Hoechst 33342® (azul). Escala 50 μm.

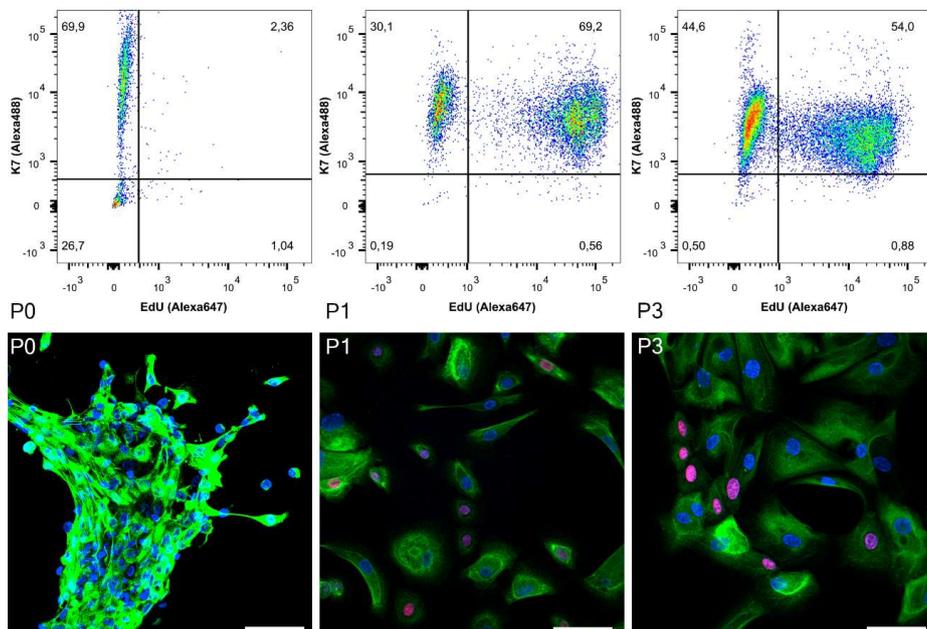


Figura 7. Seguimento da população K7 *in vitro*. (Acima) Quantificação das frações quiescente e proliferativa de P0 a P3 via citometria de fluxo. (Abaixo) Avaliação da morfologia celular por imunocitoquímica: queratina 7 (verde) e captação de EdU pelas células em processo proliferativo (rubro). Escala 50 μm.

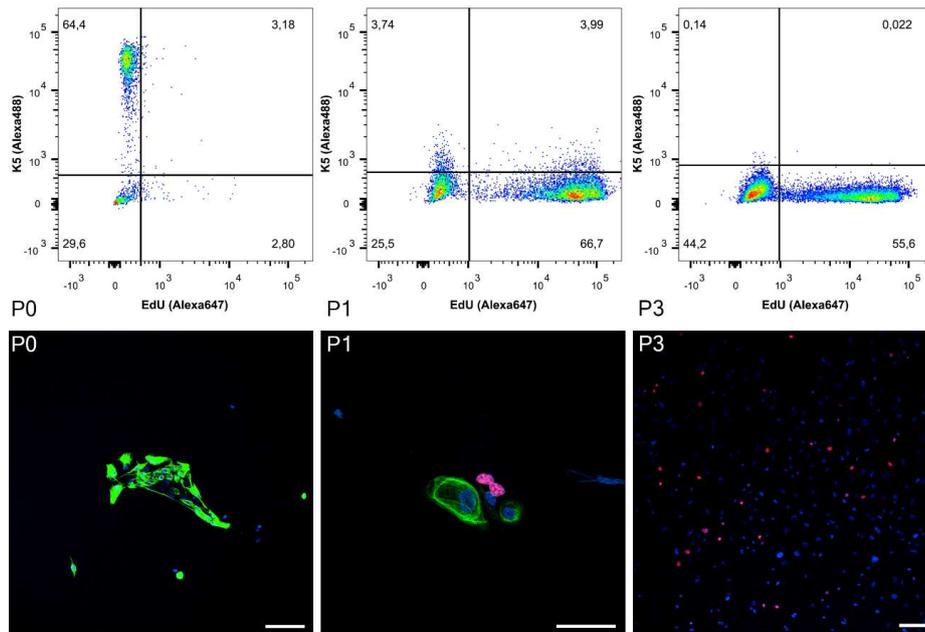


Figura 8. Seguimento da subpopulação K5 *in vitro*. (Acima) Quantificação das frações quiescente e proliferativa de P0 a P3 via citometria de fluxo. (Abaixo) Avaliação da morfologia celular por imunocitoquímica: queratina 5 (verde) e captação de EdU (rubro). Escala 50 μm .

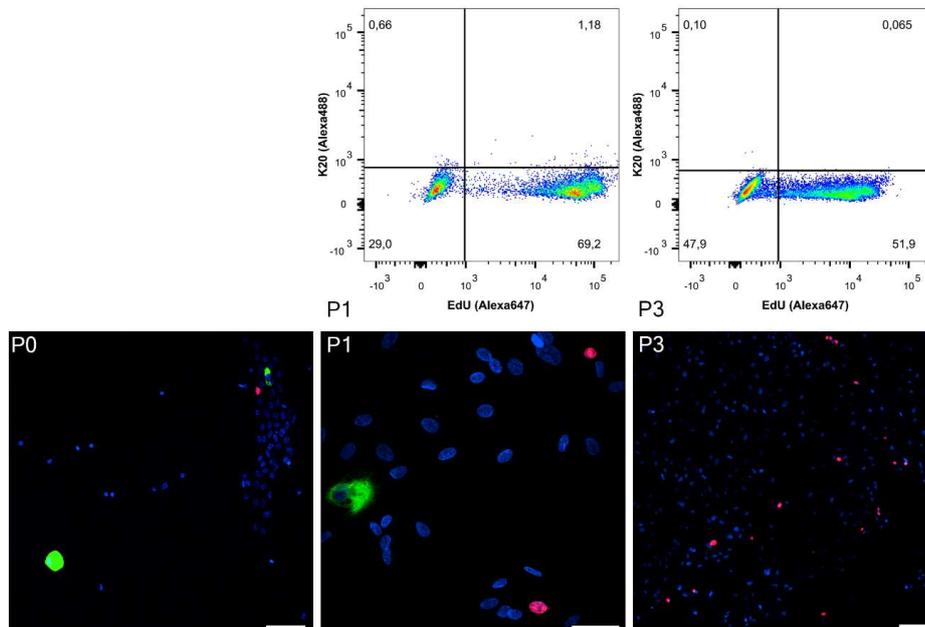


Figura 9. Seguimento da subpopulação K20 *in vitro*. (Acima) Quantificação das frações quiescente e proliferativa de P0 a P3 via citometria de fluxo. (Abaixo) Avaliação da morfologia celular por imunocitoquímica: queratina 20 (verde) e captação de EdU (rubro). Escala 50 μm .

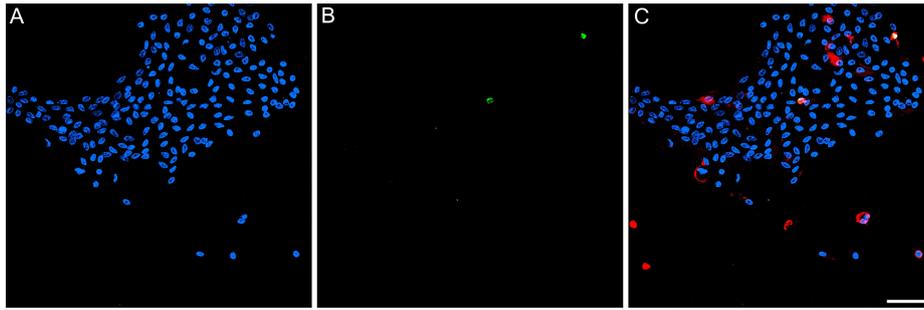


Figura 10. Ensaio de TUNEL na subpopulação K5. (A) Núcleos marcados com Hoechst 33342® (azul). (B) Núcleos que exibiam fragmentação do DNA (verde). (C) Soma de imagens associada a imunomarcação para K5 (rubro) no quarto dia pós-isolamento. Escala 50 μ m.

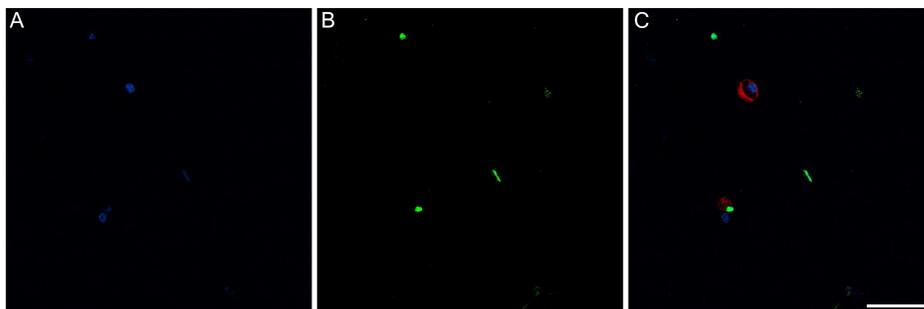


Figura 11. Ensaio de TUNEL na subpopulação K20. (A) Núcleos marcados com Hoechst 33342® (azul). (B) Núcleos que exibiam fragmentação do DNA (verde). (C) Soma de imagens associada a imunomarcação para K20 (rubro) no quarto dia pós-isolamento. Escala 50 μ m.

10.3. EXPANSÃO DO MÚSCULO LISO

A estimativa da distribuição dos marcadores de músculo liso em cortes histológicos de ureteres normais revelou que virtualmente todas das células musculares expressavam α -actina e miosina-HC de maneira conjunta (Fig.14). Por outro lado, não se identificou uma marcação significativa por vimentina nessa população. As observações feitas em P0 mostraram que 78% (DP 10,4) das células aderidas expressavam miosina-HC e 83,5% (DP 12,0) α -actina. Ao mesmo tempo, computou-se que 20,6% (DP 8,9) das células analisadas não possuíam marcadores de músculo liso (Fig.15).

À medida que subculturas foram geradas, observou-se uma paridade na expressão de miosina-HC e α -actina até P1. Entre P1 e P3, a fração de células que expressavam α -actina variou entre 92% e 94%. Por outro lado, evidenciou-se um declínio de 56% na proporção das células com marcação para miosina-HC (Fig. 12). Nesse mesmo intervalo, contabilizou-se uma subpopulação que não apresentava marcadores de músculo liso, cuja proporção representava até 10% das células amostradas (Fig.15). O modelo de análise estatística demonstrou a existência de uma interação significativa entre os fenótipos e as passagens de cultura ($F=16,25$, gl 4;8, $P=0,001$). Após P1, também observou-se o aparecimento de vimentina nas células que expressavam α -actina (Fig.17).

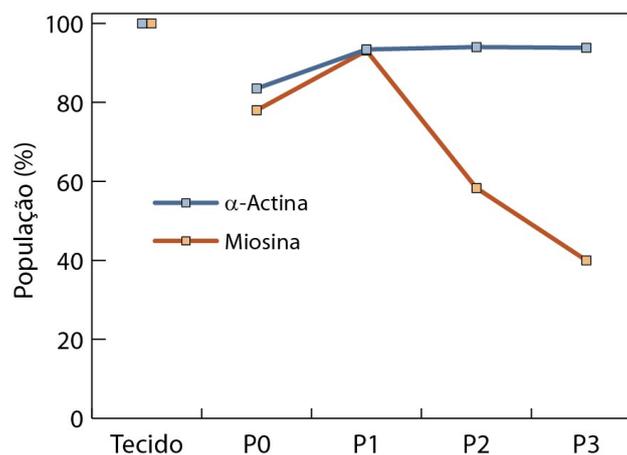


Figura 12. Perfil populacional do músculo liso. Proporção média de cada fenótipo durante o período de seguimento.

Proliferação do músculo liso

Excluindo-se as medidas pós-isolamento, nas quais não se evidenciou proliferação significativa, observou-se incrementos da ordem de 120% a 150% na taxa de proliferação das células musculares entre P1 e P3. Houve um crescimento na proporção de células a proliferar de 16% (DP 1,4) para 40% (DP 7,0), entre as células que expressavam α -actina, e de 16% (DP 2,8) para 35,5% (DP 6,4), entre a população miosina-HC (Fig. 13). Nesse mesmo intervalo,

estimou-se uma taxa de proliferação entre 1% e 5% para as células que não expressavam marcadores de músculo liso (Fig.15 e 16).

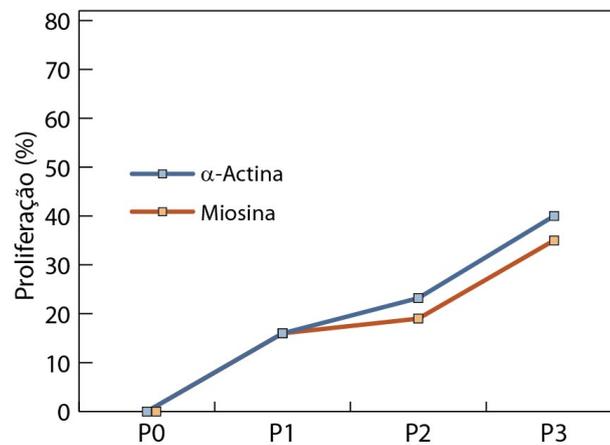


Figura 13. Taxas de proliferação entre os fenótipos do músculo liso. Média dos resultados a cada aferição.

Morte celular

Os dados do teste de TUNEL revelaram uma mortalidade de 0% (0/22) nas células miosina-HC e 33,3% (2/6) naquelas que não expressavam esse marcador. A análise pelo teste exato de Fisher demonstrou que a diferença na proporção de mortes entre as populações foi significativa (gl 1, $P=0,04$) (Fig.18).

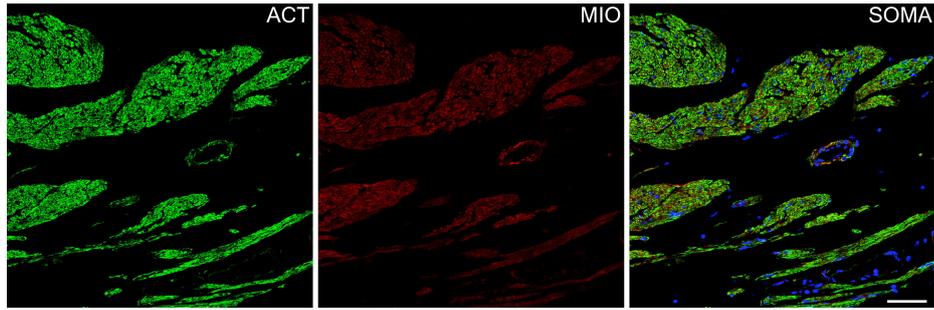


Figura 14. Expressão dos marcadores de músculo liso no ureter. (ACT) α -actina (verde). (MIO) Miosina-HC (rubro). (SOMA) Soma de imagens. Núcleos marcados com Hoechst 33342® (azul). Escala 50 μ m.

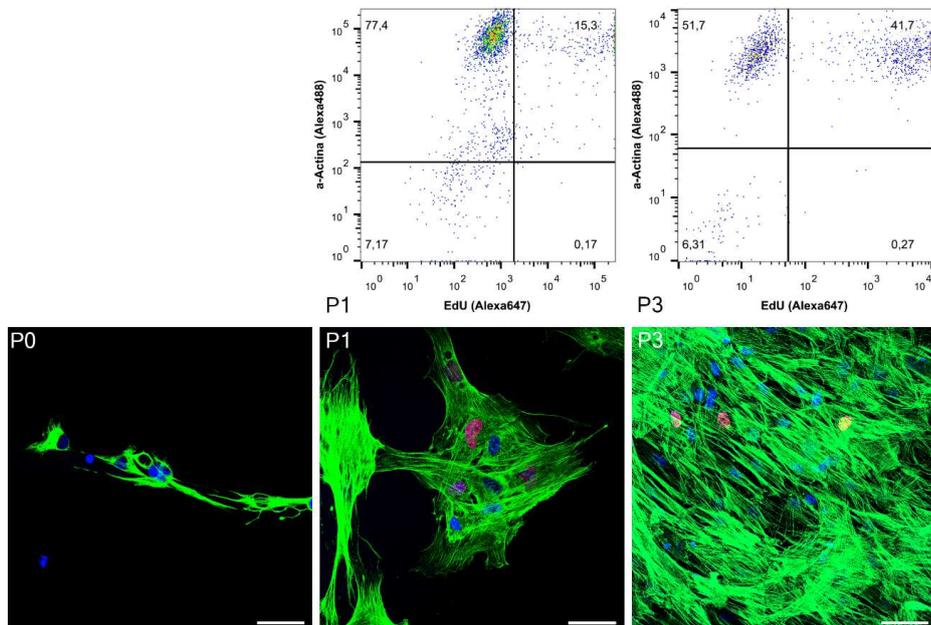


Figura 15. Seguimento da população muscular lisa que expressava α -actina *in vitro*. (Acima) Quantificação das frações quiescente e proliferativa de P0 a P3 via citometria de fluxo. (Abaixo) Avaliação da morfologia celular por imunocitoquímica: α -actina (verde) e captação de EdU (rubro). Escala 50 μ m.

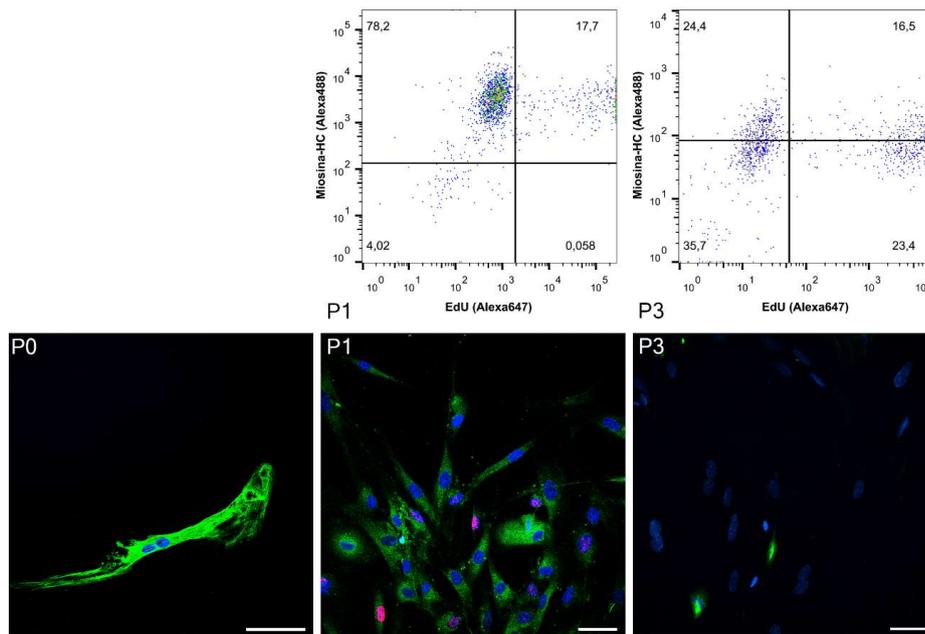


Figura 16. Seguimento da população muscular lisa que expressava miosina-HC *in vitro*. (Acima) Quantificação das frações quiescente e proliferativa de P0 a P3 via citometria de fluxo. (Abaixo) Avaliação da morfologia celular por imunocitoquímica: α -actina (verde) e captação de EdU (rubro). Escala 50 μ m.

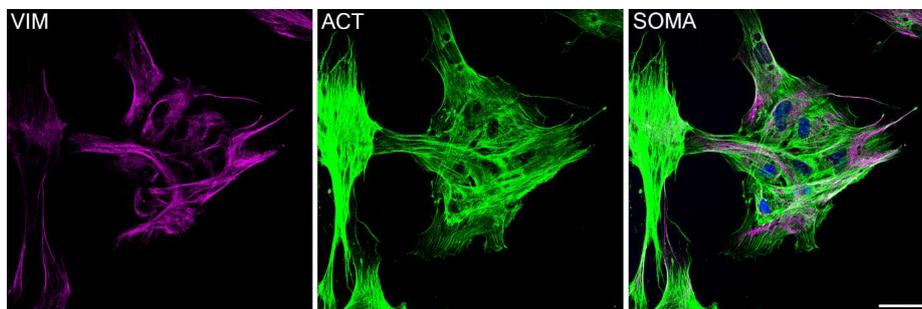


Figura 17. Expressão de vimentina no músculo liso em P1. (VIM) Vimentina (magenta). (ACT) α -actina (verde). (SOMA) Soma de imagens. Escala 50 μ m.

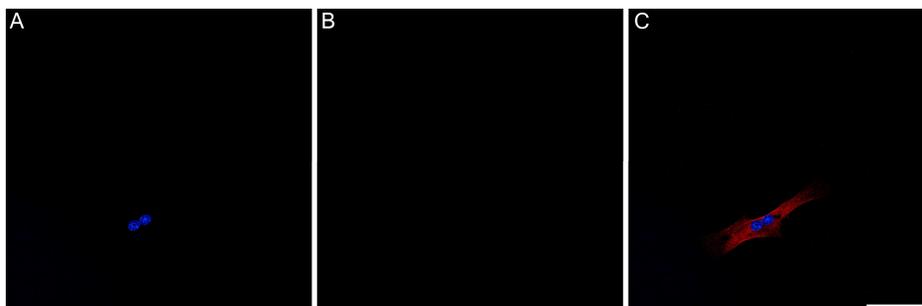


Figura 18. Ensaio de TUNEL em culturas musculares lisas. (A) Núcleos marcados com Hoechst 33342[®] (azul). (B) Núcleos que exibem fragmentação do DNA (verde). (C) Soma de imagens associada a imunomarcção para miopsina-HC (rubro) no quarto dia pós-isolamento. Escala 50 μ m

10.4. COMPARAÇÃO ENTRE MSC E MÚSCULO LISO

Considerando-se os anticorpos testados, a caracterização das células-tronco derivadas do tecido adiposo periureteral mostrou uma população homogênea, a qual expressava marcadores comuns às células-tronco mesenquimais (MSCs): CD44, CD73, CD90 e CD105. A negatividade para CD14, CD34, CD45 e HLA-DR sugere que essas células não possuíam origem hematopoética e tampouco eram progenitoras endoteliais. Além disso, ausência de expressão de CD146 indica que elas eram distintas das células perivasculares *MSC-like* (pericitos) (Tabela 2). A marcação com vimentina e a ausência de marcadores de músculo liso, confirmou o seu estado indiferenciado (Fig.20). Com base no ensaio da desoxiuridina, estimou-se a sua taxa de proliferação média em 31,6% (DP 8,0) (Fig.20).

Por sua vez, o perfil imunofenotípico das células musculares lisas revelou uma considerável homologia com as células-tronco derivadas da gordura, excetuando-se a positividade aos marcadores de músculo liso e a expressão de CD90 (Tabela 2). Ao analisar este marcador, observou-se uma distribuição populacional bimodal, na qual a parcela negativa correspondia, em média, a 30% do total de células (Fig.19 e 21). Além disso, a ausência de expressão de CD271 indica que não havia relação das células musculares avaliadas com células da medula óssea e reduz a possibilidade de serem derivadas da crista neural. A demonstração do painel imunofenotípico encontra-se nas figuras suplementares S5 e S6.

O ensaio de diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo em linhagens mesodérmicas comprovou que todas as culturas testadas foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos. No entanto, apenas uma mostrou sinais de diferenciação em condrócitos. Quando as células musculares lisas foram cultivadas com meios indutores, observou-se uma uniformidade nas diferenciações osteogênica e condrogênica. Embora sem exuberância, duas culturas de músculo liso exibiram evidências de diferenciação em adipócitos (Fig.22 e 23).

Tabela 2. Comparação entre os perfis imunofenotípicos do músculo liso e MSCs

	Músculo liso	MSC
CD14	ausente	ausente
CD34	ausente	ausente
CD44	presente	presente
CD45	ausente	ausente
CD73	presente	presente
CD90	bimodal	presente
CD105	presente	presente
CD146	ausente	ausente
CD271	ausente	nt
HLA-DR	ausente	ausente
α -Actina	presente	ausente

MSC (células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo periureteral), nt (não testado).

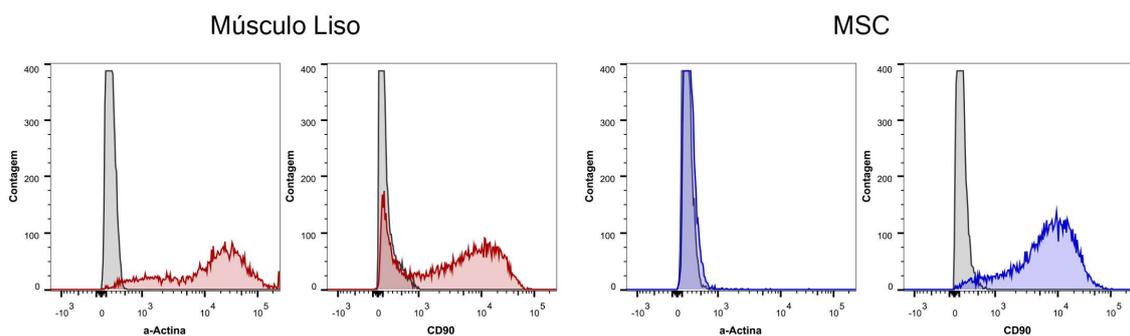


Figura 19. Citometria de fluxo das células musculares lisas e MSCs. Análise com anticorpos contra α -actina e CD90.

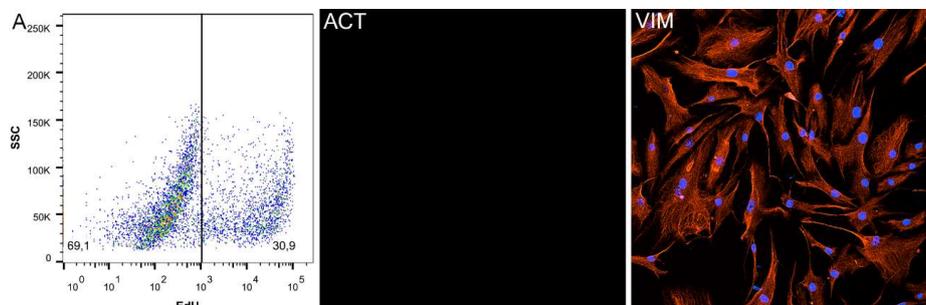


Figura 20. Características das células-tronco derivadas de tecidos periureterais. (A) Frações quiescente e proliferativa aferidas por citometria de fluxo. (ACT) Imunomarcagem com α -actina. (VIM) Vimentina (laranja). Escala 50 μ m.

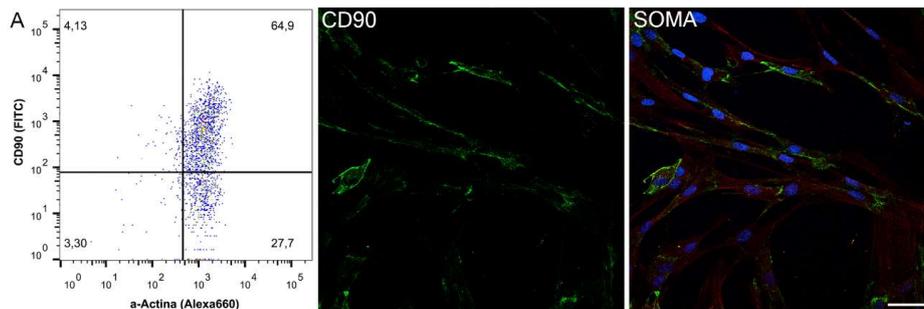


Figura 21. Expressão de CD90 nas células musculares lisas. (A) Avaliação por citometria de fluxo com anticorpos contra CD90 e α -actina. (CD90) Imunocitoquímica com CD90 (verde). (SOMA) Marcações com CD90 e α -actina (rubro). Escala 50 μ m.

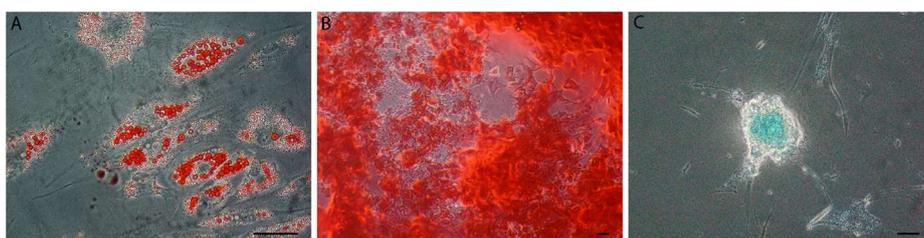


Figura 22. Ensaio de diferenciação nas MSCs. (A) Identificação do acúmulo de lipídios em adipócitos pela coloração oil red. (B) Osteoblastos e matriz óssea corados com alizarin red. (C) Condrócitos e matriz cartilaginosa corados com alcian blue. Escala 50 μ m.

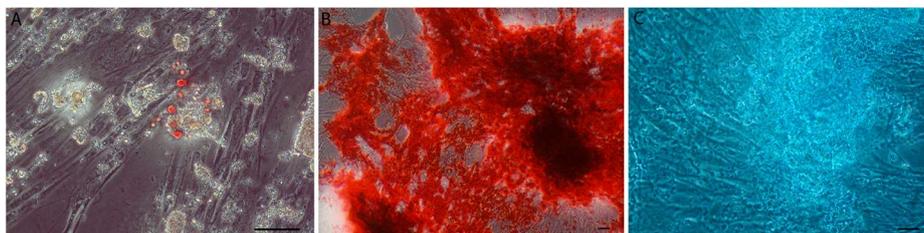


Figura 23. Ensaio de diferenciação nas células musculares lisas. (A) Identificação do acúmulo de lipídios em adipócitos pela coloração oil red. (B) Osteoblastos e matriz óssea corados com alizarin red. (C) Condrócitos e matriz cartilaginosa corados com alcian blue. Escala 50 μ m.

11. DISCUSSÃO

Neste estudo, utilizaram-se técnicas de citometria de fluxo, imunocitoquímica e expressão de mRNA para verificar as mudanças provocadas pela exposição de células uroteliais e musculares lisas a superfícies artificiais de plástico. Mesmo reconhecendo que as alterações fenotípicas são muito mais abrangentes que a diferenciação celular^{8,129}, restringiu-se a investigação a este atributo por considerá-lo o mais relevante para a caracterização dos tecidos. A observação seriada das diferentes subpopulações permitiu o monitoramento dos seus padrões de proliferação e morte celular, os quais reforçaram as conclusões da pesquisa.

A análise dos dados demonstrou que houve uma associação significativa entre as mudanças observadas nos fenótipos de ambos os tipos celulares e o cultivo ao longo do tempo. No entanto, embora a exposição tenha influenciado tanto células uroteliais, quanto musculares lisas a alterarem seus perfis populacionais, o exame individualizado revelou particularidades em cada coorte. Assim, para evitar o risco de generalizações indevidas, torna-se imperativo que a interpretação dos seus resultados ocorra de maneira independente.

11.1. UROTÉLIO

Assegurar a representatividade populacional é essencial para confirmar a veracidade das conclusões inferidas. Conseqüentemente, a confiabilidade dos dados obtidos durante o seguimento das culturas uroteliais demanda a prova de que as células cultivadas compartilhavam a mesma origem tecidual. Como a contaminação por outros tipos celulares é um evento comum durante o isolamento de culturas primárias, determinar a sua probabilidade de ocorrência deve ser a primeira questão analisada na busca pela validade do estudo.

Felizmente, as características histológicas do urotélio, acessível à dissecação e completamente separado do estroma por uma lâmina basal, combinadas à seletividade do meio de cultivo utilizado, tornam o estabelecimento de culturas primárias com alto grau de pureza uma tarefa inteiramente factível^{21,23}. De facto, embora a análise via citometria de fluxo mostrasse que até um quarto dos eventos pós-isolamento não correspondiam ao epitélio, virtualmente todas as células mensuradas nas avaliações subsequentes expressavam ao menos K7, um indicativo da sua origem urotelial (Fig.7).

A inspeção microscópica nos primeiros dias pós-semeadura revelou que a subpopulação não-epitelial presente na primeira aferição era formada principalmente por debris, partes de lâmina basal e células sanguíneas resultantes do processo de isolamento (dado não mostrado). Ao desconsiderá-la, foi possível estimar que 90% da população urotelial que aderiu ao plástico expressava K5 e K7 conjuntamente (Fig.S4). Logo, infere-se que o processo de adesão selecionou as células pertencentes a estratos basais do tecido original.

Para estabelecer o nexos de causalidade entre a exposição a superfícies plásticas e a adesão preferencial de células uroteliais basais, faz-se necessário comprovar que tal associação é robusta, reproduzível e verossímil³⁰. Ao analisar de modo sistemático os perfis fenotípicos de culturas uroteliais humanas já publicados^{21,23,29}, nota-se que os resultados deste estudo concordam com as descrições sobre a existência de células K5⁺ *in vitro*. Assim, assumindo-se que os dados apresentados são verdadeiros, o risco relativo 2,57 vezes maior de se encontrar células K5⁺ no plástico em relação ao tecido e o grande tamanho de efeito calculado^{##} (Cohen d=5,2) indicam uma significativa influência da exposição sobre a adesão celular.

No entanto, os mesmos artigos não apresentam referências que suportem o achado de uma população K5 predominante no período de 24 horas após o isolamento e, tampouco, se esse facto independe do sítio de coleta. Como consequência, a falta de informações sobre

^{##}d= $\frac{M_1 - M_2}{\sigma_{médio}}$, onde M= média aritmética simples e σ =desvio-padrão.

a reprodutibilidade dos resultados não permitiu a verificação da consistência dessa associação. Da mesma forma, a determinação da sua plausibilidade biológica foi prejudicada pela escassez de estudos sobre a adesão do urotélio. Uma hipótese crível para justificá-la seria a ação de um diferente conjunto de receptores de membrana. Sabe-se que as células basais expressam integrinas com subunidade β_4 , a qual já foi identificada em culturas uroteliais de longa permanência¹³¹. Porém, não há evidências de que esse atributo lhes ofereça vantagem na adesão a substratos sintéticos. Portanto, a despeito de a seletividade parecer real, qualquer explicação para essa associação ainda é conjectural.

Além da seleção pós-semeadura, o desaparecimento das células K5⁺ e K20⁺ ao longo das passagens tornou evidente a forte relação entre o cultivo *in vitro* e as modificações no estado de diferenciação das células uroteliais. Notadamente, a observação de que a maior parte do declínio daquelas populações ocorria até o estabelecimento da primeira subcultura levou ao exame de duas hipóteses para explicar tal achado. Em síntese, verificou-se a plausibilidade de uma associação entre morte celular ou alteração fenotípica com a mudança aferida no perfil populacional.

No caso das células K5⁺, o contraste entre as taxas de proliferação e apoptose sugere que uma alteração de fenótipo foi o evento responsável pela redução temporal da sua população. Apesar de o delineamento adotado não permitir o estabelecimento da relação causa-efeito, as tendências de redução tanto no conteúdo proteico de K5, quanto na expressão do seu mRNA, tornam aceitável a proposição que o silenciamento do gene *KRT5* esteve relacionado à expansão celular. Com efeito, relatos prévios de alterações no fenótipo epitelial provocados pelo cultivo *in vitro* confirmam a verossimilhança de uma relação consistente entre essas duas variáveis^{29,132}.

Por sua vez, a raridade de espécimes gerou uma dificuldade adicional na busca por uma explicação para a extinção das células K20⁺ após a primeira subcultura. De facto, com base nos resultados obtidos, não é possível descartar completamente a mudança de fenótipo como causa para esse fenômeno. A revisão da literatura também é ambígua, pois enquanto

o escrutínio de culturas estabelecidas não identificou expressão significativa de K20^{21,37}, a análise de *quasi*-experimentos *in vivo* mostrou que células superficiais conservam alguma capacidade de proliferação em modelos de lesão urotelial^{43,133}. Assim, ao examinar-se o conjunto de dados disponível, parece mais aceitável supor que o seu desaparecimento esteja ligado a uma relação morte/proliferação desfavorável.

Juntamente com a alteração fenotípica, a ausência de estratificação e a alta atividade proliferativa, sobretudo das células com menor volume (Fig.7), foram os achados predominantes durante o seguimento das culturas uroteliais. A grande capacidade clonogênica dessa subpopulação já foi relacionada às células progenitoras uroteliais e o seu comportamento encontra paralelo em culturas de outros epitélios estratificados^{35,134}. Neste caso, observou-se que a hiperproliferação é acompanhada pela tendência à síntese das queratinas 6, 14 e 16, um fenômeno análogo ao descrito na hiperplasia escamosa²⁹. Assim, as modificações na expressão gênica do urotélio induzidas pelo ambiente de cultivo são compatíveis com um processo de metaplasia epitelial¹³².

11.2. MÚSCULO LISO

A validação de uma associação entre o cultivo *in vitro* e as alterações fenotípicas observadas deve, obrigatoriamente, passar pela exclusão da presença de outros tipos celulares como um fator de confusão. De facto, há provas que fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais, tipos celulares distribuídos pelo parênquima do ureter, são capazes de expressar marcadores de músculo liso em situações específicas^{54,64,135}. Logo, é necessário descartar que os dados obtidos não reflitam, tão somente, o crescimento populacional de algum deles.

A suspeita de contaminação durante o isolamento é reforçada pela inspeção do tecido muscular em cortes histológicos ureterais (Fig. 14). O envolvimento de feixes musculares por tecido conjuntivo torna extremamente difícil a completa separação de ambos, mesmo com o auxílio de técnicas de microdissecção. Além disso, também há outros tipos entremeados na camada muscular, como células de vasos sanguíneos e intersticiais, os quais acabam sendo isolados juntamente com a população-alvo. Assim, é plausível considerar a fração populacional que não expressava marcadores de músculo liso como uma combinação de vários tipos celulares. A constatação, pelo ensaio de TUNEL, de que uma parte significativa deles não sobreviveu aos primeiros dias de cultura, corrobora essa proposição.

Ao considerar a contaminação como um facto, cabe ao pesquisador o ônus de provar que a população-alvo pôde ser discriminada das demais. Felizmente, estudos já confirmaram que a identificação das células musculares lisas é possível mesmo na presença de outros tipos celulares^{47,136}. Como regra, a distinção entre células musculares e fibroblastos ocorre pela marcação com α -actina de músculo liso⁴⁷. Fibroblastos não expressam essa proteína em cultura, a menos que sejam transformados em miofibroblastos via suplementação do meio com fatores indutores, como TGF- β_1 e algumas citocinas, ou via estímulos mecânicos^{64,137}.

Por sua vez, há indicativos da existência de miofibroblastos em tecidos normais especializados e em diversos processos patológicos, onde exercem função contrátil¹³⁵. Essas células possuem α -actina como parte do seu aparato microfilamentar, porém são distinguidas do músculo liso por não expressarem miosina-HC^{54,64}. Células endoteliais também podem ser induzidas a expressar α -actina quando são expostas a TGF- β_1 *in vitro*¹³⁸. Entretanto, mesmo que sofram mudanças no fenótipo, elas conservam muitos de seus marcadores endoteliais e não expressam miosina-HC^{54,138}.

Com base nessas premissas conclui-se que, embora não tenha sido possível garantir pureza no isolamento, as células musculares lisas corresponderam entre 90% e 95% das populações analisadas em P1. Além disso, nota-se que a parcela populacional restante pôde ser facilmente distinguida por não expressar marcadores seletivos para o músculo liso e,

tampouco, ter apresentado taxas de proliferação significativas. Assim, assumindo-se a representatividade da população, a dissociação temporal entre as expressões de α -actina e miosina-HC foi principal evidência de uma relação entre a expansão *in vitro* e modificações no fenótipo das células musculares lisas.

A relação entre o cultivo e a modulação fenotípica do músculo liso já foi bem documentada em estudos prévios^{47,88,139,140}. Com efeito, as mudanças seguem um padrão caracterizado pela reorganização citoesqueleto, ampliação no número de organelas citoplasmáticas e aumento na capacidade de proliferação ao longo das passagens^{47,88,139}. No que se refere às alterações do citoesqueleto, evidencia-se redução no conteúdo de suas proteínas seletivas^{141,142} juntamente com incremento na síntese de componentes comuns a outros tipos celulares, notadamente β -actina e vimentina⁸⁸.

A investigação das causas desse fenômeno revela que há uma forte correlação entre as mudanças no fenótipo e três atributos das culturas *in vitro*: a concentração de soro ou plasma sanguíneos no meio, a baixa densidade celular e a ausência de matriz extracelular^{47,55}. Enquanto a influência dos dois últimos está ligada à perda de vários sinais ambientais, críticos para a diferenciação celular, o efeito do soro está relacionado com a ação direta de alguns fatores reguladores presentes na sua composição.

Experimentos com culturas de músculo liso mostram uma relação consistente e dose-dependente entre a exposição ao soro e as mudanças descritas anteriormente^{47,136,139}. Embora haja indícios de que ele contenha várias substâncias capazes de produzir tais alterações *in vitro*, relativamente poucas têm a sua ação confirmada *in vivo*⁵⁵. Atualmente, há um conjunto de evidências suficiente para afirmar que o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), particularmente suas formas BB e DD, fosfolípidios oxidados e algumas citocinas inflamatórias são as moléculas responsáveis por silenciar vários genes marcadores do músculo liso: incluindo α -actina, miosina-HC, SM22 α e h1-calponina¹⁴³⁻¹⁴⁵.

Portanto, as alterações no estado de diferenciação das culturas do músculo liso ureteral observadas neste trabalho concordam com os resultados da literatura. No entanto,

duas ressalvas devem ser registradas. Apesar de os resultados do ensaio imunocitoquímico sugerirem uma redução no conteúdo celular de miosina-HC já em P1 (Fig.16), o desaparecimento dos marcadores de diferenciação costumou ser mais precoce na maioria dos estudos que investigaram o processo de modulação fenotípica.

A explicação para essa diferença, conquanto conjectural, pode estar em particularidades do músculo ureteral ou na menor concentração de soro fetal bovino suplementada ao meio. Na maioria dos delineamentos prévios, as células musculares haviam origem vascular e a concentração de soro era superior a 5%. Outro facto intrigante foi a existência de células exibindo alta expressão de vimentina em relação à α -actina (Fig.17). Como já foi demonstrado que essa relação é característica de células musculares de vasos sanguíneos⁶⁸, não é possível descartar que parte da população muscular cultivada houvesse origem vascular.

Além da diminuição na expressão da miosina-HC ao longo do tempo, as culturas de músculo liso também mostraram uma significativa capacidade de transdiferenciação em outras linhagens mesenquimais. Realmente, os dados indicam que a sua plasticidade foi comparável a das células-tronco mesenquimais isoladas da gordura periureteral. O mesmo comportamento fora observado em estudos prévios e levou à criação de dois modelos que procuram explicar essa espantosa capacidade. Embora nenhum tenha sido completamente validado por estudos de rastreamento celular *in vivo* até o momento, as informações obtidas nas últimas décadas permitem que sejam reconhecidos como as melhores interpretações para esse fenômeno^{82,146}.

O primeiro, denominado modulação fenotípica, declara que as células musculares lisas podem interconverter os fenótipos contrátil e sintético (ou proliferativo) via regulação epigenética^{54,55}. Diferentemente dos demais tipos celulares maduros, a ativação dos genes que conferem a diferenciação do músculo liso pode ser modulada por agentes que modifiquem a afinidade da ligação entre o fator transcricional SRF e elementos CArG encontrados nas suas regiões promotoras ou intrônicas^{99,147}.

Embora mais de um agente possa interferir nessa ligação, estudos de repressão transcricional encontraram uma associação entre o silenciamento dos genes marcadores de músculo liso e expressão de *KLF4*^{55,148,149}. O *KLF4* faz parte de um conjunto de genes responsáveis pela manutenção da pluripotência e autorrenovação das células-tronco embrionárias¹⁵⁰ e, quando superexpresso juntamente com *Oct4*, *Sox2*, e *c-myc*, pode reprogramar células somáticas em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC)¹⁵¹.

Resultados de experimentos com células musculares lisas vasculares sugerem que esse fator pode tanto ligar-se ao SRF, inativando-o, quanto inibir a transcrição de miocardina^{148,149}. Concomitantemente, descobriu-se que não há expressão significativa de *KLF4* nas células musculares lisas diferenciadas, porém ela é rapidamente induzida *in vitro* e *in vivo* em resposta à ação de PDGF BB, PDGF DD e fosfolípidios oxidados^{148,152}. Assim, a plasticidade do músculo liso seria decorrente da sua propensão em reativar algumas redes gênicas de pluripotência.

Mesmo sem negar a existência da desdiferenciação, o segundo modelo afirma que a plasticidade atribuída às células musculares lisas provém, na realidade, de células-tronco^{153,154}. Sua justificativa reside no facto de que células com conhecido multipotencial de diferenciação encontradas na parede de vasos sanguíneos, sobretudo células-tronco mesenquimais^{155,156}, pericitos^{62,157}, células precursoras endoteliais¹⁵⁸ e células circulantes derivadas da medula óssea¹⁵⁹, podem ser induzidas a expressar marcadores musculares *in vitro* e em modelos de lesão vascular. Portanto, a população tradicionalmente descrita como sintética seria derivada da transformação de um tipo imaturo em progenitor do músculo liso.

A dificuldade para provar este modelo traduz-se nos diversos candidatos a progenitores já identificados nos vasos sanguíneos de diferentes órgãos¹⁶⁰. Apenas na camada adventícia, houve a descrição de, ao menos, três populações que expressavam marcadores de células-tronco mesenquimais com potencial de diferenciação leiomiogênica. Duas agrupadas sob a denominação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo, as quais eram Sca-1⁺ CD31⁻ CD146⁻ mas diferiam pela expressão de CD34¹⁶¹⁻¹⁶³ e

outra formada por células CD31⁻ CD34⁻ CD146⁺, reconhecidas como pericitos¹⁶⁰. Além disso, observou-se que até mesmo células precursoras endoteliais CD31⁺ CD34⁺ CD146⁺ podem apresentar esse potencial¹⁵⁸.

Já no interior da túnica média, dois estudos^{91,164} constataram a capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica, mas não adipogênica, de possíveis progenitores do músculo liso. Mais recentemente, houve a descrição do isolamento de uma pequena população de células indiferenciadas provinda do músculo liso vascular, a qual possuía capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas e neurais¹⁵⁴. Segundo os autores da pesquisa, essa população era Sca-1⁻ CD31⁻ CD34⁻ CD146⁻ e miosina-HC⁻, expressava marcadores de células-tronco mesenquimais e, quando cultivada *in vitro*, transformava-se em células progenitoras do músculo liso¹⁵⁴.

Por razões inerentes ao delineamento deste estudo, não é possível validar qualquer um dos modelos descritos como explicação para a plasticidade observada. Mesmo que os dados aferidos apontem para a existência de um processo de desdiferenciação das culturas, a impossibilidade de isolar células musculares lisas sem contaminação por outros tipos celulares corrói a confiabilidade do conceito de troca fenotípica. Por outro lado, a falta de um marcador específico para o rastreamento de uma eventual população de células-tronco durante o período de cultivo também impede a confirmação desta hipótese.

Contudo, a comparação com as células-tronco derivadas do tecido adiposo periureteral permite algumas inferências sobre a natureza das células musculares cultivadas. As variações nos resultados do ensaio de diferenciação são um indício de que a plasticidade das células isoladas da camada muscular foi independente das células-tronco mesenquimais^{165,166}. Adicionalmente, a análise do seu perfil imunofenotípico revela semelhanças com os relatos de trabalhos prévios que avaliaram o tecido muscular liso vascular^{154,164} e exclui a participação nos resultados de fenótipos expressos por pericitos e células circulantes derivadas da medula óssea.

Devido à escassez de estudos sobre a marcação de células musculares lisas urinárias com CD90, o significado da sua distribuição bimodal é apenas conjectural. A melhor evidência de uma associação entre ambos vem de um artigo que descreveu uma correlação negativa entre a expressão de CD90 e a concentração de soro fetal bovino no meio¹⁶⁷. Embora possível, relacioná-lo a uma população de células-tronco ou progenitora constitui um argumento contestável, visto que, isoladamente, ele não é um marcador específico. Por outro lado, a distribuição em gradiente das populações CD90⁺ e CD90⁻ (Fig.21) pode significar apenas a heterogeneidade de diferenciação que as células musculares lisas exibem em cultura.

PARTE II

Cultura de neotecidos

12. METODOLOGIA

12.1. DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM

Este estudo visa a descrever a integração entre células originadas de tecidos urinários e matrizes temporárias. Ele foi dividido em duas análises, com delineamentos transversais, planejadas para investigar o comportamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo periureteral, células musculares lisas e uroteliais na formação de neotecidos *ex vivo*. Na primeira, houve a comparação entre dois grupos, constituídos por culturas de células-tronco mesenquimais e músculo liso, semeadas individualmente em matrizes temporárias. Planejada como um estudo *quasi*-experimental, ela serviu para verificar a capacidade intrínseca de cada tipo celular para formar um estroma com atributos de músculo liso.

A segunda envolveu o cultivo conjunto de células uroteliais e musculares lisas em matrizes temporárias, com o objetivo de gerar um substituto para a mucosa urotelial. Nela, avaliaram-se a arquitetura dos tecidos formados e o padrão de proliferação celular no momento da aferição. Em ambas as pesquisas, consideraram-se os dados obtidos no estudo das culturas *in vitro* como referência para a estimativa da influência do arcabouço sobre a diferenciação celular.

As células disponíveis para o estudo originaram-se de culturas primárias expandidas *in vitro*, conforme descrito na primeira parte deste trabalho. A amostragem foi por conveniência e compreendeu, ao menos, a metade de cada população disponível. Estabeleceu-se como critério de elegibilidade que as culturas deveriam estar na terceira passagem, a contar do isolamento. Além disso, nos casos em que dois tipos celulares fossem semeados conjuntamente, eles se originariam do mesmo doador.

12.2. MANUFATURA DE MATRIZES TEMPORÁRIAS

A matéria-prima utilizada na produção das matrizes temporárias foi uma mistura de gelatina ($\overline{M}_w=2,5 \times 10^5$ g/mol) (Labsynth) e ácido hialurônico ($\overline{M}_w=1,6 \times 10^6$ g/mol) (Sigma-Aldrich Co.). Previamente ao processo de manufatura, determinou-se que a proporção do glicosaminoglicano, em massa, corresponderia a 2% do soluto. A descrição do processamento dos materiais e a caracterização das matrizes temporárias resultantes se encontram detalhadas em um trabalho prévio do autor¹⁶⁸.

De maneira resumida, os solutos foram dispersos em uma solução de água e etanol, e processados até a obtenção de um substrato poroso. A seguir, ele foi submetido a uma reação de reticulação com 1-etil(3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida (Sigma-Aldrich Co.). Posteriormente, um processo de lavagem com água ultrapura seguido por liofilização transformou o produto reticulado em matrizes temporárias. Elas foram confeccionadas na forma circular, medindo 1 cm de diâmetro e, aproximadamente, 350 μ m de espessura. Antes de serem utilizadas, procedeu-se a sua esterilização com radiação ultravioleta.

12.3. CULTURA DOS NEOTECIDOS

O procedimento para a formação dos neotecidos iniciou pela semeadura das matrizes temporárias com os tipos celulares escolhidos para o estudo. Adotou-se a densidade de 10^5 células por cm^2 de matriz como norma para o cálculo do tamanho de cada população a ser semeada. A técnica de semeadura envolveu a instilação direta de 50 μ L de meio, o qual continha a população celular dispersa, sobre a matriz temporária. Quando houve combinação

de células, determinou-se um período de adesão de 4 horas para as células musculares antes de proceder-se a semeadura das células uroteliais sobre o estroma formado.

No estudo que comparou células-tronco e musculares lisas, utilizou-se como meio de cultura α -MEM suplementado com insulina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, transferrina 5,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e hidrocortisona 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para gerar um substituto para a parede de um órgão urotelial, formulou-se o meio de cultura com uma mistura de α -MEM + F12 + meio para queratinócitos (1:1:1) (v:v:v) suplementado com soro fetal bovino 5%, insulina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, transferrina 5,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e hidrocortisona 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os suplementos foram escolhidos com base na fórmula dos meios de cultura utilizados em estudos similares^{22,169,170}.

O cultivo dos neotecidos ocorreu de forma estática (*i.e.*, sem biorreator) dentro de poços com área aproximada de 8 cm^2 , pelo período de 3 semanas. Eles foram mantidos em estufa com atmosfera controlada: 5% CO_2 , temperatura 37°C e umidade relativa 95%. Determinou-se como frequência para troca dos meios de cultura o intervalo de dois dias. O desenvolvimento das culturas e a possibilidade de contaminação por micro-organismos eram avaliados, via microscopia óptica, antes de cada troca.

12.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Empregou-se a técnica de microscopia eletrônica de varredura com o objetivo de avaliar a conformação da superfície e o tamanho dos poros das matrizes temporárias. Três amostras foram montadas sobre plataformas (*stubs*) e houveram as suas superfícies cobertas com uma nanocamada de ouro. As imagens foram obtidas com o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 5800®. Os parâmetros de aquisição foram: diferença de potencial elétrico aplicado 15 kV e o detector ajustado para a captação dos elétrons retroespalhados.

12.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após o término do período de cultivo, os tecidos formados foram submetidos a processamento histológico. O protocolo iniciou com uma etapa de fixação em formaldeído 4% (v:v) tamponado, seguida por desidratação de etanol a xilol e inclusão em parafina. Posteriormente, procedeu-se a secção dos espécimes, em micrótomo, na espessura de 5 μ m. Os cortes histológicos foram, então, montados em lâminas e desparafinizados. De acordo com a análise pretendida, eles foram corados com hematoxilina e eosina (HE) ou seguiram para imunohistoquímica.

O preparo das lâminas para a técnica imunohistoquímica compreendeu uma etapa de reativação dos antígenos pela imersão das lâminas em tampão citrato a 95°C. Após, os cortes foram permeabilizados com Triton X 0,4% e bloqueados com uma mistura de albumina 1% (m:v) e leite em pó desnatado 5% (m:v). A seguir, procedeu-se a incubação com anticorpos primários, nas diluições descritas na tabela suplementar S1, pelo período aproximado de 12 horas.

O exame da marcação dos anticorpos monoclonais antiqueratina 5 (K5), 7 (K7) e 20 (K20) determinou o grau de diferenciação expresso pelas células uroteliais. Do mesmo modo, verificou-se a diferenciação das células-tronco mesenquimais e musculares lisas com os anticorpos primários monoclonais antialfa-actina de músculo liso (α -actina) e antimiosina de músculo liso (cadeia pesada) (miosina-HC). Os anticorpos secundários eram ligados aos fluoróforos Alexa Fluor® 488 ou 660 e as suas diluições foram padronizadas em 1:250 (v:v). Utilizou-se o corante de DNA Hoechst 33342® como marcador de núcleo celular.

As fotomicrografias das lâminas coradas com HE foram obtidas com o microscópio Zeiss PALM Microbeam®. Para a aquisição das imagens fluorescentes, utilizou-se o microscópio confocal Leica SP5®. Estabeleceu-se que o modo de excitação seria sequencial

e ajustaram-se os detectores de modo que o sinal registrado fosse exclusivo a cada fluoróforo. Considerou-se a marcação de cortes histológicos de ureter normal como controles positivos. Adotou-se como controle negativo cortes histológicos dos neotécidos submetidos ao mesmo processamento, mas sem a incubação com anticorpos primários.

12.6. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

A proliferação das células epiteliais e musculares lisas no modelo de cultura combinado foi mensurada pelo teste da 5-etinil 2'-desoxiuridina (EdU). Ao completarem três semanas de cultivo, os neotécidos foram expostos à concentração de 10 µg/mL de desoxiuridina pelo período de 8 horas. Posteriormente, eles passaram por processamento histológico e cortes representativos do espécime seguiram para análise imunohistoquímica.

O protocolo para a reação de detecção do EdU seguiu as instruções do fabricante e o fluoróforo escolhido foi Alexa Fluor® 647. A identificação das células uroteliais envolveu a marcação conjunta com anticorpo primário antiqueratina 7. Para a avaliação do músculo liso, associou-se o anticorpo primário anti α -actina. Em ambos os casos, utilizou-se o respectivo anticorpo secundário ligado à molécula Alexa Fluor® 488. Os dados foram coletados por microscopia confocal, conforme descrito no item 12.7.

12.7. ANÁLISE DE DADOS E DESFECHOS

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura serviram para caracterizar a estrutura das matrizes temporárias produzidas neste trabalho. Avaliaram-se o padrão de conformação dos agregados de gelatina e ácido hialurônico, a sua espessura e o diâmetro dos poros por eles delimitados. A estimativa da espessura dos agregados e do diâmetro dos poros resultou da medida de 20 segmentos sólidos e 20 áreas vazias (entre os agregados)

amostrados em cada imagem analisada. Utilizou-se o software Image J[®] para as mensurações e os resultados foram apresentados como média aritmética simples com seus respectivos desvios padrão.

Comparação entre MSC e músculo liso

Para efeito de comparação do estroma formado por células-tronco e musculares lisas, considerou-se como o desfecho principal expressão de marcadores de diferenciação muscular. O número de culturas disponíveis determinou o tamanho da amostra. Após três semanas de cultivo, quantificou-se a expressão de α -actina e miosina-HC pela intensidade da fluorescência emitida por cortes histológicos. As medidas obtidas em três secções histológicas transversais, originadas de diferentes pontos do espécime, representaram cada neotecido.

Utilizou-se o microscópio confocal Leica SP5[®] para a aquisição dos dados e o software LAS AF[®] versão 2.6.3 para aferi-los. Como norma, estipulou-se que o fluoróforo Alexa Fluor[®] 488 revelaria a presença de α -actina e o Alexa Fluor[®] 660 de miosina-HC. As imagens foram adquiridas na função *frame averaging* ($n=3$), com objetiva apocromática 40x (NA 1,3) e *pinhole* 65 μm . Estabeleceu-se que os espaçamentos entre as secções do eixo z variariam de 0,8 a 1,0 μm . Os lasers de excitação haviam os comprimentos de onda 488 nm e 633 nm. A detecção dos fótons ocorreu via fotomultiplicadora e a largura das bandas foi limitada aos intervalos de 500 a 550 nm e de 660 a 725 nm. Permitiu-se a variabilidade da diferença de potencial elétrico das fotomultiplicadoras entre 700 e 870 V. Em decorrência, estimou-se¹⁷¹ o coeficiente de variação (σ/μ) da intensidade do sinal entre 20% e 30%.

A média das intensidades de fluorescência de cada secção do eixo z determinou a intensidade da fluorescência da amostra. A intensidade da fluorescência de fundo (*background*) foi computada nos controles negativos e o seu valor foi subtraído do resultado de cada amostra. As diferenças de intensidade entre os grupos foram analisadas pelo teste

T de *student*. Além da diferenciação leiomiogênica, também foram descritas as variações da morfologia celular e do remodelamento da matriz observadas pelas microscopias óptica e confocal.

Cocultura

A observação de características histológicas compatíveis com as exibidas por órgãos uroteliais normais determinou o desfecho principal da análise dos neotecidos formados pela combinação entre células uroteliais e musculares lisas. Os dados se originaram do exame de secções histológicas, por microscopia óptica e confocal, de espécimes com três semanas de cultivo. Os critérios adotados para a caracterização do tecido epitelial formado foram a sua capacidade de estratificação e a expressão das queratinas 5, 7 e 20. Para o estroma, verificou-se a espessura desenvolvida e a expressão de marcadores de músculo liso.

Adicionalmente, avaliou-se o remodelamento da matriz e a proliferação de ambos os tipos celulares. O exame do remodelamento foi descritivo e exploratório. No caso da proliferação, estabeleceu-se que a marcação com K7 definiria a população epitelial e α -actina a estromal. Os resultados foram descritos como a proporção entre o número de células a proliferar e o total de células observadas.

13. RESULTADOS

13.1. CARACTERÍSTICAS DAS POPULAÇÕES

No período compreendido entre outubro de 2014 e agosto de 2015, 6 pares de culturas que satisfizeram os critérios de seleção foram incluídas neste estudo. Elas se originaram de 4 doadores e passaram por, ao menos, dois testes de caracterização descritos na primeira parte do trabalho. Houve a alocação de 3 pares na análise que comparou células-tronco mesenquimais e musculares lisas; e outros 3 na integração entre células musculares e uroteliais. A tabela 3 apresenta as características das culturas selecionadas.

Tabela 3. Características das culturas amostradas

Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico	Culturas
Mas.	29	transplante renal	U, M e T
Mas.	51	transplante renal	U e M
Fem.	40	transplante renal	U, M e T
Fem.	18	exclusão renal	M e T

Mas (masculino), Fem (feminino), U (urotélío), M (músculo liso), T (MSC).

13.2. MATRIZ TEMPORÁRIA

A análise de fotomicrografias revelou que a estrutura das matrizes temporárias era formada por uma trama fibrilar reticulada (Fig.24A). Estimou-se a espessura média das fibras em 1,23 μm (DP 0,48) e o diâmetro médio dos poros em 33,12 μm (DP 13,58). A figura 24B ilustra o aspecto macroscópico de uma matriz em cultura. Adicionalmente, a secção

histológica de uma matriz mantida em meio de cultura mostra que não houve colapamento da estrutura nas condições de uso (Fig.24C).

13.3. FORMAÇÃO DE ESTROMA

A quantificação da expressão média de α -actina no estroma muscular foi 13,60 (DP 4,80), enquanto naquele gerado por células-tronco foi 0,22 (DP 0,24). A análise pelo teste T demonstrou uma diferença significativa entre os tipos celulares $P=0,001$ (IC95% 18,40 a 8,30). Do mesmo modo, os valores médios estimados da expressão de miosina-HC nos estromas criados por células musculares lisas e células-tronco foram, respectivamente, 11,70 (DP 5,50) e 0,10 (DP 0,10). Também houve uma diferença significativa entre as expressões desta variável $P=0,004$ (IC 95% 17,30 a 5,70) (Fig.25 e 26). A figura suplementar S7 mostra os dados obtidos com a quantificação de uma secção histológica.

O estudo histológico de ambos os estromas revelou a existência de características peculiares a cada tipo celular. Nos tecidos formados por células-tronco mesenquimais, observou-se o desenvolvimento de dois fenótipos: o primeiro constituído por células alongadas, cuja distribuição predominou nas regiões superficiais; o segundo caracterizado por células com citoplasma mais eosinofílico e núcleos com cromatina densa, o qual se localizou preferencialmente no interior da matriz (Fig.27).

A maioria das células musculares lisas se organizaram em agrupamentos de células fusiformes. No entanto, em algumas regiões, identificou-se a formação de estruturas elipsoides, as quais continham células com citoplasma claro e vacúolos no seu interior, além de núcleos com cromatina frouxa (Fig.28). Com auxílio de microscopia confocal, a reconstrução de tomos no eixo z revelou que as células no interior dessas estruturas expressavam fracamente α -actina, mas não miosina-HC (Fig.29).

Houve evidências de remodelamento da matriz temporária em ambas as culturas (Fig.28 e 29). Apesar de ser uma análise exploratória, notou-se que a transformação do reticulado original da matriz manufaturada foi maior nos tecidos formados por células-tronco mesenquimais. Como exemplo comparativo, a figura 30 mostra a síntese de fibronectina em estromas constituídos por MSCs e musculares lisas.

13.4. COCULTURA

O exame das secções histológicas após 3 semanas de cultivo mostrou que houve a formação de um estrato epitelial sobre o estroma muscular (Fig.31). Observou-se uma organização do epitélio em até duas camadas e as células uroteliais exibiram variações de morfologia, com o predomínio de formas alongadas (Fig.33). A manipulação dos neotecidos revelou imaturidade na interface epitélio-estromal, assinalada pela facilidade em rompê-la durante o processamento histológico. A expressão urotelial da K7 foi ubíqua e identificou-se a presença conjunta de K5 na maioria das células analisadas (Fig.33). No entanto, não houve marcação pela K20.

A análise das imagens do tecido muscular formado permitiu a sua divisão em duas regiões (Fig.31). Uma camada superficial, cuja espessura variou entre 100 e 200 μm , caracterizada por células com morfologia relativamente uniforme e remodelamento completo da matriz temporária. Abaixo dela, observou-se uma segunda região, a qual engloba o restante do produto, constituída por células esparsas e onde não se verifica um remodelamento significativo da matriz original. Com base nas fotomicrografias obtidas, estimou-se a taxa de proliferação de ambos os tipos celulares entre 2% e 7% (Fig.32 e 34).

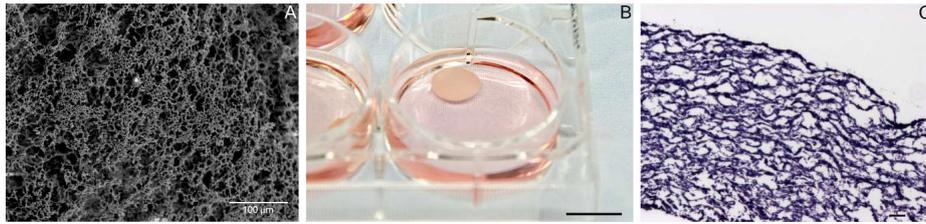


Figura 24. Caracterização da matriz manufaturada. (A) Imagem de microscopia eletrônica de varredura com escala de 100 µm. (B) Ambiente de cultivo com escala de 1 cm. (C) Corte histológico da matriz corado com HE e escala de 50 µm.

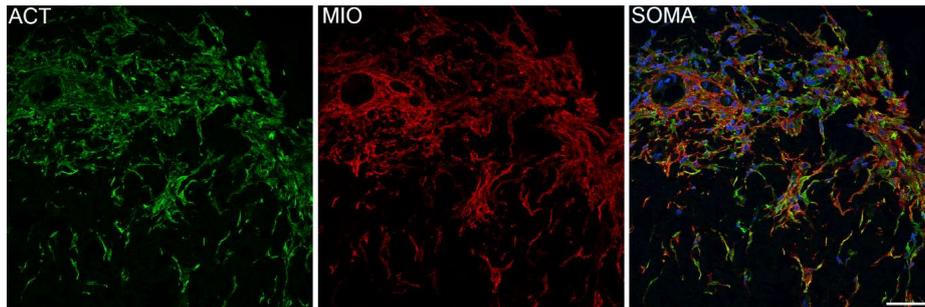


Figura 25. Imunohistoquímica de estroma formado por células musculares lisas. (ACT) Marcação com anticorpo contra α -actina (verde). (MIO) Anticorpo contra miosina-HC (rubro). (SOMA) Soma de imagens. Núcleos identificados com Hoechst 33342® (azul). Escala 50 µm.

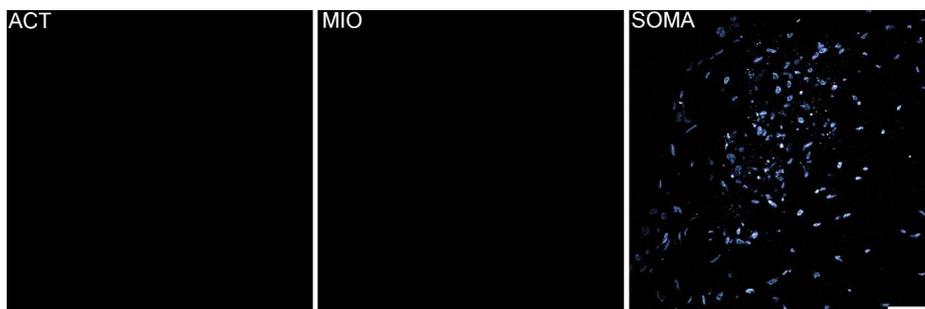


Figura 26. Imunohistoquímica de estroma formado por MSCs. (ACT) Marcação com anticorpo contra α -actina. (MIO) Anticorpo contra miosina-HC. (SOMA) Soma de imagens. Núcleos identificados com Hoechst 33342® (azul). Escala 50 µm.

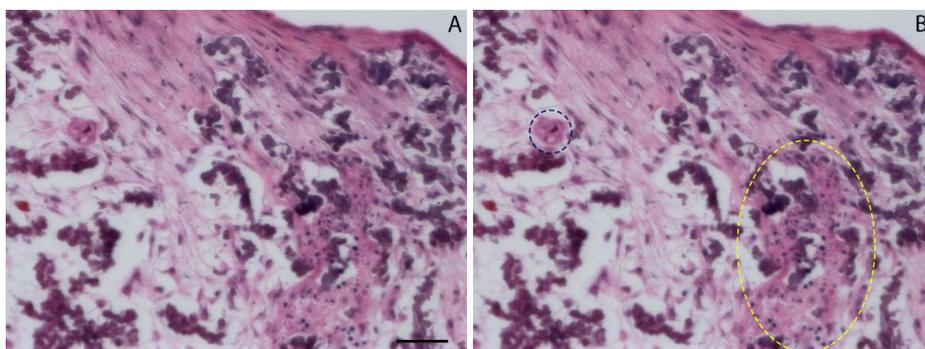


Figura 27. Fotomicrografia do estroma formado por MSCs corado com HE. (A) Imagem original. (B) Regiões com fenótipo heterogêneo demarcadas por elipses. Escala 50 µm.

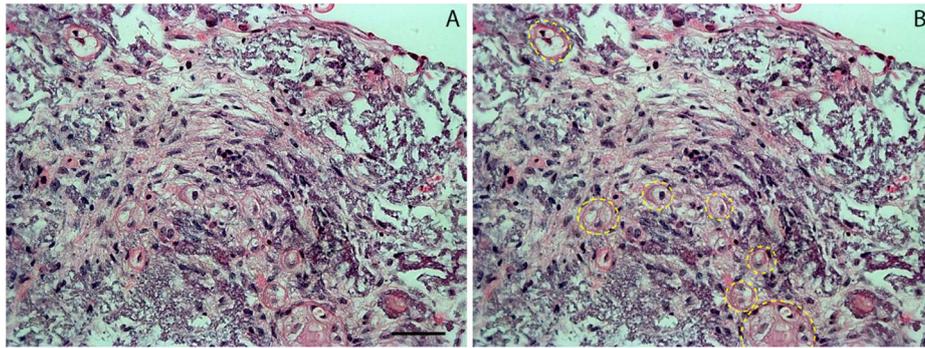


Figura 28. Fotomicrografia do estroma formado por células musculares lisas corado com HE. (A) Imagem original. (B) Regiões com fenótipo heterogêneo demarcadas por elipses. Escala 50 μm .

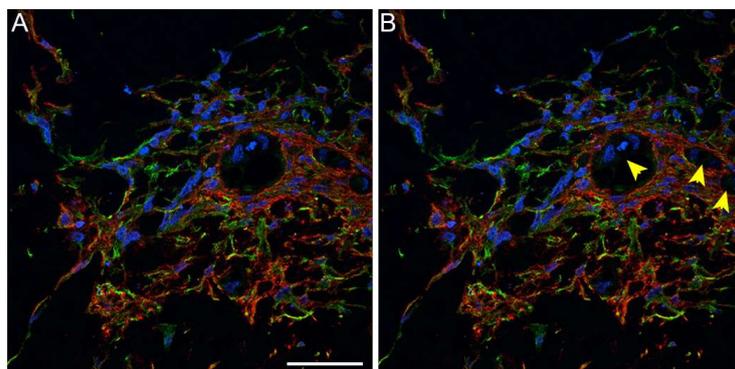


Figura 29. Caracterização das regiões heterogêneas do estroma muscular liso. (A) Imagem de microscopia confocal que mostra a imunomarcagem com α -actina (verde) e miosina (rubro). (B) Setas indicam aglomerados celulares com discreta expressão de α -actina. Escala 50 μm .

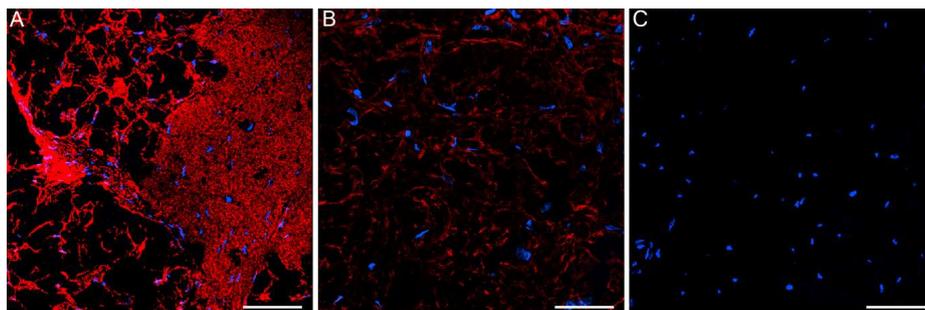


Figura 30. Imunohistoquímica para fibronectina. (A) Marcação com anticorpo contra fibronectina (rubro) no estroma formado por MSCs. (B) Expressão de fibronectina (rubro) no estroma muscular liso. (C) Controle negativo. Núcleos identificados com Hoechst 33342[®] (azul). Escala 50 μm .

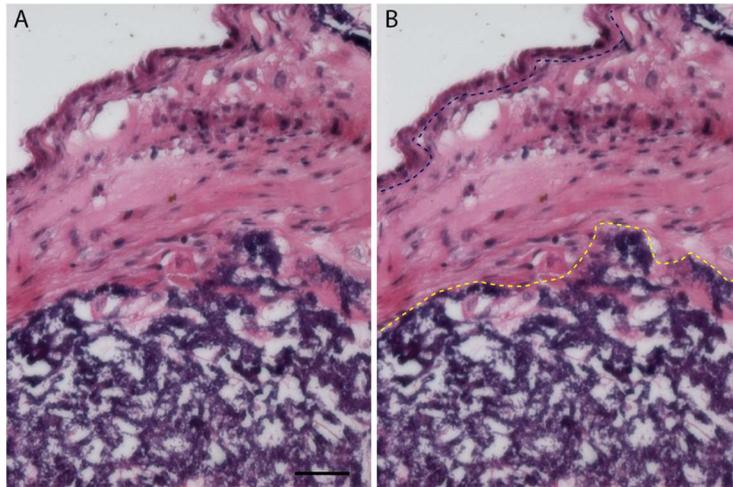


Figura 31. Secção de cocultura urotélio-músculo liso corada com HE. (A) Imagem original. (B) Imagem modificada: identificação das células uroteliais acima da linha azul. Linha amarela separa as regiões de alta e baixa celularidade. Escala 50 μ m.

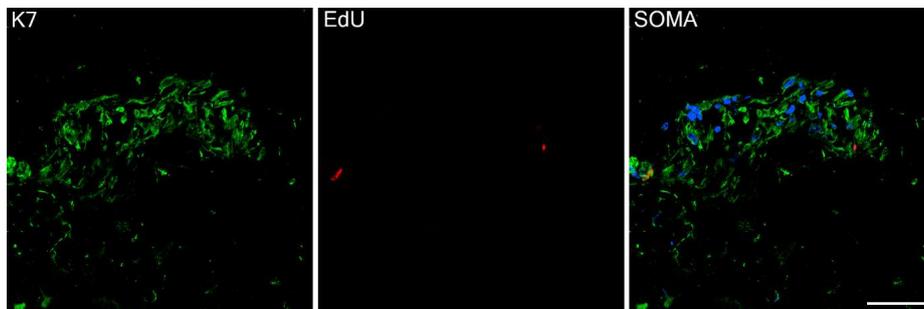


Figura 32. Proliferação das células uroteliais na matriz temporária. (K7) Imunomarcção para queratina 7 (verde). (EdU) Captação de EdU pelas células em processo de proliferação (rubro). (SOMA) Soma de imagens. Escala 50 μ m. Nota: artefatos decorrentes do processamento histológico.

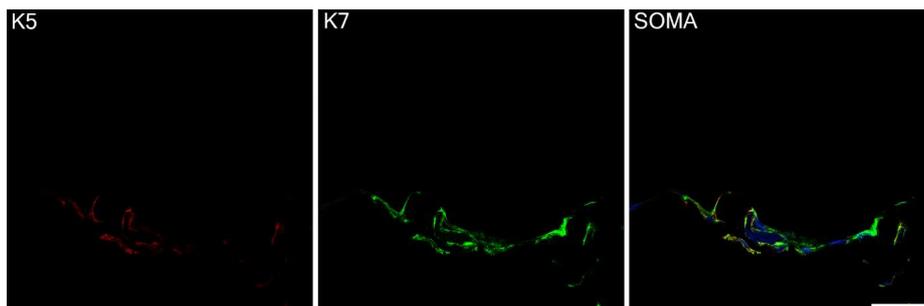


Figura 33. Expressão de queratinas pelas células uroteliais cultivadas sobre a matriz temporária. (K5) Queratina 5 (rubro). (K7) Queratina 7 (verde). (SOMA) Soma de imagens. Escala 50 μ m. Nota: artefatos decorrentes do processamento histológico.



Figura 34. Proliferação das células musculares lisas na matriz temporária. (ACT) α -actina (verde). (EdU) Captação de EdU pelas células em processo de proliferação (rubro). (SOMA) Soma de imagens. Escala 50 μ m.

14. DISCUSSÃO

A engenharia tecidual pode ser compreendida como a manipulação de três processos - cultura celular, produção do arcabouço e integração entre ambos - com a finalidade de produzir um tecido análogo ao natural. Ao valer-se da diferenciação como representante do fenótipo celular, a investigação anterior demonstrou que o cultivo *in vitro* altera decisivamente o caráter das populações primordiais. Por essa razão, o presente estudo utilizou técnicas histológicas e de microscopia para verificar se a interação das células expandidas com o modelo de matriz desenvolvido pôde restaurar seus fenótipos originais.

Embora a impossibilidade de simular todas as condições inerentes ao tecido natural limite o grau de maturação que os neotecidos podem alcançar fora do organismo, os resultados obtidos mostraram que o modelo proposto restituiu uma parte considerável das características perdidas durante o processo de expansão. De facto, verificou-se que a exposição das células musculares lisas ao novo ambiente resultou na reativação do marcador de seu fenótipo contrátil. Por outro lado, a integração do urotélio expandido ao estroma gerou um epitélio com atributos semelhantes à camada de células basais.

No arcabouço, o fenótipo celular está sujeito a estímulos provenientes da própria matriz, do meio circundante e da comunicação com outras células¹⁷². Devido a essa

complexidade de interações, vários fatores podem influenciar as correlações encontradas e, por consequência, confundir as conclusões do estudo. Dessa forma, para serem validadas, elas exigem o exame das particularidades do método de produção tecidual adotado. Como o perfil das populações celulares já foi definido previamente, discriminar os atributos da matriz temporária constitui o primeiro passo para a interpretação dos resultados.

Simular a dinâmica da matriz extracelular com um arcabouço manufaturado é um dos maiores desafios tecnológicos para a produção de tecidos *ex vivo*¹⁷³. Muito além de um papel estrutural, a sofisticação da matriz natural se reflete na diversidade de funções por ela exercidas, as quais abrangem desde as propriedades físico-químicas do microambiente até a modulação do comportamento celular^{174,175}. Assim, o planejamento de um substituto deve considerar questões relativas à interação celular, transporte de solutos e remodelamento do constructo¹⁷⁶.

Apesar de a necessidade de um substrato tridimensional para a gênese do neotecido ser consensual, há um grande debate sobre a importância relativa de aspectos da sua estrutura e composição para o sucesso do processo^{177,178}. Com efeito, ao analisar a variedade de materiais e técnicas de fabricação já descritos na literatura, torna-se evidente que ambas as variáveis podem modificá-lo¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Por essa razão, evitou-se adicionar ao sistema os efeitos de materiais sintéticos e novas conformações moleculares com a utilização de matérias-primas derivadas da própria matriz extracelular natural. Logo, a partir de uma base de colágeno e glicosaminoglicano, desenvolveu-se uma estrutura fibrilar, reticulada aleatoriamente, com o intento de favorecer o reconhecimento celular e o remodelamento da matriz.

Em laboratório, a indução do fenótipo contrátil no músculo liso demanda o controle de elementos do ambiente de cultivo. A revisão de trabalhos já publicados indica que as estratégias mais eficientes para alcançá-lo podem ser resumidas na formulação de um meio livre de soro acrescido de algum fator indutor¹⁶⁹. Apesar de haver variabilidade no grau de sucesso entre eles, é possível encontrar evidências de, ao menos, quatro agentes capazes de

promover a expressão de marcadores associados à função contrátil: TGF β ₁ (*transforming growth factor β ₁*)^{169,181}, IGF (*insulin-like growth fator*)¹⁸², insulina¹⁷⁰ e ácido ascórbico¹⁸³. Após considerar os efeitos da privação do soro sobre a proliferação celular e a produção de matriz extracelular natural, elegeu-se a combinação de insulina e ácido ascórbico como suplemento para o meio em questão.

Estabelecidos os parâmetros das culturas, a flagrante divergência fenotípica entre os estromas formados por células-tronco mesenquimais e musculares lisas conduziu o estudo a um paradoxo de difícil interpretação. Se a diferenciação celular pode ser compreendida como um processo de regulação cujo objetivo é manter estável a expressão de um conjunto específico de genes, por que dois tipos celulares indiferenciados, ainda que com graduações distintas, não seguiriam a mesma linhagem sob estímulos ambientais idênticos?

Pesquisas anteriores revelaram que a ação da insulina sobre a diferenciação do músculo liso está associada ao aumento da atividade das vias Rho e IP3K (*inositol triphosphate 3-kinase*)¹⁷⁰, porém não há confirmação se elas produziram uma expressão gênica similar nas células-tronco mesenquimais. Por sua vez, o ácido ascórbico está relacionado à diferenciação leiomiogênica de células-tronco derivadas do tecido adiposo¹⁸⁴ e musculares lisas¹⁸¹, mas, aparentemente, seu efeito sobre a expressão gênica é maior que sobre a proteica.

Conquanto o delineamento proposto não permita resolver o conflito gerado pela incongruência dos resultados, o escrutínio de estudos que produziram estromas a partir da diferenciação leiomiogênica de células-tronco mesenquimais indicou a preferência de seus autores pela indução com TGF β ₁¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Acredita-se que a sua multiplicidade de ações, as quais abrangem desde a inibição de fatores de pluripotência¹¹¹ até o favorecimento da atuação do complexo SRF^{111,188}, conferem-lhe o maior potencial diferenciador entre os agentes indutores¹⁶⁹. Embasado nesse argumento, é plausível supor que a hipótese de memória de linhagem possa estar envolvida na diferença de desfechos.

Além dos aspectos da diferenciação já comentados, a avaliação microscópica dos estromas revelou regiões com fenótipos heterogêneos ao restante do espécime. Tais alterações não foram investigadas a posteriori, portanto, quaisquer explicações para os seus significados não passam de proposições. Ao analisá-las no estroma muscular liso, foi possível identificar agrupamentos celulares com três atributos comuns: tendência de organização em estruturas elipsoides circundadas por células musculares lisas maduras; baixa expressão de marcadores contráteis; e a presença de vacúolos ou áreas vazias. Mesmo que questionamentos sobre a linhagem das células pouco diferenciadas e a existência de um processo de autofagia¹⁸⁹ possam levar a conclusões diversas, é curioso como, em conjunto, esses atributos lembram a formação de um lúmen.

No caso do estroma constituído por células-tronco mesenquimais, a discussão se concentra na probabilidade de as regiões heterogêneas serem o resultado de uma diferenciação inesperada ou de um processo isquêmico. Se por um lado relatos sobre a instabilidade de células-tronco para manterem a diferenciação induzida *in vitro* explicariam as variações aferidas¹⁹⁰, a sua grande habilidade para a síntese de matriz extracelular (Fig.30) poderia resultar em sofrimento tecidual. Estudos sugerem que a superprodução de certas proteínas de matriz, particularmente fibronectina, tornariam o ambiente mais permissivo à colonização e levariam à formação de nichos¹⁹¹⁻¹⁹⁴. No entanto, na ausência de forças convectivas, o impedimento estérico gerado pela sua deposição limitaria a difusividade de solutos através do arcabouço¹⁹⁵, uma condição propícia à isquemia.

A despeito das vicissitudes encontradas durante a formação de estromas, a tentativa de recapitular o contexto biológico de um órgão urinário em uma matriz temporária representou o maior desafio enfrentado por este estudo. Realmente, o acréscimo de complexidade determinado pelo cocultivo de urotélio e músculo liso demandou a otimização de vários elementos do processo, como os componentes do meio, proporção entre os tipos celulares, forma de semeadura e tempo para diferenciação. Por essa razão, a análise dos espécimes se restringiu à descrição das suas características histológicas, já que a mudança

de parâmetros ambientais impede a comparação honesta entre os estromas com e sem a influência das células uroteliais.

Pesquisas *in vivo* mostraram que as interações recíprocas entre o epitélio e a camada muscular são essenciais para o estabelecimento da morfologia¹⁹⁶ e para a promoção da regeneração dos órgãos urinários⁴². De modo similar, há evidências que a integração de culturas epiteliais e estromais implica vantagens para o estado de diferenciação e sobrevivência celulares, as quais se refletem na funcionalidade dos neotécidos¹⁹⁷. A partir dessas informações, pode-se interpretar a tendência de desenvolvimento estromal sob o urotélio e os sinais de epitelização como um indício de comunicação entre os dois tipos celulares.

Estabelecida a viabilidade da cocultura, o objetivo central da pesquisa deslocou-se para a restauração da diferenciação celular original. Neste aspecto, os dados coletados mostraram que o modelo executado favoreceu o desenvolvimento dos tecidos de maneira desigual. Enquanto houve grande expansão da camada muscular lisa, com alguns sinais de diferenciação terminal (dado não mostrado), o urotélio exibiu características de um estrato basal incipiente. Pesquisadores já demonstraram a factibilidade de induzir a estratificação urotelial *in vitro* via manipulação das condições ambientais¹⁹⁸⁻²⁰¹. Contudo, o mesmo efeito não pôde ser reproduzido neste estudo.

Uma possível explicação para esse resultado está na falta de estabilidade do urotélio. Os sinais de fragilidade epitelial e proliferação celular são um indício de que a formação do tecido ainda estava em curso no momento da análise. Como comparação, a tentativa de criar substitutos para pele revelou que a epiderme pode demorar até doze semanas para atingir um estado de homeostasia tecidual em cultura²⁰². Assim, a determinação de um regime mais eficiente para restaurar a diferenciação de células derivadas de tecidos urinários constitui um conhecimento crítico para o futuro da pesquisa nesta área.

15. CONCLUSÃO

Este estudo desenvolveu uma estratégia para acompanhar as variações na diferenciação de células uroteliais e musculares lisas durante o processo de engenharia de tecidos urinários. Seus resultados demonstraram que o procedimento de expansão em superfícies plásticas alterou significativamente as características celulares originais via seleção de subpopulações e indução de modificações fenotípicas. Como consequência, o urotélio adquiriu atributos hiperplásicos, enquanto o músculo liso transformou-se em um tipo celular imaturo.

O protótipo de matriz temporária fabricado mostrou-se adequado para suportar a formação de tecidos no ambiente *ex vivo*. Ao utilizá-lo como substrato, foi possível recuperar o fenótipo contrátil das células musculares lisas pela adição de insulina e ácido ascórbico ao meio, embora o mesmo procedimento não tenha sido eficaz para induzir a diferenciação leiomiogênica de células-tronco mesenquimais. Finalmente, estabeleceu-se um modelo para a formação de um substituto para a mucosa urotelial via cocultivo de células uroteliais e musculares lisas. A restauração parcial da diferenciação original, sobretudo do urotélio, é um indicativo do tamanho do desafio tecnológico que representa a gênese de neotecidos funcionais.

16. BIBLIOGRAFIA

- 1 Pannek, J. & Senge, T. History of urinary diversion. *Urologia Internationalis* **60**, 1-10 (1998).
- 2 Tonelli, M. *et al.* Systematic Review: Kidney Transplantation Compared With Dialysis in Clinically Relevant Outcomes. *American Journal of Transplantation* **11**, 2093-2109 (2011).
- 3 Gleeson, M. J. & Griffith, D. P. The use of alloplastic biomaterials in bladder substitution. *Journal of Urology* **148**, 1377-1382 (1992).
- 4 Schaefer, M., Kaiser, A., Stehr, M. & Beyer, H. J. Bladder augmentation with small intestinal submucosa leads to unsatisfactory long-term results. *Journal of Pediatric Urology* **9**, 878-883 (2013).
- 5 Vacanti, J. P. & Langer, R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354**, S132-S134 (1999).
- 6 Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J. & Retik, A. B. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* **367**, 1241-1246 (2006).
- 7 Raya-Rivera, A. *et al.* Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. *Lancet* **377**, 1175-1182 (2011).
- 8 Harma, V. *et al.* A Comprehensive Panel of Three-Dimensional Models for Studies of Prostate Cancer Growth, Invasion and Drug Responses. *Plos One* **5**, 1-17 (2010).
- 9 Kreft, M. E., Hudoklin, S., Jezernik, K. & Romih, R. Formation and maintenance of blood-urine barrier in urothelium. *Protoplasma* **246**, 3-14 (2010).
- 10 Apodaca, G. The uroepithelium: Not just a passive barrier. *Traffic* **5**, 117-128 (2004).
- 11 Birder, L. & Andersson, K. E. Urothelial signaling. *Physiological Reviews* **93**, 653-680 (2013).
- 12 Khandelwal, P., Abraham, S. N. & Apodaca, G. Cell biology and physiology of the uroepithelium. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **297**, F1477-F1501 (2009).
- 13 Lewis, S. A. Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **278**, F867-F874 (2000).
- 14 Lavelle, J. *et al.* Bladder permeability barrier: recovery from selective injury of surface epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **283**, F242-F253 (2002).
- 15 Yamany, T., Van Batavia, J. & Mendelsohn, C. Formation and regeneration of the urothelium. *Current Opinion in Organ Transplantation* **19**, 323-330 (2014).
- 16 Truschel, S. T. *et al.* Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Molecular Biology of the Cell* **13**, 830-846 (2002).
- 17 Elliott, A. Y., Stein, N. & Fraley, E. E. Technique for cultivation of transitional epithelium from mammalian urinary-bladder. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* **11**, 251-254 (1975).
- 18 Chlapowski, F. J. & Haynes, L. Growth and differentiation of transitional epithelium invitro. *Journal of Cell Biology* **83**, 605-614 (1979).
- 19 Kirk, D. *et al.* Selective growth of normal adult human urothelial cells in serum-free medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **21**, 165-171 (1985).
- 20 Reznikoff, C. A., Johnson, M. D., Norback, D. H. & Bryan, G. T. Growth and characterization of normal human urothelium in vitro. *In Vitro-Journal of the Tissue Culture Association* **19**, 326-343 (1983).
- 21 Southgate, J., Hutton, K. A. R., Thomas, D. F. M. & Trejdosiewicz, L. K. Methods in laboratory investigation - normal human urothelial cells in-vitro - proliferation and induction of stratification. *Laboratory Investigation* **71**, 583-594 (1994).
- 22 Takagi, R. *et al.* Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **5**, E63-E73 (2011).

- 23 Cilento, B. G., Freeman, M. R., Schneck, F. X., Retik, A. B. & Atala, A. Phenotypic and cytogenetic characterization of human bladder urothelia expanded in-vitro. *Journal of Urology* **152**, 665-670 (1994).
- 24 Habuka, M. *et al.* The urinary bladder transcriptome and proteome defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *Plos One* **10** (2015).
- 25 Kreft, M. E., Romih, R. & Sterle, M. Antigenic and ultrastructural markers associated with urothelial cytodifferentiation in primary explant outgrowths of mouse bladder. *Cell Biology International* **26**, 63-74 (2002).
- 26 Wu, X. R., Kong, X. P., Pellicer, A., Kreibich, G. & Sun, T. T. Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. *Kidney International* **75**, 1153-1165 (2009).
- 27 Hu, P. *et al.* Role of membrane proteins in permeability barrier function: uroplakin ablation elevates urothelial permeability. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **283**, F1200-F1207 (2002).
- 28 Wu, X. R. *et al.* Mammalian uroplakins - a group of highly conserved urothelial differentiation-related membrane-proteins. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 13716-13724 (1994).
- 29 Sun, T. T. Altered phenotype of cultured urothelial and other stratified epithelial cells: implications for wound healing. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **291**, F9-F21 (2006).
- 30 Bragulla, H. H. & Homberger, D. G. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *Journal of Anatomy* **214**, 516-559 (2009).
- 31 Southgate, J., Harnden, P. & Trejdosiewicz, L. K. Cytokeratin expression patterns in normal and malignant urothelium: a review of the biological and diagnostic implications. *Histology and Histopathology* **14**, 657-664 (1999).
- 32 Erman, A., Veranic, P., Psenicnik, M. & Jezernik, K. Superficial cell differentiation during embryonic and postnatal development of mouse urothelium. *Tissue & Cell* **38**, 293-301 (2006).
- 33 Alonso, A., Ikinge, U. & Kartenbeck, J. Staining patterns of keratins in the human urinary tract. *Histology and Histopathology* **24**, 1425-1437 (2009).
- 34 Veranic, P., Romih, R. & Jezernik, K. What determines differentiation of urothelial umbrella cells? *European Journal of Cell Biology* **83**, 27-34 (2004).
- 35 Kurzrock, E. A., Lieu, D. K., deGraffenried, L. A., Chan, C. W. & Isseroff, R. R. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **294**, F1415-F1421 (2008).
- 36 Romih, R., Koprivec, D., Martincic, D. S. & Jezernik, K. Restoration of the rat urothelium after cyclophosphamide treatment. *Cell Biology International* **25**, 531-537 (2001).
- 37 Feil, G. *et al.* Immunoreactivity of p63 in monolayered and in vitro stratified human urothelial cell cultures compared with native urothelial tissue. *European Urology* **53**, 1066-1073 (2008).
- 38 Pignon, J. C. *et al.* p63-expressing cells are the stem cells of developing prostate, bladder, and colorectal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 8105-8110 (2013).
- 39 Xin, L., Lukacs, R. U., Lawson, D. A., Cheng, D. H. & Witte, O. N. Self-renewal and multilineage differentiation in vitro from murine prostate stem cells. *Stem Cells* **25**, 2760-2769 (2007).
- 40 Cheng, W. *et al.* Delta Np63 plays an anti-apoptotic role in ventral bladder development. *Development* **133**, 4783-4792 (2006).
- 41 Caserta, T. M. *et al.* p63 overexpression induces the expression of sonic hedgehog. *Molecular Cancer Research* **4**, 759-768 (2006).
- 42 Shin, K. *et al.* Hedgehog/Wnt feedback supports regenerative proliferation of epithelial stem cells in bladder. *Nature* **472**, 110-U145 (2011).
- 43 Colopy, S. A., Bjorling, D. E., Mulligan, W. A. & Bushman, W. A Population of Progenitor Cells in the Basal and Intermediate Layers of the Murine Bladder Urothelium Contributes to Urothelial Development and Regeneration. *Developmental Dynamics* **243**, 988-998 (2014).
- 44 Gandhi, D. *et al.* Retinoid Signaling in Progenitors Controls Specification and Regeneration of the Urothelium. *Developmental Cell* **26**, 469-482 (2013).

- 45 Van Batavia, J. *et al.* Bladder cancers arise from distinct urothelial sub-populations. *Nature Cell Biology* **16**, 982-991 (2014).
- 46 Andersson, K. E. & Arner, A. Urinary bladder contraction and relaxation: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* **84**, 935-986 (2004).
- 47 Chamleycampbell, J., Campbell, G. R. & Ross, R. Smooth-Muscle cell in culture. *Physiological Reviews* **59**, 1-61 (1979).
- 48 Somlyo, A. P. & Somlyo, A. V. Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: Modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiological Reviews* **83**, 1325-1358 (2003).
- 49 Babu, G. J., Warshaw, D. M. & Periasamy, M. Smooth muscle myosin heavy chain isoforms and their role in muscle physiology. *Microscopy Research and Technique* **50**, 532-540 (2000).
- 50 Boopathi, E. *et al.* Mechanical stretch upregulates proteins involved in Ca²⁺ sensitization in urinary bladder smooth muscle hypertrophy. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **307**, C542-C553 (2014).
- 51 Fry, C. H., Meng, E. & Young, J. S. The physiological function of lower urinary tract smooth muscle. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* **154**, 3-13 (2010).
- 52 Patel, C. A. & Rattan, S. Spontaneously tonic smooth muscle has characteristically higher levels of RhoA/ROK compared with the phasic smooth muscle. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291**, G830-G837 (2006).
- 53 Szymanski, P. T., Chacko, T. K., Rovner, A. S. & Goyal, R. K. Differences in contractile protein content and isoforms in phasic and tonic smooth muscles. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **275**, C684-C692 (1998).
- 54 Owens, G. K., Kumar, M. S. & Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews* **84**, 767-801 (2004).
- 55 Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annual Review of Physiology* **74**, 13-40 (2012).
- 56 Vandekerckhove, J. & Weber, K. Complete amino-acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal-muscle, and rabbit slow skeletal-muscle - protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation* **14**, 123-133 (1979).
- 57 Khaitlina, S. Y. Functional specificity of actin isoforms. *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol. 202* **202**, 35-98 (2001).
- 58 Miwa, T. *et al.* Structure, chromosome location, and expression of the human smooth-muscle (enteric type) gamma-actin gene - evolution of 6 human actin genes. *Molecular and Cellular Biology* **11**, 3296-3306 (1991).
- 59 Owens, G. K., Loeb, A., Gordon, D. & Thompson, M. M. Expression of smooth-muscle specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth-muscle cells - relationship between growth and cytodifferentiation. *Journal of Cell Biology* **102**, 343-352 (1986).
- 60 Owens, G. K. & Thompson, M. M. Developmental-changes in isoactin expression in rat aortic smooth-muscle cells *in vivo* - relationship between growth and cytodifferentiation. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 3373-3380 (1986).
- 61 Chaponnier, C. & Gabbiani, G. Pathological situations characterized by altered actin isoform expression. *Journal of Pathology* **204**, 386-395 (2004).
- 62 Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313 (2008).
- 63 Dewar, R., Fadare, O., Gilmore, H. & Gown, A. M. Best Practices in Diagnostic Immunohistochemistry Myoepithelial Markers in Breast Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **135**, 422-429 (2011).
- 64 Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R. A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 349-363 (2002).

- 65 Szucsik, J. C., Lewis, A. G., Marmer, D. J. & Lessard, J. L. Urogenital tract expression of enhanced green fluorescent protein in transgenic mice driven by a smooth muscle-gamma-actin promoter. *Journal of Urology* **171**, 944-949 (2004).
- 66 Qian, J., Kumar, A., Szucsik, J. C. & Lessard, J. L. Tissue and developmental specific expression of murine smooth muscle gamma-actin fusion genes in transgenic mice. *Developmental Dynamics* **207**, 135-144 (1996).
- 67 Hoggatt, A. M., Simon, G. M. & Herring, B. P. Cell-specific regulatory modules control expression of genes in vascular and visceral smooth muscle tissues. *Circulation Research* **91**, 1151-1159 (2002).
- 68 Gabbiani, G. *et al.* Vascular smooth-muscle cells differ from other smooth-muscle cells - predominance of vimentin filaments and a specific alpha-type actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **78**, 298-302 (1981).
- 69 Assinder, S. J., Stanton, J. A. L. & Prasad, P. D. Transgelin: An actin-binding protein and tumour suppressor. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 482-486 (2009).
- 70 Miano, J. M. & Olson, E. N. Expression of the smooth muscle cell calponin gene marks the early cardiac and smooth muscle cell lineages during mouse embryogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 7095-7103 (1996).
- 71 Li, L., Miano, J. M., Cserjesi, P. & Olsen, E. N. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circulation Research* **78**, 188-195 (1996).
- 72 Li, L., Miano, J. M., Mercer, B. & Olson, E. N. Expression of the SM22 alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* **132**, 849-859 (1996).
- 73 Zhang, J. C. L. *et al.* Analysis of SM22 alpha-deficient mice reveals unanticipated insights into smooth muscle cell differentiation and function. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 1336-1344 (2001).
- 74 Frid, M. G., Shekhonin, B. V., Koteliansky, V. E. & Glukhova, M. A. Phenotypic changes of human smooth-muscle cells during development - late expression of heavy caldesmon and calponin. *Developmental Biology* **153**, 185-193 (1992).
- 75 Long, X. C. *et al.* Smooth muscle calponin an unconventional CARG-dependent gene that antagonizes neointimal formation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **31**, 2172-U2155 (2011).
- 76 Wang, C. L. A. in *Tropomyosin* Vol. 644 *Advances in Experimental Medicine and Biology* (ed P. Gunning) 250-272 (2008).
- 77 Sobue, K., Hayashi, K. & Nishida, W. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry* **190**, 105-118 (1999).
- 78 Rensen, S., Merckx, G., Doevendans, P., van Kessel, A. G. & van Eys, G. Structure and chromosome location of Smtn, the mouse smoothelin gene. *Cytogenetics and Cell Genetics* **89**, 225-229 (2000).
- 79 Rensen, S. S. M. *et al.* Contribution of serum response factor and myocardin to transcriptional regulation of smoothelins. *Cardiovascular Research* **70**, 136-145 (2006).
- 80 vanderLoop, F. T. L., Schaart, G., Timmer, E. D. J., Ramaekers, F. C. S. & vanEys, G. Smoothelin, a novel cytoskeletal protein specific for smooth muscle cells. *Journal of Cell Biology* **134**, 401-411 (1996).
- 81 Rensen, S. S. M. *et al.* Expression of the smoothelin gene is mediated by alternative promoters. *Cardiovascular Research* **55**, 850-863 (2002).
- 82 Nguyen, A. T. *et al.* Smooth muscle cell plasticity fact or fiction? *Circulation Research* **112**, 17-22 (2013).
- 83 Miano, J. M., Cserjesi, P., Ligon, K. L., Periasamy, M. & Olson, E. N. Smooth-muscle myosin heavy-chain exclusively marks the smooth-muscle lineage during mouse embryogenesis. *Circulation Research* **75**, 803-812 (1994).

- 84 Lee, M. Y. *et al.* Smooth muscle cell genome browser: Enabling the identification of novel serum response factor target genes. *Plos One* **10** (2015).
- 85 Nelander, S., Mostad, P. & Lindahl, P. Prediction of cell type-specific gene modules: Identification and initial characterization of a core set of smooth muscle-specific genes. *Genome Research* **13**, 1838-1854 (2003).
- 86 McDonald, O. G., Wamhoff, B. R., Hoofnagle, M. H. & Owens, G. K. Control of SRF binding to CArG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **116**, 36-48 (2006).
- 87 Gomez, D., Shankman, L. S., Nguyen, A. T. & Owens, G. K. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nature Methods* **10**, 171-177 (2013).
- 88 Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J. & Campbell, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **49**, 130-145 (2001).
- 89 Nemenoff, R. A. *et al.* Sdf-1 alpha induction in mature smooth muscle cells by inactivation of pten is a critical mediator of exacerbated injury-induced neointima formation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **31**, 1300-U1138 (2011).
- 90 Levin, R. M. *et al.* Obstructive response of human bladder to BPH vs. rabbit bladder response to partial outlet obstruction: A direct comparison. *Neurourology and Urodynamics* **19**, 609-629 (2000).
- 91 Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation Research* **104**, 733-U765 (2009).
- 92 Bentzon, J. F., Sondergaard, C. S., Kassem, M. & Falk, E. Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* **116**, 2053-2061 (2007).
- 93 Schiffrin, E. L. Effects of antihypertensive drugs on vascular remodeling: do they predict outcome in response to anti hypertensive therapy? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* **10**, 617-624 (2001).
- 94 Ziegler, M. G., Mills, P. & Dimsdale, J. E. Hypertensives pressor-response to norepinephrine - analysis by infusion rate and plasma-levels. *American Journal of Hypertension* **4**, 586-591 (1991).
- 95 Andreeva, E. R., Pugach, I. M. & Orekhov, A. N. Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro. *Atherosclerosis* **135**, 19-27 (1997).
- 96 Damera, G., Tliba, O. & Panettieri, R. A. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* **22**, 353-359 (2009).
- 97 Golder, M. *et al.* Smooth muscle cholinergic denervation hypersensitivity in diverticular disease. *Lancet* **361**, 1945-1951 (2003).
- 98 Mack, C. P. & Owens, G. K. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circulation Research* **84**, 852-861 (1999).
- 99 Manabe, I. & Owens, G. K. CArG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 823-834 (2001).
- 100 Miano, J. M. Role of serum response factor in the pathogenesis of disease. *Laboratory Investigation* **90**, 1274-1284 (2010).
- 101 Shore, P. & Sharrocks, A. D. The transcription factors elk-1 and serum response factor interact by direct protein-protein contacts mediated by a short region of elk-1. *Molecular and Cellular Biology* **14**, 3283-3291 (1994).
- 102 Zhou, J. L., Hu, G. Q. & Herring, B. P. Smooth muscle-specific genes are differentially sensitive to inhibition by Elk-1. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9874-9885 (2005).
- 103 Wang, Z. G. *et al.* Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* **428**, 185-189 (2004).
- 104 Cooper, S. J., Trinklein, N. D., Nguyen, L. & Myers, R. M. Serum response factor binding sites differ in three human cell types. *Genome Research* **17**, 136-144 (2007).

- 105 Zhou, J. L. & Herring, B. P. Mechanisms responsible for the promoter-specific effects of
myocardin. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 10861-10869 (2005).
- 106 Du, K. L. *et al.* Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional
program regulating smooth muscle cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 2425-
2437 (2003).
- 107 Hoofnagle, M. H. *et al.* Myocardin is differentially required for the development of smooth
muscle cells and cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory
Physiology* **300**, H1707-H1721 (2011).
- 108 Doi, H. *et al.* HERP1 inhibits myocardin-induced vascular smooth muscle cell differentiation by
interfering with SRF binding to CArG box. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **25**,
2328-2334 (2005).
- 109 Mack, C. P., Thompson, M. M., Lawrenz-Smith, S. & Owens, G. K. Smooth muscle alpha-actin
CArG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-
containing activation complex. *Circulation Research* **86**, 221-232 (2000).
- 110 Hendrix, J. A. *et al.* 5' CArG degeneracy in smooth muscle alpha-actin is required for injury-
induced gene suppression in vivo. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 418-427 (2005).
- 111 Hautmann, M. B., Madsen, C. S. & Owens, G. K. A transforming growth factor beta (TGF beta)
control element drives TGF beta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene
expression in concert with two CArG elements. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 10948-
10956 (1997).
- 112 Kumar, M. S., Hendrix, J. A., Johnson, A. D. & Owens, G. K. Smooth muscle alpha-actin gene
requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix
proteins. *Circulation Research* **92**, 840-847 (2003).
- 113 Miano, J. M. Myocardin in biology and disease. *Journal of Biomedical Research* **29**, 3-19 (2015).
- 114 Cordes, K. R. *et al.* miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*
460, 705-U780 (2009).
- 115 Staack, A., Hayward, S. W., Baskin, L. S. & Cunha, G. R. Molecular, cellular and developmental
biology of urothelium as a basis of bladder regeneration. *Differentiation* **73**, 121-133 (2005).
- 116 Nieuwenhuijzen, J. A. *et al.* Urinary diversions after cystectomy: The association of clinical
factors, complications and functional results of four different diversions. *European Urology* **53**,
834-844 (2008).
- 117 Pariente, J. L., Kim, B. S. & Atala, A. In vitro biocompatibility evaluation of naturally derived and
synthetic biomaterials using normal human bladder smooth muscle cells. *Journal of Urology*
167, 1867-1871 (2002).
- 118 Southgate, J., Cross, W., Eardley, I., Thomas, D. F. M. & Trejdosiewicz, L. K. Bladder
reconstruction - from cells to materials. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers
Part H-Journal of Engineering in Medicine* **217**, 311-316 (2003).
- 119 Sloff, M., Simaioridis, V., de Vries, R., Oosterwijk, E. & Feitz, W. Tissue engineering of the
bladder-Reality or myth? A systematic review. *Journal of Urology* **192**, 1035-1042 (2014).
- 120 Burmeister, D. *et al.* Early stages of in situ bladder regeneration in a rodent model. *Tissue
Engineering Part A* **16**, 2541-2551 (2010).
- 121 Akbal, C. *et al.* Bladder augmentation with acellular dermal biomatrix in a diseased animal
model. *Journal of Urology* **176**, 1706-1711 (2006).
- 122 Oberpenning, F., Meng, J., Yoo, J. J. & Atala, A. De novo reconstitution of a functional
mammalian urinary bladder by tissue engineering. *Nature Biotechnology* **17**, 149-155 (1999).
- 123 Joseph, D. B., Borer, J. G., De Filippo, R. E., Hodges, S. J. & McLorie, G. A. Autologous cell seeded
biodegradable scaffold for augmentation cystoplasty: Phase II study in children and adolescents
with spina bifida. *Journal of Urology* **191**, 1389-1394 (2014).
- 124 *Click-iT EdU*, <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp10338.pdf>> (2011).
- 125 *Click-iT TUNEL*, <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp10245.pdf>> (2008).

- 126 Chomczynski, P. & Sacchi, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1**, 581-585 (2006).
- 127 *Illustra*,
<http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc28982258_20150519185912.pdf> (2015).
- 128 <www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (
- 129 Weigelt, B., Lo, A. T., Park, C. C., Gray, J. W. & Bissell, M. J. HER2 signaling pathway activation and response of breast cancer cells to HER2-targeting agents is dependent strongly on the 3D microenvironment. *Breast Cancer Research and Treatment* **122**, 35-43 (2010).
- 130 Hill, A. B. The environment and disease: association or causation? *Journal of the Royal Society of Medicine* **108**, 32-37 (2015).
- 131 Southgate, J., Kennedy, W., Hutton, K. A. R. & Trejdosiewicz, L. K. Expression and in-vitro regulation of integrins by normal human urothelial cells. *Cell Adhesion and Communication* **3**, 231-& (1995).
- 132 Liang, F. X. *et al.* Cellular basis of urothelial squamous metaplasia: roles of lineage heterogeneity and cell replacement. *Journal of Cell Biology* **171**, 835-844 (2005).
- 133 Sun, W. L., Aalders, T. W. & Oosterwijk, E. Identification of potential bladder progenitor cells in the trigone. *Developmental Biology* **393**, 84-92 (2014).
- 134 Thangappan, R. & Kurzrock, E. A. Three clonal types of urothelium with different capacities for replication. *Cell Proliferation* **42**, 770-779 (2009).
- 135 Gabbiani, G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology* **200**, 500-503 (2003).
- 136 Rutherford, R. B. & Ross, R. Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth-muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *Journal of Cell Biology* **69**, 196-203 (1976).
- 137 Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor beta-1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation-tissue miofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *Journal of Cell Biology* **122**, 103-111 (1993).
- 138 Arciniegas, E., Sutton, A. B., Allen, T. D. & Schor, A. M. Transforming growth factor beta-1 promotes the differentiation of endothelial-cells into smooth muscle-like cells-invitro. *Journal of Cell Science* **103**, 521-529 (1992).
- 139 Kato, S., Shanley, J. R. & Fox, J. C. Serum stimulation, cell-cell interactions, and extracellular matrix independently influence smooth muscle cell phenotype in vitro. *American Journal of Pathology* **149**, 687-697 (1996).
- 140 Zheng, Y. *et al.* Generation of a human urinary bladder smooth muscle cell line. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* **48**, 84-96 (2012).
- 141 Corjay, M. H., Thompson, M. M., Lynch, K. R. & Owens, G. K. Differential effect of platelet-derived growth factor-induced versus serum-induced growth on smooth-muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin messenger-rna expression in cultured rat aortic smooth-muscle cells. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 10501-10506 (1989).
- 142 Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmberg, L. & Bottger, B. A. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth-muscle cells. *Arteriosclerosis* **10**, 966-990 (1990).
- 143 Chen, C. N. *et al.* Synergistic roles of platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1 beta in phenotypic modulation of human aortic smooth muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 2665-2670 (2006).
- 144 Pidkovka, N. A. *et al.* Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Circulation Research* **101**, 792-801 (2007).
- 145 Thomas, J. A. *et al.* PDGF-DD, a novel mediator of smooth muscle cell phenotypic modulation, is upregulated in endothelial cells exposed to atherosclerosis-prone flow patterns. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **296**, H442-H452 (2009).
- 146 Tang, Z. Y., Wang, A. J., Wang, D. & Li, S. Smooth muscle cells: To be or not to be? response to Nguyen *et al.* *Circulation Research* **112**, 23-26 (2013).

- 147 Kim, S., Ip, H. S., Lu, M. M., Clendenin, C. & Parmacek, M. S. A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 2266-2278 (1997).
- 148 Liu, Y. *et al.* Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 9719-9727 (2005).
- 149 Shankman, L. S. *et al.* KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature Medicine* **21**, 628-637 (2015).
- 150 Jiang, J. *et al.* A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature Cell Biology* **10**, 353-U103 (2008).
- 151 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
- 152 Turner, E. C., Huang, C. L., Govindarajan, K. & Caplice, N. M. Identification of a Klf4-dependent upstream repressor region mediating transcriptional regulation of the myocardin gene in human smooth muscle cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Genes and Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 1191-1201 (2013).
- 153 Majesky, M. W., Dong, X. R., Regan, J. N. & Hogg, V. J. Vascular Smooth Muscle Progenitor Cells Building and Repairing Blood Vessels. *Circulation Research* **108**, 365-377 (2011).
- 154 Tang, Z. *et al.* Differentiation of multipotent vascular stem cells contributes to vascular diseases. *Nature Communications* **3**, 1-13 (2012).
- 155 Li, G. H., Chen, S. J., Oparil, S., Chen, Y. F. & Thompson, J. A. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* **101**, 1362-1365 (2000).
- 156 Passman, J. N. *et al.* A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1(+) smooth muscle progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 9349-9354 (2008).
- 157 Meirelles, L. d. S., Caplan, A. I. & Nardi, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **26**, 2287-2299 (2008).
- 158 Medici, D. *et al.* Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nature Medicine* **16**, 1400-U1480 (2010).
- 159 Tanaka, K. *et al.* Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in nonirradiated chimeric mice. *FASEB Journal* **22**, 428-436 (2008).
- 160 Lin, C.-S. & Lue, T. F. Defining vascular stem cells. *Stem Cells and Development* **22**, 1018-1026 (2013).
- 161 Hu, Y. H. *et al.* Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1258-1265 (2004).
- 162 Zengin, E. *et al.* Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* **133**, 1543-1551 (2006).
- 163 Klein, D. *et al.* Vascular Wall-Resident CD44+ Multipotent Stem Cells Give Rise to Pericytes and Smooth Muscle Cells and Contribute to New Vessel Maturation. *Plos One* **6** (2011).
- 164 Tintut, Y. *et al.* Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* **108**, 2505-2510 (2003).
- 165 Zuk, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering* **7**, 211-228 (2001).
- 166 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 167 Sharma, A. K. *et al.* Do current bladder smooth muscle cell isolation procedures result in a homogeneous cell population? Implications for bladder tissue engineering. *World Journal of Urology* **27**, 687-694 (2009).
- 168 Tomedi, J. *Desenvolvimento de matriz extracelular temporária para gênese de mucosa urotelial. Dissertação de mestrado* Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (2011).
- 169 Baker, S. C. & Southgate, J. Towards control of smooth muscle cell differentiation in synthetic 3D scaffolds. *Biomaterials* **29**, 3357-3366 (2008).

- 170 Schaafsma, D. *et al.* Insulin increases the expression of contractile phenotypic markers in airway
smooth muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **293**, C429-C439 (2007).
- 171 Zucker, R. M. Quality assessment of confocal microscopy slide based systems: Performance.
Cytometry Part A **69A**, 659-676 (2006).
- 172 Isenberg, B. C. & Wong, J. Y. Building structure into engineered tissues. *Materials Today* **9**, 54-
60 (2006).
- 173 Lee, J., Cuddihy, M. J. & Kotov, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: State of the art.
Tissue Engineering Part B-Reviews **14**, 61-86 (2008).
- 174 Hynes, R. O. The extracellular matrix: Not just pretty fibrils. *Science* **326**, 1216-1219 (2009).
- 175 Lu, P. F., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling
in Development and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3** (2011).
- 176 Chung, S. & King, M. W. Design concepts and strategies for tissue engineering scaffolds.
Biotechnology and Applied Biochemistry **58**, 423-438 (2011).
- 177 Dvir, T., Timko, B. P., Kohane, D. S. & Langer, R. Nanotechnological strategies for engineering
complex tissues. *Nature Nanotechnology* **6**, 13-22 (2011).
- 178 Lin, H. K. *et al.* Biomatrices for bladder reconstruction. *Advanced Drug Delivery Reviews* **82-83**,
47-63 (2015).
- 179 Tsuda, Y. *et al.* Cellular control of tissue architectures using a three-dimensional tissue
fabrication technique. *Biomaterials* **28**, 4939-4946 (2007).
- 180 Baker, S. C., Rohman, G., Southgate, J. & Cameron, N. R. The relationship between the
mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue
engineering. *Biomaterials* **30**, 1321-1328 (2009).
- 181 Kim, P. D., Peyton, S. R., VanStrien, A. J. & Putnam, A. J. The influence of ascorbic acid, TGF-beta
1, and cell-mediated remodeling on the bulk mechanical properties of 3-D PEG-fibrinogen
constructs. *Biomaterials* **30**, 3854-3864 (2009).
- 182 Hayashi, K. *et al.* Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling
pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of
Biological Chemistry* **273**, 28860-28867 (1998).
- 183 Arakawa, E. *et al.* L-ascorbic acid stimulates expression of smooth muscle-specific markers in
smooth muscle cells both in vitro and in vivo. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **42**, 745-
751 (2003).
- 184 Lee, W. C. C., Rubin, J. P. & Marra, K. G. Regulation of alpha-smooth muscle actin protein
expression in adipose-derived stem cells. *Cells Tissues Organs* **183**, 80-86 (2006).
- 185 Jack, G. S. *et al.* Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three
dimensional synthetic composite. *Biomaterials* **30**, 3259-3270 (2009).
- 186 Tian, H. *et al.* Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a
3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* **31**, 870-877 (2010).
- 187 Wang, C. *et al.* A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions
from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem
cells. *Biomaterials* **31**, 621-630 (2010).
- 188 Mack, C. P. Signaling Mechanisms That Regulate Smooth Muscle Cell Differentiation.
Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **31**, 1495-1505 (2011).
- 189 Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741
(2011).
- 190 Saha, S., Kirkham, J., Wood, D., Curran, S. & Yang, X. B. B. Informing future cartilage repair
strategies: a comparative study of three different human cell types for cartilage tissue
engineering. *Cell and Tissue Research* **352**, 495-507 (2013).
- 191 Kaplan, R. N. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-
metastatic niche. *Nature* **438**, 820-827 (2005).
- 192 Singh, P. & Schwarzbauer, J. E. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from
chondrogenesis. *Journal of Cell Science* **125**, 3703-3712 (2012).

- 193 Lu, P. F., Weaver, V. M. & Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer
progression. *Journal of Cell Biology* **196**, 395-406 (2012).
- 194 Watt, F. M. & Huck, W. T. S. Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nature
Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 467-473 (2013).
- 195 Jain, R. K. Transport of molecules in the tumor interstitium - a review. *Cancer Research* **47**, 3039-
3051 (1987).
- 196 Tasian, G., Cunha, G. & Baskin, L. Smooth muscle differentiation and patterning in the urinary
bladder. *Differentiation* **80**, 106-117 (2010).
- 197 Jerman, U. D., Kreft, M. E. & Veranic, P. Epithelial-mesenchymal interactions in urinary bladder
and small intestine and how to apply them in tissue engineering. *Tissue Engineering Part B-
Reviews* **21**, 521-530 (2015).
- 198 Scriven, S. D., Booth, C., Thomas, D. F. M., Trejdosiewicz, L. K. & Southgate, J. Reconstitution of
human urothelium from monolayer culture. *Journal of Urology* **158**, 1147-1152 (1997).
- 199 Mudge, C. S. & Klumpp, D. J. Induction of the urothelial differentiation program in the absence
of stromal cues. *Journal of Urology* **174**, 380-385 (2005).
- 200 Ajallouelian, F., Zeiai, S., Fossum, M. & Hilborn, J. G. Constructs of electrospun PLGA, compressed
collagen and minced urothelium for minimally manipulated autologous bladder tissue
expansion. *Biomaterials* **35**, 5741-5748 (2014).
- 201 Bouhout, S., Goulet, F. & Bolduc, S. A novel and faster method to obtain a differentiated 3-
dimensional tissue engineered bladder. *Journal of Urology* **194**, 834-841 (2015).
- 202 Stark, J. J. *et al.* Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents. *Journal
of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* **11**, 93-105 (2006).

17. SUPLEMENTO

Tabela S1. Especificações dos anticorpos utilizados

Anticorpo	Clone	Diluição (v:v)	Fabricante
K5	SP27	1:300	Abcam®
K7	LP5K	1:300	Santa Cruz Biot.®
K20	EPR1622Y	1:300	Abcam®
α -actina	E184	1:300	Abcam®
miosina-HC	hSM-V	1:300	Sigma-Aldrich®
vimentina	D2H3	1:200	Cell Signaling®
fibronectina	IST-9	1:250	Abcam®

K5: queratina 5; K7: queratina 7; α -actina: alfa actina do músculo liso; miosina-HC: cadeia pesada da miosina do músculo liso.

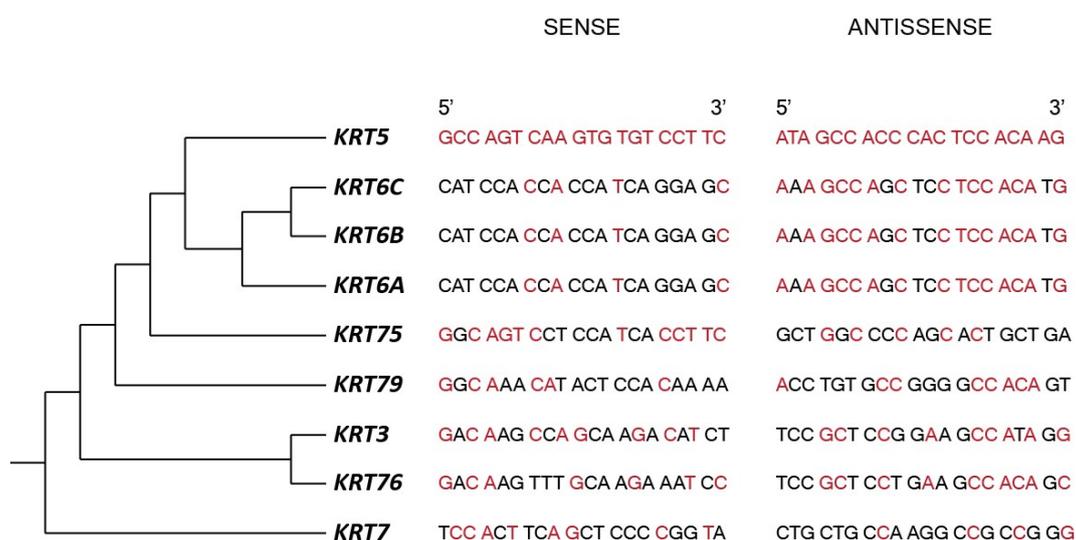
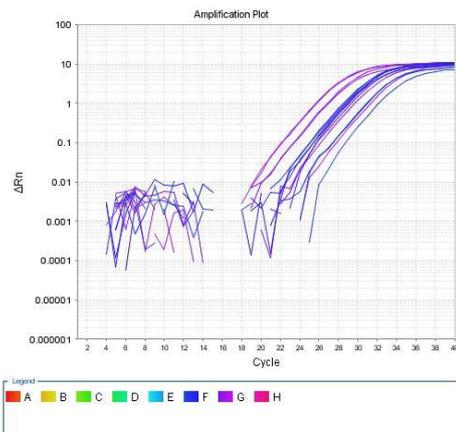


Figura S1. Gráfico em árvore mostrando os primers desenhados para o gene *KRT5* e as suas homologias às seqüências ontogeneticamente mais próximas.

A



B

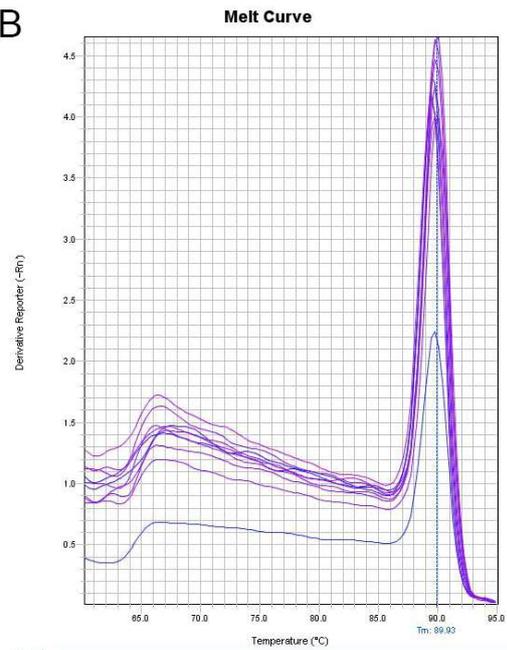
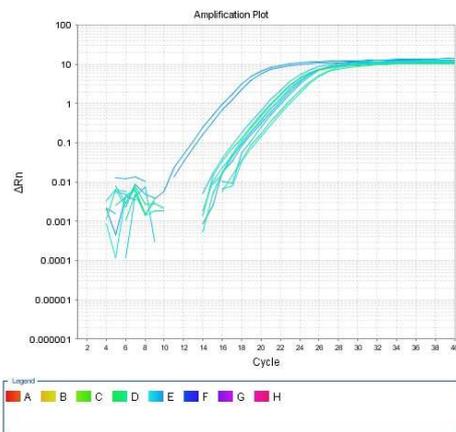


Figura S2. Curvas de amplificação do gene *KRT5* (A). Gráfico do *melting* ($\frac{dI}{dT}$) das sequências amplificadas (B).

A



B

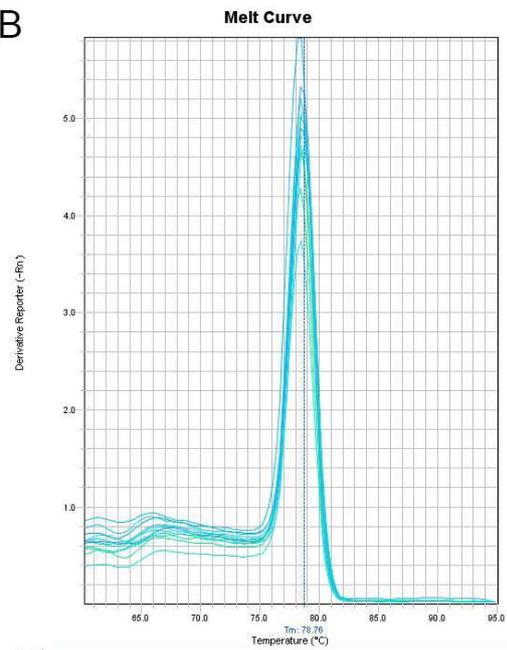


Figura S3. Curvas de amplificação do gene *B2M* (A). Gráfico do *melting* ($\frac{dI}{dT}$) das sequências amplificadas (B).

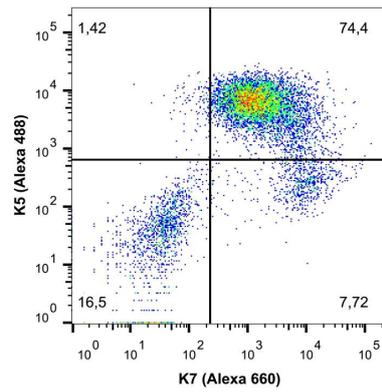


Figura S4. Citometria de fluxo das células uroteliais 24 h pós-isolamento com anticorpos contra K5 e K7.

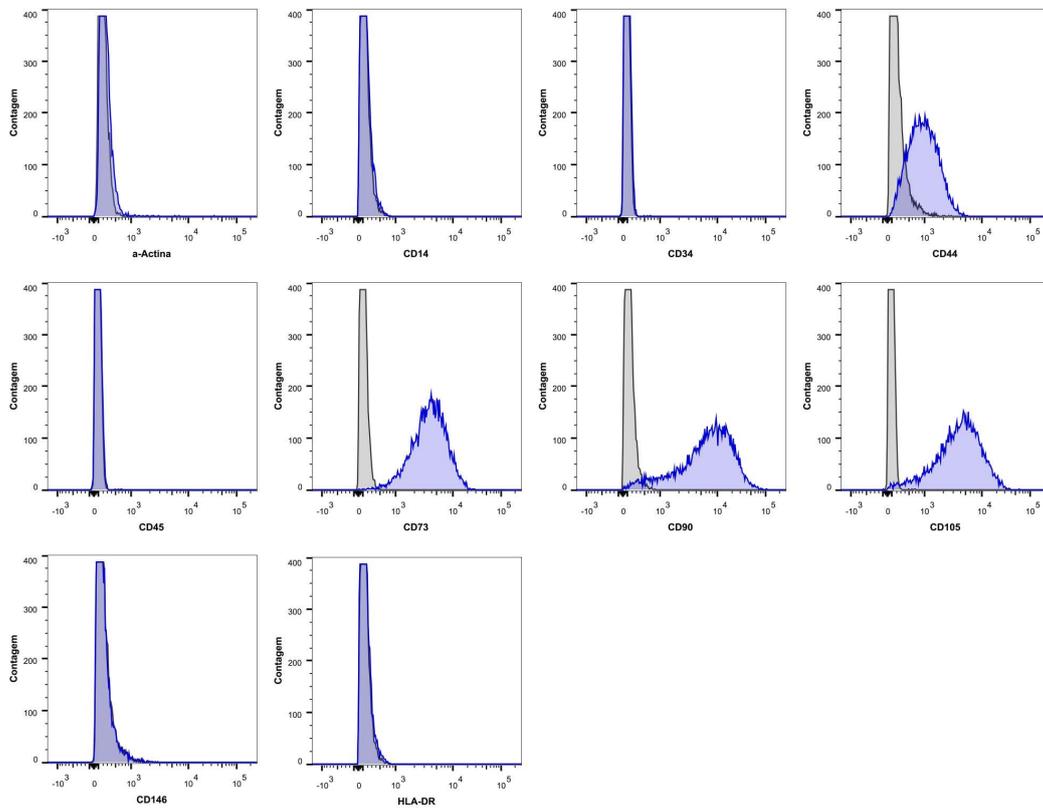


Figura S5. Perfil imunofenotípico das MSCs em P3.

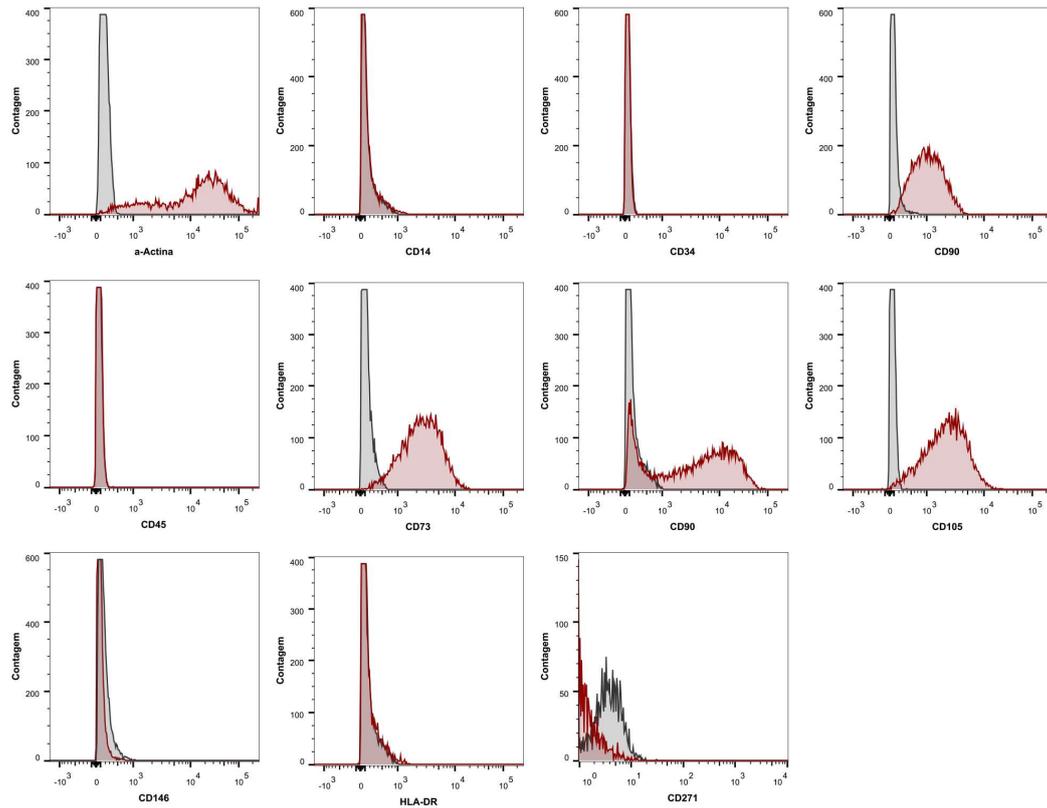


Figura S6. Perfil imunofenotípico das células musculares lisas em P3.

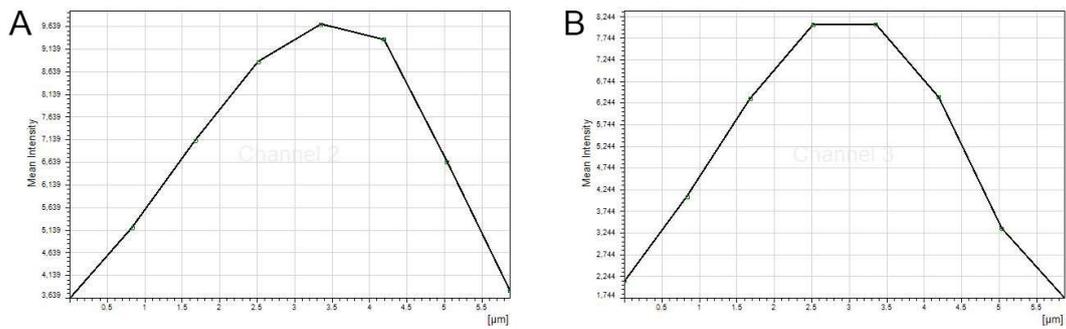


Figura S7. Quantificação da fluorescência emitida no eixo z de uma amostra de estroma muscular liso. (A) α -actina. (B) Miosina-HC.