

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA IRIODA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO APÓS O BIOPROCESSO DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

Curitiba
2010

ANA CAROLINA IRIODA

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO APÓS O BIOPROCESSO DE
CRIOPRESERVAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Saúde Animal e Humana, Departamento de Engenharia Química, Setor de Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em ciências- Processos Biotecnológicos.

Orientadora: Prof. Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho

Curitiba
2010

AGRADECIMENTOS

A Professora Doutora Katherine Athayde Teixeira de Carvalho, orientadora desta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, pela sua paciência. Gostaria de ratificar a sua competência, participação com discussões, correções, revisões, sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol e a Profa. Dra. Luciana Porto de Souza Vandenberg, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

A Liana Alves de Oliveira, Maria de Lourdes Torres, Jackeline Boiko Magalhães e demais funcionários do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe pela hospitalidade, agilidade e auxílio que permitiram a realização deste estudo.

A todos os professores do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, em especial ao Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo e ao Prof. Dr. Roberto Rosati pelo seu coleguismo, ajuda, interesse e sábias idéias.

A Dra. Marister Malvezzi e a Dra. Miriam P. Beltrame, pelo auxílio imprescindível na interpretação dos resultados de citometria, mostrando competência, sugestões, discussões, busca de resultados, ensinamentos e empenho no intuito de chegar à excelência.

Aos colegas de laboratório Larissa Zocche, Ricardo Corrêa Cunha, Julio César Francisco, Eduardo Aliprandini, Carolina Maria Costa de Oliveira Souza, Gilberto Delinski Junior, que colaboraram no desenvolvimento desta pesquisa, sendo imprescindível para a sua realização.

A todos os colegas e professores do Laboratório de Bioprocessos da UFPR, em especial ao Prof. Luiz Alberto Letti Junior, por seu auxílio em relação às dúvidas relacionadas a diversas disciplinas do curso.

A Professora Dra. Dorly de Freitas Buchi por sua permissão para o uso do Citometro de Fluxo.

Aos colegas Dr. Rafael Vargas e doutorando Diogo Kuczera, pelo auxílio imprescindível para a realização da citometria de fluxo.

A professora Dra. Maria Rita Sierakowski, pelo apoio com insumos e equipamentos.

A CAPES, pelo incentivo da Bolsa de estudo e também apoio financeiro para compra de insumos, sem a qual se tornaria ainda mais difícil a conclusão deste trabalho.

A FUNPAR pelo apoio financeiro para compra de insumos.

Ao Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe juntamente com a Associação de Proteção a Infância e Adolescência Dr. Raul Carneiro, por seu apoio institucional, sem o qual este trabalho não seria possível e pela parceria permitida pela Sra. Ety Cristina Forte Carneiro, a Diretoria Geral do Complexo Hospitalar Pequeno Príncipe.

À Estatística Márcia Olandoski, por suas considerações pertinentes.

Ao amigo Bruno Agostini por sua imensa ajuda nas questões matemáticas.

A todos os médicos que disponibilizaram seus pacientes a participarem desta pesquisa, em especial ao Dr. Rafael Cassilha, que colaborou ativamente para a realização deste trabalho prestativo, dedicado e competente. Agradeço também a sua secretária Shelly e todos os enfermeiros e funcionários da Clínica Anima Bella

por sua generosidade e atenção.

Aos pacientes que participaram desta pesquisa, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

Ao meu esposo Jansen Fiorenza Irioda, pelo apoio, carinho, dedicação, paciência e constante colaboração.

Aos meus pais e aos meus irmãos que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

A amiga Laura Marília Costa pelo incentivo ao curso e pelo seu constante apoio.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa Dissertação de Mestrado.

A DEUS

“Sempre estiveste ao meu lado, nas minhas quedas, nas minhas fraquezas, nas lutas e controvérsias, vitórias e derrotas. Sei que, principalmente agora, estais ao meu lado. Obrigado por este presente que agora me ofereces. Obrigado por tudo que vi, ouvi e aprendi. Obrigado pela graça. Obrigado pela Vida!”

Marcelli Negrão

RESUMO

As células-tronco de origem adulta surgem como promessa terapêutica na medicina regenerativa podendo ser encontradas em diversos tecidos como o adiposo. Com as perspectivas da criação de um banco de célula-tronco para pesquisa e posterior uso terapêutico, o estudo da criopreservação dessas células urge, a fim de garantir que essas células após o descongelamento permaneçam viáveis e funcionais. **Objetivos:** Comparar as células-tronco do tecido adiposo antes da criopreservação e após o seu descongelamento quanto a: a) índice de proliferação e capacidade de formar colônias b) expressão das moléculas de superfícies em especial a integrina $\alpha 4$; c) capacidade de diferenciação d) viabilidade e integridade celular. **Métodos:** Células-tronco adultas foram obtidas do tecido adiposo de 10 mulheres e 2 homens, saudáveis pela técnica de lipoaspiração, realizada por cirurgiões plásticos e após o consentimento informado. O isolamento das células foi realizado através de digestão enzimática com colagenase tipo I posterior cultivo em DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB e 100U/mL de Penicilina/100 μ g/mL de Estreptomicina. Foi calculado o índice de proliferação celular da primeira à terceira passagem para cada amostra. Realizadas análises de unidade formadora de colônia na segunda passagem, as células foram submetidas à diferenciação adipogênica e osteogênica com auxílio de meios indutores. A Imunofenotipagem através de citometria de fluxo (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA), utilizando-se marcadores: CD34, CD45, CD49d, CD73, CD90, CD105, anexina V e 7-AAD, seguidas do processo de criopreservação, precedido de congelamento programável (Nicoool LM10). Vinte dias após, as células foram descongeladas e os testes repetidos. **Resultados:** Rendimento celular: $9,09 \pm 4,55 \times 10^6$ células/mL isoladas. Índice de proliferação antes da criopreservação: Passagens 1= 0,24; 2= 21,33; 3= 13,03 ($p=0,001$), respectivamente; passagem 3= $17,43 \pm 4,11$ após descongelamento ($p=0,07$). Unidade formadora de colônia antes da criopreservação: 28,08 % \pm 7,06%, após o descongelamento 21,51% \pm 6,61% ($p=0,001$). Todas as amostras induzidas tiveram diferenciação adipogênica e osteogênica, antes da criopreservação e após o descongelamento. A análise imunofenotípica demonstrou as seguintes expressões antes da criopreservação: CD34⁻ (98,88% \pm 1,08%), CD45⁻ (99,79% \pm 0,22%), CD49d⁺ (88,67% \pm 6,55), CD90⁺ (99,55 \pm 0,07%), CD73⁺ (99,57% \pm 0,43%) e CD105⁺ (99,4% \pm ,64%); Após o descongelamento: CD34⁻ (99,26% \pm 0,61%, $p= 0,11$), CD45⁻ (99,8% \pm 0,14%, $p= 0,79$), CD49d⁺ (77,8% \pm 14,45%, $p= 0,01$), CD73⁺ (99,5% \pm 0,43%, $p= 0,53$), CD90⁺(99,45 \pm 0,7%, $p= 0,62$), CD105⁺ (98,26% \pm 2,07%, $p= 0,05$). Viabilidade celular (7-AAD⁻) e apoptose (Anexina V⁺) antes da criopreservação: 91,39% \pm 5,85%, 91,34% \pm 4,54%; após descongelamento das células: 76,31% \pm 13,33% ($p= 0,001$), 74,99% \pm 14,19% ($p= 0,003$), respectivamente. **Conclusão:** As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo mantêm suas características imunofenotípicas, viabilidade, capacidades de proliferação e de diferenciação após o descongelamento das células criopreservadas, à exceção da integrina $\alpha 4$ (CD 49d), uma molécula de adesão que participa da integração da célula no tecido hospedeiro.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimal do tecido adiposo. Criopreservação. Integridade celular. Integrina $\alpha 4$.

ABSTRACT

Adult stem-cells emerge as a therapeutic promise in regenerative medicine such as adipose. From the perspective of creation of a stem-cell bank for research and there after therapeutic use, the study of cryopreservation of these cells urge. However, to the safety of this technique, some criteria must be established in order to guarantee that cells after thawing remain viable and functional. **Objective:** To compare stem-cells of adipose tissue before cryopreservation and after thawing: a) proliferation index and capacity of colony forming; b) cell viability and integrity; c) differentiation capacity; d) expression of surface molecules, especially integrin $\alpha 4$; d) **Methods:** Adult stem-cells were obtained from adipose tissues of 12 adult healthy donors (10 female and two male) by the technique of liposuction, performed by plastic surgeons with informed consent. The isolation was performed by enzymatic digestion with collagenase type I, and cells were cultured on DMEM/F12 supplemented with 10% of Calf Fetal Serum, 100 units/mL of penicillin and 100 μ g/mL of Penicillin/Streptomycin. It was calculate the index of cellular proliferation from the first to the third passage to each sample and performed analyses of Colony Forming Units. At the second passage, cells were submitted to adipogenic and osteogenic differentiation using inducing media. Immunophenotyping using flow cytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson, USA), utilizing the markers CD34, CD45, CD49d, CD73, CD90, CD105, annexin V and 7-AAD, followed of cryopreservation process, with programmed freezing (Nicool LM10). After 20 days, the cells were thawed and tests were repeated. **Results:** Cellular yield: $9.09 \pm 4.55 \times 10^6$ cells/mL. Proliferation index, Passage 1 = 0.24 ± 0.12 ; 2 = 21.33 ± 8.48 ; 3 = 13.03 ± 5.38 ($p=0.001$); passage 3 = 17.43 ± 4.11 , after thaw ($p=0.07$). Colony forming units before cryopreservation: $28.08\% \pm 7.06\%$, after thaw $21.51\% \pm 6.61\%$ ($p= 0.001$). All samples induced underwent adipogenic and osteogenic differentiation before cryopreservation and after thawing. The immunophenotypic analysis demonstrated the following expression pattern before cryopreservation: CD34- ($98.88\% \pm 1.08\%$), CD45- ($99.79\% \pm 0.22\%$), CD49d+ ($88.67\% \pm 6.55$), CD90+ ($99.55 \pm 0.07\%$), CD73+ ($99.57\% \pm 0.43\%$) e CD105+ ($99.4\% \pm 0.64\%$). After thawing: CD34- ($99.26\% \pm 0.61\%$, $p= 0.11$), CD45- ($99.8\% \pm 0.14\%$, $p= 0.79$), CD49d+ ($77.8\% \pm 14.45\%$, $p 0.01$), CD73+ ($99.5\% \pm 0.43\%$, $p= 0.53$), CD90+ ($99.45 \pm 0.7\%$, $p= 0.62$), CD105+ ($98.26\% \pm 2.07\%$, $p= 0.05$). Cell viability (7-AAD⁻) and apoptosis (Annexin V⁻) before cryopreservation: $91.39\% \pm 5.85\%$, $91.34\% \pm 4.54\%$; after cell thawing: $76.31\% \pm 13.33\%$ ($p= 0.001$), $74.99\% \pm 14.19\%$ ($p= 0.003$), respectively. **Conclusion:** Mesenchymal stem-cells derived from adipose tissue maintain their immunophenotypic characteristics as well viability, proliferation and differentiation capacities after thawing of cryopreserved cells. The exception is integrin $\alpha 4$ (CD 49d), an adhesion molecule involved in the integration of the cell in the host tissue.

Key-words: mesenchymal stem-cell from adipose tissue, cryopreservation, cell integrity, integrin $\alpha 4$.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Tipo de cirurgias plásticas <u>estéticas*</u> , realizadas entre setembro de 2007 e agosto de 2008 (73%)	36
FIGURA 02 - Estratégia experimental.....	37
FIGURA 03 - Amostra de gordura	39
FIGURA 04- Células com 80% de confluência	50
FIGURA 05 - Índice de proliferação celular.....	51
FIGURA 06 - Índice de proliferação celular após descongelamento	52
FIGURA 07 - UFC antes da criopreservação e após o descongelamento	53
FIGURA 08 - Placas de UFC antes da criopreservação e após o descongelamento	54
FIGURA 09 - Histogramas de expressão dos marcadores de superfície	54
FIGURA 10 - Expressão dos marcadores de superfície antes da criopreservação e após o descongelamento.....	56
FIGURA 11 - Histogramas de expressão dos marcadores de apoptose (integridade celular) e viabilidade	57
FIGURA 12 - Integridade Celular	58
FIGURA 13 - Viabilidade celular	59
FIGURA 14 - Células diferenciadas em adipócitos	60
FIGURA 15 - Células diferenciadas em osteócitos	60

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Marcadores utilizados para caracterização imunofenotípica	43
QUADRO 02 - Painel de marcadores utilizados para análise das CTMTA.....	44
QUADRO 03 - Idade, IMC e rendimento celular	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Correlação Idade/Rendimento e IMC/rendimento.....	51
TABELA 02 - Tabela de expressão dos marcadores de superfície antes da criopreservação.....	55
TABELA 03 - Tabela de expressão dos marcadores de superfície após o descongelamento.....	55

LISTA DE SIGLAS

% - percentagem ou porcentagem

µg – microgramas

µl - microlitro

µm – micrometro

7-AAD *7-Aminoactinomycin D*

a- FABP – *adipocyte fatty acid-binding protein*

AMP - adenosine mono-fosfato

C/ EBPs – *c-enhancer-binding protein*

CAM – *cell-adhesion molecules*

CBFA 1 – *Core-binding factor 1*

CD - *Cluster of Differentiation*

CT – células-tronco

CTA – células-tronco adultas

CTE – células-tronco embrionárias

CTH - células-tronco hematopoiéticas

CTM – células-tronco mesenquimais

CTMCU – células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical

CTMMO – células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

CTMTA – células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

DMEM – Meio Dulbecco modificado de Eagle

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP- desvio padrão

EDTA – ácido etilenediaminetetracético

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GFPA- *glial fibrillary acidic protein*

HEPES – ácido 4,2 hidroxietil 1 piperazina etanesulfônico

HLA - human leukocyte antigen

IgSF – superfamília das imunoglobulinas

IMC - Índice de Massa Corporal

IP- índice de proliferação
MA – moléculas de adesão
MAP-2- *Microtubule-associated protein 2*
MAX – máximo
MIN – mínimo
min - minuto
mL – mililitro
mM – microMol
mm – milímetro
NEU N – *neuronal nuclear antigen A60*
NSE- Neuron Especific Enolase
°C – graus Celsius
P/S – penicilina e estreptomicina
P1 – passagem 1
P2 – passagem 2
P3 – passagem 3
PBS – solução tampão fosfato
PE - Ficoeritrina
PPARs – *peroxisome proliferator-activated receptors*
REND - rendimento
RPM – rotações por minuto
RT-PCR – reação da cadeia de polimerase transcrição reversa
SFB – soro fetal bovino
SH₂ – *src-homology 2*
SH₃ - *src-homology 3*
TGF β – *Transforming growth factor beta*
UFC – Unidade Formado de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	PROBLEMA	17
3	HÍPOTESE	18
4	OBJETIVOS	19
4.1	OBJETIVO GERAL.....	19
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5	REVISÃO DA LITERATURA	20
5.1	CÉLULAS-TRONCO	20
5.1.1	Células-tronco embrionárias.....	20
5.1.2	Células-tronco adultas	21
5.1.3	Células-tronco hematopoiéticas	22
5.1.4	Células-tronco mesenquimais	23
5.2	ALGUMAS FONTES DE CÉLULAS-TRONCO	24
5.2.1	Células-tronco derivadas da medula óssea	25
5.2.2	Células-tronco derivadas do cordão umbilical	25
5.2.3	Células-tronco derivadas da placenta e do líquido amniótico.....	26
5.2.4	Células-tronco derivadas do tecido adiposo	26
5.2.4.1	Tecido adiposo.....	28
5.2.4.2	CMTA diferenciadas em adipócitos	30
5.2.4.3	CMTA diferenciadas em osteócitos	30
5.3	MOLECULAS DE ADESÃO.....	32
5.3.1	Imunoglobulinas.....	32
5.3.2	Integrinas.....	33
5.3.3	Selectinas	33
5.3.4	Caderinas	34
5.4	CRIOPRESERVAÇÃO	34
5.5	CIRURGIAS PLÁSTICAS NO BRASIL	35
6	MÉTODOS	37
6.1	DESENHO DO ESTUDO.....	37
6.2	ISOLAMENTO DE CTM A PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO.....	38
6.3	CULTIVO E EXPANSÃO	40
6.4	CRIOPRESERVAÇÃO	40
6.5	ANÁLISE DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA	41
6.6	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	42
6.7	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA	42
6.8	ANÁLISES DE VIABILIDADE CELULAR COM ANEXINA V e 7-AAD.....	44
6.9	DIFERENCIAÇÃO	45
6.9.1	Diferenciação adipogênica	45
6.9.1.1	Coloração Oil Red O	46
6.9.2	Diferenciação osteogênica	46
6.9.2.1	Coloração com Alizarina Vermelha	47
6.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
7	DELIMITAÇÃO	48
8	RESULTADOS	49
8.1	RENDIMENTO CELULAR.....	50
8.2	ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (IP)	51

8.2.1	Índice de proliferação celular após o descongelamento.....	52
8.3	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA	53
8.4	ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA.....	54
8.4.1	Análise imunofenotípica antes da criopreservação.....	55
8.4.2	Análise imunofenotípica após o descongelamento.....	55
8.5	INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR	56
8.5.1	Integridade celular.....	57
8.5.2	Viabilidade celular.....	58
8.6	DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	59
8.6.1	Diferenciação adipogênica	59
8.6.2	Diferenciação osteogênica.....	60
8	DISCUSSÃO	61
9	CONCLUSÃO	70
10	PERSPECTIVAS	71
12	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
13	ANEXOS	80

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são células que possuem alta capacidade de regeneração e são capazes de se diferenciar em células do tecido de origem ou em células de outros tecidos mantendo-se funcional *in vivo* (WEISSMAN, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2004). Estas células podem ser de origem embrionária, denominadas células-tronco embrionárias (CTE) (PEREIRA, 2008) ou podem estar presentes em tecidos adultos, sendo denominadas de células-tronco adultas (CTA) (WEISSMAN, 2000).

As CTA mais estudadas são as de origem na medula óssea, onde é possível encontrar tanto células-tronco hematopoiéticas (CTH), quanto células-tronco mesenquimais (CTM). Mas sabe-se que as CTA estão presentes em outros tecidos, como, por exemplo, no cordão umbilical (OH *et al.*, 2008), na polpa dentária, no músculo, entre outros. Dentre esses diversos tecidos, o adiposo tem despertado um interesse especial dos pesquisadores, pois possui uma quantidade considerável de CTA, denominadas de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMTA) (ZUK *et al.*, 2001).

As CTMTA apresentam características semelhantes às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTMMO), podendo, quando induzidas, se diferenciar em adipócitos, osteócitos (ELABD *et al.*, 2007), condrócitos e apresentar características neuronais (ZUK *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2006; HUANG, *et al.*, 2008, LEI *et al.*, 2007). Além disso, as CTMTA acabam sendo mais acessíveis que as CTMMO devido à sua forma de coleta ser menos invasiva e por apresentar maior quantidade de CTA disponíveis (ZUK *et al.* 2001).

O isolamento das CTMTA se dá através do tecido lipoaspirado de cirurgias de lipoaspiração. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgias Plásticas (2009), são realizadas aproximadamente 629 mil cirurgias plásticas por ano no Brasil, sendo em média, 73% de caráter estético e 27% de caráter reparador. Dentre as cirurgias estéticas, a lipoaspiração está em segundo lugar, perdendo apenas para próteses de mama. Sendo assim, uma grande quantidade de tecido lipoaspirado é descartado diariamente, representando grande potencial para o isolamento de CTMTA e sua aplicação na engenharia de tecidos.

Devido a esta potencialidade, a engenharia de tecidos está bastante confiante em relação ao emprego das CTMTA na terapia celular e há uma perspectiva da criação de um banco de célula-tronco para pesquisa e posterior uso terapêutico. Por isso o estudo da criopreservação destas células se faz urgente. Entretanto, para a segurança desta técnica, alguns critérios devem ser estabelecidos a fim de garantir que as células, após o descongelamento permaneçam viáveis e funcionais. As principais características a serem analisadas é a integridade celular após a criopreservação e descongelamento no que tange a preservação das suas características de proliferação e imunofenotípicas, dentre estas a expressão de moléculas que participam da adesão.

2 PROBLEMA

Devido à capacidade das CTMTA se diferenciarem em diversas linhagens celulares, tem havido grande interesse em seu uso na engenharia de tecidos. As células transplantadas necessitam de uma integração no tecido transplantado e para tal é necessária a presença de moléculas de superfície que permitam a adesão destas com as demais células do tecido hospedeiro assim como na matriz tissular. No entanto, independente do tipo celular ou destino das células, quando transplantadas em organismos humanos, o número de células aderentes bastante reduzido, isto é comprovado por vários estudos, mesmo quando há grande pureza e elevada concentração de células (CHAVAKIS, URBICH, DIMMELER, 2008).

3 HIPÓTESE

Em consequência das características inerentes das CTMTA: baixa imunogenicidade, rendimento celular superior à medula óssea e sua multipotencialidade; a criopreservação destas células seria uma alternativa bastante conveniente, porém, deve-se avaliar a qualidade da criopreservação e do descongelamento bem como o impacto destas na integridade celular. Uma vez que estas células são cultivadas e estão aderidas ao substrato (placa de cultivo), antes de criopreservá-las, essas são submetidas ao estresse de desagregação do substrato, podendo colocar em risco a integridade da membrana e de suas moléculas de superfície, dentre estas as relacionadas à adesão celular. Após o descongelamento das células criopreservadas, o risco de danificar a membrana e outras características funcionais das células é ainda maior. O resultado do transplante celular é multifatorial, no entanto uma das variáveis importantes é a dependência do número de células capaz de se integrar no tecido hospedeiro, assim como a relação entre viabilidade e apoptose. Havendo prejuízo nas células, ficará comprometida esta integração, podendo haver um resultado inferior ao desejado.

A criopreservação das CTMTA poderá interferir na integridade celular bem como na expressão das moléculas de adesão e/ou na sua capacidade de diferenciação nas diversas linhagens?

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a integridade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano, após o bioprocesso de criopreservação.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice de proliferação celular antes da criopreservação e após o seu descongelamento.
- Avaliar a capacidade de formar colônias fibroblastóides antes da criopreservação e após o seu descongelamento;
- Identificar e comparar a expressão de moléculas de superfície das CTMA antes da criopreservação e após o seu descongelamento.
- Identificar e comparar a expressão das moléculas de adesão integrina $\alpha 4$ (CD49d) antes da criopreservação e após o seu descongelamento;
- Avaliar a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos das CTMTA, antes da criopreservação e após o seu descongelamento;
- Avaliar a viabilidade, apoptose e suas relações antes da criopreservação e após o descongelamento das CTMTA.

5 REVISÃO DA LITERATURA

5.1 CÉLULAS-TRONCO

As células-tronco são células indiferenciadas, capazes de se multiplicar e permanecer nesta condição por longos períodos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Quando estimuladas estas células podem sofrer divisões assimétricas, ou seja, podem se dividir gerando células progenitoras de um determinado tecido e também continuar a gerar células indiferenciadas para manutenção de todo o organismo (HORWIT *et al*, 2003; WEISSMAN, 2000). Sendo assim, as células-tronco possuem funções não somente de formar órgãos, mas também de regenerar tecidos durante toda a vida de um organismo (WEISSMAN, 2000).

Existem diversos tipos de células-tronco, por exemplo, células-tronco mesenquimais e células-tronco hematopoiéticas. Uma ferramenta extremamente importante para caracterizar os diferentes tipos de células-tronco é a citometria de fluxo, que permite identificar marcadores de superfície das células-tronco podendo determinar a linhagem celular e propriedades biológicas, incluindo a multipotencialidade (GONDA, *et al*, 2008).

O uso destas CT pode ser uma ferramenta chave para o tratamento de diversas doenças, porém, seu isolamento e identificação são de grande importância. Desta forma, as CT devem obedecer alguns critérios: (1) capacidade de auto-regeneração, que seria a capacidade de proliferação, diferenciação e manutenção desta capacidade; (2) capacidade de se diferenciar em células do tecido de origem e em células de outros tecidos; e (3) capacidade de diferenciação funcional *in vivo* em células do tecido de origem e de outros tecidos (WEISSMAN, 2000, HORWIT *et al*, 2003).

5.1.1 Células-tronco embrionárias (CTE)

Durante o desenvolvimento de um organismo humano, o ovócito fertilizado, formará um organismo complexo, composto por mais de 200 tipos de células

diferentes. Este potencial de desenvolvimento resulta a partir da capacidade de proliferação das primeiras células do zigoto, que podem se diferenciar em todas as linhagens celulares, incluindo os anexos embrionários. Nesta fase estas células são totipotentes, ou seja, células com a habilidade de gerar um organismo completo mantidas pelo zigoto e seus descendentes até a oitava célula do estágio de mórula. Após estas primeiras divisões, seguem-se processos de diferenciações primárias, resultando na formação do blastocisto, que possui uma forma de esfera oca, onde as células mais externas são chamadas de trofoblasto que dará origem aos tecidos extra-embrionários, e a massa celular interna de células que dará origem ao embrião propriamente dito. Estas células da massa celular interna, já não apresentam um potencial de diferenciação tão completo quanto às células anteriores, pois são capazes de dar origem a todas as estruturas do embrião, mas não aos anexos embrionários, sendo então consideradas CT pluripotentes (ALBERTS, *et al.*, 2004). Tendo em vista a grande capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação destas células, surgiu o interesse em utilizá-las para o uso terapêutico, com intuito de regenerar tecidos. Para testar esta hipótese, seriam necessárias, técnicas de isolamento destas células, e isto ocorreu primeiramente a partir de blastocistos de ratos há mais de vinte anos, possibilitando o desenvolvimento de técnicas para seu cultivo em laboratório (EVANS e KAUFMAN, 1981). Com esta descoberta, houve grande interesse em isolar células análogas de origem humana, no entanto, considerações éticas em relação ao uso destas células na pesquisa e na medicina, causam polêmicas em muitos países (RODRIGUEZ *et al.*, 2004; ZUK *et al.*, 2001). Outra questão, é que a grande capacidade de auto-regeneração das CTE, pode acarretar uma proliferação descontrolada das células indiferenciadas de desconhecido mecanismo de controle, que pode resultar em teratomas (LEE *et al.*, 2008).

5.1.2 Células-tronco adultas (CTA)

As CTA, não são totipotentes como as CTE, elas são multipotentes, ou seja, possuem o potencial de diferenciação, porém menor que as CTE (ZUK *et al.*, 2002). Estas células estão presentes em todos os tecidos do organismo, como por exemplo,

na medula óssea, no cordão umbilical, no sangue periférico, no músculo esquelético, no cérebro, no tecido adiposo, entre outros. As CTA isoladas destes tecidos apresentam grande potencial de proliferação e diferenciação em diversos tipos celulares, não apenas de origem mesodermal, mas também de outras linhagens, como ectodermal e endodermal (MOON *et al.*, 2008; Zuk, *et al.* 2002; HUANG *et al.*, 2005).

5.1.3 Células-tronco hematopoiéticas (CTH)

São células responsáveis pela manutenção e proteção do sistema imune de todos os tipos celulares do corpo, sendo elas as responsáveis principalmente pela constante renovação e produção de bilhões de células sanguíneas a cada dia (FRIEDENSTEIN, *et al.*, 1968).

As CTH podem ser isoladas de diversas fontes como medula óssea, sangue periférico e cordão umbilical (FLEMING e HUBEL, 2006; MINGUELL, ERICES e CONGET, 2001). Em princípio, a função destas células é apoiar processos de renovação fisiológica, reconstituindo o sistema hematopoiético, assim sendo, podem se diferenciar em diversas linhagens de células do sangue, tanto da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrócitos, megacariócitos/plaquetas, células dendríticas) quanto da linhagem linfóide (linfócitos T, linfócitos B, serial Killers) (WEISSMAN e SHIZURU, 2008). Diversos estudos tem mostrado que estas células podem ser amplamente utilizadas para o tratamento de diversas doenças oncohematológicas, como leucemias e doenças linfoproliferativas (FLEMING e HUBEL, 2006 e OGAWA, 1993) e hematológicas como Wiskott- Aldrich (PARKMAN, *et al.*, 1978), anemia de Falconi (BARRETT, *et al.*, 1977) anemia aplástica severa (STORB, *et al.*, 1976) dentre outras.

As CTH são caracterizadas imunofenotipicamente pela presença dos marcadores CD133, CD45 e CD34 (ZUK *et al.*, 2002).

5.1.4 Células-tronco mesenquimais (CTM)

O termo mesenquimal descreve tecidos de origem mesodérmica embrionária que originam o sistema músculo-esquelético, sanguíneo, vascular, urogenital e tecido conjuntivo (NARDI e MEIRELES, 2006), portanto, células-tronco mesenquimais são células derivadas do mesênquima.

As CTM foram inicialmente descritas como uma população de células formadoras de colônias (FRIEDENSTEIN, CHAILAKHJAN e LALYKINA, 1970), capazes de se diferenciar em diversos tecidos (PITTINGER *et al*, 1999). Inicialmente estas células eram isoladas da medula óssea, onde teriam a função de dar suporte as CTH. Posteriormente, descobriu-se que estas células também estavam presentes em outros tecidos do organismo, como polpa do dente (GROTHOS, *et al*, 2000), músculo esquelético, (QU-PETERSEN, *et al*, 2002), osso (NOTH, *et al*, 2002) e tecido adiposo, com a função de repor células perdidas (ZUK, *et al*, 2001) .

As CTM apresentam grande capacidade de auto-regeneração, além de exibir um amplo potencial para dar origem a diversos tipos celulares podendo se diferenciar não somente em células dos tecidos de origem mesodérmica, como osteócitos, condrócitos e adipócitos, mas também em células do sistema nervoso central (HORWITZ, 2003). Estas características fazem com que essas células tenham um papel essencial na regeneração e manutenção da homeostase de tecidos adultos que sofreram algum tipo de dano (DJOUAD *et al.*, 2007), representando, portanto, um tipo de CT somática com aplicações promissoras na medicina regenerativa (WAGNER *et al.*, 2005).

As CTM podem ser isoladas a partir de diversos tecidos, porém a similaridade destas células é bastante questionada (KOLF, CHO E TUAN, 2007). Alguns grupos citam diferenças nos marcadores de superfície, outros dizem que todas possuem expressões gênicas idênticas (JIANG, VAESSEN e LENVIK, 2002), mas alguns defendem que estas expressões são apenas similares (LEE, KIM e CHOI, 2004; WAGNER *et al*, 2005). Wagner e colaboradores (2005), afirmam que as expressões gênicas entre as CTM isoladas de diferentes tecidos apresentam grande variação gênica, principalmente no que diz respeito aos genes relacionados às

diferenciações. Este perfil gênico provavelmente está relacionado ao seu tecido de origem e podem ter implicações importantes nas funções celulares, tendo um grande impacto na medicina regenerativa, que deverá analisar muito bem estas variantes.

Quanto à morfologia, estas células são semelhantes aos fibroblastos e também possuem marcadores em comum com estes, como: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD 166 e não apresentam marcadores presentes nas CTH, em particular os marcadores CD31, CD45 e CD34 (ZUK *et al.*, 2002; WAGNER, *et al.*, 2005).

Devido às semelhanças com fibroblastos e grande gama de pesquisa usando este tipo celular a Sociedade Internacional de Terapia Celular recomendou em 2006 um conjunto de critérios mínimos para identificar estas células. Estes critérios são os seguintes: 1) as células devem ser aderentes ao frasco de cultivo; 2) devem expressar os marcadores de superfície CD90, CD73, CD105 e ser negativo para os marcadores de superfície CD14, CD19 e CD34, CD45, devem se diferenciar pelo menos em condrócitos, osteócitos e adipócitos (DOMONICI, *et al.*, 2006)

Em suma, existem semelhanças nas CT isoladas de diversas fontes, porém identificaram-se algumas particularidades, por exemplo, os diferentes tipos de marcadores de superfície bem como as diferentes taxas de diferenciação e diferentes expressões gênicas. Sendo assim, células multipotentes vindas de diversas fontes, podem responder diferentemente a diferentes estímulos. Todas estas características devem ser consideradas para efetivação de uma terapia celular (FRASER, *et al.*, 2006).

5.2 ALGUMAS FONTES DE CÉLULAS-TRONCO

Inicialmente acreditava-se que a medula óssea era a fonte exclusiva de CTA. Atualmente, acredita-se que todos os tecidos apresentem este tipo celular, inclusive o sistema nervoso central (BIEBACK *et al.*, 2008).

5.2.1 Células-tronco derivadas da medula óssea (CTMMO)

A medula óssea é derivada do mesênquima, e possui um suporte estromal que é facilmente isolado (ZUK *et al.*, 2002). Neste estroma, é possível encontrar células de origem endotelial, CTH e seus progenitores, e CTM (MINGUELL, ERICES e CONGET e 2001; KAISER *et al.*, 2007).

Amostras destas células são coletadas comumente através de punção na crista ilíaca, tíbia, fêmur, coluna vertebral, lombar e torácica, de doadores saudáveis, em seguida seu isolamento é feito utilizando protocolos específicos. As CTMMO depois de isoladas, podem se diferenciar em progenitores de vários tecidos mesenquimais, como ósseo, cartilaginoso e adiposo (KAISER *et al.*, 2007).

Segundo De Ugarte e colaboradores (2003), as CTMMO expressam os marcadores CD13, CD29, CD44, CD58, CD90, CD105, CD166, CD106 e SH-3 e representam uma população especializada de CTM que possui a função de dar suporte às CTH e regular a mobilização das mesmas.

Estas células possuem um grande potencial terapêutico, porém existem algumas características que dificultam o seu uso: a) O procedimento de coleta invasivo; c) baixo rendimento celular (BIEBACK *et al.*, 2008).

5.2.2 Células-tronco derivadas do cordão umbilical

O cordão umbilical possui duas fontes alternativas de CT, uma destas fontes é o sangue do cordão, onde é possível isolar CTH, através de um gradiente de concentração, a outra fonte é o tecido do cordão, onde, através de digestão enzimática, pode-se isolar CTM (WANG *et al.*, 2004).

A porção de células-tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical (CTMCU) apresenta aparência de fibroblasto assim como as CTMMO e CTMTA, e expressa marcadores CD73, CD105, CD90, CD29 e CD44. É também positiva para HLA-classe I, mas não expressa HLA-classe II nem os marcadores CD14, CD31,

CD34 e CD45 (BIEBACK *et al.*, 2008) que estão presentes apenas na porção de células-tronco hematopoiética derivada do cordão umbilical (CTMCU).

Quando cultivadas em meio apropriado, as CTMCU podem sofrer diferenciação osteogênica, condrogênica, e neurogênica, (OH *et al.*, 2008), porém, há divergências entre os autores quando relatam a diferenciação adipogênica. Alguns afirmam que estas células não sofrem diferenciação adipogênica (BIEBACK, 2008), outros confirmam a diferenciação (MAJORE, *et al.*, 2010).

Segundo Bieback (2008), quando comparadas à medula óssea e ao tecido adiposo, os isolados de células do cordão umbilical apresentam uma menor quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC), porém, sua capacidade de expansão é bem maior.

5.2.3 Células-tronco derivadas da placenta e do líquido amniótico

A placenta e o líquido amniótico parecem ser as fontes mais completas de CTA, possuindo linhagens mesenquimal, hematopoiética, trofoblasto e possivelmente um tipo mais primitivo de células indiferenciadas. Estas células teriam potencial pluripotente e podem ser coletadas por processos não invasivos e sem implicações éticas. Mas, o método de isolamento e a quantidade de células ainda dificultam o processo (FAUZA, 2004).

5.2.4 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMTA)

Embora a medula óssea seja a fonte universal de CTM, estudos recentes indicam o tecido adiposo como uma nova fonte de CT multipotentes, servindo como ferramenta para estudos farmacológicos e clínicos. Estas células são isoladas a partir de tecido adiposo lipoaspirado e quando induzidas *in vitro*, podem sofrer diferenciação adipogênica, osteogênica, angiogênica, miogênica e apresentar características morfológicas e expressar várias proteínas consistente com fenótipos neuronais (ZUK *et al.*, 2002; KATZ *et al.*, 2005).

O tecido adiposo é derivado da camada germinativa mesodérmica, similar a medula óssea e contém um estroma que pode ser facilmente isolado. Este estroma é composto de diversos tipos celulares incluindo células endoteliais, células musculares, pericitos, fibroblastos, mastócitos e pré-adipócitos (ZUK *et al.*, 2001). Após o isolamento, estas células podem ser cultivadas selecionando uma população homogênea de células e estas podem se manter em estado indiferenciado por um longo período (ZUK *et al.*, 2001).

Vários grupos estão estudando estas células e sua nomenclatura é bem diversa: células precursoras de adipócitos, pré-adipócitos, células-tronco adultas derivada do tecido adiposo, células estromal derivada do tecido adiposo, células estromal aderente derivada do tecido adiposo e células-tronco derivadas do tecido adiposo, sendo este último o termo consensual definido no Segundo Encontro Anual Internacional da Sociedade de tecnologia em gordura aplicada de 2004 em Pittsburgo (Mitchell *et al.* 2006).

As CTMTA possuem muitas características fenotípicas e funcionais semelhantes às CTMMO (MEYERROSE, *et al.* 2006), dentre estas semelhanças, estão a morfologia fibroblastóide e a expressão de marcadores como o CD44, CD73, THy-1 (CD90), endoglina (CD105) e a não expressão de marcadores de linhagem hematopoiética CD34 e CD45 (CHOI *et al.*, 2006; NOEL *et al.* 2008; DE UGARTE, *et al.*, 2003). O tamanho e a granulosidade destas células também é semelhante.

Uma das diferenças entre as CTMMO e as CTMTA é a expressão de alguns marcadores de superfície, relacionados às moléculas de adesão, sendo estes o CD49d, e o CD106. O CD49d está presente apenas nas CTMTA já CD106 apenas nas CTMMO (KATZ *et al.* 2005; DE UGARTE, *et al.*, 2003). As diferenças entre as CTMMO e as CTMTA também podem estar relacionadas às suas funções, pois as CTMMO representam uma população especializada de CTM que dá suporte a hematopoiese e regula o tráfico das CTH. Já as CTMTA representam uma população de CTM periféricas e devido a diferenças relacionadas a moléculas de adesão, pode ter o *homing* diferente das CTMMO (DE UGARTE, *et al.*, 2003). Além disto, as CTMTA apresentam algumas vantagens em relação às CTMMO: a) o tecido adiposo é mais abundante, sendo possível isolar uma maior quantidade de células-tronco multipotentes (ELABD *et al.*, 2007) (4×10^7 células/100 cm³ de tecido adiposo aspirado *versus* 1×10^5 células/30 cm³ de medula óssea aspirada) (DRAGOO *et al.*, 2003); b) é de fácil obtenção, com procedimentos pouco invasivos; c) Possui maior

capacidade de expansão *in vitro* (ZUK *et al.* 2001, DE UGARTE *et al.*, 2003, BIEBACK *et al.*, 2008).

Além das CT, segundo Fernyhough (2008), os adipócitos maduros, que normalmente são removidos após a lavagem e centrifugação do tecido lipoaspirado, também possuem um potencial de proliferação, porém não se sabe se estas células também possuem um capacidade de diferenciação, por isto, esta fração do tecido lipoaspirado também deve ser melhor estudada, pois pode representar uma alternativa para alguns tipos de transplantes.

As células isoladas através da digestão do tecido gorduroso retirado da lipoaspiração possuem subpopulações heterogêneas de células. Rada e colaboradores (2010) separaram estas populações com o auxílio de *beads* magnéticos previamente tratados com diferentes anticorpos (CD29, CD44, CD49d, CD73, CD90, CD105, p75 ou STRO-1) e descobriu que nem todas as subpopulações dos isolados de gorduras possuem o mesmo perfil gênico, porém todos apresentam uma capacidade de diferenciação osteogênica. O grupo também observou que as subpopulações positivas para STRO-1, apresentaram uma coloração mais intensa, o que pode significar uma maior plasticidade desta subpopulação.

Um dos grandes problemas em se enxertar CT é a probabilidade destas células desenvolverem características tumorais. Rubio (2005) injetou CTMTA logo após o isolamento, em ratos imunodeprimidos e estes não apresentaram características tumorais dentre um e quatro meses após o enxerto, porém quando as células foram cultivadas, e injetadas em ratos nas mesmas condições, houve a formação de tumores três meses após o transplante. Por isso, apesar de ser uma excelente fonte de CT, e uma grande promessa para a engenharia de tecidos, ainda são necessários muitos estudos antes de ser aplicada em humanos.

5.2.4.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo pode ser dividido em dois: a gordura branca e a gordura marrom, sendo que ambas estão ativamente relacionadas com a regulação da homeostase energética através da liberação de diversas moléculas bioativas denominadas adipocitocinas, fazendo com que este tecido possua importantes

funções endócrinas. A homeostase energética é o balanço determinado pela ingestão de macronutrientes, pelo gasto energético e pela termogênese dos alimentos (TRAYHURN e WOOD, 2004). As gorduras branca e marrom compartilham características metabólicas, sendo que a gordura marrom funciona como um órgão de dissipação de energia, já a gordura branca é o principal armazenamento de energia do organismo (HIMMS-HAGEM, 1990).

O tecido adiposo é bastante complexo, com populações de células diversas de acordo com a natureza e o local onde esta gordura. Sendo assim este tecido possui grande variabilidade celular, podendo sofrer alterações microscópicas e macroscópicas. A gordura marrom pode ser transformada em branca durante o desenvolvimento, assim como a gordura branca pode ser transformada em marrom durante adaptações ao frio ou durante um tratamento medicamentoso (CASTEILLA, *et al.*, 1989).

O tecido adiposo é dividido em duas diferentes frações, sendo uma de adipócitos maduros e outra o estroma vascular, que é bastante heterogêneo. Qualquer gordura abdominal possui basicamente duas populações celulares, no que diz respeito a tamanho e granulosidade e possui uma maior quantidade de gordura marrom do que branca. A fração que possui maior quantidade de gordura branca, também possui mais células hematopoiéticas, sendo isto comprovado através da citometria de fluxo usando o marcador de linfócitos CD45 (40% na fração de gordura branca, contra 10% na fração de gordura marrom) (PRUNET-MARCASSUS, *et al.* 2006).

Prunet-Marcassus e colaboradores (2006) estudaram a heterogeneidade das células que compõem isolados de diferentes depósitos de gordura, comparando o seu potencial de diferenciação e verificaram que as gorduras marrom e branca possuem grandes diferenças em termos de metabolismo e composição celular. Ambas as células, extraídas tanto de gordura branca como de gordura marrom, possuem capacidade de secretar matriz extracelular em condições osteogênicas, porém a densidade desta matriz em células derivadas da gordura marrom é bem menor do que quando comparada a gordura branca, fato que pode significar uma menor quantidade de células-tronco nas frações estromais com gordura marrom.

Pensando em terapia celular, deve-se analisar muito bem as diferenças entre estes dois tipos de gordura.

5.2.4.2 CTMTA diferenciadas em adipócitos

Constantemente, cirurgiões plásticos se deparam com desafios de reconstruir tecidos moles perdidos. Devido este problema, a engenharia de tecidos tem procurado terapias que possam reparar estes danos. Uma das alternativas, por exemplo, é a técnica de enxertos, mas na maioria das vezes os pacientes submetidos a este procedimento precisam de um segundo enxerto. Outra técnica que tem surgido neste sentido é a terapia celular, onde as CTMTA podem ser utilizadas como uma fonte de células que irão ajudar na regeneração do tecido lesionado (CHOI *et al.*, 2006).

A diferenciação adipogênica é um complexo processo acompanhado pela troca da morfologia celular, sensibilidade hormonal e expressão gênica (BUNNELL, 2008). Quando induzidas, através de meios especializados, as CTMTA poderão apresentar características exclusivas de adipócitos como, por exemplo, crescimento do acúmulo de lipídios intracelulares, que pode ser observado a partir do quarto dia de diferenciação (CHOI *et al.*, 2006); também expressam marcadores específicos como α -FABP, PPARs, C/EBPs, além de respostas lipolíticas e capacidade de secretar leptina e adiponectina dentro dos valores relatados para adipócitos humanos (RODRIGUEZ *et al.*, 2004).

Se as CTMTA não forem induzidas, mesmo assim elas poderão se diferenciar em condrócitos, osteócitos e adipócitos, porém, quando cultivadas em meio indutivo para adipócitos, elas não irão se diferenciar em condrócitos ou osteócitos (CHOI *et al.*, 2006).

5.2.4.3 CMTA diferenciadas em osteócitos

Outro desafio para a engenharia de tecidos é a recomposição de tecidos ósseo, recomendada em tratamento de fraturas, procedimento de alongamento ósseo e reconstrução facial. Novamente a engenharia de tecido tem apostado na

utilização de populações de células progenitoras como estratégia (DRAGOO *et al.*, 2003) e as CTMTA foram recentemente aceitas para desempenhar este papel, pois, quando cultivadas *in vitro*, e induzidas com a utilização de meio adequado, com aproximadamente 14 dias estarão exibindo potencial osteoblástico, que poderá ser comprovado pela formação de matriz extracelular, expressão de fosfatase-alcaina e expressão de marcadores gênicos como CBFA-1 e osteonectina (ELABD *et al.*, 2007).

Para a diferenciação osteogênica é necessário o uso da dexametasona (um glicocorticóide sintético), que irá estimular a proliferação das células e irá dar suporte a osteogênese (COOPER, HEWISON E STEWART, 2008). A mineralização e a modulação da atividade dos osteoblastos são feitas através de um fosfatos orgânico, o β -glicerofosfato e o ascorbato 2 fosfato (TUAN, BOLAND E TULI, 2002)

Elabd e colaboradores (2007) testaram a efetividade da osteogênese injetando CTMTA na fase inicial de diferenciação (dia 3) em camundongos. Essas células foram capazes de induzir a formação de um grande tecido ósseo, mineralizado e vascularizado, exibindo osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A presença destes três tipos celulares se dá pelo fato de que o desenvolvimento ósseo consiste basicamente de três fases: 1) proliferação com secreção da matriz; 2) maturação da matriz; 3) mineralização da matriz. Na fase de proliferação, ocorrem diferenciação e proliferação de osteoblastos e uma matriz extracelular, incluindo colágeno tipo I, é formada. Na fase de maturação da matriz, a taxa de proliferação dos osteoblastos decresce, e vários genes, incluindo a osteonectina, fosfatase alcalina e osteopontina são expressos. A fosfatase alcalina é uma enzima ligada à membrana que é abundante nas fases iniciais da formação óssea, o aumento nos níveis desta enzima, corresponde com aumento da formação óssea. Por fim, ocorre a fase de mineralização, que é observada aproximadamente duas semanas após a indução da osteogênese. Nesta fase existe a mineralização da matriz extracelular e a expressão de marcadores de genes ósseos, incluindo sialoproteína e osteocalcina. A osteonectina é expressa em todas as fases, mesmo antes da diferenciação, por este motivo, não pode ser utilizada como indicadora de osteogênese (LEE *et al.*, 2008).

5.3 MOLÉCULAS DE ADESÃO (MA)

A terapia celular é sem dúvida uma terapia promissora para a engenharia de tecidos, mas além capacidade de diferenciação e migração celular, esta técnica exige uma preocupação com a aplicação correta destas células e precisa de garantias que estas células terão a aderência desejada, caso contrário o implante não apresentará o resultado desejado. Por isso, uma atenção especial deve ser dada à expressão das MA.

Segundo De Ugarte e colaboradores (2003), uma das grandes diferenças entre as CTMMO e as células CTMTA é a expressão de algumas MA ligadas ao *homing* e mobilização das CTH. Devido estas diferenças, o *homing* destas células pode ser diferente, e esta possibilidade tem implicações muito importantes para as terapias.

As MA são grupos de proteínas que se encontram na superfície das células, com função de mediar a interação entre duas ou mais classes celulares, e entre a matriz extracelular (APLIN, *et al.* 1999; PARKES, HART, 2000). Esta interação demanda uma vasta gama de respostas celulares, dependentes de integrinas expressas pelas células e as propriedades químicas das moléculas de adesão situadas na matriz extracelular (DJOUAD *et al.* 2007).

Como as CT possuem a função de promover a manutenção dos tecidos, regulando quais tipos celulares o organismo esta necessitando, as MA facilitam a comunicação das células com a matriz extra-celular, sendo portanto pré requisito para a manutenção dos tecidos (DJOUAD, *et al.* 2007).

As MA mais conhecidas estão divididas em quatro famílias: as imunoglobulinas, as integrinas, as selectinas e as caderinas.

5.3.1 Imunoglobulinas

A super família das imunoglobilinas (IgSF), são glicoproteínas transmembranais com importante papel de sinalização e adesão célula a célula e

matriz celular e célula, tendo importante função para coordenar as interações celulares como respostas imunes e formação de tecido durante a morfogênese.

Os receptores das imunoglobulinas são os CD4 e CD8 co-receptores de células T (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003).

As imunoglobulinas facilitam a ligação das células do endotélio envolvidas com respostas imunes (KOUKOULIS, CARLO, GOULD, 1998).

5.3.2 Integrinas

As integrinas são glicoproteínas transmembranais, compostas de subunidades α e β e sua combinação determina especificidades ligantes. Sua interação com proteínas específicas da matriz extracelular, sugere que elas podem estar envolvidas na diferenciação e migração celular (DJOUAD *et al.*, 2007) bem como na angiogênese, em processos inflamatórios e na metástase de tumores (BERCZI, SZENTIVANYI, 2003).

As integrinas interagem com a matriz extracelular, sendo necessário um representante de ambos para a ligação célula-matriz, incluindo laminina, fibronectina, tenascina. O tipo de integrina varia dependendo do tipo celular, tendo importante papel em diferentes ligações. Estas glicoproteínas estão presentes tanto em interações célula-matriz, como em interações célula-célula (KOUKOULIS, CARLO, GOULD, 1998).

5.3.3 Selectinas

As selectinas são MA expressas em células endoteliais, leucócitos e plaquetas e é a primeira molécula de adesão envolvida em reações inflamatórias.

A família das selectinas consiste de três moléculas relacionadas: 1) as L-selectinas, que são expressas por muitos leucócitos; 2) a E-selectina, que é restrita as células endoteliais ativadas por citocinas inflamatórias; 3) P-selectinas, que são

expressas nas células endoteliais e plaquetas (CHAVAKIS, URBICH, DIMMELER, 2008).

5.3.4 Caderinas

As caderinas são uma família de moléculas de adesão essencial para a preservação, integridade do tecido, morfogênese, reconhecimento célula-célula (KOUKOULIS, CARLO, GOULD, 1998).

As caderinas são um grupo de glicoproteínas Ca^{2+} dependente, que medeiam interações célula-célula durante a morfogênese (DUGUAY, FOTY, STEINBERG, 2003). Também estão presentes em desmossomos e outras junções complexas (SIED *et al.*, 2002).

Em embriões, a migração celular é inicialmente associada com a perda da expressão de caderinas, que só reaparece quando as células chegam ao seu destino e integram ao novo tecido (KOUKOULIS, CARLO, GOULD, 1998).

As caderinas são predominantemente expressas no sistema nervoso central, mas também estão presentes em outros tecidos. Os membros desta família são nomeados de acordo com seu tecido de origem, por exemplo, E-caderina são células epiteliais, N-caderinas são células neurais (KOUKOULIS, CARLO, GOULD, 1998).

5.4 CRIOPRESERVAÇÃO

Sendo as CTMTA ferramentas tão importantes para a terapia celular, o armazenamento destas células é sem dúvida uma questão a ser pensada. Dentre as técnicas utilizadas para este fim está a criopreservação. Esta técnica tornou-se muito vantajosa para os cientistas, pois facilita o transporte de materiais biológicos, permite o armazenamento de células até que os pesquisadores atinjam o número adequado para realizar uma determinada terapia ou estudo e tempo para a conclusão de testes de controle de qualidade deste material (GONDA, *et al*, 2008).

A solução de criopreservação de células mais utilizado é SFB (Soro Bovino Fetal), que serve como de nutriente para as células, acrescido de 10% de DMSO (Dimetil Sulfóxido), um agente crioprotetor permeável que previne a formação de cristais de gelo intracelular, com ou sem 10% de meio de cultivo. O DMSO pode ser tóxico para as células em temperatura ambiente, por isso, deve-se remover todo o DMSO imediatamente após o descongelamento das células. O soro adicionado à solução crioprotetora, na maioria das vezes, é derivado de animais e serve como fonte de nutrientes para as células e outros fatores indefinidos (De ROSA *et al.* 2009), porém, para o uso destas células em seres humanos, há necessidade de se estudar outros meios, com menor risco de contaminantes.

Apesar das inúmeras vantagens que a criopreservação apresenta, estudos continuam sendo realizados, para avaliar os danos que esta técnica pode causar ao material biológico. O resfriamento considerável causa um desequilíbrio celular, o que pode ocasionar a formação de gelo no interior da célula, que é letal, (TONER, CRAVALHO, KAREL *et al.*, 1993). A taxa de congelamento e descongelamento do material biológico também influencia na sua viabilidade e pode trazer danos a membrana celular (MIENO *et al.*, 2008; GONDA, *et al.*, 2008). O uso de soluções crioprotetoras, como o glicerol e o DMSO, amenizam este problema, porém devem ser administradas com cautela, pois, conforme dito anteriormente podem ser tóxicas às células, principalmente o DMSO (GOLDMAN, *et al.*, 1978).

A eficiência deste método, já foi testada sobre as CTMTA e quando comparadas células criopreservadas e não criopreservadas as CTMTA expressaram marcadores de superfície semelhantes, além de manterem uma taxa de crescimento e de diferenciação similar às taxas das células não criopreservadas, indicando que a criopreservação não afeta suas características funcionais (LIU, *at al.*, 2008; GONDA *et al.*, 2008).

5.5 CIRURGIAS PLÁSTICAS NO BRASIL.

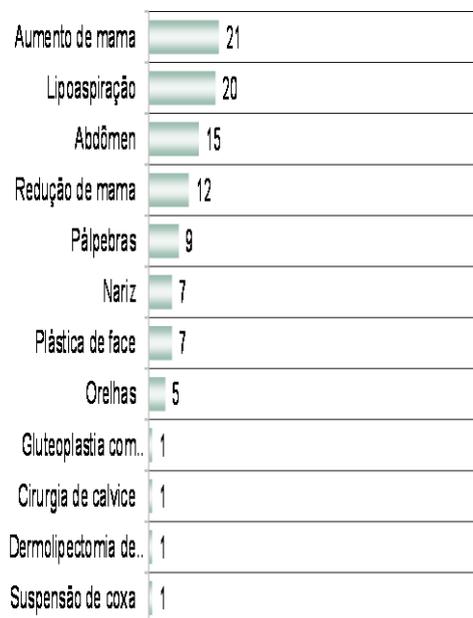
Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, os cirurgiões plásticos no Brasil, possuem em média 12 anos de especialização em cirurgia plástica e cada um destes cirurgiões realizam cerca de 178 cirurgias por ano, sendo a maioria de

caráter estético (132 cirurgias estéticas x 58 de cirurgias reparadoras). Considerando que existem no Brasil aproximadamente 3533 profissionais habilitados, são realizadas 629 mil cirurgias plásticas por ano, excetuando cirurgias de pequeno porte.

A maior parte das cirurgias é realizada em hospitais particulares, sendo a maioria pagas pelo próprio paciente (82% x 17% por meio de convênio médico). As mulheres representam a maior parte dos pacientes (88%) e faixa etária predominante ocorre entre os 19 e 50 anos (72%).

Dentre as cirurgias estéticas, as intervenções mais realizadas são aumento de mama (21%), seguida da lipoaspiração (20%) e de abdômen (15%). Já em relação às cirurgias reparadoras, as mais freqüentes estão relacionadas a retiradas de tumores (43%) (FIGURA 01).

Todos os dados mencionados acima foram coletados no período de setembro de 2007 à agosto de 2008, segundo pesquisa encomendada ao Datafolha Instituto de Pesquisa (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA, 2009)



Base: Profissionais que realizaram cirurgias estéticas – 360 entrevistas

P.13 Do total de cirurgias plásticas estéticas, realizadas entre setembro de 2007 e agosto de 2008, e excetuando as ambulatoriais, de pequeno porte, (datafolha, 2009)

FIGURA 01 – TIPO DE CIRURGIAS PLÁSTICAS ESTÉTICAS*, REALIZADAS ENTRE SETEMBRO DE 2007 E AGOSTO DE 2008 (73%)

FONTES- Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (2009)

* 73% das cirurgias plásticas realizadas no Brasil são de caráter estético.

6 MÉTODOS

Os experimentos foram realizados após autorização do Comitê de Ética do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

A coleta das amostras foi realizada por cirurgiões plásticos em clínicas especializadas, durante o procedimento de lipoaspiração e com a prévia assinatura do termo de consentimento esclarecido do doador (ANEXO 1).

6.1 DESENHO DO ESTUDO

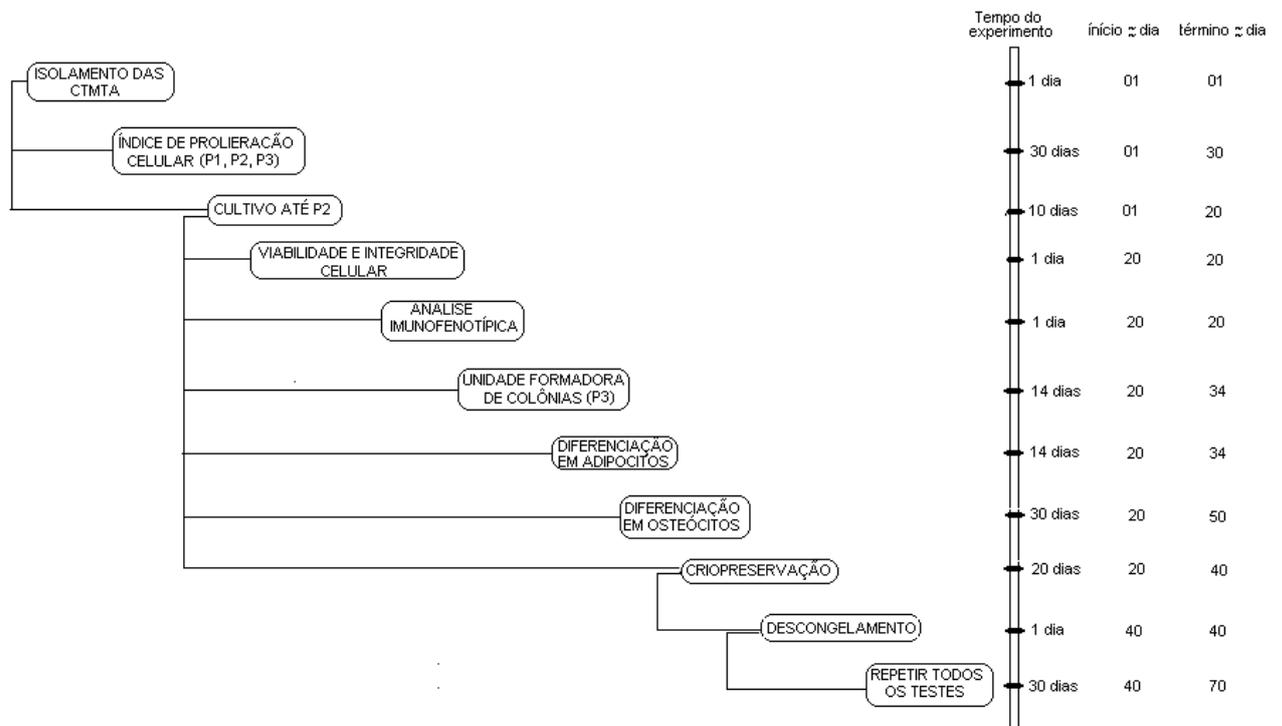


FIGURA 02: ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.
FONTE: O autor (2010)

Primeira Etapa: Foram coletadas amostras de tecido adiposo de 40 pacientes, maiores de 18 anos. Estas amostras foram utilizadas para o aprendizado e padronização dos procedimentos de isolamento, cultivo, índice de crescimento celular, unidade formadora de colônia, diferenciação em adipócitos e osteócitos, criopreservação e citometria de fluxo. **Segunda Etapa:** As CTMTA foram isoladas de acordo com os protocolos pré-estabelecidos na primeira etapa e cultivadas. Após expansão das células até a passagem dois (P2), as amostras foram fracionadas. Uma fração foi utilizada para caracterização imunofenotípica (1×10^7), utilizando citometria de fluxo; outras duas frações foram destinadas a criopreservação; uma terceira fração foi induzida a se diferenciar em adipócitos e osteócitos; e outra foi destinada a análise de unidade formadora de colônia. Da primeira passagem (P1) até terceira passagem (P3) foi calculado o índice de Proliferação celular (IP). **Terceira Etapa:** As amostras criopreservadas foram descongeladas as análises foram repetidas. **Quarta Etapa:** análise dos resultados, publicação científica e elaboração da Dissertação de Mestrado.

6.2 ISOLAMENTO DE CTM A PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO.

As amostras de tecido adiposo foram coletadas a partir de doadores saudáveis, mediante prévia autorização dos mesmos, por assinatura do termo de consentimento esclarecido (Anexo I). As coletas foram realizadas em Clínicas especializadas, por cirurgiões plásticos devidamente habilitados, utilizando técnica de lipoaspiração. Após a coleta, as amostras foram manipuladas em no máximo 24 horas, seguindo o protocolo abaixo:

Cinqüenta mililitros de cada amostra foram lavados extensivamente com tampão fosfato salino (PBS) (Sigma, St. Louis, MO-USA) contendo 300 **unidades**/mL de **penicilina** e 300µg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, MO- USA). Após a lavagem das amostras e remoção dos *debris*, estas foram colocadas em um tubo de 50 ml com 0,075% de colagenase tipo I A (Sigma, St. Louis, MO- USA) preparada em PBS contendo 300 **unidades**/mL de **penicilina** e 300µg/mL de estreptomicina, para digestão do tecido. As células foram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta de 25 ml para facilitar a digestão enzimática e em seguida

foram incubadas por 30 minutos a 37°C com agitação. Após a incubação a atividade da colagenase tipo I foi inativada, adicionando igual volume de Eagle modificado por Dulbecco/F12 (DMEM/F12) (LGC Biotecnologia, Brasil), contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO B Life Technologies, inc., Rockville-USA RL). Para desagregar possíveis células agrupadas, a amostra foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta de 25 mL várias vezes. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 600g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete ressuspenso em 10 ml de PBS com 300 **unidades**/mL de **penicilina** e 300µg/mL de estreptomicina e novamente centrifugado a 600g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete re-suspenso em 5 ml de DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100**unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL estreptomicina. A suspensão de células foi filtrada em malha de 100µM (Becton Dickinson, USA). A contagem das células foi realizada com um hemocitômetro e utilizando Azul de Trypan (Sigma, St. Louis, MO- USA) (para diluição de 1:1 foi adicionado 10 µL da suspensão de células para 10 µL de Azul de Tripan) e então semeadas na quantidade de 1×10^5 células por cm^2 em frascos de cultivo de 25 cm^2 e de 75 cm^2 com meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100**unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL de estreptomicina (meio de cultivo padrão) e incubadas a 37°C e 5% CO_2 (adaptado de ZUK *et al.* 2002 e BUNNELL *et al.*, 2008).

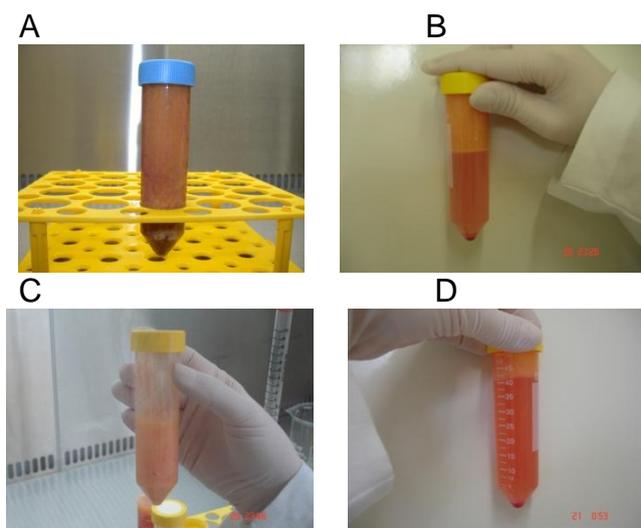


FIGURA 03 –. AMOSTRA DE GORDURA
 FONTE – O Autor (2010)

NOTA: A) amostra recém coletada; B) amostra após 2 lavagens com PBS; C) amostra após 4 lavagens com PBS; D) amostra após a digestão enzimática e centrifugação

6.3 CULTIVO E EXPANSÃO

Após 72 horas de cultivo o meio foi aspirado das garrafas e as células foram lavadas com PBS pré-aquecido suplementado com 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL de estreptomicina, em seguida foram adicionados 7 ml de DMEM/F12 nas garrafas de 25 cm² e 12 mL na garrafas de 75 cm². As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado duas vezes por semana até que as células alcançassem de 80 a 90% de confluência. Após atingirem a confluência desejada, as células foram lavadas brevemente com PBS pré-aquecido e adicionado tripsina/EDTA (0,25%) (Sigma, St. Louis, MO- USA). As células foram incubadas por 10 minutos á 37°C, e foi verificado em microscópio, se as células se desprenderia do frasco. Em seguida foi adicionado igual volume de meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100**unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL de estreptomicina para neutralizar a ação da tripsina. A suspensão de células foi transferida para um tubo de centrífuga estéril e centrifugada a 600g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em aproximadamente 5ml de meio de DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL de estreptomicina.

A contagem das células foi realizada com uma câmara de hemocítômetro, utilizando Azul de Tripán (diluição de 1:1) (BUNNELL *et al.*, 2008).

Após a contagem, as células foram novamente semeadas em garrafas de 75 cm² na concentração de 1X10³ células/ cm² e incubadas a 37°C e 5% CO₂ até que atingissem 80% de confluência. Após atingirem a confluência as células foram tripsinizadas novamente e disponibilizadas para as análises.

A primeira semeadura de células foi considerada passagem 1 (P1), a segunda semeadura passagem 2 (P2) e a terceira passagem 3 (P3).

6.4 CRIOPRESERVAÇÃO

Após tripsinizar as células em P2 conforme descrito anteriormente, e confirmar a viabilidade das células pelo método de exclusão por azul de Tripán, uma

fração de células foi submetida ao procedimento de criopreservação. As células foram contadas com o auxílio de um hemocítômetro (aproximadamente 1×10^6 células/ml). O meio crioprotetor foi composto de 80% de SFB, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO); (LGC Biotecnologia, Brasil) e 10% de DMEM/F12 e 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100 µg/mL estreptomicina.

Alíquotas de um ml (contendo 1×10^6 células) foram transferidas para tubos criogênicos pré-marcados (tipo celular, densidade e data). Estes tubos foram resfriados com auxílio de um equipamento de congelamento programável (Nicool Lm10; Air Liquide, Marne La Vallée, France) usando o seguinte programa: 15 minutos velocidade 3, 45 minutos velocidade 5 e 10 minutos na velocidade 9. Este método impede a formação de cristais de gelo no interior da célula, pois o congelamento ocorre lentamente (De Rosa *et al.* 2009). Logo após, os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido onde permaneceram estocados por aproximadamente 20 dias.

Todas as amostras foram criopreservadas em triplicata.

O botijão de nitrogênio foi reabastecido sempre que o nível estava em 15 cm, sendo a leitura realizada semanalmente (adaptado de BUNNELL, *et al.*, 2008 e CARVALHO *et al.*, 2008).

6.5 ANÁLISE DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

Antes e após a criopreservação, foram semeadas, em triplicata, 10 células por cm^2 em poços de 9cm^2 com meio de DMEM/F12 suplementado com 10% de SFB, 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100 µg/mL estreptomicina. Após 14 dias, o meio foi removido e as células foram fixadas com metanol por 5 minutos e em seguida coradas com 0,5% de cristal violeta em metanol por mais 5 minutos. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e secos. O número de colônias com mais de 2 mm foram contadas e os resultados representam o número de colônias formadas por 100 células semeadas, (colônias contadas/ células inoculadas) X 100. (SOTIROPOULOU, *et al.* 2006)

6.6 ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em todas as passagens e após a criopreservação, uma fração de cada amostra foi semeada, em triplicata, em garrafas de cultivo de 25 cm² na concentração de 1X10³ células por cm², com meio de cultivo padrão e incubadas a 37°C e 5% CO₂. No décimo dia de cultivo estas células foram tripsinizadas, conforme descrito na etapa de cultivo e expansão e contadas com um hemocitômetro. Durante os 10 dias de cultivo o meio foi trocado duas vezes por semana. O índice de proliferação foi obtido dividindo o número de células coletadas pelo número de células semeadas (adaptado de SOTIROPOULOU, *et al* 2006).

6.7 ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA

Todas as amostras foram analisadas quanto à expressão de marcadores de superfície (QUADRO 01), utilizando anticorpos monoclonais contra antígenos CD, conjugados com fluorocromos e analisados, antes da criopreservação e após o descongelamento, por citometria de fluxo. Para a citometria de fluxo foi usado o painel representado no quadro 02.

Todo o material utilizado na citometria de fluxo, Kit Anexina V – 7AAD, anticorpos monoclonais e tubos, foram da marca Becton Dickinson (USA) com exceção do PBS.

As células aderentes foram destacadas com tripsina (0,25%), centrifugadas por 3 minutos a 600g e ressuspensas em 1,1 mL de PBS. Em seguida foram colocados 100µL desta solução de células em 11 tubos de 5mL para citometria. As alíquotas foram incubadas com os anticorpos que estão descritos no quadro 01. Os anticorpos primários foram incubados por 15 minutos no escuro. Em seguida foram adicionados 400µL de PBS em cada tubo, homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se a 600g por três minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de *Binding Buffer*. O anticorpo contra o CD105 é um anticorpo purificado e não conjugado com fluorescência, por este motivo foi necessário incubá-

lo com anticorpo secundário por 15 minutos no escuro e repetida a etapa de lavagem das células. Após todas as alíquotas estarem lavadas, inclusive a amostra incubada com o anticorpo contra o CD105 e com o anticorpo secundário, foram adicionados 5 µL de 7-AAD e incubada no escuro por 15 minutos. Logo após foram adicionados 400 µL de *Binding Buffer* e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA) (DE UGARTE *et al.*, 2003 e CARVALHO *et al.*, 2008).

Foram analisados 20.000 eventos (células), sendo que FL1 representa a leitura para FITC, FL2 leitura para PE e FL3 leitura para 7AAD.

Marcador	Clone	Reatividade	Fluoróforo	Função
CD34	581/CD34	Humano *	FITC	Marcador de células-tronco (precursoras), presente também em progenitores hematopoéticos, endotélio vascular e em fibroblastos de alguns tecidos. Possivelmente desempenha um papel na sinalização da transdução. Também pode ter um papel na adesão de antígenos específicos do endotélio
CD45 (antígeno leucocitário comum)	HI30	Humano *	PE	Marcador de leucócitos, as proteínas CD45 são encontradas em todas as células de origem hematopoéticas, exceto eritrócitos.
CD49d (Integrina α4)	9F10	Humano *	PE	Glicoproteína transmembranar, integrina α4. Intermedia uma variedade de interações célula-célula e célula matriz, estando envolvida na adesão celular.
CD73 (Ecto-5-nucleotidase)	AD2	Humano *	PE	Possui atividade enzimática e catalisa a desfosforilação da adenosina monofosfato convertendo em adenosina. Tem-se sugerido que pode mediar sinais co-estimulatórios na ativação de células T e adesão de linfócitos no endotélio.
CD90 (THy-1)	5E10	Humano *	FITC	Tem-se especulado papéis na célula a célula, e as interações célula-matriz, com implicação no crescimento de neuritos, a regeneração do nervo, apoptose, metáfase, inflamação e fibrose.
CD105 (endoglina)	266	Humano *	PURIFICADO	Modulador de respostas celulares do complexo TGF-β

QUADRO 01 – Marcadores utilizados para caracterização imunofenotípica

FONTES - BD Biosciences

NOTA: * Todos os anticorpos foram fabricados em camundongos.

Tubos	Marcadores
1	Controle só células
2	Controle isotópico
3	Anti- CD90 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (controle)
4	Anti- CD73 conjugado com Ficoeritrina (PE) (controle)
5	CD34 FITC / CD45PE / 7-AAD
6	CD34 FITC / CD49d PE / 7-AAD
7	CD34 FITC / CD73 PE / 7-AAD
8	CD90 FITC / CD45PE / 7-AAD
9	CD90 FITC / CD49d PE / 7-AAD
10	CD90 FITC / CD73 PE / 7-AAD
11	CD105 FITC / 7-AAD

QUADRO 02: Painel de marcadores utilizados para análise das CTMTA.
 FONTE: O autor (2010)

Os valores de percentagem de cada marcador foram analisados através do software Cyflogic v. 1.2.1. Os resultados foram apresentados pelo software através da sobreposição do controle isotópico com a marcação de expressão de cada marcador. As expressões são negativas quando a marcação sobrepõe a marcação do controle isotópico. Expressões positivas são apresentadas por marcações que estão fora da sobreposição da marcação do controle isotópico. Quanto mais distante do controle isotópico esta a marcação da expressão, maior a população de células positivas para o marcador em questão. Após a sobreposição, o próprio software apresenta uma tabela de valores em percentagem de expressão para cada marcador.

6.8 ANÁLISES DE VIABILIDADE CELULAR COM ANEXINA V e 7-AAD

As células aderentes foram destacadas com tripsina (0,25%), centrifugadas por 3 minutos a 600g e ressuspensas em 2 mL de PBS. Em seguida foram colocados 100µL desta solução de células em 2 tubos de 5mL para citometria. Em um dos frascos foi adicionado o anticorpo contra o CD34 e no outro anticorpo contra o CD90 e incubados no escuro por 15 minutos. Em seguida foram adicionados 400µL de PBS em cada tubo, o qual foi homogeneizado em vortex e centrifugado. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100µL de *Binding Buffer*. Logo

após foram adicionados 5µL de anexina V, 5µL de 7-AAD e os tubos foram incubados no escuro por 15 minutos. Após a incubação foram adicionados 400µL de Binding Buffer homogeneizado no vortex e realizada a leitura no citometro de fluxo (FACS Calibur; Becton Dickinson, USA) (CARVALHO *et al.*, 2008).

6.9 DIFERENCIAÇÃO

Todas as amostras foram submetidas ao processo de diferenciação celular antes da criopreservação e após o descongelamento. Estas foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos e osteócitos.

As células em P2 foram tripsinizadas (tripsina 0,25%) e semeadas na concentração de 1×10^3 células/cm² em placas de 12 poços com meio de cultivo padrão (3ml em cada poço) e incubadas a 37°C e 5% CO₂ até que as células atingissem aproximadamente 80% de confluência. Durante este período o meio de cultivo padrão foi trocado duas vezes por semana. Após atingir a confluência desejada, células de 4 poços foram induzidas a se diferenciarem em adipócitos, células de outros quatro poços foram induzidas a se diferenciarem em osteócitos e células de quatro poços foram mantidas com meio de cultivo padrão (controle).

6.9.1 Diferenciação adipogênica

A diferenciação adipogênica foi induzida mantendo o cultivo das células em meio DMEM/F12 suplementado com 10% de FBS, 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL estreptomicina, 1 µM de dexametasona (Sigma, USA), 0.5 mM de isobutilmetilxantina (Sigma, USA) e 50 µM de indometacina (Sigma, USA) e posteriormente incubadas a 37°C e 5% CO₂. As células foram mantidas nestas condições por 14 dias, sendo que neste período o meio foi trocado 2 vezes por semana.

Após 14 dias, as células submetidas à diferenciação adipogênica, juntamente com as células de 2 poços controle, foram fixadas com glutaraldeído a 2,5% por 1 hora e 30 minutos e em seguida submetidas a coloração com Oil Red O (Sigma,

USA), em temperatura ambiente por 5 minutos. Esta coloração permite detectar a diferenciação adipogênica através da coloração de lipídeos no interior das células. (BUNNELL *et al.*, 2008; NOEL *et al.*, 2008).

6.9.1.1 Coloração Oil Red O

O preparo da solução mãe de Oil red O foi realizada diluindo-se 300mg de Oil Red O em 100mL de isopropanol a 99%. Em seguida foi preparada uma solução com 3 partes da solução mãe para 2 partes de água destilada, a qual foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e filtrada em papel filtro. O gluteraldeído foi removido dos 4 poços de células induzidas a diferenciação adipogênica e de 2 poços controle. Os poços foram lavados duas vezes com água destilada, aos quais foram adicionados 5 mL de isopropanol 60% e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos. O isopropanol foi retirado dos poços, foram adicionados 2mL da solução de uso do corante e os poços incubados por 5 min. em temperatura ambiente. A solução de Oil Red O foi removida e os poços foram lavados com água destilada até que esta saísse incolor. Após a lavagem foram adicionados 2mL de água e a coloração foi verificada em microscopia de contraste de fase. Os lipídeos foram corados de vermelho.

6.9.2 Diferenciação osteogênica

A osteogênese foi induzida mantendo o cultivo das células em meio DMEM suplementado com 100 **unidades**/mL de **penicilina** e 100µg/mL estreptomicina, 1nM de dexametasona, 2 mM de β- glicerol-fosfato (Sigma, USA), e 50 µM ascorbato-2-fosfato (Sigma, USA) e incubadas a 37°C e 5% CO₂. As células foram mantidas nestas condições por 35 dias, sendo trocado o meio duas vezes por semana. Após 35 dias, as células submetidas ao meio de indução osteogênica juntamente com células de dois poços controle foram fixadas com 2,5% de gluteraldeído por 1 hora e trinta minutos e em seguida foram submetidos a coloração com Alizarina Red, que

permite visualizar mineralização de matriz extracelular, sendo este um indicativo que as células se diferenciaram em osteócitos (Sigma, USA), (pH 4.1).

6.9.2.1 Coloração com Alizarina Vermelha

O preparo da solução do corante foi realizada diluindo 0,41g de Alizarina vermelha em 30mL de água ultra pura e homogeneizada sob agitador magnético por aproximadamente 2 horas. O pH foi ajustado para 4,1 (podendo variar de 4,1 a 4,3) usando uma solução de hidróxido de amônio a 10%. A solução de gluteraldeído foi removida dos 4 poços induzidos a diferenciação osteogênica e de 2 poços do controle. Os poços foram lavados 2 vezes com solução salina 0,9%, em seguida adicionou-se 1 mL da solução de alizarina em cada poço e incubou-se por 10 minutos em temperatura ambiente. A solução de Alizarina Red foi removida e os poços foram lavados com solução salina 0,9%. A mineralização foi constatada usando microscópio óptico.

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões. Para a comparação entre as avaliações da expressão das moléculas antes e depois da criopreservação, bem como, análise de quaisquer diferenças entre diversas variáveis antes da criopreservação e após o descongelamento das células, foi usado o Teste T estatístico. A avaliação da correlação foi feita estimando-se o coeficiente de correlação de Spearman. A comparação do IP entre as passagens P1, P2 e P3 antes da criopreservação foi feita considerando-se o teste não-paramétrico de Friedman. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.9.0.

7 DELIMITAÇÃO

7.1- Clínica Anima Bella, situada a Rua XV de novembro, nº 2913- Alto da VX.

7.2- Laboratório Experimental de Cultivo Celular Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe (IPPPP).

7.3- Laboratório de Processos Biotecnológicos da Universidade Federal do Paraná, situado no Campus Politécnico.

7.4 – Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, situado no Campus Politécnico.

8 RESULTADOS

Foram isoladas amostras de lipoaspirado de 54 doadores saudáveis com idade entre 19 e 52 anos, todas com prévio consentimento dos doadores. As 40 primeiras amostras foram utilizadas para padronização dos métodos. Sendo que nas sete primeiras não foi possível estabelecer o cultivo devido o uso de uma solução de lise de hemáceas, que, por motivo desconhecido, impedia a proliferação destas. Nas demais amostras foram testadas o melhor meio de cultivo: 1) DMEM suplementado com 10% de SFB, 100 *unidades*/mL de **penicilina** e 100µg/mL; 2) DMEM/F12 com a mesma suplementação. Após 7 dias de cultivo com ambos os meios, foi optado pelo uso do DMEM/F12, por favorecer, aparentemente um melhor crescimento celular. Como este trabalho tem como objetivo a análise de moléculas de superfície, inicialmente foi optado por baixas concentrações de tripsina 0,05%, acreditando que isto poderia minimizar os danos a membrana, porém esta concentração oferecia um bom descolamento das células, mas dificultava a contagem celular. Devido a este problema foram descartados os resultados da cinética celular. Após alguns testes com outras concentrações, foi optado pela concentração indicada na maioria dos artigos que trabalham com esta linhagem, que é de 0,25% de tripsina, demonstrando resultados satisfatórios. Também foram realizados alguns testes para a citometria de fluxo, criopreservação, diferenciação, UFC e IP.

Após a padronização dos métodos foram utilizadas 14 amostras. Porém dentre estas, uma sofreu contaminação (A44) e outra foi excluída do trabalho por apresentar resultados muito dispares das demais amostras provavelmente devido ao uso de medicamentos para artrite reumatóide utilizados pelo doador (A54).

Após o isolamento as células foram cultivadas conforme descrito nos materiais e métodos. As células aderentes, em três dias apresentaram morfologia estrelada semelhantes a fibroblastos, justificando a sua descrição clássica de aspecto fibroblastóide. Também apresentaram um crescimento rápido, atingindo a confluência de 80% em aproximadamente 7 dias de cultivo (FIGURA 04).

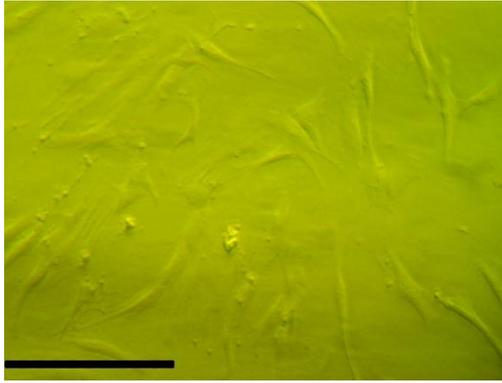


FIGURA 04: CÉLULAS COM 80% DE CONFLUÊNCIA

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Cultivo em P1, com 8 dias de cultivo e aproximadamente 80% de confluência (amostra A49) (aumento de 250X)

— - Escala (10 µm)

8.1 RENDIMENTO CELULAR

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (QUADRO 02). Foi aplicado o teste estatístico de coeficiente de Spearman, não sendo observada nenhuma correlação significativa quando comparado à relação rendimento celular, idade e IMC dos pacientes (TABELA 01).

	IDADE	IMC	REND/mL X 10 ⁶
MÉDIA	36,33	24,68	9,09
MAX	47	29,4	16,5
MIN	19	20,5	1,45
DP	9,50	3,00	4,55

QUADRO 03 – Idade, IMC e rendimento celular

NOTA: Quadro representativo de 12 amostras apresentando valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões para idade, índice de massa corporal (IMC) e rendimento celular (REND) das CTMTA.

FONTE – O autor (2010).

Tabela 01: Correlação Idade/Rendimento e IMC/rendimento

	IDADE/REND	IMC/REND
Coeficiente de Spearman	-0,22	-0,36

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Tabela representativa de 12 amostras em valores de coeficiente de Spearman entre idade e rendimento celular (IDADE/REND) e índice de massa corporal e rendimento celular (IMC/REND).

Valores consideráveis significativos acima de 0,7 ou abaixo de -0,7.

8.2 – ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (IP)

Testou-se a hipótese nula de que os resultados de P1, P2 e P3 (antes da criopreservação) são iguais, versus a hipótese alternativa de que não são todos iguais. O resultado mostra que houve diferença significativa entre as passagens (P1 $0,24 \pm 0,12$; P2 $21,33 \pm 8,48$; P3 $13,03 \pm 5,38$) ($p > 0,001$) (FIGURA 05)

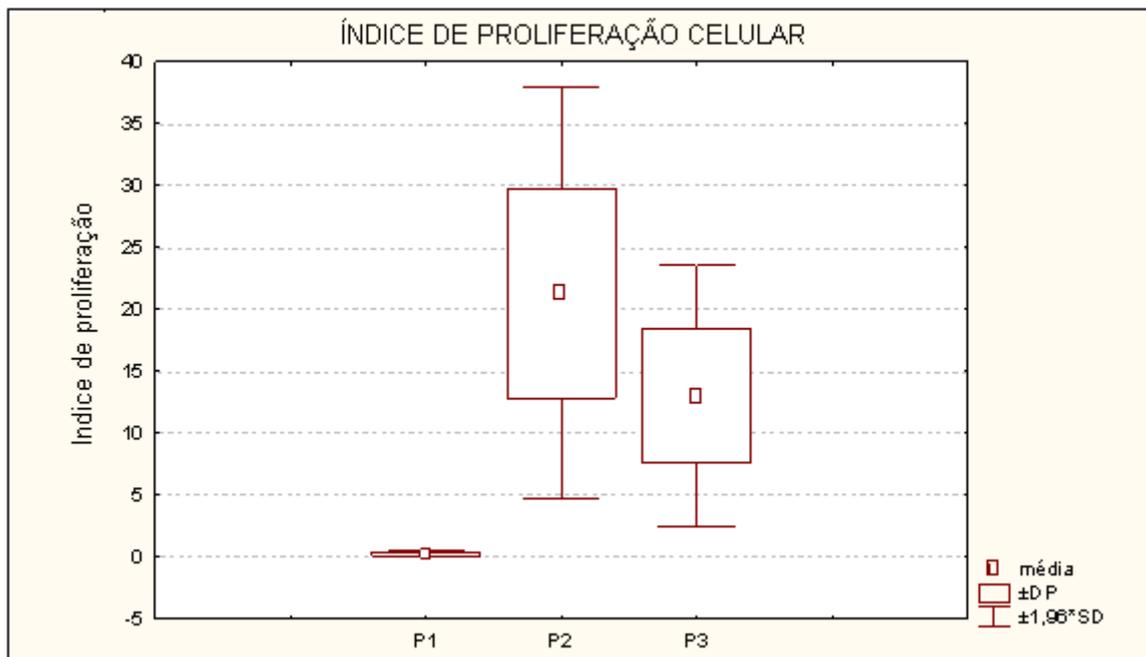


FIGURA 05 – ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Gráfico representativo de 12 experimentos diferentes, do crescimento celular entre as passagens 1, 2 e 3 (P1, P2 e P3 respectivamente). O resultado representa a média \pm desvio padrão e segundo desvio padrão para cada passagem. Teste estatístico não-paramétrico de Friedman com significância $p < 0,05$, sendo que houve diferença significativa entre todas as passagens ($< 0,001$).

8.2.1 Índice de proliferação celular após o descongelamento

Testou-se a hipótese nula de que os resultados de P3 antes da criopreservação são iguais aos resultados de P3 depois do descongelamento, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Antes da criopreservação as amostras apresentavam uma média de IP de $13,08 \pm 5,62$ e após o descongelamento $17,43 \pm 4,11$. Aplicando teste T estatístico, não houve diferença significativa entre as variáveis ($p=0,07$) (FIGURA 06).

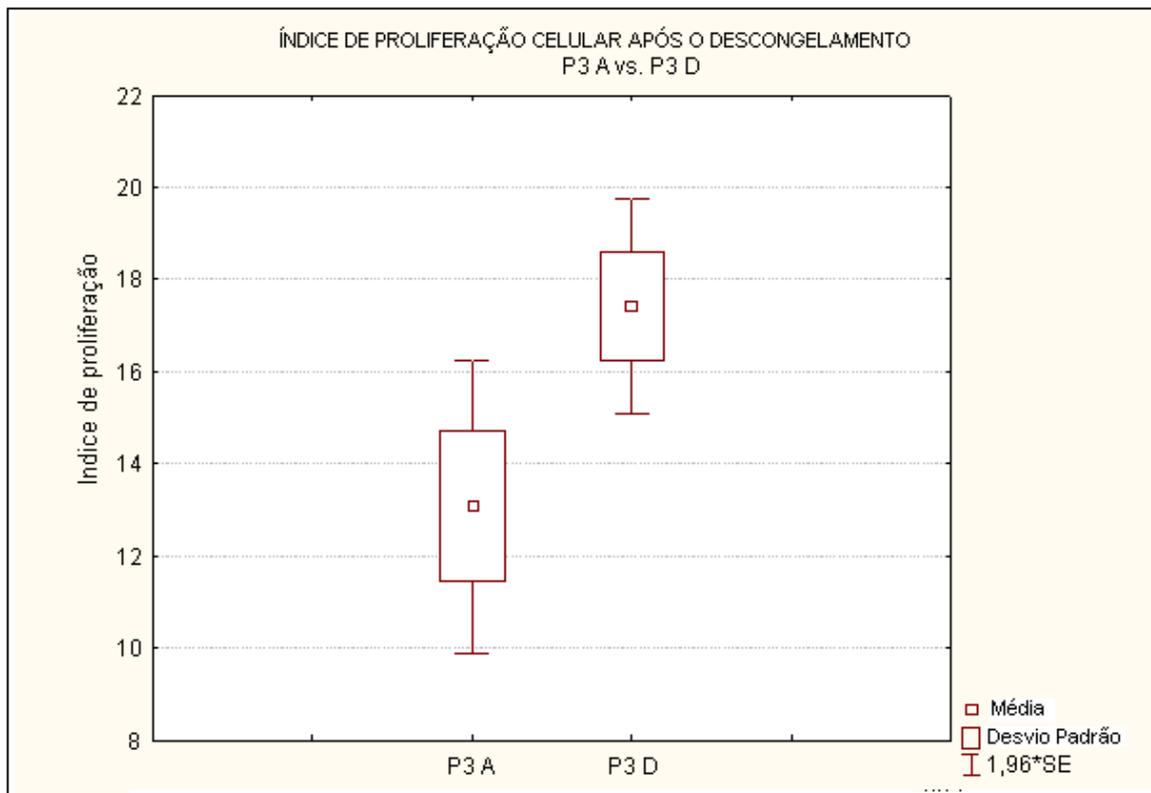


FIGURA 06: ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR APÓS DESCONGELAMENTO

FONTE: O Autor (2010)

NOTA: Gráfico representativo de 12 experimentos diferentes, do crescimento celular entre P3 antes da criopreservação (P3A) e P3 após o descongelamento (P3D). O resultado representa a média \pm desvio padrão e segundo desvio padrão de cada variável. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que não houve diferença significativa entre as variáveis ($p=0,07$).

8.3 UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA

Testou-se a hipótese nula de que os resultados de UFC antes da criopreservação são iguais aos resultados de UFC depois do descongelamento, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes. Os resultados estão expressos em percentagem de células capazes de formar colônias. Comparando os resultados, pode-se observar uma queda significativa na capacidade de formação de colônias, das células após o descongelamento, sendo a média deste antes da criopreservação $28,08\% \pm 7,06\%$ e após o descongelamento das células $21,51\% \pm 6,61\%$ ($p=001$) (FIGURA 07).

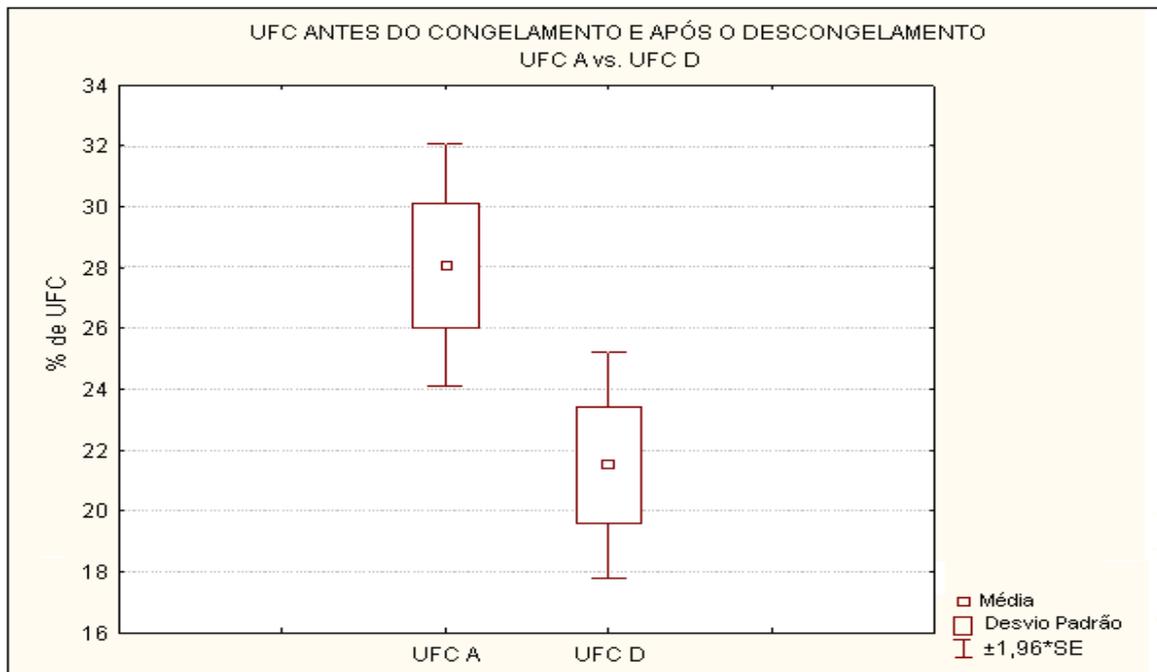


FIGURA 07: UFC ANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E APÓS O DESCONGELAMENTO
 FONTE – O autor (2010)

NOTA: Gráfico de percentagem de Unidade Formadora de colônias antes da criopreservação (UFC A) e depois do descongelamento das células (UFC D) de 12 experimentos diferentes, sendo semeadas 10 células por cm^2 em placas de 6 poços (9 cm^2 cada poço). O resultado representa a média \pm desvio de cada variável. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que houve diferença significativa entre as variáveis ($p = 0,001$)

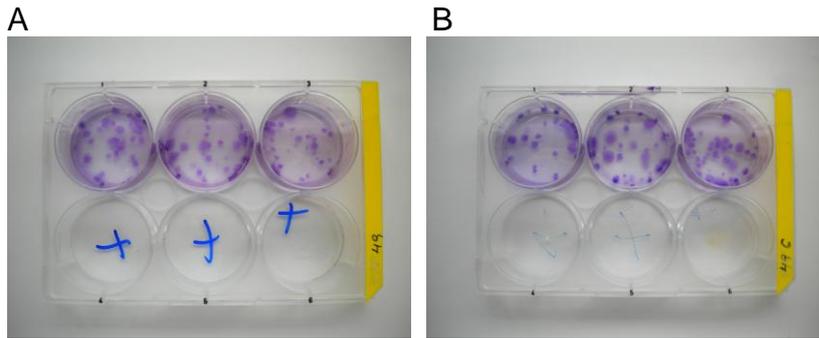


FIGURA 08 – PLACAS DE UFC ANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E APÓS O DESCONGELAMENTO

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Amostra A49 . A) antes da criopreservação; B) Após o descongelamento

8.4 ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA

A análise imunofenotípica dos marcadores de superfície foi realizada através da citometria de fluxo e os resultados foram analisados no programa Cyflogic v. 1.2.1. Sendo os resultados apresentados em percentagem pela sobreposição da marcação de expressão do CD em questão com a marcação do controle isotópico (Figura 09).

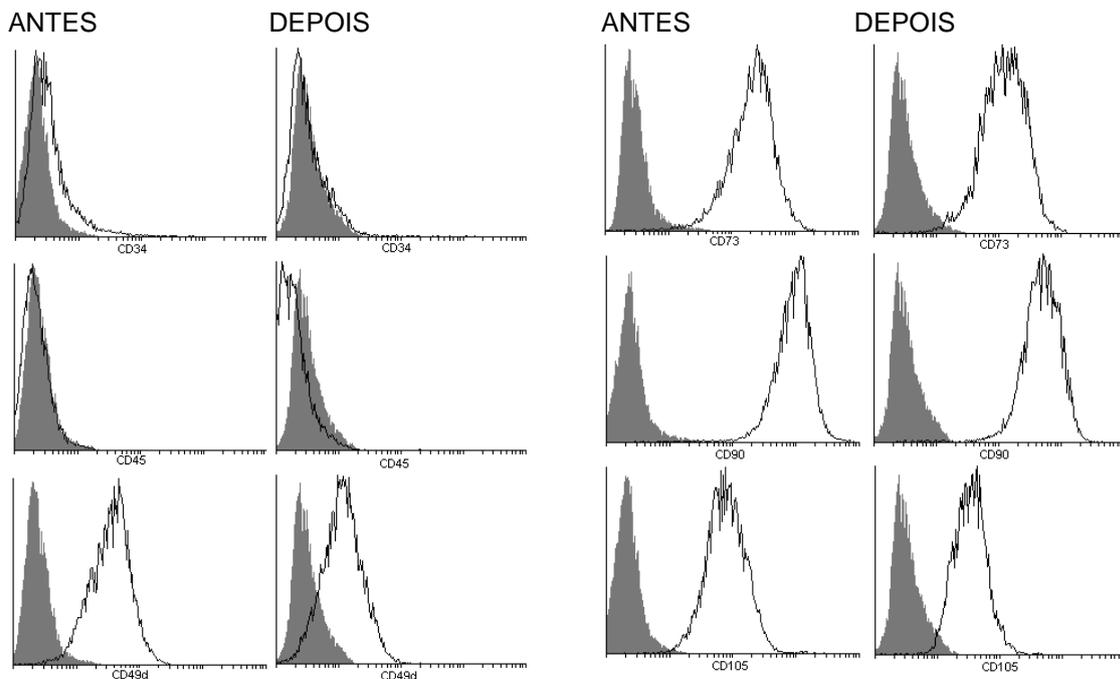


FIGURA 09- HISTOGRAMAS DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE

FONTE: O Autor

NOTA - Dados representativos de 01 amostras (A49), apresentando os histogramas com expressões dos marcadores de superfícies de células na passagem 3 antes da criopreservação (ANTES) e após o descongelamento (DEPOIS). O histograma “cheio” é o controle isotópico, o histograma em linha marca a expressão do marcador de superfície em questão.

8.4.1 Análise imunofenotípica antes da criopreservação.

O resultado da citometria de fluxo forneceu valores em percentuais de cada marcador (CD34, CD45, CD49d, CD73, CD90, CD105). A partir desses dados, foram obtidos médias, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (TABELA 02).

TABELA 02: Tabela de expressão dos marcadores de superfície antes da criopreservação.

	CD34-	CD34+	CD45-	CD49d+	CD73+	CD90+	CD105+
MEDIA	98,88	1,12	99,79	88,67	99,57	99,55	99,4
MÁX	99,86	3,32	100	96,38	99,94	99,97	99,91
MÍN	96,98	0,14	99,27	80,15	98,51	98,15	97,87
D.P.	1,08	1,08	0,22	6,55	0,43	0,07	0,64

FONTE: O autor (2010)

NOTA: Tabela representativa de 12 amostras, apresentando valores em percentagem de expressão dos marcadores de superfície antes da criopreservação

8.4.2 Análise imunofenotípica após o descongelamento.

O resultado da citometria de fluxo forneceu valores em percentuais de cada marcador. A partir desses dados, foram obtidos médias, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões (Tabela 03).

TABELA 03 – Tabela de expressão dos marcadores de superfície após o descongelamento

	CD34-	CD34+	CD45-	CD49d+	CD73+	CD90+	CD105+
MEDIA	99,26	0,78	99,8	77,8	99,5	99,45	98,26
MÁX	99,97	2,1	99,99	93,07	99,88	99,97	99,87
MÍN	97,90	0,03	99,58	41,64	98,51	97,46	93,87
D.P.	0,61	0,6	0,14	14,45	0,43	0,7	2,07

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Tabela representativa de 12 amostras, apresentando valores em percentagem para expressão dos marcadores após o descongelamento.

Para cada marcador (CD34, CD45, CD49d, CD73, CD90, CD105), testou-se a hipótese nula de que os resultados da expressão antes da criopreservação são iguais aos resultados depois do descongelamento das células criopreservadas, *versus* a hipótese alternativa de resultados diferentes.

Após o descongelamento a maioria dos marcadores de expressão não apresentou diferença significativa, com exceção do marcador de superfície CD49d (Integrina $\alpha 4$) sendo a média de expressão deste, antes da criopreservação $88,67\% \pm 6,55\%$ e após o descongelamento das células $77,8\% \pm 14,45\%$ (p 0,001) (FIGURA 10).

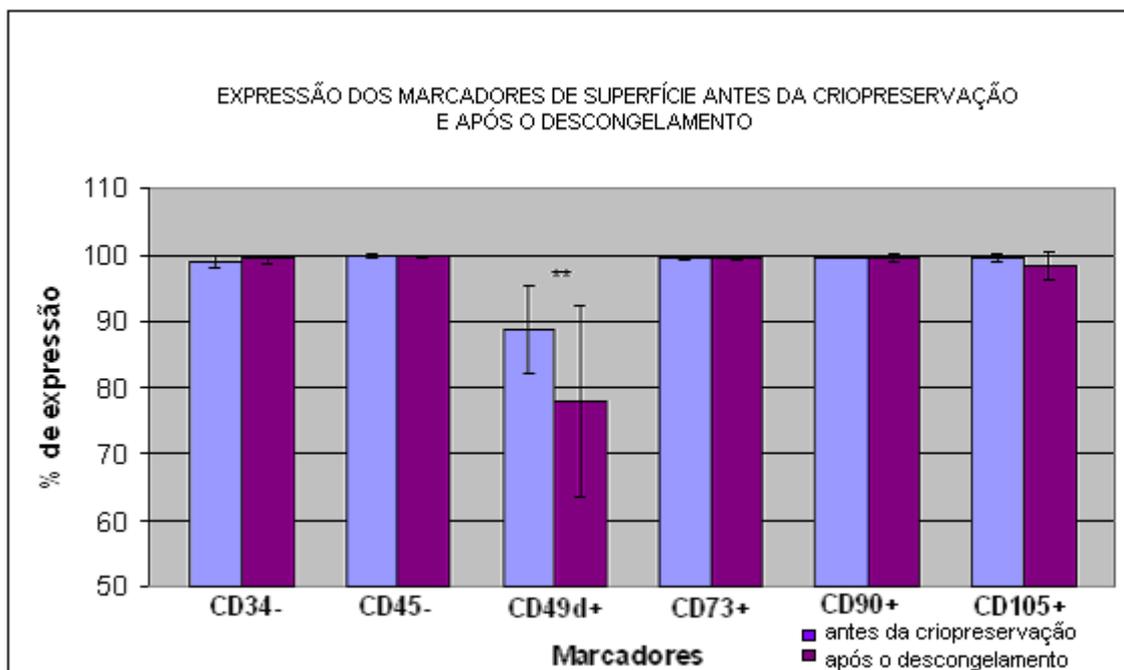


FIGURA 10 - EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE ANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E APÓS O DESCONGELAMENTO

FORTE – O autor (2010)

NOTA: Gráfico representativo de 12 experimentos independentes. Foram realizadas citometria de fluxo antes da criopreservação e após o descongelamento das CTMTA. Análise de dados realizadas através do software Cyflogic. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que no CD49d houve diferença significativa após o descongelamento das células ($p = 0,001$).

8.5 INTEGRIDADE E VIABILIDADE CELULAR

Os testes de viabilidade e integridade celular também foram realizados com marcações identificadas através da citometria de fluxo e analisadas no programa

Cyflagic v.1.2.1. Usando o mesmo princípio para o cálculo de percentagem de células viáveis e percentagem de células íntegras (FIGURA 11)

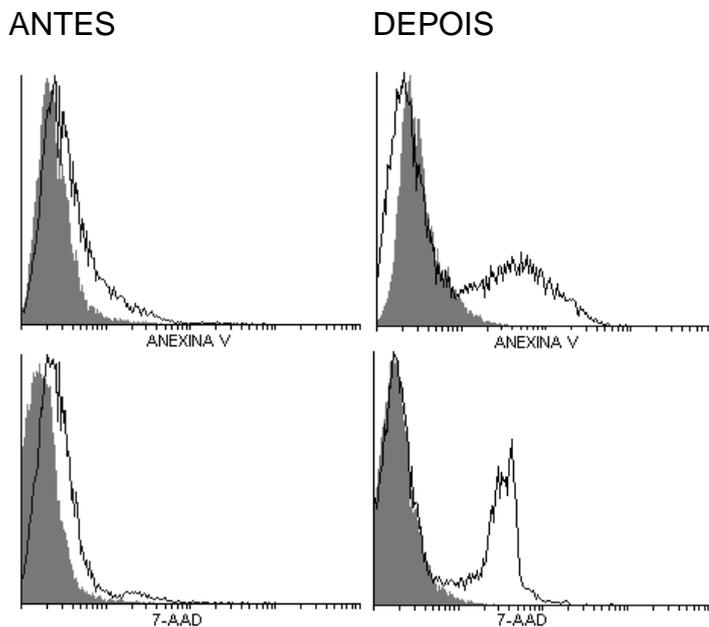


FIGURA 11- HISTOGRAMAS DE EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE APOPTOSE (INTEGRIDADE CELULAR) E VIABILIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.

FONTE: O Autor

NOTA - Dados representativos de 01 amostras (A49), apresentando os histogramas com expressões dos marcadores de apoptose celular (Anexina V) e marcadores de morte celular (7-AAD) das células na passagem 3 antes da criopreservação (ANTES) e após o descongelamento (DEPOIS). O histograma “cheio” é o controle isotípico, o histograma em linha marca a expressão do marcador em questão.

8.5.1 Integridade celular

Testou-se a hipótese nula de que a percentagem de células negativas para Anexina V (ANX) antes da criopreservação, é igual aos resultados após o descongelamento, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Na figura a seguir são apresentadas estatísticas descritivas e o valor de p do teste estatístico (TABELA 05).

Após o descongelamento houve uma perda significativa da integridade das células (FIGURA 12) sendo esta 16,5% menor que às células antes da criopreservação.

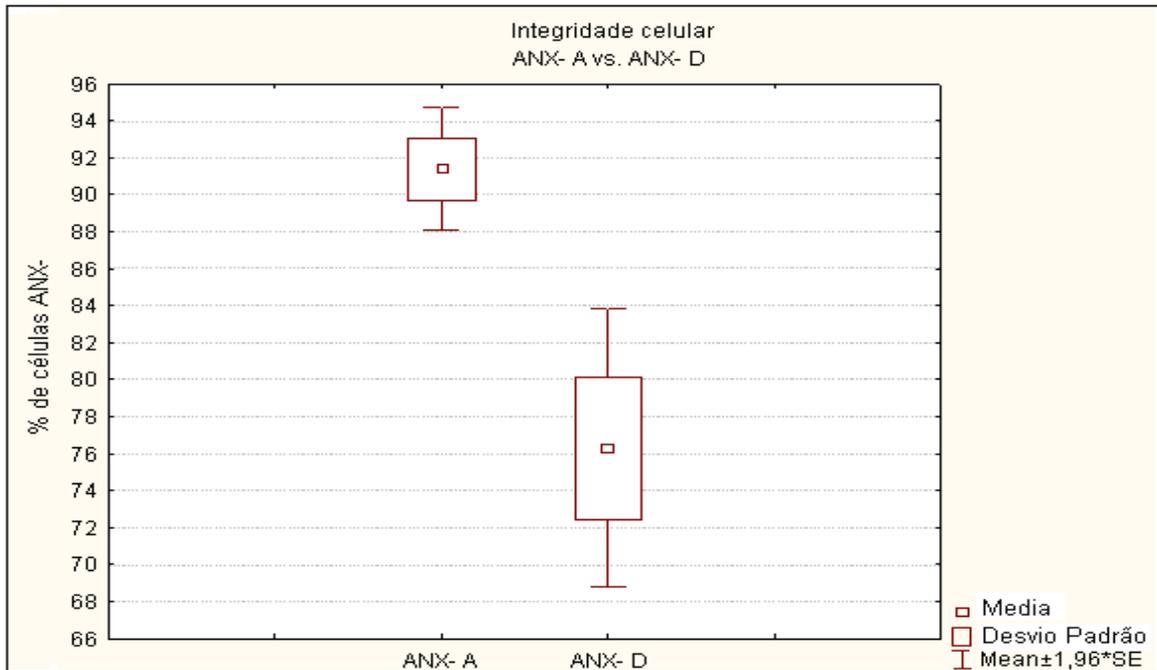


FIGURA 12: INTEGRIDADE CELULAR ANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E APÓS O DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS.

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Gráfico representativo de 12 experimentos independentes, mostrando a diferença da integridade celular (ANX-D). O resultado representa a média \pm desvio padrão e desvio padrão secundário. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que no houve perda significativa da integridade celular após o descongelamento das células ($p 0,003$).

8.5.2 Viabilidade celular

Testou-se a hipótese nula de que a percentagem de células negativas para 7-AAD antes da criopreservação é igual aos resultados após a criopreservação, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Aplicando o teste T estatístico, observou-se uma queda significativa das amostras negativas para 7-AAD (17,9%) (FIGURA 13)

..

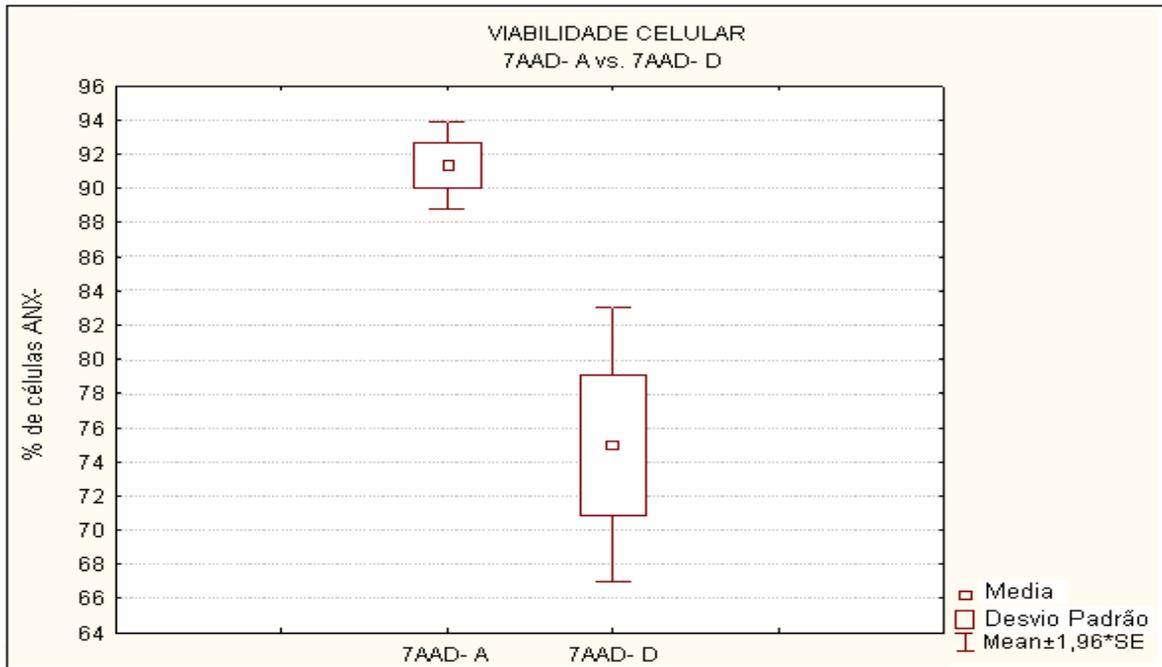


FIGURA 13 – VIABILIDADE CELULAR ANTES DA CRIOPRESERVAÇÃO E APÓS O DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS.

FONTE – O autor (2010)

NOTA: Gráfico representativo de 12 experimentos independentes. O resultado representa a média \pm desvio padrão e desvio padrão secundário. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que não houve perda significativa da viabilidade celular após o descongelamento das células ($p < 0,001$).

8.6 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

8.6.1 Diferenciação adipogênica

Todas as amostras, antes da criopreservação e após o descongelamento, submetidas ao meio de diferenciação adipogênica apresentaram células coradas com Oil Red O 14 dias após o início da indução, mostrando a presença de lipídeos no interior das células (FIGURA 14A), comprovando assim a diferenciação adipogênica. No meio controle onde as células foram cultivadas, apenas meio de cultivo padrão foi adicionado, não houve demonstração da presença de lipídeos, indicando que estas não sofreram diferenciação (FIGURA 14B).

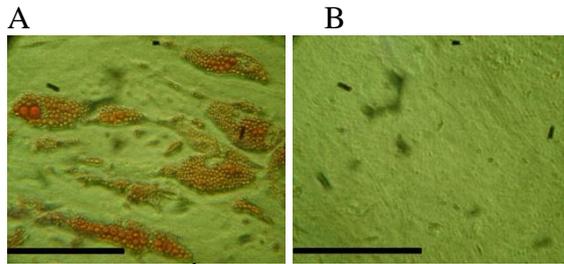


FIGURA 14- CÉLULAS DIFERENCIADAS EM ADIPÓCITOS APÓS 14 DIAS DE CULTIVO EM MEIO INDUTOR

FONTE – O autor (2010)

NOTA – Amostra A49 após o descongelamento das células criopreservadas, microscopia com contraste de fase, aumento de 250X, zoom de 3.0. A) Presença de lipídeos (corados com Oil red O), em CTMTA cultivadas com meio indutor de adipócitos; B) controle, não demonstra a presença de lipídeos, indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

—— - Escala (10 µm)

8.6.2 Diferenciação osteogênica

Em todas as amostras, antes da criopreservação e após o descongelamento, submetidas ao meio de diferenciação osteogênica, foi possível identificar a presença de uma matriz através da coloração com alizarina vermelha, 30 dias após a indução. Porém com 35 dias de indução a diferenciação foi mais evidente. Esta matriz indica que houve diferenciação osteogênica (FIGURA 15A). Nos poços controle não houve demonstração da presença da matriz, indicando que não houve diferenciação osteogênica (FIGURA 15B).

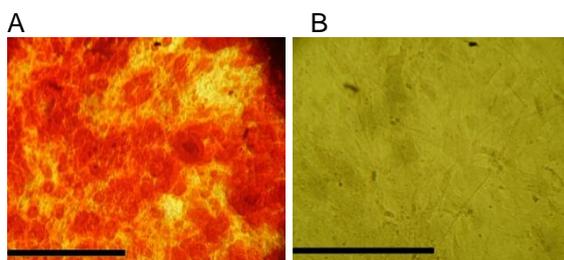


FIGURA 15 – CÉLULAS DIFERENCIADAS EM OSTEÓCITOS APÓS 35 DIAS APÓS CULTIVO COM MEIO INDUTOR DE OSTEÓCITOS

FONTE – O autor (2010)

NOTA – Amostra A49 após a criopreservação, aumento de 250X, zoom de 3.0. : A) CTMTA coradas com Alizarina vermelha, indicando a presença de cálcio na matriz extracelular, compatíveis com diferenciação osteogênica,.B) controle, sem demonstração de matriz, indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

—— - Escala (10 µm)

9 DISCUSSÃO

As CTMTA são células com grande potencial terapêutico e também uma importante ferramenta para estudos do metabolismo celular. Assim sendo, é de suma importância a caracterização destas células e a manutenção destas características após o descongelamento de células criopreservadas.

Após o isolamento das CTMTA verificou-se que a taxa de rendimento celular foi bastante variada (1,45 à $16,5 \times 10^6$ células/ml) não seguindo um parâmetro de idade e sexo conforme descrito por alguns autores (LEI, *et al.* 2007), porém, no presente trabalho foi difícil quantificar estes fatores, pois não há muita diferença de idade entre os doadores e apenas duas amostras são do sexo masculino (ANEXO 3), mesmo assim, foi realizada a estatística de vários fatores relacionados com a idade dos doadores (ex: idade X expressão positiva do CD34, idade X CD49d, idade X viabilidade celular, etc.), mas nenhum destes testes apresentou diferença ou correlação significativa (dados não mostrados). Esta relação de idade com o rendimento das células-tronco e com sua capacidade de proliferação é bastante pertinente, pois com o envelhecimento, há um decréscimo na capacidade de regenerar tecidos, conseqüentemente este fato deve influenciar na quantidade de células-tronco disponíveis em organismos mais velhos (LEI *et al.* 2007).

A grande variação do rendimento celular pode estar relacionada a flutuações inevitáveis durante o processo de lipoaspiração, bem como variações metabólicas de cada paciente (MEYERROSE *et al.*, 2006). Outra hipótese é a região lipoaspirada, embora Oedayrajsingh-Varma e colaboradores (2006) relatem que não encontraram diferenças significativas no rendimento celular de acordo com a região lipoaspirada, outros grupos garantem que esta diferença existe (JURGENS, *et al.*, 2006). No presente trabalho, não foi possível quantificar esta diferença, pois as amostras eram entregues após o término da cirurgia, sendo, na maioria das vezes, um *mix* de diversas regiões. Dependendo da região, a amostra também poderia estar contaminada com tecido glandular ou conectivo, que pode resultar em maior ou menor número de células contadas (OEDAYRAJSINGH-VARMA *et al.*, 2006).

Outra questão que deve ser levada em conta é a forma como são coletadas e isoladas as células, pois alguns isolam células a partir de lipoaspirados, como no presente trabalho, outros grupos, isolam a partir de cortes do tecido subcutâneo (LEI,

et al 2007). Oedayrajsingh-Varma e colaboradores (2006) também sugerem que a diferença de rendimento entre as amostras pode estar relacionada com a equipe que realiza a cirurgia, pois possuem diferentes maneiras de manipulação, porém, no presente trabalho a maioria das amostras foram coletadas pela mesma equipe, com exceção da amostra A47, que foi realizada pela mesma equipe, porém com outro cirurgião. Mesmo assim esta amostra obteve resultados muito semelhantes as demais amostras.

Sotiropoulou e colaboradores (2005), usando meio DMEM com alta glicose e suplementado com L-glutamina (DMEM/HG/L-G), obtiveram um índice de proliferação (IP) médio entre P1 e P3 de $8 \pm 6,4$ em CTMMO. Este grupo também relata um aumento no número de células de P1 para P2 e de P2 para P3, sendo a densidade celular um fator determinante para este aumento, pois quanto menor o valor semeado, maior o número final de células. No presente trabalho o IP em P1 foi em média $0,26 \pm 10$, sendo este valor inferior aos valores das demais passagens. Este valor inferior pode estar relacionado com o fato de que as células recém isoladas apresentam uma população heterogênea de células (PLANAT-BERNARD, *et al*, 2004), incluindo células de linhagens não aderentes que também acabam sendo contadas. Outra questão é que estas células têm que se adaptar a um novo nicho, pois estão saindo de um ambiente *in vivo* para um ambiente *in vitro*. Em P2 o IP teve um aumento considerável em relação a P1, ficando em média $22,87 \pm 6,68$. Estes valores foram em média bem acima dos valores encontrados por Sotiropoulou quando usou meio DMEM/HG/L-G, porém, deve-se lembrar que o trabalho em questão usou outro tipo de célula e outro meio de cultivo. Este aumento significativo do IP se deu pelo fato de que as células já estavam adaptadas ao ambiente e provavelmente estavam em sua fase log, onde o crescimento é exponencial. Em P3, as amostras continuaram a ter um IC com valores positivos, porém, estes foram menores que os valores encontrados em P2 ($13,08 \pm 5,62$). É válido lembrar que as passagens e conseqüentemente a contagem das células foram realizadas a cada 10 dias, sendo assim, em P3 as células estavam com 30 dias de cultivo.

O IP celular também foi comparado entre as células antes da criopreservação em P3 e as células após o descongelamento, também em P3. Não havendo diferença significativa. Este resultado condiz com resultados de diversos autores que afirmam que a criopreservação não altera a capacidade de proliferação das CTMTA (GONDA *et al*, 2008). Porém, alguns autores contradizem estes resultados, dizendo que a

criopreservação diminui a capacidade de proliferação destas células (OISHI *et al*, 2008, MARTINELLO *et al*, 2010). Estas divergências, mais uma vez podem estar ligadas a variações de diversos fatores já discutidos anteriormente, agregados as diferentes formas de congelamento e descongelamento das células bem como meios crioprotetores.

Sotiropoulou (2005) testou diversos meio de cultivo para CTMMO em P3 e encontrou valores médios de UFC (%) variando de 30 (± 2) à 68 (± 9) dependendo do meio de cultivo utilizado. No presente trabalho, foram encontrados valores médios de 28,42 (± 6) , estando de acordo com os níveis mais baixos encontrados por Sotiropoulou. Após o descongelamento houve uma queda significativa na capacidade destas células em formar colônias, tendo a media caído para 21,51% \pm 6,61. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados por Goh e colaboradores (2007), que afirmam que a criopreservação possui um pequeno efeito na eficiência de adesão das CTMTA. Esta diferença pode estar relacionada com diminuição da expressão da integrina $\alpha 4$ (CD49d). Mitchell e colaboradores (2006) relataram que a capacidade de formar colônias das CTMTA é consideravelmente maior que CTMMO, mesmo após a criopreservação. O grupo também relata que quanto mais passagens, maiores a quantidade de UFC e sugere que as passagens selecionam um determinado tipo celular, possivelmente as células-tronco. Pensando em terapia celular a questão das passagens deve ser bastante estudada, pois este aumento da capacidade de proliferação e adesão celular podem estar relacionadas a mutações nem sempre benéficas para o organismo que esta recebendo o transplante.

Com relação às diferenciações, a maioria dos grupos que trabalham com CTMTA, relata que após 14 dias de indução adipogênica todas as amostras apresentam células com morfologia compatível a adipócitos, sendo esta confirmada através da coloração de lipídeos com Oil Red O e também por PCR que identificam genes compatíveis com adipócitos e que não estão presentes nas células indiferenciadas. Rodriguez e colaboradores (2004) relatam que após este período aproximadamente 90% das células acumulam lipídeos intracelulares e que também pode haver acúmulo não significativo nas células não tratadas. No presente trabalho, não foi realizado a quantificação das células diferenciadas, mas o acúmulo de lipídeos foi nítido. Com relação ao controle, não foi identificada nenhuma célula com morfologia adipogênica. Estes resultados mostram claramente que as CTMTA

possuem, após indução adequada, uma capacidade de diferenciação adipogênica. Como as células em questão são derivadas do tecido adiposo, poderia se concluir que seriam precursoras adipogênicas, porém, o fato da não diferenciação das células controle, exclui esta hipótese.

Para identificar a diferenciação osteogênica, vários grupos relatam que entre 14 e 21 dias após a indução, pode-se observar presença de uma matriz mineralizada, através da coloração de fosfato de cálcio pela Alizanina vermelha (MITCHELL, *et al*, 2006; Gonda, *et al*, 2008). No presente trabalho, a visualização desta matriz só foi possível 30 dias. As células cultivadas apenas com meio de cultivo padrão não apresentaram indicativos da presença da matriz mineralizada. Apesar de ser necessário um período maior de indução, as CTMTA apresentaram características compatíveis a osteócitos, e mais uma vez o controle não apresentou estas características. Relacionando os resultados da diferenciação adipogênica com os resultados da diferenciação osteogênica, pode-se sugerir que as células aqui isoladas, possuem a característica de tronco.

Oishi e colaboradores (2008) e Gonda e colaboradores (2008), relatam a manutenção da capacidade de diferenciação das CTMTA, tanto em adipócitos como em osteócitos, após o descongelamento das mesmas. Esta manutenção também pode ser observada no presente trabalho em 100% das amostras, com o mesmo tempo de indução.

Existem muitas divergências a respeito dos marcadores para CTM. Isto ocorre devido a diferentes desenhos de diferentes tipos de marcadores, porém, existe um consenso que as CTM são negativas para CD45 (um marcador de CTH) (KOLF, *et al*, 2007). No presente estudo todas as amostras analisadas foram negativas para CD45, sendo este, um grande indício que estas seriam CTM. Caso houvesse alguma positividade do CD45, poderia tratar-se de uma contaminação com macrófagos, que também são células aderentes e apresentam CD45+ (PLANAT-BERNARD, *et al*, 2004).

Com relação ao CD34 (um marcador primitivo de célula-tronco hematopoiética), alguns autores admitem que este possa ser raramente e fracamente, expresso em algumas populações de CTM (KOLF, *et al*, 2007, DE UGARTE, *et al*, 2003). PLANAT-BERNARD e colaboradores (2004) trabalharam com uma fração de pré-adipócitos derivados do tecido adiposo e encontraram 90 a 99% de células positivas para CD34, a forma de isolamento que o grupo utilizou foi muito semelhante ao

isolamento das CTMTA do presente trabalho, porém, segundo o grupo, a forma de cultivo impede que CTM proliferem, sendo assim estas células seriam apenas pré-adipócitos e células progenitoras endoteliais. Já Oedayrajsingh-Varma e colaboradores (2006), também efetuaram um procedimento de isolamento muito semelhante ao utilizado neste trabalho e encontraram uma população com mais de 90% de células CD34+, além disto, esta população seguiu o seguinte parâmetro: CD31-, CD105+, CD166+, CD45-, CD90+, as demais marcações condizem com as CTMTA. O grupo justifica a positividade do CD34 dizendo que o CD34 é positivo neste tipo celular, porém seus níveis vão diminuindo em curtos períodos de cultivo (13-14 dias). Gonda e colaboradores (2008), também concordam com esta hipótese. No presente trabalho, 4 amostras apresentaram uma pequena população de células positivas para CD34 (de 1 à 3%). Como a análise foi realizada em P2, o risco de contaminação com CTH (que são células não aderentes) é baixo. Uma outra questão que descarta a possibilidade de contaminação por CTH é o fato destas amostras serem CD45-, que conforme dito anteriormente, esta presente em todas as CTH. Sendo assim, estes resultados sugerem que não se trata de uma contaminação com CTH e sim de uma sub-fração de células CD34+, conforme citado sugerido por Kolf e Gonda, ou uma contaminação com pré-adipócitos e células progenitoras endoteliais (PLANAT-BERNARD, *et al*, 2004). Como estas células foram analisadas apenas em P3, não foi possível testar a hipótese sugerida por Oedayrajsingh-Varma e colaboradores 2006.

No presente trabalho foi encontrado valores variados para o CD49d ($88,67 \pm 6,55$), condizentes com os valores encontrados por Katz e colaboradores (2005) (78 ± 20). Além de valores variados de expressão, este marcador de superfície apresentou quedas significativas após o descongelamento das células criopreservadas ($77,8 \pm 14,45$, $p= 0,007$). Este marcador corresponde a interina $\alpha 4$, uma molécula de adesão, que interage com a integrina $\beta 1$ constituindo um heterodímero, ativando tardiamente o antígeno 4 (VLA-4) (DE UGARTE *et al.*, 2003). Lei e colaboradores (2007) encontraram valores de baixa positividade para o CD49d (em média 12,6%), porém a forma de isolamento das CTMTA foi através do tecido subcutâneo e não através de lipoaspirado, outra questão é que ele utilizou meio DMEM com baixa glicose, estas diferenças de protocolos podem selecionar tipos diferentes de células, com características parecidas, porém não idênticas. Para Katz e colaboradores (2005), as divergências entre alguns grupos, com relação a

expressão do CD49d, é reflexo de adaptações destas células a inúmeras variações do meio extracelular, como densidade, ciclo celular, tempo de cultivo e o número de passagens.

O ambiente produz nichos apropriados para as células-tronco e regulam a manutenção deste nicho para determinadas linhagens celulares. Para esta regulação a adesão das CT na matriz extracelular é crucial, pois permite a comunicação entre as células e a matriz, sendo um pré-requisito para a manutenção do tecido (DJOUAD, *et al.*, 2007), sendo assim estas alterações na expressão do CD49d após a criopreservação pode significar um grande problema no transplante destas células, fazendo com que estas não se comuniquem adequadamente com o tecido lesionado.

Katz e colaboradores (2007) realizaram um trabalho com 29 marcadores diferentes e afirmam que as CTMTA possuem um padrão de marcadores consistente e reprodutível, porém deve-se seguir um padrão de protocolo de isolamento, meio de cultivo e demais variáveis, para garantir esta reprodutividade. O efeito das diferenças encontradas devido a estas diversas formas de isolamento e cultivo ainda não foi bem estudado.

Mitchell e colaboradores (2006), criopreservou as células recém isoladas (sem cultivá-las) e as cultivou somente após o seu descongelamento. Ele realizou o cultivo até P4 e percebeu que os níveis de positividade do CD73, CD90 e CD105 aumentavam no decorrer das passagens. Em P3 os valores encontrados por este grupo foram um pouco inferior aos valores encontrados no presente trabalho, feito somente com células em P3 após o descongelamento. Dentre estes valores inferiores encontrados por Mitchell e colaboradores (2006) o CD105 é o que mais chama a atenção, pois ficou em média $68\% \pm 16,8\%$, e os valores encontrados no presente trabalho foram de $98,26 \pm 2,7$. O CD73 e o CD90 também estavam abaixo, mas em menor proporção, isto pode indicar que as células cultivadas antes da criopreservação, possuem uma melhor manutenção das suas características imunofenotípicas do que quando são criopreservadas logo após o seu isolamento.

Martinello e colaboradores (2010) não encontraram diferenças significativas em diversos marcadores antes e após a criopreservação de CTMTA de cachorros, a molécula de adesão testada por este grupo foi a CD44, uma glicoproteína que também está envolvida na adesão célula-célula, sendo que esta também não

apresentou alterações significativas ($90\% \pm 17.3$ antes da criopreservação - $88.8\% \pm 20.2$ após o descongelamento).

Gonda e colaboradores (2008) realizaram análise de vários marcadores de superfície antes da criopreservação e após o descongelamento das células. O grupo usou alguns marcadores em comum com o presente trabalho (CD34, CD49d, CD90 e CD105). Esse grupo não encontrou diferenças significativas em nenhum destes marcadores, contradizendo o resultado de alteração do CD49d do presente trabalho. O grupo usou um meio de cultivo diferente (M-119) e um meio criogênico disponível no Japão que não tem sua composição detalhada, mas contém SFB. Conforme dito anteriormente, as diferentes formas de manipulação, bem como os meios utilizados, podem interferir nos resultados. Uma outra consideração importante é que o grupo não usou a mesma amostra pra analisar as células antes da criopreservação e após o descongelamento. Os próprios autores admitem que esta não seja a condição ideal, pois as células podem apresentar diferenças metabólicas que irão interferir nos resultados, mas devido ao baixo número de células o grupo não teve outra opção. Também não foram realizados os testes de viabilidade e apoptose celular, que podem interferir nos resultados. No presente trabalho apenas as células viáveis e íntegras foram analisadas.

Gonda e colaboradores (2008) afirmam que a criopreservação pode causar danos estruturais e funcionais às proteínas das células e reduzir sua viabilidade, mas trocas imunofenóticas dificilmente poderiam ocorrer. Trocas de expressão realmente não teriam justificativas, porém a perda da expressão é muito pertinente, pois como o próprio grupo mencionou, a criopreservação pode causar danos às proteínas da membrana, sendo este o caso do CD49d, que representa uma proteína de adesão.

Poucos estudos estão relacionados a diferença imunofenotípica após o descongelamento de células criopreservadas, sendo esta uma característica extremamente importante que deve ser estudada (MIENO *et al*, 2008; GONDA, *et al*, 2008).

A viabilidade celular antes e após a criopreservação, foi analisada através da coloração do Kit de viabilidade (BD) anexina V PE_ 7-AAD em um total de 20000 eventos. A apoptose das células é caracterizada pela fosfatidilserina, um componente do folheto interno das membranas celulares. Quando a célula entra em processo de apoptose a fosfatidilserina fica exposta na parede externa da

membrana, porém a membrana celular permanece intacta. As células positivas para Anexina-V, representam as células que tiveram esta translocação da fosfatidilserina (THIRUMALA, GIMBLE E DEVIREDDY, 2010). Outra linha de células que foram positivas para 7-AAD, indicam que a integridade da membrana foi comprometida, consequentemente houve morte celular. Sendo assim, estas marcações são usadas para distinguir células mortas de células que estão em processo de apoptose. Para analisar estas marcações foi utilizado o Software Cyflogic 1.2.1, que proporciona a sobreposição de histogramas do controle isotópico com os resultados da fluorescência de cada marcador, e quantifica a percentagem de marcações positivas (não sobrepostas ao controle isotópico) e negativas (sobrepostas ao controle isotópico). Sendo assim foi possível analisar três variáveis: i) células 100% viáveis (negativo para anexina V-PE e negativa para 7AAD); ii) células mortas (positiva para Anexina V-PE e positiva para 7AAD); iii) células em processo de apoptose (positivas para Anexina V-PE e negativas para 7AAD). Seguindo estes parâmetros, a viabilidade antes da criopreservação foi de $91,34\% \pm 4,54\%$. Após o descongelamento as células apresentaram uma queda significativa da viabilidade celular, $74,99\% \pm 14,19\%$ ($p=0,001$), perdendo em média 17,9% de células viáveis. Com relação a marcação com Anexina V (apoptose) os valores foram bem próximo aos valores da viabilidade celular, ficando em $91,39\% \pm 5,5\%$ antes da criopreservação e $76,31\% \pm 13,33$ após o descongelamento ($p=0,003$). Uma observação importante é que a maioria das células marcadas com Anexina V também estavam marcadas com 7-AAD, o que significa que a quantidade de células somente em processo de apoptose foi pequena.

A viabilidade das CTMTA após o descongelamento de células criopreservadas pode variar de acordo com a concentração de células em cada criotubo. Goh e colaboradores (2007) testaram quatro concentrações celulares: $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , 1×10^6 e 2×10^6 por ml e encontraram uma viabilidade de 71,4, 81,10%, 77,9% e 69,2%, respectivamente. O presente trabalho criopreservou as células em concentrações de 1×10^6 células por ml e encontrou valores de viabilidade semelhantes aos valores encontrados pelo grupo de Goh para esta concentração (2007), porém o método utilizado por Goh e colaboradores (2007) foi por coloração por azul de tripan, que é mais relativo por ser contado manualmente, o método utilizado no presente trabalho é mais preciso. Thirumala e colaboradores (2010) encontraram viabilidades, ficando em $84\% \pm 8\%$, quando usou o mesmo meio de

crioprotetor do presente trabalho, porém seu teste foi realizado em P1. Devido o baixo número de células, no presente trabalho as análises de viabilidade e apoptose celular foram realizadas somente em P2.

De Rosa e colaboradores (2009), encontraram valores surpreendentes de viabilidade celular 92,5%. Esta alta taxa de viabilidade pode estar relacionada com a forma de descongelamento destas células, que foram transferidas para o meio de cultivo com 10% de SFB antes do descongelamento total, isto fez com que as células ficassem pouco tempo em contato com o DMSO em temperatura ambiente.

Diversas pesquisas têm mostrado que vários fatores influenciam na dinâmica intracelular quando as células estão congeladas, afetando a viabilidade destas. Dentre estes fatores pode-se destacar a formação de gelo intracelular, que pode perfurar as membranas celulares; a alta concentração de células que pode limitar o espaço impedindo a expansão celular durante o congelamento; dentre outras (GOH *et al.*, 2007). Na maioria das vezes é usado um protocolo padrão para vários tipos celulares, porém algumas células possuem características próprias, que podem requerer um cuidado especial. Por este motivo seria ideal a criação de um protocolo específico para as CTMTA, visando uma melhor taxa de viabilidade e demais características (GONDA *et al.*, 2008).

Alguns grupos utilizam como método de estocagem de longo período o congelamento em freezer à -80°C ao invés do nitrogênio líquido (-196°C), porém este método tem apresentado níveis mais baixos de viabilidade, embora mantenham as características funcionais. Outras variáveis que podem influenciar na viabilidade é a velocidade do congelamento, pois quanto mais rápido, maior a probabilidade de formação de gelo intracelular e conseqüente dano na membrana (GONDA, *et al.* 2008; MIENO *et al.*, 2008), e a opção por meios livre de soro, que pode não beneficiar um grande viabilidade celular, mas pensando em aplicações terapêuticas, mesmo com esta baixa viabilidade poderia ser mais indicado pelo menor risco de contaminantes (MIENO *et al.*, 2008).

10 CONCLUSÃO

As CTMTA mantêm sua capacidade de proliferação, suas características imunofenotípicas e a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos após o descongelamento de células criopreservadas.

Alterações, causadas pela criopreservação demonstradas neste estudo, estão relacionadas à molécula integrina $\alpha 4$ e com a capacidade de formar colônias. Ambas estão relacionadas à adesão celular, podendo comprometer a integração no tecido hospedeiro.

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo possuem um bom rendimento celular e características que condizem com características de células indiferenciadas; confirmando ser uma promessa para diversas terapias baseadas no implante de células-tronco.

11 PERSPECTIVAS

Apesar destas alterações, a criação de um banco de células destinado à pesquisa é uma alternativa extremamente interessante e viável, pois irá permitir que diversos grupos trabalhem com a mesma linhagem celular, minimizando as diferenças de protocolos, aumentando a segurança dos ensaios terapêuticos; pois na atualidade há uma gama de resultados diversos e díspares, retardando os avanços importantes.

E para o uso das CTMTA para terapias em humanos, ainda há muito que se estudar e estabelecer para garantir a segurança e eficácia, pois existem muitas divergências e dúvidas.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., & WALTER, P. (2004). *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed

BERCZI, I.; SZENTIVANYI, A. Adhesion molecules. *Neuroimmune Biology*. v. 3. p. 99-115, 2003.

BARRETT, A.J.; BRIGDEN, W.D.; HOBBS, J.R.; HUGH-JONES, K.; HUMBLE, G.; JAMES, D.C.; RETSAS, S.; ROGERS, T.R.; SELWYN, S.; SNEATH, P.; WATSON, J.G. Successful bone marrow transplant for Fanconi's anaemia. *Br Med J*. v.1. n.6058. p.420-422, 1977.

BIEBACK,K.; KERN, S.; KOCAOMER,A.; FERLIK,K.; BUGERT,P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissue: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Bio-Medicals Materials and Engineering*. v.18.n.p.S71-S76, 2008.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose derived stem cell: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*. v. 45. n. 2. p. 115-120, 2008.

BYDLOWSKY,S.P.; DEBES,A.A.; MASELLI,L.M.F.; JANZ,F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.31.n.1.p.25-35, 2009.

CARVALHO, K.A.T.; SIMEONI, R.B.; GUARITA-SOUZA, L.C.; FRANCISCO, J.C.; ABDELWAHID, E.; MYIAGUE, N.I.; CHACHQUES, J.C.; RIVETTI, L.A.; OLIVEIRA, L.; MALVEZZI, M.; OLANDOSKI, M.; GREMSKI, W. Angiogenesis without functional outcome after mononuclear stem cell transplant in doxorubicin-induced dilated cardiomyopathy murine model. *The International Journal of Artificial Organs*. v. 31. n. 5. p. 431-438, 2008.

CASTEILLA,L.; CHAMPIGNY,O.; BOUILLAUD,F.; ROBELIN,J.; RICQUIER,D. Sequential changes in the expression of mitochondrial protein mRNA during the development of brown adipose tissue in bovine and ovine species, *Biochem. J*. v. 257. p. 665–671, 1989.

CHAVAKIS, E.; URBICH, C.; DIMMELER, S. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* . v.45. n.4. p. 514-522, 2008.

CHOI, Y.S.; CHA, S.M.; LEE, Y.Y.; KWON, S.W.; PARK, C.J.; KIM, M. Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 345. p. 631-637, 2006.

COOPER, M.S.; HEWISON, M.; STEWART, P. M.; Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*. v.163. n.2. p.159-164, 2008.

DE ROSA, A.; FRANCESCO, F.; TIRINO, V.; FERRARO, G.A.; DESIDERIO, V.; PAINO, F. *et al.* A New Method for Cryopreserving Adipose-Derived Stem Cells: An Attractive and Suitable Large-Scale and Long-Term Cell Banking Technology. *Tissue Engineering*. v.15.n.9.p.659-667, 2009.

DE UGARTE, D.A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ELBARBARY, A.; ZHU, M. ASHJIAN, P.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H.; FRASER, J.K. Differential expression of stem cell mobilization-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology letters*. v. 89. p. 267-270, 2003.

DJOUAD, F.; DELORME, B.; MAURICE, M.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; LOIUS- PLENCE, P.; CANOVAS, F.; CHARBORD, P.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cell towards chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy*. v.9. n. 2. R33, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A. ; PROCKOP, D.J; HORWITZ,E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy*.v.8 p.315–317, 2006.

DRAGOO, J.L.; CHOI, J.Y.; LIEBERMAN, J.R.; HUANG, J.; ZUL, P.A.; ZHANG, J.; HEDRICK, M.H.; BENHAIM, P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cell derived from human fat. *Journal of Orthopaedic Research*. v. 21. p. 622-629, 2003.

DUGUAY, D.; FOTY, R.A.; STEINBERG, M.S. Cadherin-mediated cell adhesion and tissue segregation: qualitative and quantitative determinants. *Developmental Biology*. v. 253. p. 309-323, 2003.

ELABD, C.; CHIELLINI, C.; MASSOUDI, A.; COCHET, O.; ZARAGOSI, L.E.; TROJANI, C.; MICHIELS, J.F.; WEISS, P.; CARLE, G.; ROCHET, N.; DECHESNE, C.A.; AILHAUD, G.; DANI, C.; AMRI, E.Z. Human adipose tissue-derived multipotent stem cell differentiate *in vitro* and *in vivo* into osteocyte-like cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 361. p. 342-348, 2007.

ERICKSON, G.R.; GIMBLE, J.M.; FRANKLIN, D.M.; RICE, H.E.; AWAD, H.; GUILAK, F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 290. p. 763-769, 2002.

EVANS, M.J; KAUFMAN, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* .p. 154-156, 1981.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. v. 18. n. 6. p. 877-891, 2004.

FERNYHOUGH, M.E.; HAUSMAN, G.J.; GUAN,L.L.; OKINE,E.; MOORE,S.S.; DODSON,M.V. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue

engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v.368.n.p.455-457, 2008.

FLEMING, K.K.; HUBEL, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cell. *Transfusion and Apheresis Science*. v. 34. p. 309-315, 2006.

FRASER, J.K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M.H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology*. v.24.n.4.p.151-154, 2006.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K. e LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell tissue Kinet*, v.3. 393-403, 1970

GOH, B.C.; THIRUMALA, S.; KILORY, G.; DEVIREDDY, R.V.; GIMBLE, J.M. Cryopreservation characteristics of adipose-derived stem cells: maintenance of differentiation potential and viability. *J Tissue Eng Regen Med*. v. 1. n.4. p. 322-324, 2007.

GOLDMAN, M.; TH'NG, K.H.; PARK, D.S.; SPIERS, A.S.D.; LOWENTHAL, R.M. ;RUUTU, T. Collection, Cryopreservation and Subsequent Viability of Haemopoietic Stem Cells Intended for Treatment of Chronic Granulocytic Leukaemia in Blast-Cell Transformation. *British Journal of Haematology*. v.14.n.2.p.185-195, 1978.

GONDA, K.; SHIGEURA, T.; SATO, T.; MATSUMOTO, D.; SUGA, H.; INOUE, K. Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long term cryopreserved. *Plastic and reconstructive surgery*.v.121. n.2. p.401-410, 2008

GROTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.97. n. 25. p.13625-13630.

HIMMS-HAGEN J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J*. v.4n.11.p. 2890-2898, 1990.

HORWITZ, E.M. Stem cell plasticity: The growing potential of cellular therapy. *Archives of Medical Research*. v. 34. p. 600-606, 2003.

HUANG, J.I.; KAZMI, N.; DURBHAKULA, M.M.; HERING, T.M.; YOO, J.U.; JONHSTONE, B. Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison. *Journal of Orthopaedic Research*. v. 23 p. 1383-1389, 2005.

JIANG, Y.; VAESSEN, B.; LENVIK, T., *et all.* Multipotent progenitors cell can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol* , v.30 p. 896-904, 2002.

JURGENS, W.J., OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.J., HELDER, ZANDIEHDOULABI, B., SCHOUTEN, T.E., KUIK, D.J., RITT, M.J., VAN MILLIGEN, F.J. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res.* v.332. n. 3. p. 415-26, 2008.

KAISER, S.; HACKANSON, B.; FOLLO, M.; MEHLHORN, A.; GEIGER, K.; IHORST,G.; KAPP, U. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy.* v. 9. p. 1-12, 2007.

KATZ, A.J.; THOLPADY, A.; THOLPADY, S.S.; SHANG, H. OGLE, R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human Adipose-derived stromal (hADAS) cells. *Stem cells.*v.23. n. p.412-423.

KOLF, C.; CHO, E,; TUAN, S.R. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and diferentiation.

KOUKOULIS, G.K.; CARLO, P.; GOULD, V.E. Adhesion molecules and tumor metastasis. *Human Pathology.* v. 29. n. 9. p. 889-892, 1998.

LEE, J.H.; RHIE, J.W.; OH, D.Y.; AHN, S.T. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cell (hASCs) in a porous three-dimensional scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* v. 370. p. 456-460, 2008.

LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I.; *et all.* Characterization and expression analisys of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* v. 14 p. 311-324, 2004.

LEI, L.; LIAO, W.; SHENG, P.; FU, M.; HE, A.; HUANG, G. Biological character of human adipose derived adult stem cells and influence of donor age on cell replication in culture. *Science in China Press.* v.50. n. 3.p. 320-328, 2007.

LIU , G.; ZHOU, H.; LI, Y.; LI, G.; CUI, L.; LIU, W.; CAO, Y. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cell. *Cryobiology.* v.57, n.1. p. 18-24, 2008.

MAJORE, I.; MORETTI, P.; STAHL, F; HASS, R.; KASPER, C. Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. *Stem Cell Ver*, 2010.

MARTINELLO, T.; BRONZZINI, I.; MACCATROZZO, L.; SAMPAOLESI, M.; MASCARELLO,F.; DECAMINADA, M.; PATRUNO, M. Canine adipose-derived-

mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*. v.n.p. , 2010.

MEYERROSE, T.E.; DE UGARTE, D.A.; HOFLING, A.; HERRBRICH, P.E.; CORDONNIER, T.D.; SHULTZ, L.D.; EAGON, J.C.; WIRTHLIN, L.; SANDS, M.S.; HEDRICK, M.A.; NOLTA, J.A. *In vivo* Distribution of human adipose-derived Mesenchymal stem cells is novel xenotransplantation models. *Stem cells*.v.25. n.1. p. 220-227, 2006

MIENO,S.; CLEMENTS, R.T.; BOODHWANI, M.; SODHA, N.R.; RAMLAWI, B.; BIANCHI, C.; SELLKE, F.W. Characteristics and function of cryopreserved bone marrow- derived endothelial progenitor cells. *The Annals of Thoracic Surgery*. v. 85. n. 4. 2008.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal Stem Cells. *Society for Experimental Biology and Medicine*. p.507-520, 2001.

MITCHELL, J.B.; McINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRETT, S.; FLOYD, E.Z.; KLOSTER, A.; *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: Temporal changes in stromal associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells. Tissue-Specific Stem Cells*, v.24. p. 376-385, 2006.

MOON, Y.J.; LEE, J.E.; YOON, H.H.; YANG, M.S.; JANG, I.K.; LEE, J.E.; KIM, H.E.; EOM, Y.; PARK, J.S.; KIM, H.C.; KIM, Y.J.; LEE, K. Hepatic differentiation of cord blood-derived multipotent progenitor cells (MPCs) *in vitro*. *Cell Biology International*. v. 32. p. 1293-1301, 2008.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, S.L.; Mesenchymal Stem cells: isolation *in vitro* expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol*, n.174. p. 249-282, 2006.

NOEL, D.; CATON, D.; ROCHE, S.; BONY, C.; LEHMANN S.; CASTEILLA, L.; JORGENSEN, C.; COUSIN, B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cell despite similar differentiation potentials. *Experimental Cell Research*. v. 314. p. 1575-1584, 2008.

NÖTH, U.; OSYCZKA, A.M.; TULI, R.; J. HICKOK, N.J.; DANIELSON, K.G.; TUAN, R.S. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*. v.20.n.5. p.1060-1069, 2002.

EDAYRAJSINGH-VARMA, M.JM; HAM, S.M.V.; KNIPPENBERG, M.; HELDER,M.N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T.M.; RITT M.J.P.F.; MILLIGEN, F.J.V. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. v 8. p 166-177, 2006.

OGAWA, M. differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood*. v. 81. p. 2844-2853. 1993.

OH, W.; KIM, D.S.; YANG, Y.S.; LEE, J.K. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cellular Immunology*. v.251. n.2 p. 116-123, 2008.

PARKES, R.J.; HART, S.L. Adhesion molecules and gene transfer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 44. p. 135-152, 2000.

PARKMAN, R.; RAPPEPORT, J.; GEHA, R.; BELLI, J.; CASSADY, R.; LEVEY, R.; NATHAN, D.G.; ROSEN, F.S. Complete correction of the Wiskott-Aldrich syndrome by allogeneic bone-marrow transplantation. *N Engl J Med*. v.298. n.17. p.921-927, 1978

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. *Ciência e saúde coletiva*. v. 13. p. 7-14, 2008.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, S., MOCKA, J.D.; *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal. *Science*. v.284. n. 5411. p.143-147, 1999.

PRUNET-MARCASSUS, B.; COUSIN, B.; CATON, D.; ANDRÉ, M.; PÉNICAUD, L.; CASTEILLA, L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Experimental Cell Research*. v.312, n.6. p.727-736, 2005.

QU-PETERSEN, Z.; DEASY, B.; JANKOWSKI, R.; IKEZAWA, M.; CUMMINS, J.; PRUCHNIC, R.; MYTINGER, J.; CAO, B.; GATES, C.; WERNIG, A.; HUARD, J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J cell Biol*. v.157.n.5. p. 851-864, 2002.

RAPOSIO, E.; GUIDA, C.; BALDELLI, I.; BENVENUTO, F.; CURTO, M.; PALEARI, L.; FILIPPI, F.; FIOCCA, R.; ROBELLO, G.; SANTI, P.L. Characterization and induction of human pré-adipocytes. *Toxicology in Vitro*. v. 21. p. 330-334, 2007.

RODRIGUEZ, A.M.; ELABD, C.; DELTEIL, F.; ASTIER, J.; VERNOCHE, C.; SAINT-MARC, P.; GUESNET, J.; GUEZENNEC, A.; AMRI, E.Z.; DANI, C.; AILHAUD, G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 315. p. 255-263, 2004.

RUBIO, D.; GARCIA-CASTRO, J.; MARTÍN, M.C.; LA FUENTE, R.; CIGUDOSA, J.C.; LLOYD, A.C.; BERNARD, A. Spontaneous Human Adult Stem cells Transformation. *Cancer res*. v.65.n.8.p.3035-3039, 2005.

SANTOS, I.R.I. Crioconservação de gametoplasma vegetal. *Biotecnologia ciência e desenvolvimento*. n. 20. p. 60-65, 2001.

SIED, S.H.; TRINNAMAN, B.; MATIN, S.; MAJOR, S.; HUTCHINSON, J.; MAGEE, A.I. Molecular interactions between desmosomal cadherins. *Journal Biochemical Society*. v. 362. p. 317-327, 2002.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA. Cirurgias Plásticas no Brasil. 2009. Disponível em: http://www2.cirurgiaplastica.org.br/index.php?option=com_jforms&view=form&id=1&Itemid=212. Acesso em: 20 de jan. 2010.

SOTIROPOULOU, P.A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, B. N.; PAPAMICHAIL, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. v.24. p. 462-471, 2006.

STORB, R.; THOMAS, E.D.; WEIDEN, P.L.; BUCKNER, C.D.; CLIFT, R.A.; FEFER, A.; FERNANDO, L.P.; GIBLETT, E.R.; GOODELL, B.W.; JOHNSON, F.L.; LERNER, K.G.; NEIMAN, P.E.; SANDERS, J.E. Aplastic anemia treated by allogeneic bone marrow transplantation: a report on 49 new cases from Seattle. *Blood*. v. 48. n.6. p. 817-841, 1976.

THIRUMALA, S.; GIMBLE, J.M.; DEVIREDDY, R.V. Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Stem Cells and Development*. v.19. v.4. p.513-522, 2010.

TONER, M.; CRAVALHO, E.G.; KAREL, M. Cellular response of mouse oocytes to freezing stress: prediction of intracellular ice formation. *J Biomech Eng*. v. 115.n.2. p. 169-174, 1993.

TRAYHURN P.; WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr*. v.92. n. 3. p. 347-55, 2004.

TUAN, R. S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. v.5.n.1. p. 32-45, 2002.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cell from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*. v. 33. p. 1402-1416, 2005.

WANG, J.; WANG, L.; WU, Y.; XIANG, Y.; XIE, C.; JIA, B.; HARRINGTON, J.; MCNIECE, I.K. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34+ hematopoietic stem cell and for chondrogenic differentiation. *Hematologica*. v. 89. p. 834-844, 2004.

WEISSMAN, I.L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*. v. 287. p. 1442-1446, 2000.

WEISSMAN, I.L.; SHIZURU, J.A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific

transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood journal*. v. 112. p. 3543-3553, 2008.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. *Molecular Biology of the Cell*. v. 13. p. 4279-4295, 2002.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNI, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, P.; HEDRICK, A.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. v. 7. n. 2 p.211-228, 2001.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento é um termo de consentimento livre e esclarecido, ele informa a você: objetivos, procedimentos, riscos e benefícios, do estudo de pesquisa no qual você esta sendo convidada a participar. Você precisa ler, entender e assinar este termo de consentimento livre e esclarecido e se concordar em participar deste estudo assiná-lo.

Eu _____, RG

nº _____, estou sendo convidada (o) a participar de um estudo denominado:

“Avaliação da expressão de moléculas de adesão das células-tronco mesenquimais criopreservadas, derivadas de tecido adiposo humano” cujo objetivo é analisar se há alterações na expressão das moléculas de adesão após a criopreservação (congelamento) de células-tronco obtidas a partir da gordura retirada por lipoaspiração humana.

Sei que para o avanço da pesquisa, a participação de voluntários é de fundamental importância. Caso aceite participar desta pesquisa eu doarei o meu tecido adiposo (a gordura) após o procedimento cirúrgico de lipoaspiração.

Entendo que o tecido gorduroso coletado após o término da cirurgia sofre descarte (jogada no lixo hospitalar) e não haverá prejuízo para minha pessoa. Fui orientada que as amostras serão criopreservadas (congeladas) por um período máximo de 2 meses, **não** sendo autorizado de minha parte a manutenção destas por um período maior, com objetivo de Banco de Amostras ou outro uso que não seja a pesquisa autorizada.

Entendo que o tecido adiposo será utilizado para o estudo, portanto não apresentará fins lucrativos.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome, ou qualquer outro dado confidencial, será mantido em sigilo. A elaboração final dos dados será feita de maneira codificada, respeitando o imperativo ético da confidencialidade.

Estou ciente de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, sem sofrer qualquer dano.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho (Coordenadora do Projeto), e Mestranda Ana Carolina Irioda (Pesquisadoras), com quem poderei manter contato pelos telefones.

Estarão garantidas todas as informações que eu queira saber antes, durante e depois do estudo.

Li, portanto, este termo e fui orientada quanto ao teor da pesquisa acima mencionada e compreendi todas as informações dadas, estou satisfeita com as informações recebidas, pude formular todas as perguntas convenientes e me foram esclarecidas todas as dúvidas.

Concordo, voluntariamente em participar desta pesquisa, sabendo que não receberei e nem pagarei nenhum valor econômico por minha participação.

Diante do exposto nos parágrafos anteriores eu, firmado abaixo, (primeiro nome e sobrenome)....., residente à (endereço).....e concordo em doar o material de tecido gorduroso proveniente de lipoaspiração para o Projeto: “ **Avaliação da expressão de moléculas de adesão das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano**”.

Nome:_____

Assinatura do (a) doador (a) do tecido adiposo:_____

Local e Data:_____

Katherine Athayde Teixeira de Carvalho- CRM-PR:16.631 (Coordenadora do Projeto)

Assinatura do coordenador:_____

Tel: (41) 32231689.

Local e Data:_____

Ana Carolina Irioda (Pesquisadora-Mestranda)

Tel: (41) 84091827

Assinatura:_____

Local e Data:_____

Testemunha: Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que este termo foi apresentado ao doador voluntário e maior de idade.

Nome:_____ -

Assinatura:_____

Local e Data:_____

Observação: Em caso de perguntas com referência a este protocolo, gentileza contatar diretamente o Instituto Pelé Pequeno Príncipe, situado à Avenida Silva Jardim, 1632. Bairro Água Verde, Curitiba, ou por meio de telefone; 41-3310 1720 (Falar com Ana Carolina Irioda ou Dra. Katherine Athayde Teixeira de Carvalho).

ANEXO 2

DADOS SOLICITADOS AOS DOADORES

Nome:

RG:

Data de Nascimento:

Sexo:

Peso:

Pessoa para contato:

Fone: ()

Tecido coletado da região:

Já sofreu intervenções cirúrgicas? Quais?	() não	() sim
Tem alergias a medicamentos Quais? Outras alergias:	() não	() sim
Tem doença existente ou pré- existentes? Quais	() não	() sim
Usa medicamentos, mesmo naturais Quais?	() não	() sim
Teve hepatite?	() não	() sim
Já recebeu transfusão de sangue?	() não	() sim
Fuma?	() não	() sim Cigarros/dia?

ANEXO 3

Quadro de dados dos pacientes

Amostra	Idade	IMC	Sexo	Rendimento por ml ($\times 10^6$)
A41	47	22,3	F	1,94
A42	40	27,2	M	1,45
A43	38	26,7	F	3,70
A45	38	29,4	F	5,55
A46	24	24,7	M	3,18
A47	45	29,4	F	5,84
A48	35	22,8	F	5,48
A49	41	23,6	F	12,3
A50	22	20,7	F	6,00
A51	43	20,5	F	16,5
A52	19	24,2	F	9,20
A53	44	24,6	F	1,95

Fonte: o autor (2010)

IMC – Índice de crescimento celular

ANEXO 4

Índice de Proliferação celular

AMOSTRA	A41	A42	A43	A45	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A53
IP P1 A	0,38	0,38	0,31	0,20	0,28	0,26	0,25	0,28	0,12	0,18	0,08	0,40
IP P2 A	16,8	19,40	34,64	30,40	16,40	24,80	17,60	16,40	28,40	24,40	15,60	29,60
IP P3 A	12,4	4,00	16,00	14,00	14,40	26,80	15,00	8,40	10,40	8,80	16,00	10,80

Quadro com valores individuais do índice de proliferação celular (IP) nas passagens 1 (P1), 2(P2) e 3 (P3), de 12 amostras antes da criopreservação.

Fonte – O autor (2010)

Tabela de comparação de Índice de proliferação

Variável	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
P1 A	13	0,26	0,08	0,40	0,10	
P2 A	13	22,87	15,60	34,64	6,68	
P3 A	13	13,08	4	26,80	5,62	<0,001

FONTES – O autor (2010)

NOTA – Tabela representativa de 12 amostras antes da criopreservação com valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões das passagens 1 (P1), passagem 2 (P2) e passagem 3 (P3). Estatística usando teste de Friedman, mostrou que houve diferença significativa entre as passagens ($p < 0,001$).

AMOSTRA	A41	A42	A43	A45	A46	A47	A48	A49	A50	A52	A52	A53
IP P3 A	12,4	4	16	14	14,4	26,8	15	8,4	10,4	8,8	16	10,8
IP P3 D	18	13,2	12	25,2	22,8	13,2	18,3	21,6	15,6	18	16,8	14,4

Quadro com valores individuais do Índice de proliferação celular (IP) de 12 amostras, na passagem 3 (P3), antes da criopreservação (A) e depois do descongelamento das células (D).

FONTES – O autor (2010)

Tabela de comparação do Índice de proliferação antes da criopreservação e após o descongelamento

Variável	n	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
P3 A	12	13,08	4	26,8	5,62	
P3 D	12	17,43	12	25,2	4,11	=0,07

FONTES – O autor (2010)

NOTA – Tabela representativa de 12 amostras antes da criopreservação e após o descongelamento, com valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões da passagens 3 (P3 A) antes da criopreservação, e da passagem 3 (P3) após o descongelamento. Estatística usando teste T, mostrou não houve diferença significativa nas células após o descongelamento ($p = 0,007$).

ANEXO 5

Valores em percentuais de unidade formadora de colônias fibroblastóides (UFC)

AMOSTRA	A41	A42	A43	A45	A46	A47	A48	A49	A50	A51	A52	A52	A54
UFC A	28,8	16,6	34,4	22,2	30	30	22,2	31,1	35,5	21	41,1	27,7	28,8
UFC D	26,6	11	21	18,8	23,3	28,8	13,3	30	16,6	16,6	31,1	21	20

Quadro com valores individuais em percentagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de 12 amostras, na passagem 3 (P3), antes da criopreservação (UFC A) e depois do descongelamento das células (UFC D).

FONTE – O autor (2010)

Tabela de Unidade formadora de Colônia Antes da criopreservação e após o descongelamento

Variável	Média	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	Valor de p
UFC A	28,08	16,6	41,1	7,06	
UFC D	21,51	11	31,1	6,61	0,001

FONTE – O autor (2010)

NOTA – Tabela representativa de 12 amostras com valores em percentagem de unidade formadoras de colônia, antes da criopreservação (UFC A) e depois do descongelamento (UFC D) com valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões das passagens 3 (P3) antes da criopreservação e após o descongelamento.

ANEXO 6

Percentagem de expressão dos marcadores de superfície

Amostra	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
	CD34-		CD34+		CD45-		CD49d+		CD73+		CD90+		CD105+	
A41	99,64	99,43	0,36	0,57	99,43	99,65	84,07	83,65	99,58	99,81	99,67	99,97	98,55	99,15
A42	99,83	99,97	0,17	0,03	99,79	99,58	80,15	76,69	99,94	99,78	98,27	97,46	99,89	99,59
A42	99,86	99,06	0,14	0,94	99,27	99,67	92,13	91,95	99,94	99,76	98,15	99,82	99,88	99,87
A45	99,64	99,95	0,36	0,05	99,83	99,95	96,38	93,07	99,84	99,78	99,95	99,94	99,41	99,78
A46	98,81	99,12	1,19	0,88	99,99	99,81	94,09	79,8	99,12	99,47	99,52	99,68	99,84	98,06
A47	96,68	97,9	3,32	2,1	99,85	99,79	93,74	82,83	99,66	99,63	99,86	99,51	99,8	99,78
A48	99,19	99,71	0,81	0,81	99,88	99,95	88,77	82,44	99,88	99,75	99,87	99,75	99,91	99,85
A49	97,04	99,28	2,96	0,72	100	99,96	81,24	41,64	99,45	98,94	99,86	99,69	99,2	96,28
A50	99,02	99,51	0,98	0,49	99,91	99,71	95,17	74,59	99,78	99,67	99,81	99,82	99,6	94,98
A51	97,98	98,35	2,02	1,65	99,71	99,99	81,33	61,74	99,23	98,51	99,85	99,07	97,86	93,87
A52	99,63	99,26	0,37	0,74	99,84	99,78	81,39	73,75	99,86	99,88	99,81	99,67	99,05	99,14
A53	99,22	99,61	0,78	0,39	99,93	99,78	95,6	91,44	98,51	99,04	99,97	98,99	99,83	98,78

Quadro de percentagem de expressão dos marcadores de superfície de 12 amostras, antes da criopreservação e após o descongelamento das células.

FONTE – O autor 2010.

Tabela de expressão dos marcadores

	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
	CD34-		CD34+		CD45-		CD49d+		CD73+		CD90+		CD105+	
MEDIA	98,88	99,26	1,12	0,78	99,79	99,80	88,67	77,80	99,57	99,50	99,55	99,45	99,40	98,26
MAXIMA	99,86	99,97	3,32	2,1	100	99,99	96,38	93,07	99,94	99,88	99,97	99,97	99,91	99,87
MIN	96,68	97,9	0,14	0,03	99,27	99,58	80,15	41,64	98,51	98,51	98,15	97,46	97,86	93,87
DP	1,08	0,61	1,08	0,60	0,22	0,14	6,55	14,45	0,43	0,43	0,07	0,70	0,64	2,07
P=	0,113		0,158		0,791		0,007		0,528		0,618		0,049	

FONTE – O autor (2010)

NOTA – Tabela representativa de 12 amostras, com valores de percentagem dos marcadores de superfície antes da criopreservação e após o descongelamento das células. Resultados apresentados com valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões das percentagens de expressões dos marcadores de superfície.

ANEXO 7

Viabilidade e integridade celular

AMOSTRA	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
	ANX-		7AAD-	
A41	95,59	78,48	95,02	77,21
A42	92,43	73,51	93,38	75,65
A43	90,03	92,72	93,86	91,96
A45	93,52	63,86	91,57	60,98
A46	86,31	79,54	87,02	78,34
A47	95,22	93,76	92,65	93,38
A48	96,2	81,87	94,22	80,75
A49	90,4	66	95,17	63,55
A50	93,81	52,38	89,68	49,21
A51	95,44	69,02	89,92	65,82
A52	75,18	68,71	79,29	67,75
A53	92,52	95,83	94,35	95,27

FIGURA: Integridade e Viabilidade Celular

FONTE – O autor (2010)

NOTA: quadro com valores individuais de 12 experimentos, mostrando a diferença da integridade e viabilidade celular de células antes da criopreservação e após o descongelamento. A integridade celular é caracterizada pela marcação com anexina V, sendo que, as células integras são as que não possuem esta marcação (ANX-). A viabilidade celular é caracterizada pela marcação com 7-AAD, sendo que, as células viáveis são as que não possuem esta marcação (7AAD-). As marcações identificadas através da citometria de fluxo e análise de dados realizada com software Cyflogic.

MEDIA	91,39	76,31	91,34	74,99
MAX	96,2	95,83	79,29	49,21
MIN	75,18	52,38	95,17	95,27
DP	5,85	13,33	4,54	14,19
P		=0,003		=0,001
DIF		16,50%		17,90%

FONTE: O autor (2010)

NOTA – Tabela representativa de 12 amostras antes da criopreservação e após o descongelamento das células, com valores de média, mínimos, máximos e desvios padrões das percentagens de células integras e viáveis. Os resultados são apresentados a média \pm desvio padrão. Teste T estatístico com significância $p < 0,05$, sendo que no houve perda significativa da integridade celular após o descongelamento das células (integridade celular $p = 0,003$;).

ANEXO 8

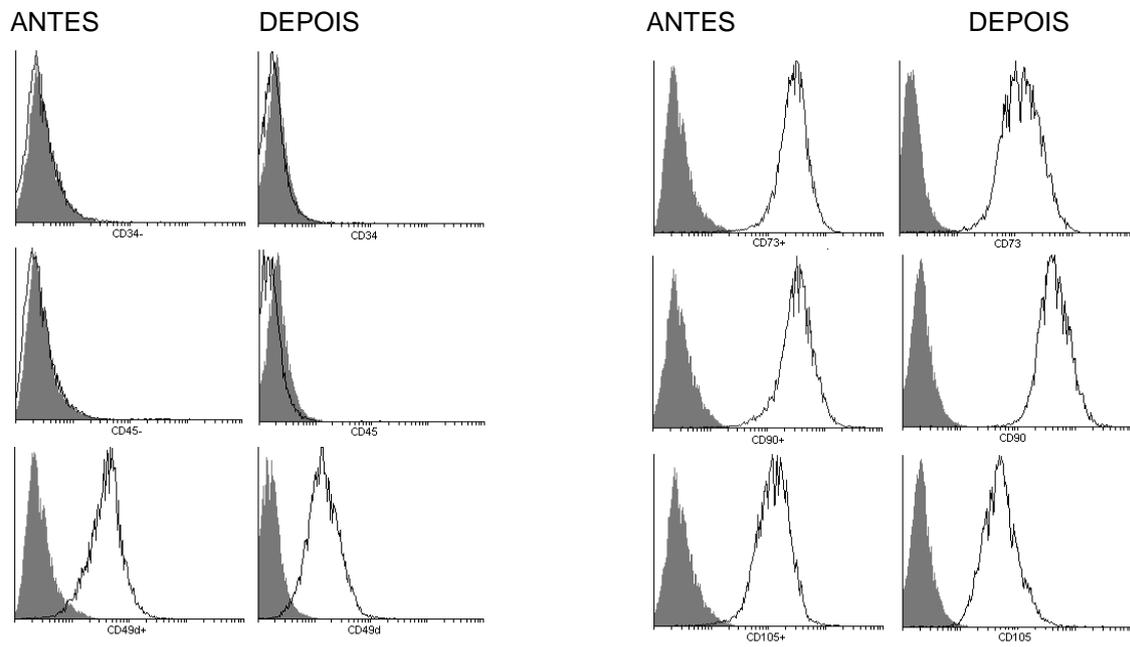
HISTOGRAMAS DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES DE SUPERFÍCIE, VIABILIDADE E APOPTOSE CELULAR.

Dados representativos de 12 amostras, apresentando histogramas com expressões dos marcadores de superfícies, Anti-CD34, Anti-CD45, Anti-CD49d, Anti-CD73, Anti-CD90 e Anti-CD105, de células na passagem 3 antes da criopreservação e após o descongelamento. As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo foram criopreservadas por aproximadamente 20 dias e após o descongelamento foram analisadas por citometria de fluxo para verificar a expressão de marcadores de superfície celular e a análise foi realizada no software Cyglogic v. 1.2.1. O histograma “cheio” é o controle isotípico a linha marca a expressão do marcador de superfície em questão.

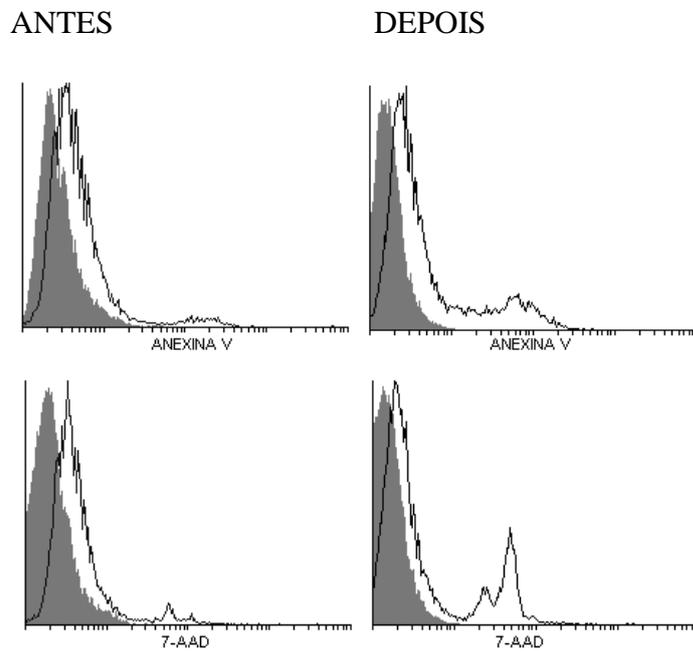
A apoptose e a viabilidade celular, também foram analisadas usando citometria de fluxo e os marcadores de apoptose (anexina V) e de viabilidade celular (7-AAD). As populações em processo de apoptose são positivas para Anexina V. As populações mortas são positivas para 7-AAD.

As análises de marcadores de superfície foram realizadas apenas nas populações células viáveis e integras (Anexina V negativa e 7AAD negativa, respectivamente).

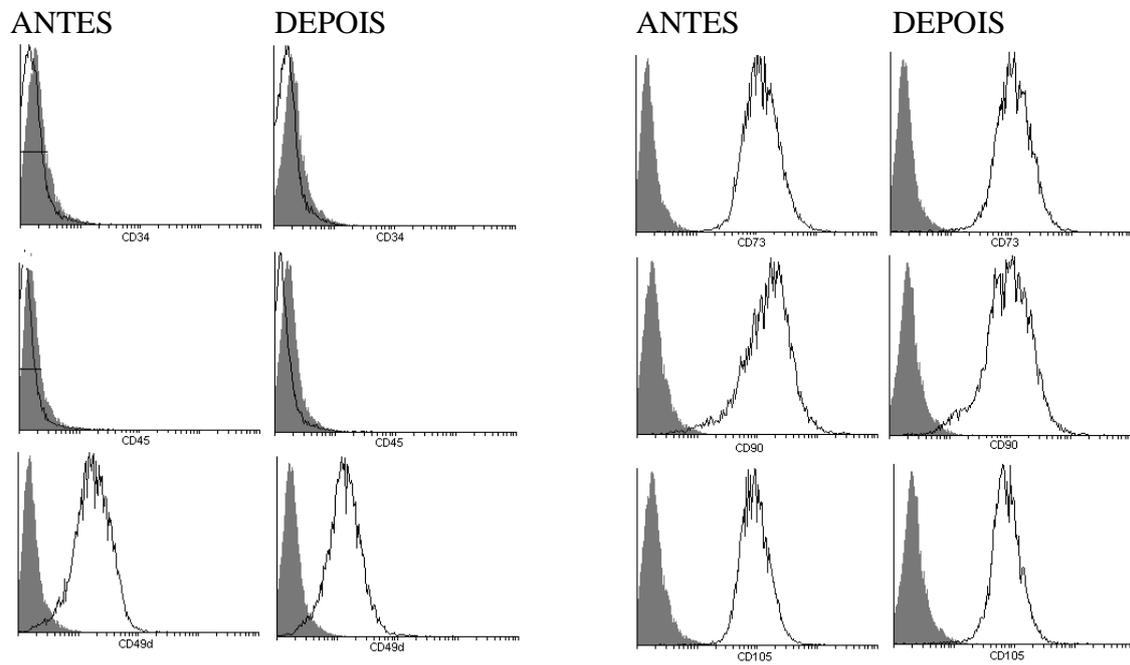
A41



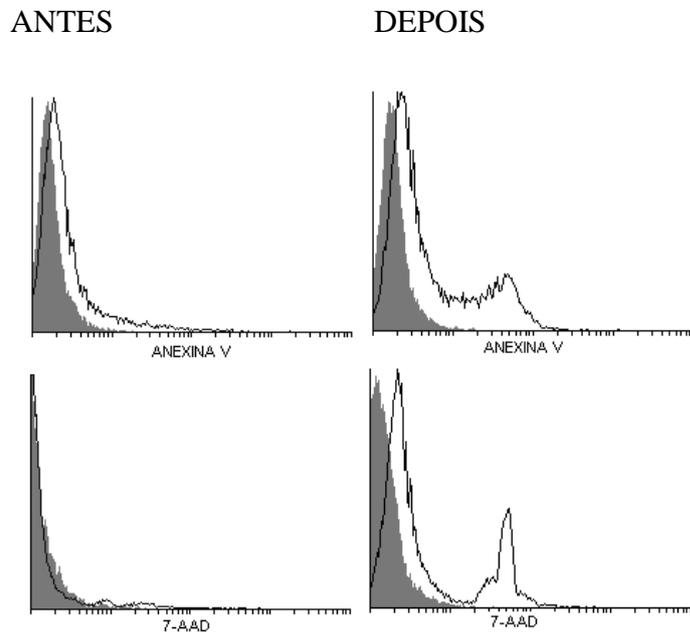
APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR



A42



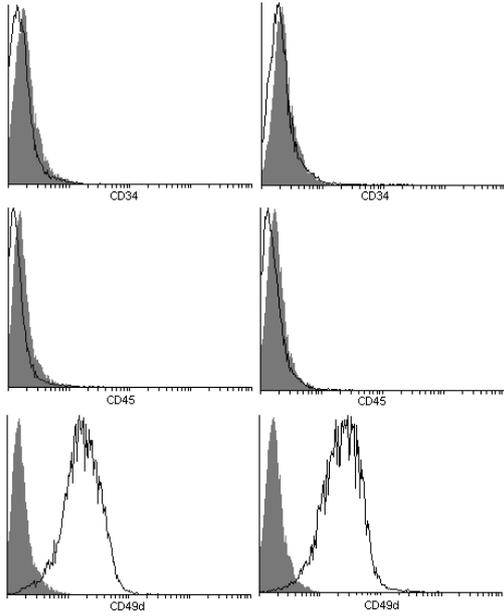
APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR



A43

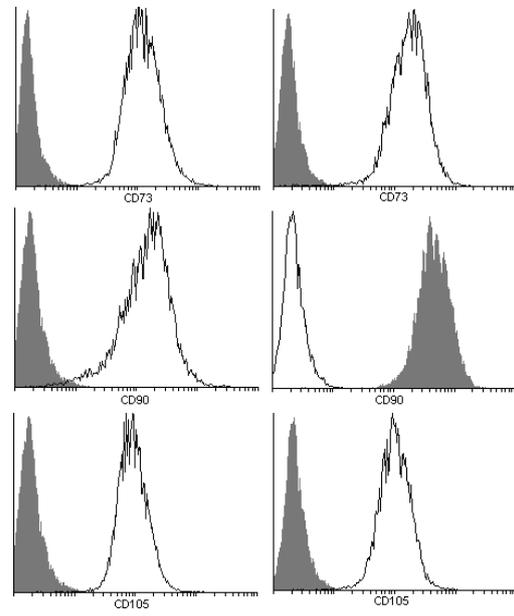
ANTES

DEPOIS



ANTES

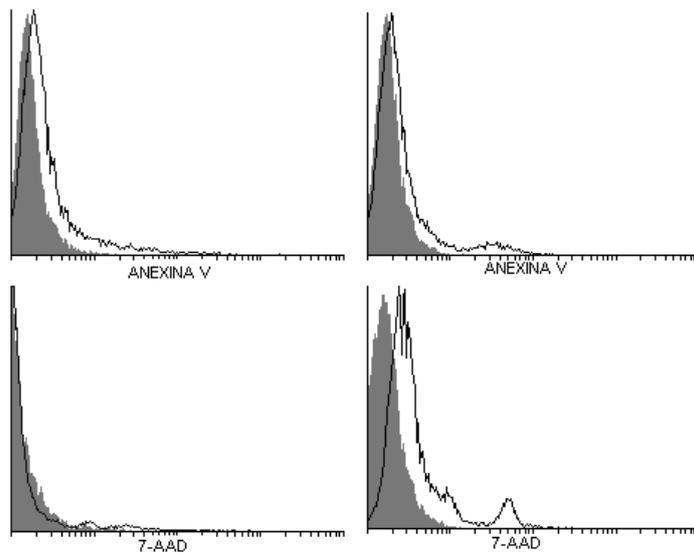
DEPOIS



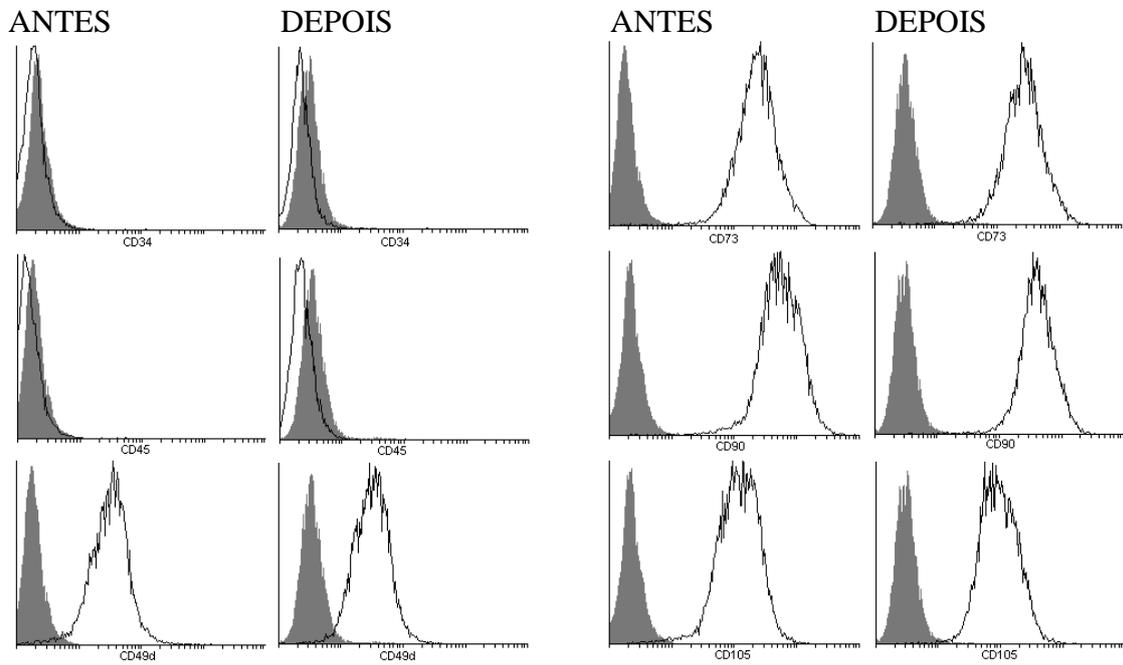
APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



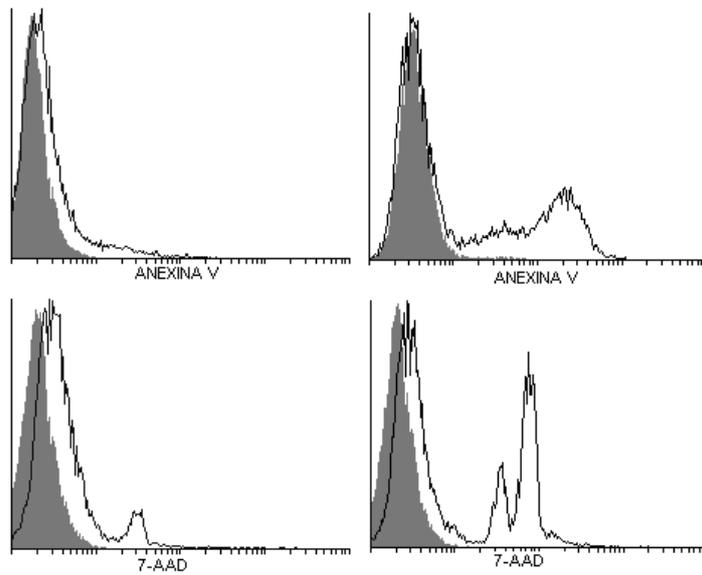
A45



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



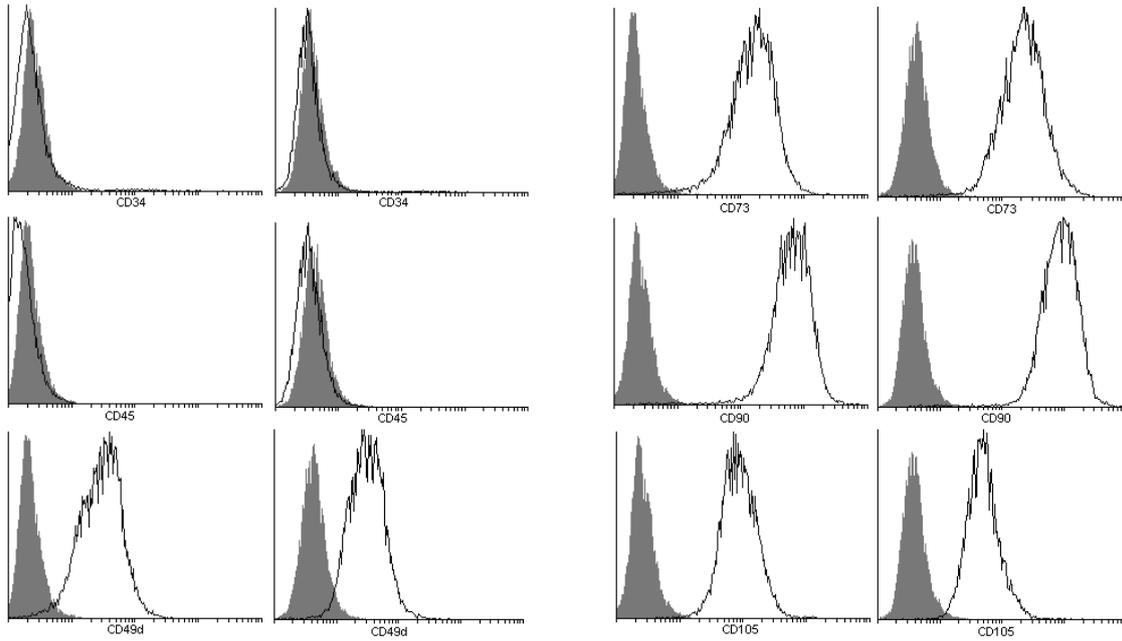
A46

ANTES

DEPOIS

ANTES

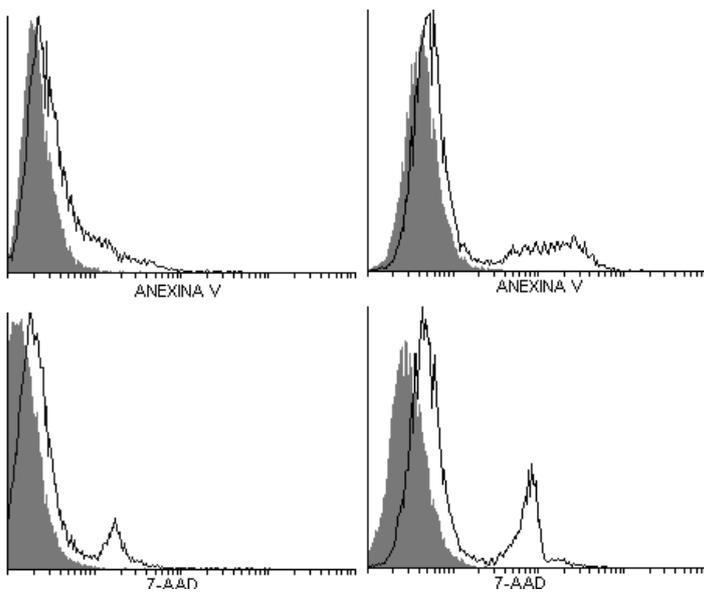
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



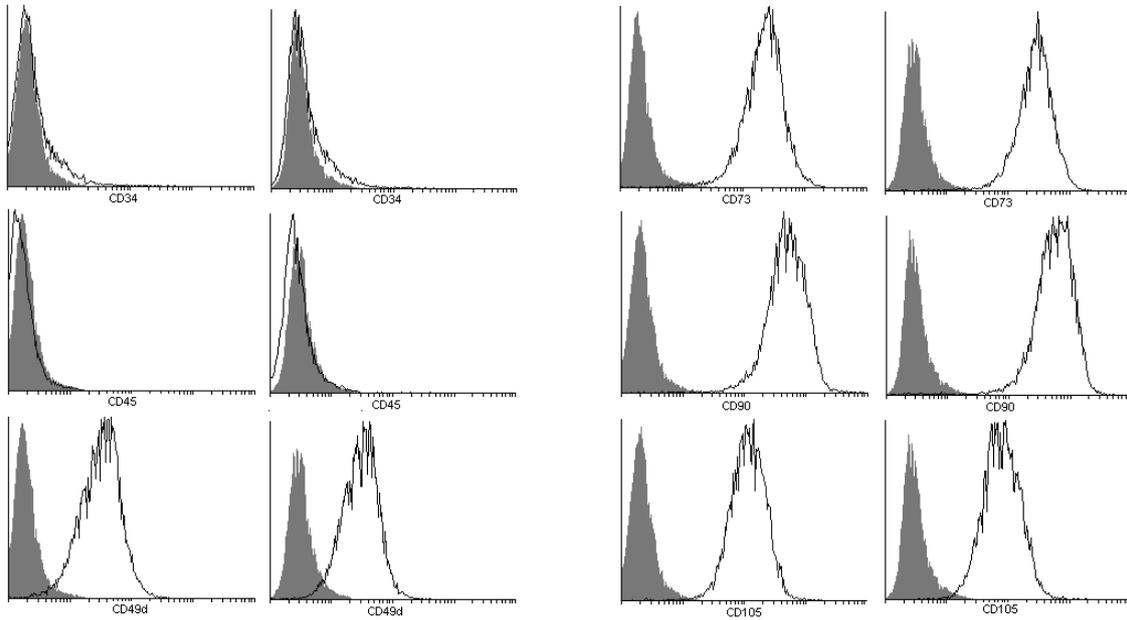
A47

ANTES

DEPOIS

ANTES

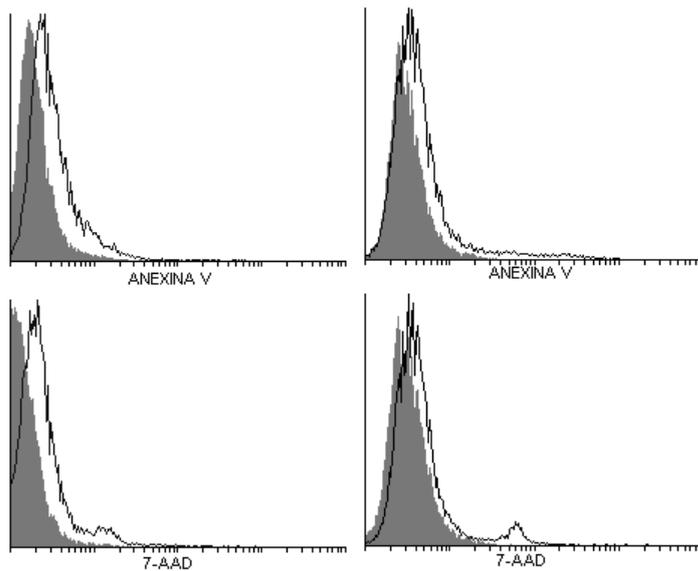
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

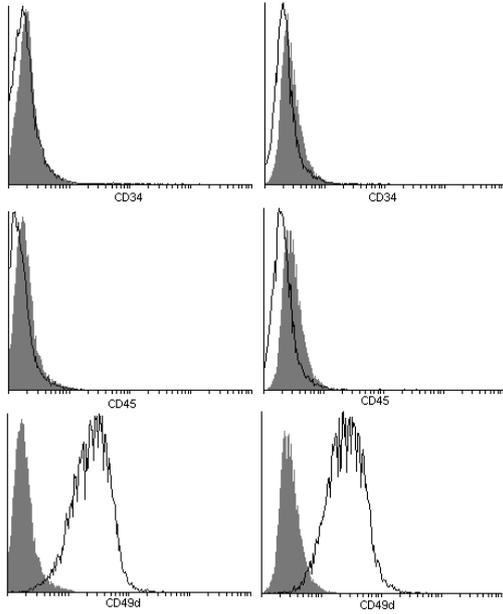
DEPOIS



A48

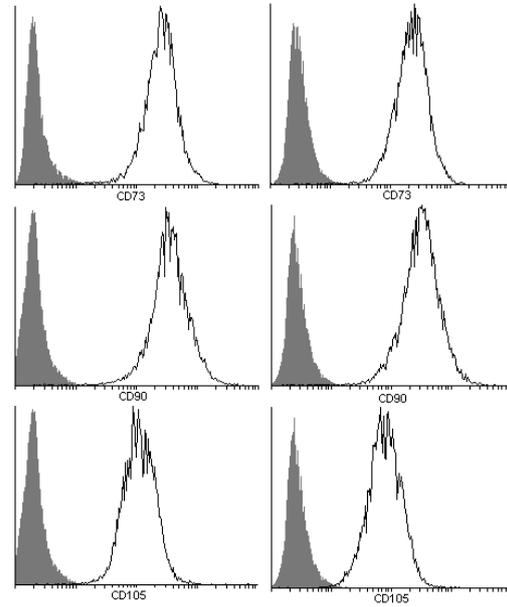
ANTE

DEPOIS



ANTES

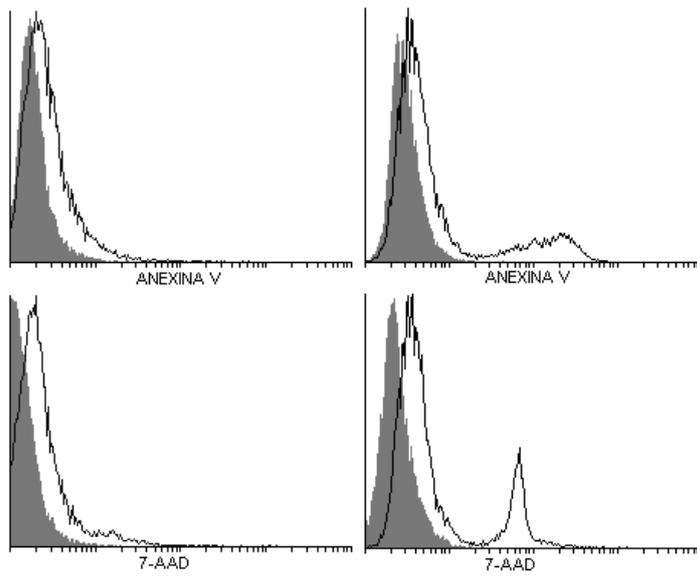
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



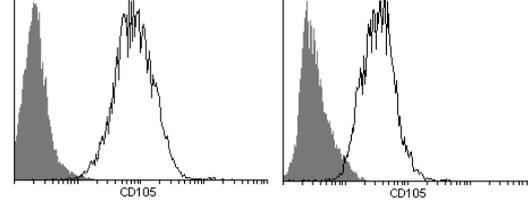
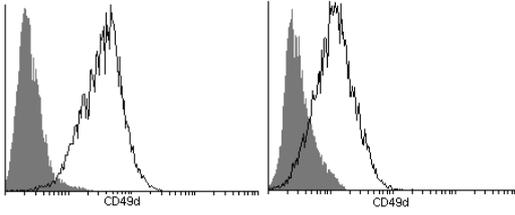
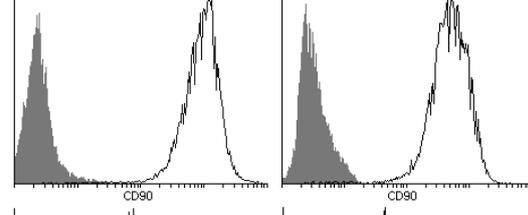
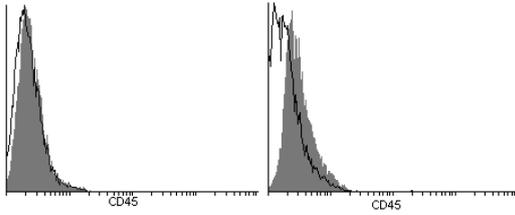
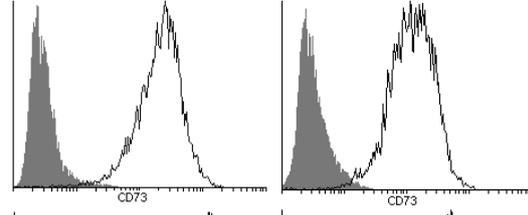
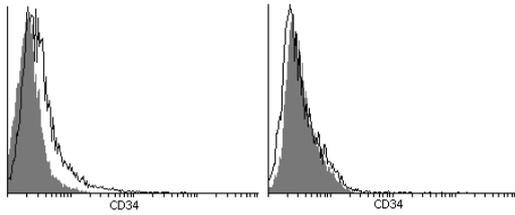
A49

ANTES

DEPOIS

ANTES

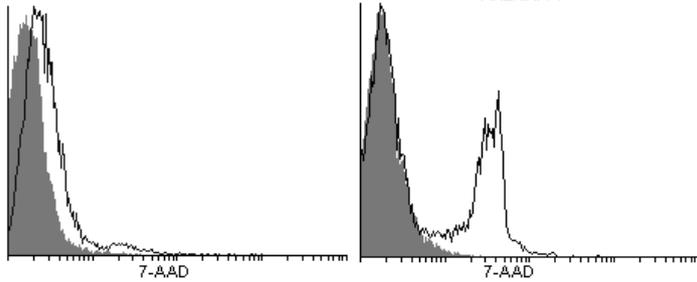
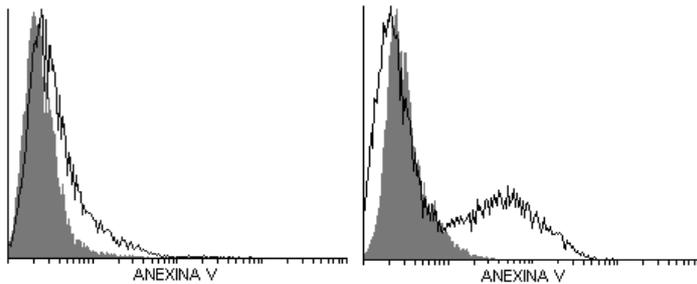
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



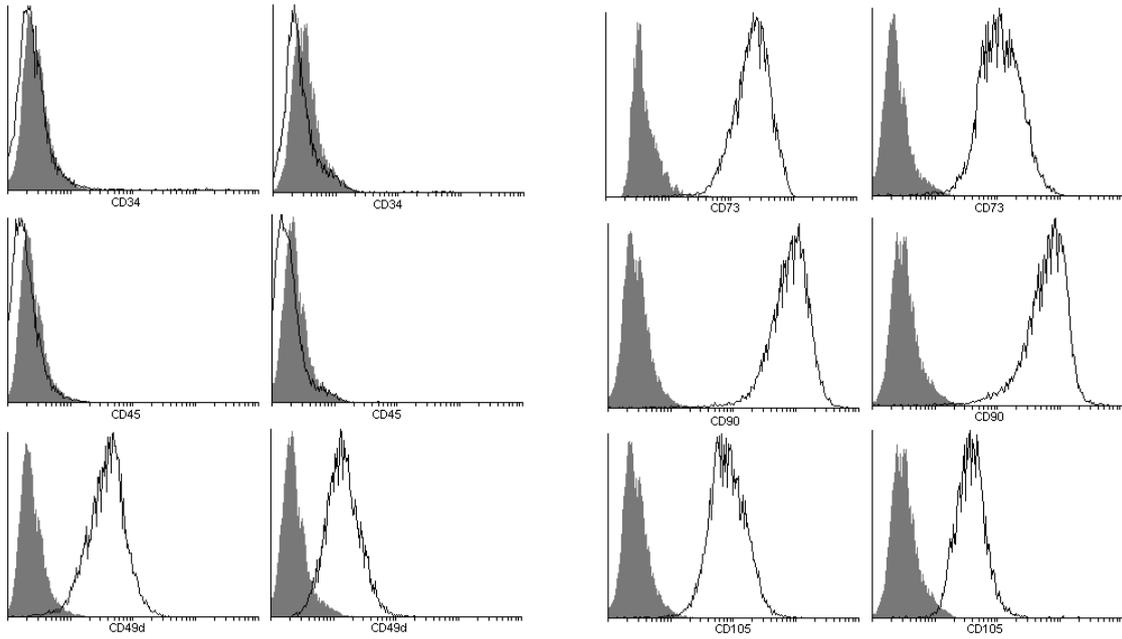
A50

ANTES

DEPOIS

ANTES

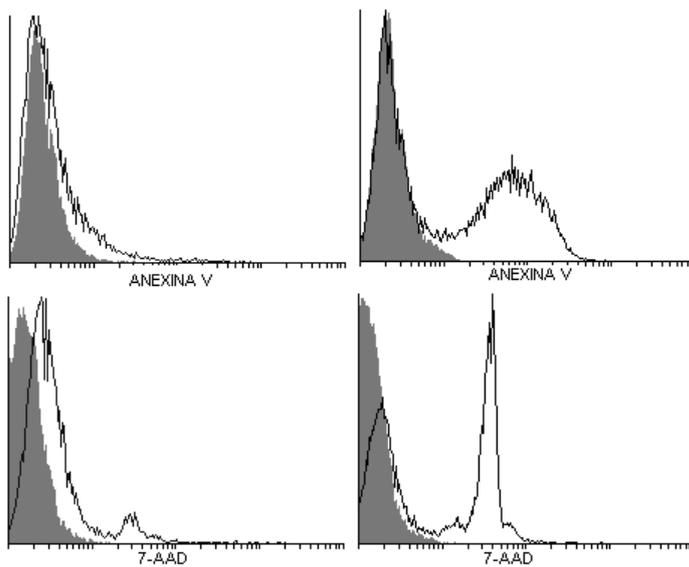
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



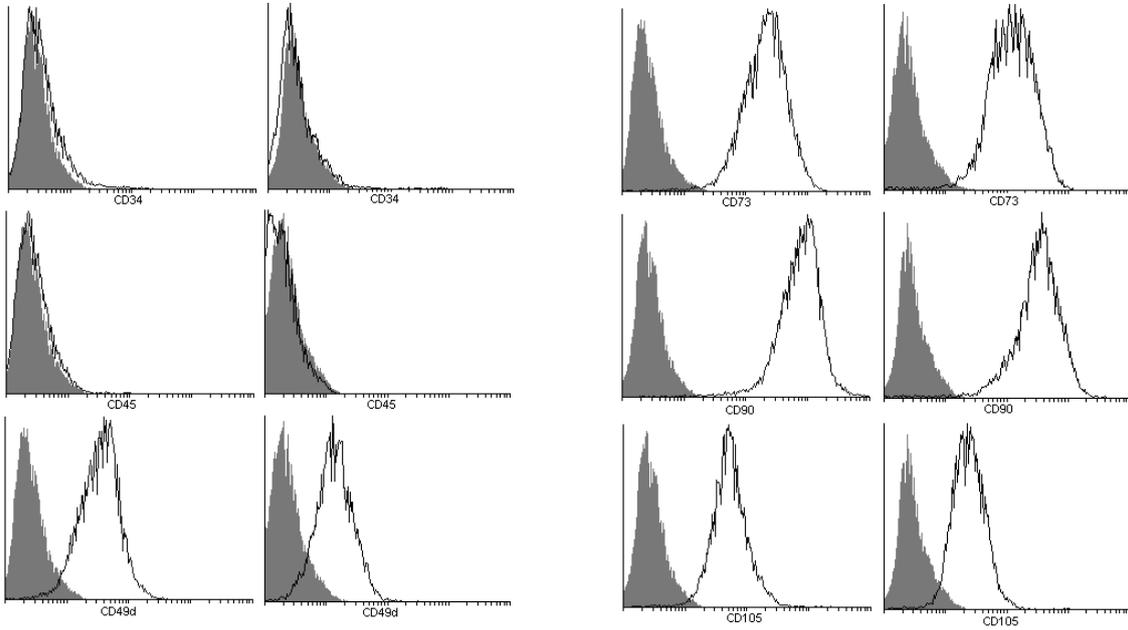
A51

ANTES

DEPOIS

ANTES

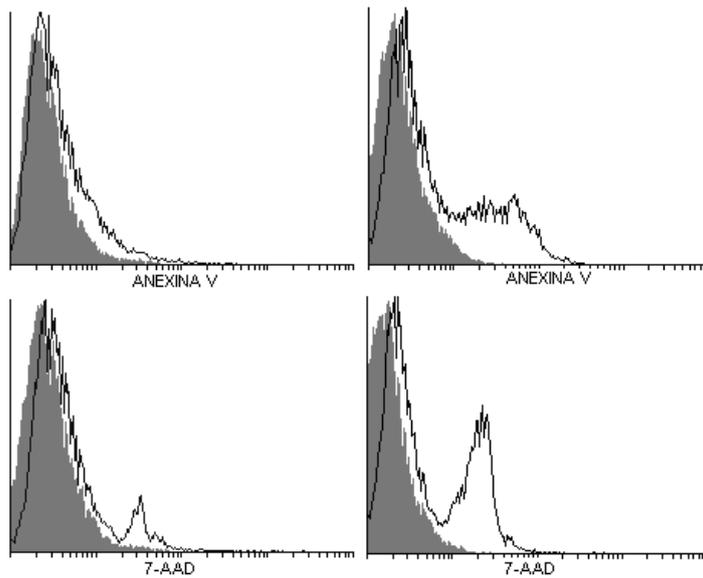
DEPOIS



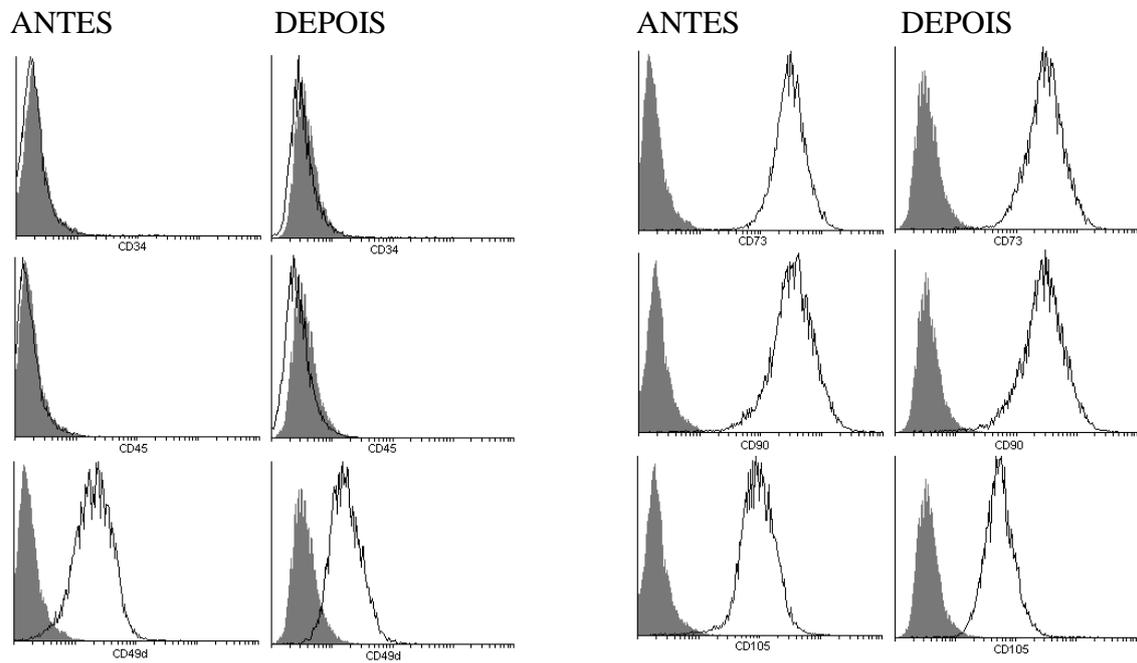
APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

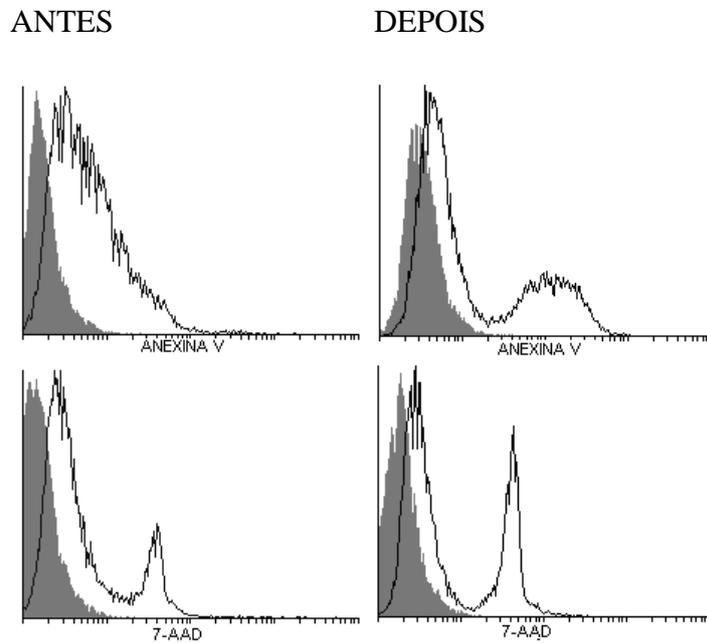
DEPOIS



A52



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR



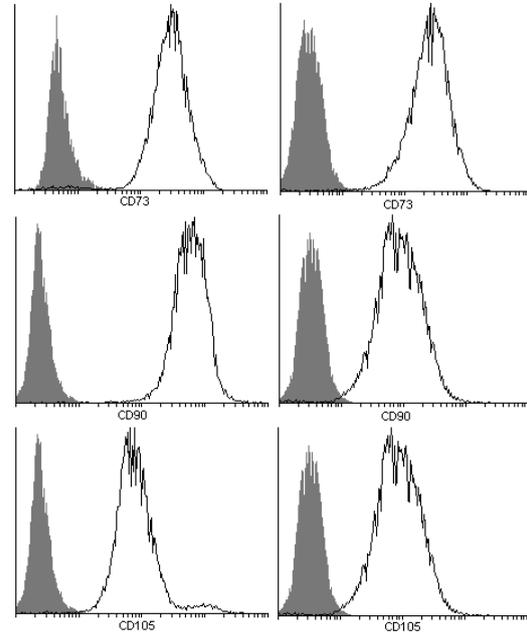
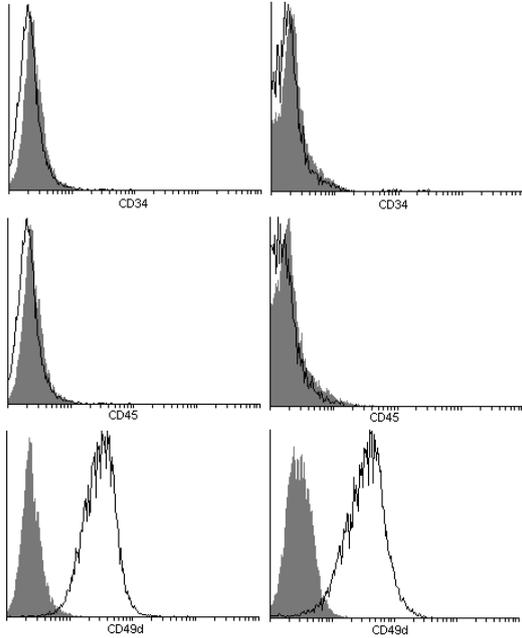
A53

ANTES

DEPOIS

ANTES

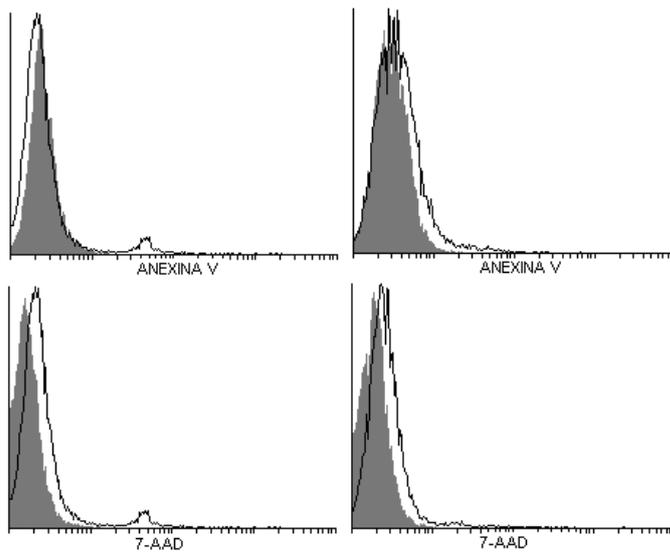
DEPOIS



APOPTOSE E VIABILIDADE CELULAR

ANTES

DEPOIS



ANEXO 9

Fotos das diferenciações adipogênicas antes da criopreservação e após o descongelamento das CTMTA.

A) Presença de lipídeos (corados com Oil red O), em CTMTA antes da criopreservação, cultivadas com meio indutor de adipócitos;

B) controle de CTMTA antes da criopreservação, não demonstra a presença de lipídeos, indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

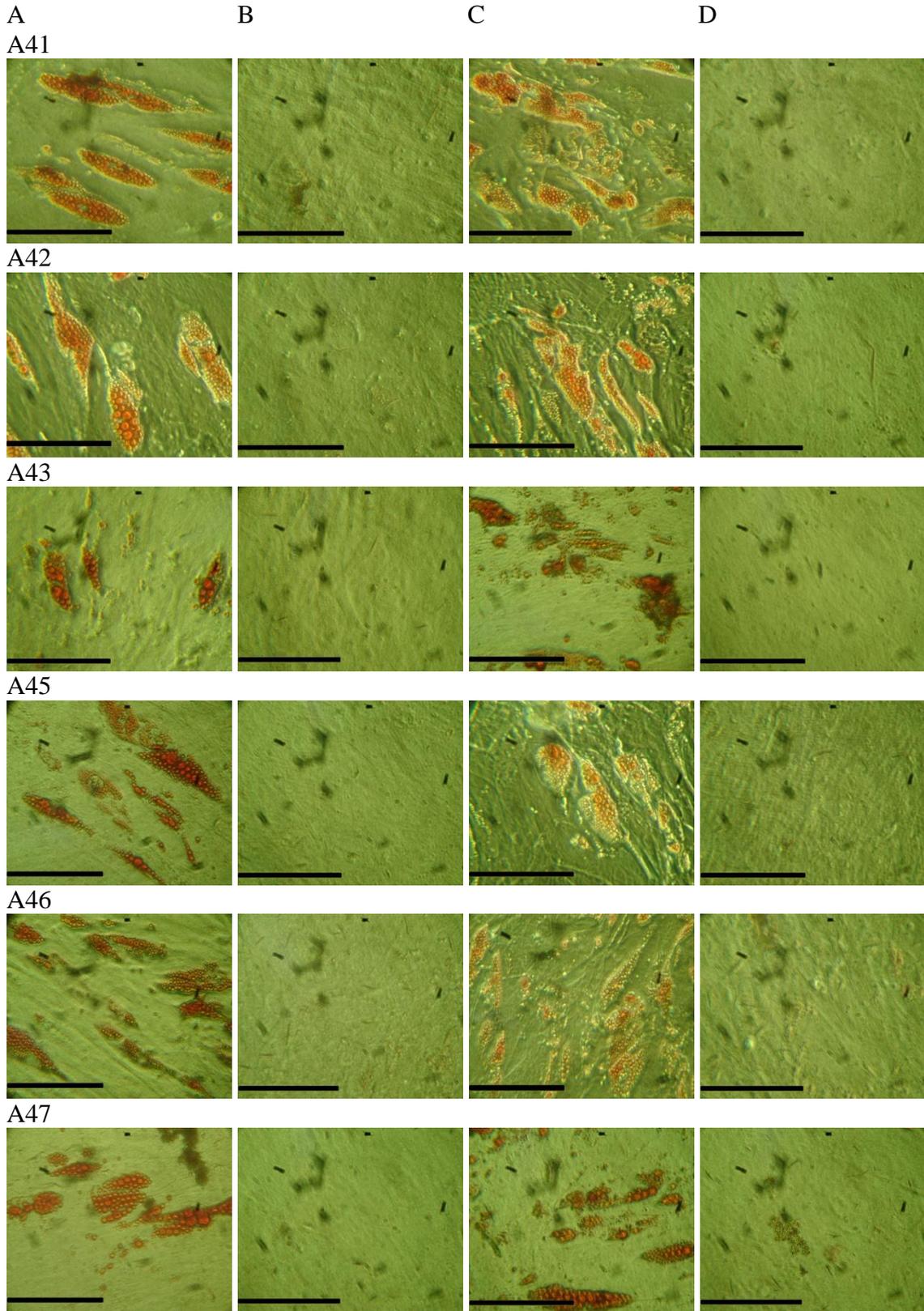
C) Presença de lipídeos (corados com Oil red O), em CTMTA após o descongelamento, cultivadas com meio indutor de adipócitos;

D) controle de CTMTA após o descongelamento, não demonstra a presença de lipídeos, indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

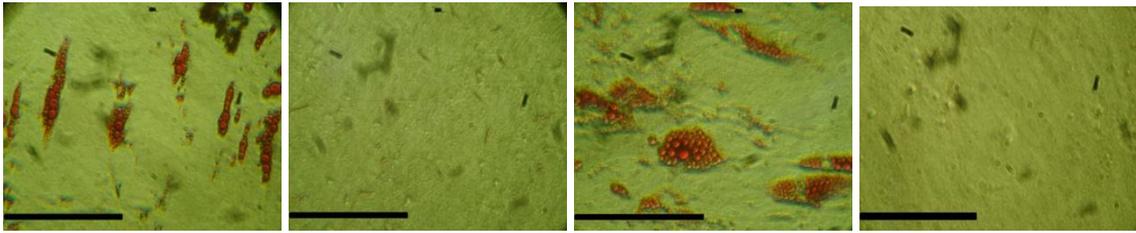
FONTE: O autor

NOTA: aumento de 250X, zoom de 3.0.

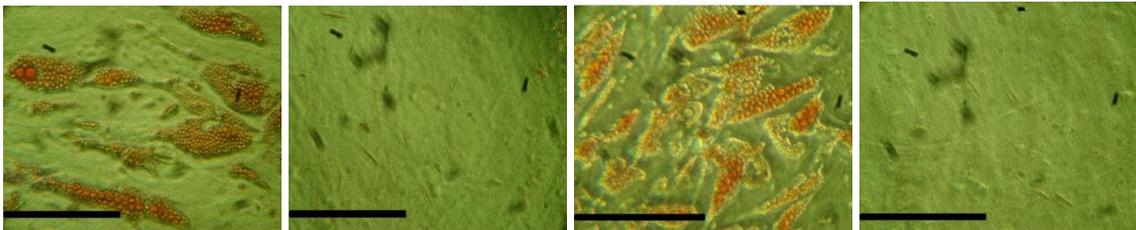
—— - Escala (10 μ m)



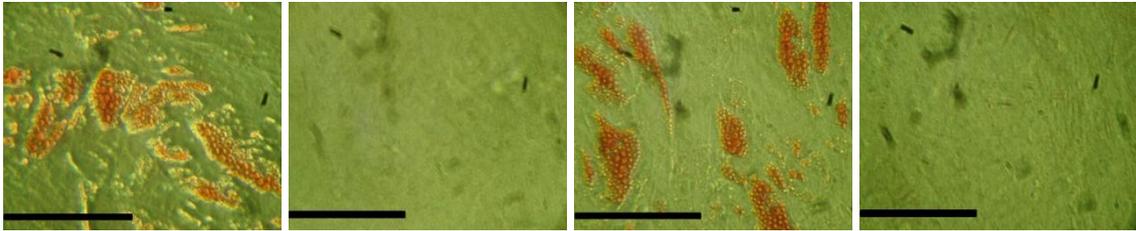
A48



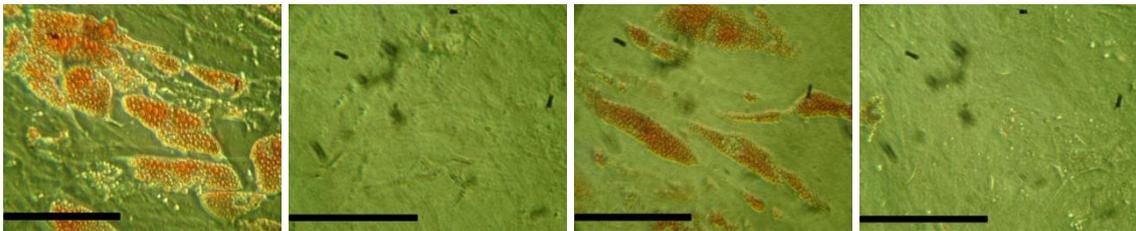
A49



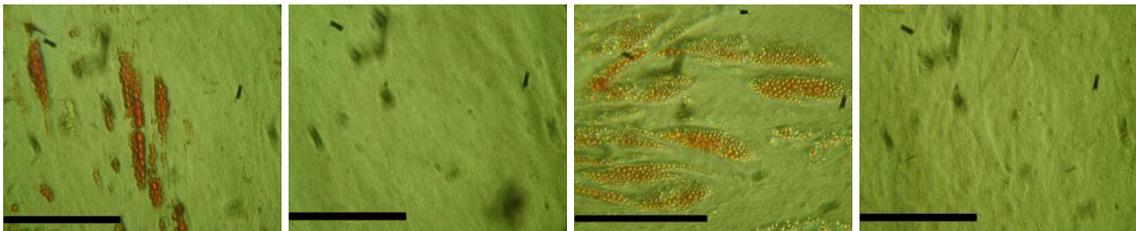
A50



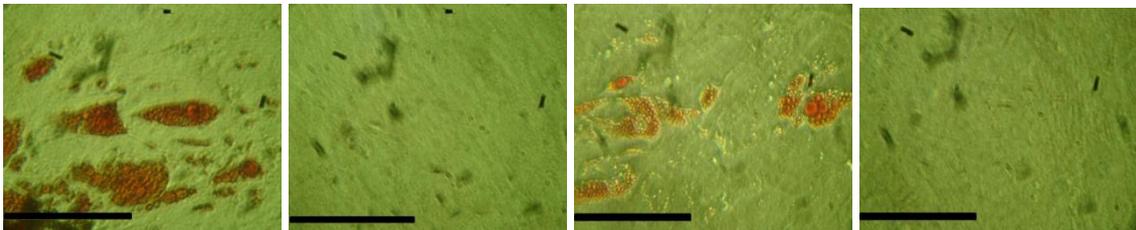
51



52



53



ANEXO 10

Fotos das diferenciações osteogênicas antes da criopreservação e após o descongelamento das CTMTA.

A) CTMTA, antes da criopreservação, coradas com Alizarina vermelha indicando a presença de cálcio na matriz extracelular, compatíveis com diferenciação osteogênica.

B) controle de CTMTA antes da criopreservação, sem demonstração de matriz indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

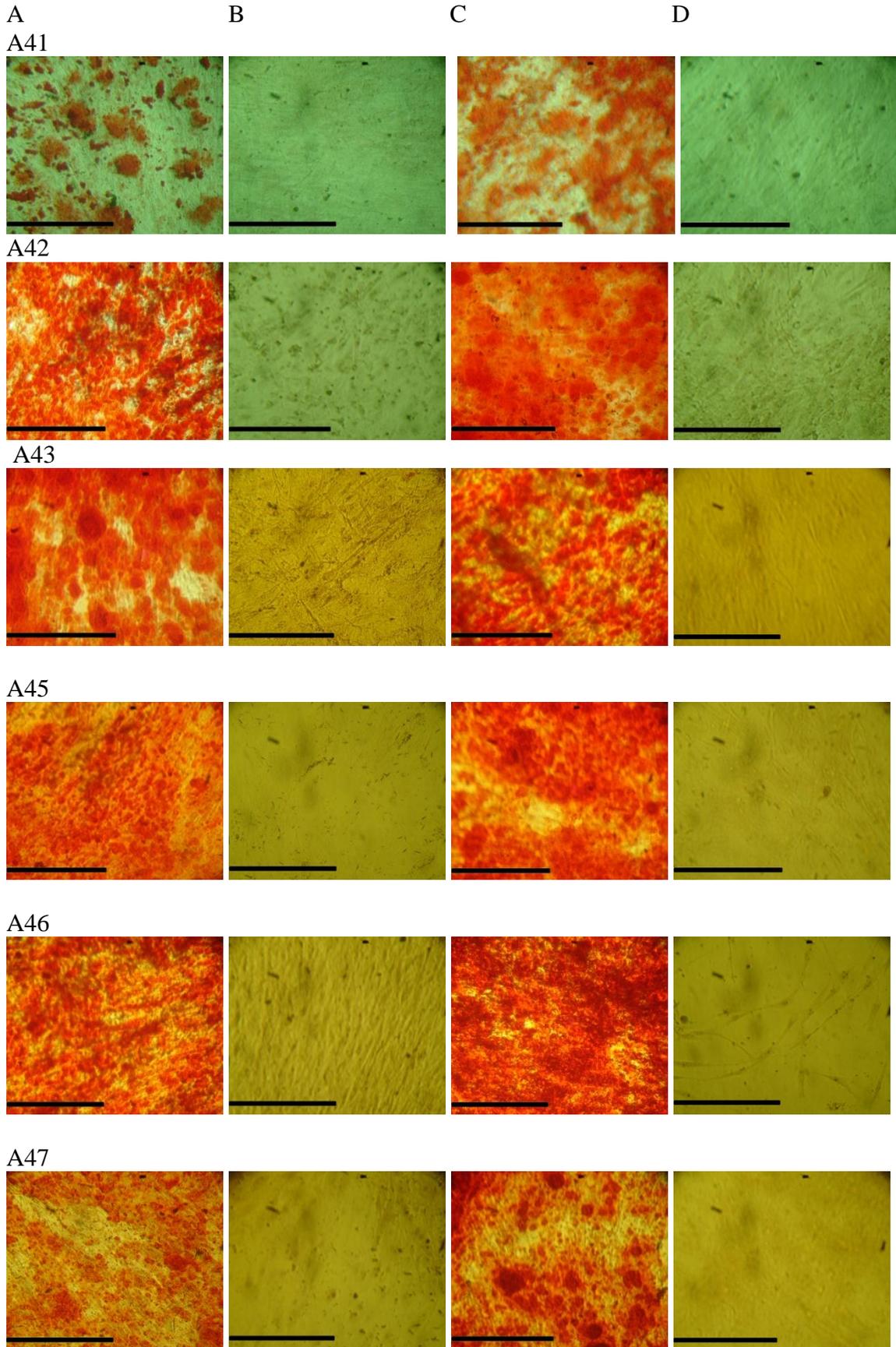
A) CTMTA, após o descongelamento, coradas com Alizarina vermelha indicando a presença de cálcio na matriz extracelular, compatíveis com diferenciação osteogênica.

B) controle de CTMTA após o descongelamento, sem demonstração de matriz, indicando a não diferenciação das células que foram cultivadas com meio de cultivo padrão.

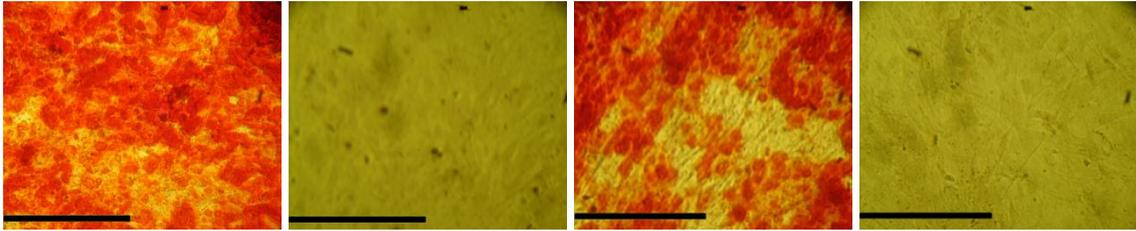
FONTE: O autor

NOTA: aumento de 250X, zoom de 3.0.

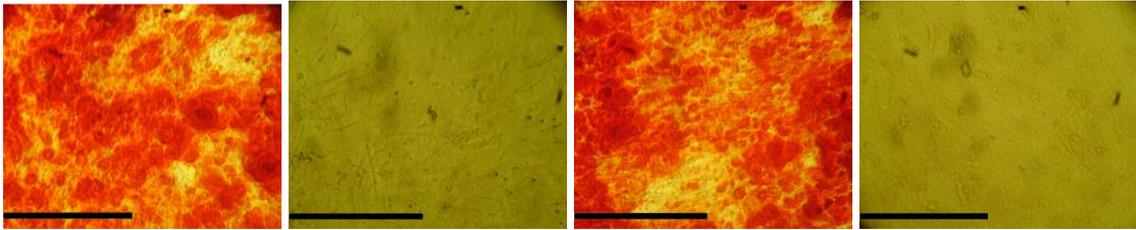
—— - Escala (10 μ m)



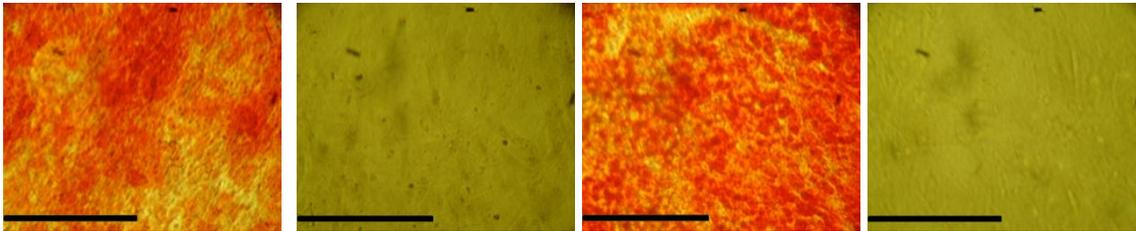
A48



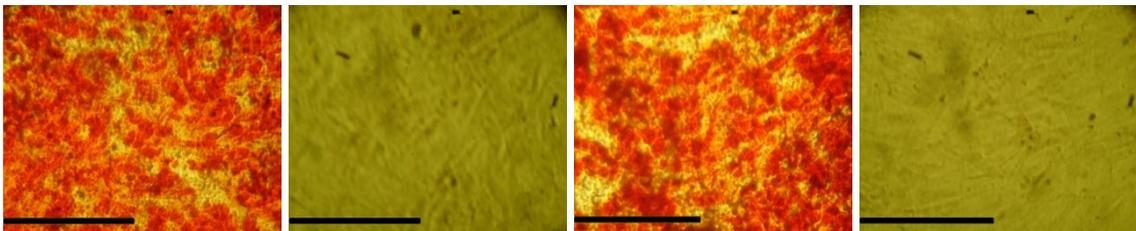
A49



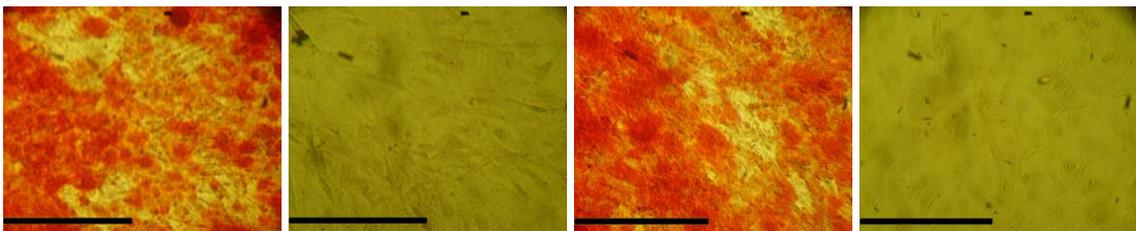
50



51



52



53

