

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre UNICENTRO e UEPG)**

DAIANA MILENA BRONOSKI DE FREITAS

**CULTURA DE EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS -TRONCO
PROVENIENTES DE TECIDOS ADIPOSOS HUMANOS**

**PONTA GROSSA
2014**

DAIANA MILENA BRONOSKI DE FREITAS

**CULTURA DE EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS - TRONCO
PROVENIENTES DE TECIDOS ADIPOSOS HUMANOS**

Dissertação de mestrado apresentada para a obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro – Oeste, área de concentração Biologia Evolutiva.

Orientadores:

Prof. Dr. Giovani Marino Fávero

Dr^a. Alessandra Melo de Aguiar

**PONTA GROSSA
2014**

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

F866 Freitas, Daiana Milena Bronoski de
Cultura de expansão e diferenciação de
células tronco provenientes de tecidos
adiposos humanos/ Daiana Milena Bronoski
de Freitas. Ponta Grossa, 2014.
74f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Biológicas - Área de Concentração:
Biologia Evolutiva), Universidade Estadual
de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino
Fávero.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Alessandra
Melo de Aguiar.

1.Célula-tronco. 2.Tecido adiposo.
3.Diferenciação celular. I.Fávero, Giovani
Marino. II. Aguiar, Alessandra Melo de.
III. Universidade Estadual de Ponta
Grossa. Mestrado em Ciências Biológicas.
IV. T.

CDD: 574.88



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro-Oeste (Departamento de Ciências Biológicas).



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 08/2014

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **DAIANA MILENA BRONOSKI DE FREITAS**.

Aos dez dias do mês de junho de dois mil e quatorze, no auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Dr. Giovani Marino Favero em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno (a) **DAIANA MILENA BRONOSKI DE FREITAS**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Giovani Marino Favero (Orientador UEPG), Dr. José Fabiano Costa Justus (UEPG) e Dr. Felipe de Lara Janz (UNIAN) Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato (a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: "**Cultura de Expansão e Diferenciação de Células-Tronco Provenientes de Diferentes Tecidos Adiposos Humano**". Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o (a) candidato (a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de trinta dias; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) até o prazo máximo de 60 dias após a defesa; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo (a) orientador (a) assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 10 de junho de dois mil e quatorze.

Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Prof. Dr. José Fabiano Costa Justus

Prof. Dr. Felipe de Lara Janz

Dedico este trabalho à minha família,
namorado e amigos pelo carinho,
paciência e incentivo ao longo do
caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conduzir pelos caminhos corretos, dando-me força e oportunidades para realização dessa etapa importante na minha carreira.

À minha família, amigos e ao meu namorado pelo amor, paciência e incentivo.

Aos Orientadores, Giovani Fávero e Alessandra Aguiar, pela confiança, paciência e motivação para continuar a pesquisa.

Ao pessoal do Hospital Vicentino – Unidade São Camilo, Ponta Grossa – Paraná. Minha gratidão a todos os funcionários, enfermeiros e ao médico Dr. Fábio Milléo pela disponibilidade de tempo, conhecimento e permissão para realizar a pesquisa com seus pacientes.

Aos professores da Pós Graduação em Biologia Evolutiva pelos conselhos e trocas de experiências que enriqueceram tanto meus conhecimentos como profissional, como no andamento da pesquisa.

Ao pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas, que forneceram as condições físicas e materiais para realização deste trabalho. Às agências de fomento e fontes financiadoras desse projeto: Capes, Cnpq, Fiocruz.

Agradecimento especial às meninas do Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, LABCET, pelo companheirismo, aprendizado e incentivo.

E um agradecimento especial aos meus colegas de trabalho do laboratório Multidisciplinar: Murilo Delgobo, Laís Ayub, Bruna Carletto, Juliana Bertoni, Dr^a. Kátia Paludo por todo aprendizado, auxílio, paciência e incentivo para que toda pesquisa fosse concretizada. Agradeço também a minha amiga Priscila Kunh pelo apoio e pelas fotos do experimento.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são uma população residente em tecidos como medula óssea e tecido adiposo. Devido á baixa porcentagem destas células presentes em medula (0,01 – 0,001%), a fonte de maior utilização, se faz necessária à busca de novas fontes para utilização em terapia celular. Desta forma o trabalho propôs-se a obtenção, expansão, cultivo e criopreservação das CTMs a partir de tecido adiposo subcutâneo, visceral mesentérico e visceral de omento retirados de um mesmo indivíduo. Utilizou-se a técnica de dissociação mecânica, a fim de investigar novas fontes de obtenção de CTMs por essa metodologia simples e barata. As amostras foram coletadas de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica, entre 30 a 45 anos, pacientes obesos e com doenças associadas. De 10 amostras coletadas foi possível o isolamento e expansão celular de 40% dos pacientes. O tecido que apresentou maior taxa celular foi o tecido visceral de omento. Nos ensaios de criopreservação, a substância que apresentou capacidade crioprotetora de 81% foi a Dimetilformamida em concentração de 5%, a solução de DMSO em concentração 5% obteve 49% de sucesso.

Palavras-chaves: célula-tronco, tecido adiposo, diferenciação celular

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are a population of tissue -resident adult cells that have the capacity for self-renewal and differentiation into different cell types of mesenchymal origin with great potential for application in cell therapies. Thus the work proposed to obtain, expand and cultivation of MSCs from subcutaneous adipose tissue, visceral mesenteric and omental visceral taken from the same individual . The technique of mechanical dissociation was used, in order to investigate new sources for obtaining MSCs by this simple and cheap method. The samples were collected from patients undergoing bariatric surgery, between 30 to 45 years old, obese patients with associated diseases. Among 10 collected samples it was possible to measure cell viability from 4 patients. The tissue showed higher cell rate was the visceral tissue of omentum. In tests cryopreservation, the substance showed cryoprotectant capacity was 81% dimethylformamide at a concentration of 5% DMSO solution in a concentration of 5% 49% success was obtained.

Key – words: stem cell, adipose tissue, cell differentiation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Linhagens celulares mesenquimais: uma célula-tronco mesenquimal poderia dar origem a todas as células com funções específicas de sua linhagem.....	21
FIGURA 2	Tipos de lesões celulares nos processos de criopreservação.....	35
FIGURA 3	Gastrectomia vertical com interposição ileal.....	40
FIGURA 4	Isolamento das CTMA humana por dissociação mecânica.....	42
FIGURA 5	Esquema demonstrativo de fontes de tecido adiposo humano.....	47
FIGURA 6	Cultura celular de célula-tronco mesenquimal proveniente de tecido adiposo humano.....	49
GRÁFICO 1	Comparativo entre diferentes fontes de CTMA de tecido adiposo....	51
GRÁFICO 2	Crescimento celular de CTMA criopreservada.....	54
QUADRO 1	Agentes crioprotetores.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Comparativo do isolamento celular entre dissociação enzimática, dissociação mecânica e cultura de explantes.....	48
TABELA 2	Dados dos pacientes doadores das amostras de tecidos adiposos.....	50
TABELA 3	Crescimento celular em passagem 1 da cultura celular de CTMA humana..	50
TABELA 4	Crescimento celular de diferentes concentrações da Solução – 1.....	52
TABELA 5	Crescimento celular de diferentes concentrações da Solução – 2.....	52
TABELA 6	Crescimento celular de diferentes concentrações da Solução – 3.....	52
TABELA 7	Teste piloto de contagem celular criopreservada de CTMA.....	53
TABELA 8	Contagem celular criopreservada de CTMA.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BMP - 2	Proteína morfogenética óssea 2
BMP – 6	Proteína morfogenética óssea 6
BSA	Albumina de soro bovino
cMYC	Oncogênese viral
CT	Célula-tronco (Stem cell – SC)
CTA	Célula-tronco adulta (Adult stem cell - ASC)
CTM	Célula-tronco mesenquimal (Mesenchymal stem cell - MSC)
CTMA	Célula-tronco mesenquimal proveniente de tecido adiposo (Adipose stem cell – ADSC)
CO ₂	Gás carbônio ou dióxido de carbono
C/EBP β	Nucleoproteína complexo contendo Sp1
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAse	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HEPES	Ácido 4 - (2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico
IBMX	3 isobutil-1-metilxantina
IL - 3	Interleucina 3
IL – 6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
KLF - 4	Fator de transcrição (Kruppel-like factor 4)
OCT - 4	Fator de transcrição (Octamer-binding transcription factor 4)

OMS	Organização mundial da saúde
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PPAR – g	Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissoma
PPAR-γ	Receptor alfa ativado por proliferadores de peroxissoma
RPMI	Meio de cultura celular (Roswell Park Memorial Institute)
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
S – ASC	Célula-tronco de origem subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SOX - 2	Fator de transcrição (Sex determining region Y-box 2)
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TAV	Tecido adiposo visceral
UCP	Proteína desacopladora (uncoupling protein)
VEGF β	Fator de crescimento endotelial vascular B

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
cel/cm ²	Células por centímetro quadrado
cel/mL	Células por milímetros
cm ²	Centímetro quadrado
g	Grama
h	Hora(s)
Kg	Kilograma
Kg/m ²	Kilograma por metro quadrado
M	Molar
mM	Micromolar
min	Minutos (s)
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrometro
RPM	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Caracterização das células-tronco (CT)	15
2.2 Células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo	20
2.3 Aspectos evolutivos das células-tronco (CT)	25
2.4 A Bioética e Aspectos terapêuticos das células-tronco (CT)	26
2.5 Técnicas de isolamento celular	30
2.6 Criopreservação	34
3 JUSTIFICATIVA	38
3.1 OBJETIVOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Amostragem	40
4.2 Coleta das amostras	40
4.3 Isolamento e expansão celular de células-tronco provenientes de tecido adiposo (CTMA)	41
4.3.1 Manutenção, repique e purificação celular	42
4.4 Técnicas de isolamento celular	43
4.4.1 Dissociação enzimática	43
4.4.2 Dissociação mecânica	43
4.4.3 Cultura de explante	44
4.5 Criopreservação	44
4.5.1 Criopreservação de tecido adiposo	44
4.5.2 Criopreservação de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo	45
4.5.3 Análise estatística	45

5 RESULTADOS	46
5.1 Padronização do protocolo de isolamento e cultivo de CTMA humana	46
5.2 Isolamento das CTMA pela técnica de dissociação mecânica	47
5.3 Criopreservação	51
5.3.1 Criopreservação de tecido adiposo visceral de omento	51
5.3.2 Criopreservação de CTMA humana	53
6 DISCUSSÃO	55
6.1 Padronização do protocolo de isolamento e cultivo de CTMA humana	55
6.2 Isolamento das CTMA pela técnica de dissociação mecânica	56
6.3 Criopreservação de tecido adiposo visceral de omento e CTMA humana	60
6.4 Perspectivas e impactos esperados	61
7 CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63

1 - INTRODUÇÃO GERAL

A célula-tronco é uma célula estaminal que ao se dividir pode dar origem a uma nova célula indiferenciada ou a uma célula com função específica em determinados tecidos, como osso, músculo ou pele (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001). A variedade de funções adotadas pelas células diferenciadas e o seu potencial progenitor é chamado de potencial de desenvolvimento, potência ou plasticidade, podendo ser dividida em Multipotente: possuem uma capacidade de proliferação limitada, relacionada apenas ao seu tecido de origem; Pluripotente: tem o potencial de se diferenciar em qualquer célula dos três folhetos embrionários exceto anexos embrionários; Totipotente: pode se diferenciar em todos os tipos de células incluindo os anexos embrionários. Há duas classes de fontes de células-tronco bem descritas: embrionária e adulta (CARVALHO, 2012) e uma nova classe em fase de estudos chamadas células-tronco pluripotentes induzidas iPSCs (NAKAGAWA, 2008; YAMANAKA, 2011).

As células-tronco embrionárias são retiradas da massa interna do blastocisto (HEINS, 2003), tem alto potencial de proliferação, alta taxa de diferenciação *in vitro*, mas há possibilidade de formação de teratomas, um tipo de tumor de células germinais derivados de células pluripotentes formados de resíduos fetais ou tecidos embrionários (SCHWINDT, 2005). Questões éticas como a utilização de embriões para retirada de células-tronco, quantos embriões seriam necessários para o isolamento e obtenção do número necessário de células ou mesmo se as pesquisas com células-tronco embrionárias não induziria ao contrabando de embriões e indução ao aborto, podem dificultar o acesso à fonte destas células o que limita o avanço das pesquisas (MONTENEGRO, 2008), além de gerar grande polêmica quanto sua aplicabilidade clínica. Caplan (1991) sugere que as células-tronco mesenquimais sejam um grupo de células estromais de suporte para alguns tecidos adultos de origem mesodérmica, como osso e cartilagem. Estas células tem despertado muito interesse dos pesquisadores devido ao fato de estar um pouco mais comprometida com uma linhagem de célula, evitando assim a formação de teratomas, e podendo ser retirada do próprio paciente, evitando problemas de rejeição imunológica.

A aplicabilidade das células-tronco provenientes de estroma de tecido adiposo é amplamente variável e estudos pré-clínicos com terapia celular no tratamento de diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, esclerose lateral, reparação de tecidos ósseos, dentre outros, descrevem resultados promissores (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2006). O estudo

da biologia básica destas células visa a compreensão das propriedades que as torna células indiferenciadas e os mecanismos pré-estabelecidos para torná-las células especializadas com funções distintas (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001). Um fator restritivo na utilização terapêutica das CTMs é a capacidade e o número de replicações possíveis das células que se deve ao encurtamento da telomerase a cada divisão (JOSEPHON, 2006). Sugere-se que a idade do doador seja um fator limitante para a utilização das células-tronco provenientes de estroma adiposo, como alteração de nicho (fatores extrínsecos) e mutações (fatores intrínsecos). Com a idade avançada, os mecanismos de defesa corporal contra cânceres, envelhecimento e apoptose podem induzir o declínio da função multiplicativa das células-tronco (SHARPLESS, 2007), assim como no caso clonal da ovelha Dolly em 1999, onde ocorreu um envelhecimento precoce das células do animal (PAUL, 2004). Estudos de rastreamento descobriram que a taxa de proliferação celular para estas células dentro de depósitos adiposos (*in vivo*) variam entre 6 a 15 meses em seres humanos e roedores (NEESE, 2002; STRAWFORD, 2004). Embora seja descrito que as CTM derivadas de estroma vascular do tecido adiposo tenham a multipotencialidade de gerar tecidos mesodermiais (BARRY, 2004; PITTEGER, 1999; GIMBLE, 2003), alguns pesquisadores acreditam que esse local é rico em fonte de células pluripotentes (GIMBLE, 2003; KATZ, 2005).

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterização das células – tronco (CT)

As células-tronco diferem de outros tipos de células do corpo por apresentarem duas propriedades gerais: elas são capazes de se dividir, renovam-se por períodos longos e podem dar origem a tipos de células especializadas (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2006). No processo de autorrenovação e diferenciação, as CTs podem fazer o processo de divisão de forma assimétrica, cuja célula pode dar origem a uma nova célula-tronco e ou uma nova célula diferenciada (THOMSON et al, 1998). As células-tronco apresentam diferentes capacidades de diferenciação de acordo com sua plasticidade e origem embrionária. A plasticidade ou potência pode ser classificada em: totipotente, pluripotente e multipotente. As células-tronco totipotentes podem formar todos os tipos de tecidos, incluindo os anexos embrionários, são encontradas no zigoto. As células-tronco pluripotentes apresentam o potencial de se diferenciar em qualquer célula dos três folhetos embrionários: endoderme (ex: pulmões), ectoderme (ex: tecidos epidermais) e mesoderme (ex: músculos) assim como as

totipotentes, mas não tem a capacidade de se diferenciar em células dos anexos embrionários. As células multipotentes são células-tronco que possuem uma potência limitada, diferenciando-se apenas em linhagens de seu tecido de origem. São exemplos às células-tronco hematopoiéticas, mesenquimais e neurais (CARVALHO, 2012). Em relação a sua origem são classificadas em células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e células-tronco pluripotentes induzidas (IPSCs).

As células-tronco pluripotentes induzidas são um tipo particular de células-tronco que ocorre somente “in vitro”. É uma reprogramação celular direta: geração de células pluripotentes a partir de células somáticas adultas sem a necessidade de destruição de um embrião. Elas são caracterizadas por apresentarem alta capacidade de proliferação, morfologia embriônica e a expressão de marcadores específicos, como OCT-4, SOX-2, KLF-4, cMYC, de pluripotência (THOMSON, 1998; VERFAILLIE, 2002; JOSEPHSON, 2006). Com o objetivo de melhorar a plasticidade das células-tronco adultas, os pesquisadores descobriram meios de ampliar o potencial de diferenciação dessas células através de transferência nuclear somática (CHAMBERS, 2003) e reprogramação genética de células somáticas ao estado embrionário através de introdução de genes determinantes de pluripotência denominadas células-tronco pluripotentes induzidas ou *IPs cells* (NISHIKAWA, 2009). A técnica deve ser avaliada para utilização de forma segura em seres humanos. Em animais, a introdução de fatores de reprogramação celular com vírus pode desencadear tumores. Além disso, para produzi-las é necessário reprogramar a expressão gênica, através de fatores indutores com o uso de vetores virais ou proteínas (AGUIAR, 2011 apud KEIRSTEAD, NISTOR et al., 2005). A perspectiva de obter células-tronco embrionárias específicas do paciente por transferência nuclear poderia representar o potencial uso desta tecnologia na medicina regenerativa, contudo representa limitações na aplicação clínica em humanos (HOCHEDLINGER, 2006), embora tecnicamente possível, como descrito por Tachibana e colaboradores (2013).

As células-tronco embrionárias são formadas nos primeiros dias de fecundação e durante esse período das primeiras divisões (2 a 8 células) elas possuem capacidade totipotente de diferenciação. Conforme ocorrendo as demais divisões as células se tornam especializadas em duas linhas: as que irão dar origem aos anexos embrionários e as células (com capacidade pluripotente) que irão dar origem aos demais tecidos e órgãos (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, 2001). As células-tronco embrionárias foram primeiramente descritas em camundongos em 1981 (AGUIAR, 2011 apud EVANS e KAUFMAN, 1981) e isoladas a partir de células-tronco embrionárias humanas em 1998 (THOMSON, 1998), sendo que somente em 2008 o Brasil obteve a primeira linhagem de células-tronco embrionárias

(FRAGA, SUKOYAN et al., 2010). Essas células possuem um alto índice de crescimento celular *in vitro* e potencial de diferenciação nos três folhetos embrionários, contudo Fraga (2010) destaca que aplicação das células-tronco embrionárias deve superar problemas como rejeição imunológica, formação de tumores e questões éticas, políticas e legais como destruição do embrião para obtenção das células. No Brasil está em vigor a legislação específica sobre o tema, a Lei de Biossegurança no. 11.105 de 25 de Março de 2005. Descreveu-se recentemente o uso de células-tronco embrionárias humanas como fonte de células cardíacas para o transplante em primatas não humanos infartados experimentalmente (Chong et al, 2014). Neste estudo obteve-se um bilhão de células para cada transplante, o que abre a possibilidade de aplicação em humanos, embora a não comprovação e a eficácia da terapia em animais infartados além de serem observados episódios de arritmia pós-transplante, indicando a necessidade de mais estudos nesta área.

As células-tronco adultas são encontradas em indivíduos adultos, elas estão relacionadas com mecanismos de reparo tecidual, entre suas principais funções estão manter a homeostase do tecido e substituir as células especializadas mortas por envelhecimento, lesão ou morte (CARVALHO, 2012). Acreditava-se que estas células possuíam um potencial de diferenciação limitado, contudo Verfallie (2002) relata a possível existência de fatores intrínsecos e extrínsecos à célula que inibem ou controlam esse potencial nas células adultas. O mecanismo de reparo tecidual das células adultas pode ser estudado observando o desenvolvimento embrionário. Em teoria a camada média de células proliferativas, chamada de mesoderme daria origem aos elementos de sustentação do corpo, como esqueleto, músculos e órgãos conectivos. O termo mesênquima conceitua-se meio ou infusão, onde se refere á capacidade de migrar no desenvolvimento precoce para os demais folhetos embrionários (ectoderme e endoderme), esta capacidade migratória e de formar agregados celulares é sugerida por Gaviro (2012) como sendo peça chave na reparação de feridas ou renovação tecidual pelas células-tronco.

As células-tronco adultas foram inicialmente estudadas no final dos anos 50, a primeira evidência experimental que sustenta a ideia da existência de células-tronco mesenquimais multipotentes provém de estudos com medula óssea. No século XIX E.Goujon (1869) fez a primeira indicação de uma célula progenitora mesenquimal com transplantes de medula do fêmur de um coelho e inserindo no músculo do mesmo e observando a proliferação de células ósseas. Muitos pesquisadores repetiram a experiência, mas Danis (1960) provou que as células não eram quimioatraídas pela medula, mas que elas próprias se diferenciaram em outro tecido. Em 1961 alguns pesquisadores iniciavam tratamento de quimioterapia e

radioterapia contra o câncer associados ao transplante de medula óssea com sucesso, nesse período ainda não se conhecia o termo células-tronco mesenquimais (TILL, McCULLOCH, 1961). Em 1966 Friendstein e colegas demonstraram que as células provenientes de medula óssea eram aderentes em culturas se diferenciavam em células osteoblásticas e condrocíticas (SCHWINDT, 2005). No final dos anos 80 que Caplan (1987) sugeriu o termo células-tronco mesenquimais, observando em suas pesquisas que estas células tinham a capacidade de reparar tecido danificado além da autorrenovação celular o que abriria a perspectiva de isolar essas células em cultura, do próprio paciente, expandi-las e introduzir novamente para regenerar o tecido lesionado.

Observando o grande potencial terapêutico as células-tronco adultas (CTA) têm sido isoladas e caracterizadas em diferentes tecidos do corpo, como medula óssea, cordão umbilical, encéfalo, epitélio, polpa de dente e tecido adiposo (YARAK, 2010). Contudo há diferenças no potencial de diferenciação entre as diversas fontes de tecido do corpo humano (BARRY, 2004). Uma variedade de termos tem sido usada para descrever a mesma população de células aderentes ao plástico, isoladas por digestão de collagenase obtidas de tecido adiposo: células-tronco/estromais derivadas de gordura, células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo, células-tronco adultas mesenquimais adiposas, lipoblastos, pericitos, células de lipoaspirado, pré-adipócitos, etc. A *International Fat Applied Technology Society* (IIFATS) entrou em um consenso e reconhece como ASC – adipose-derived stem cells, células-tronco derivadas de tecido adiposo (BUNNEL, 2008). De acordo com Barry (2004) e Pittenger (1999) as CTMs são pesquisadas afins de aplicações terapêuticas devido aos seguintes critérios: a) serem de fácil obtenção; b) podem ser retiradas do próprio paciente; c) podem ser obtidas de um numero adequado de células para transplante, devido à alta capacidade de proliferação celular *in vitro*; d) ter a capacidade multipotente de diferenciação celular; sendo de uma linhagem mais comprometida que as embrionárias evitando assim a formação de teratomas e) serem de fácil manipulação no laboratório; f) serem pouco imunogênicas e g) possuírem habilidade de integração no tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente. Em pesquisa Rebelatto et all (2008) compara células-tronco mesenquimais isoladas de medula óssea, sangue de cordão umbilical e tecido adiposo. A eficiência de isolamento de medula óssea e tecido adiposo foram de 100% enquanto que sangue de cordão umbilical apresentou 30% de eficiência no isolamento. Elas apresentam potencial de diferenciação semelhantes em relação à linhagem condrogênica e osteogênica e distintas em linhagem adipogênica. Em pesquisa comparativa entre medula óssea, membrana sinovial, periósteo, músculo esquelético e tecido adiposo; os resultados demonstrados indicam

diferenças significativas de acordo com a fonte de tecido, variação experimental e natureza dos doadores. Relatou-se maior potencial de aplicação clínica das células-tronco mesenquimais provenientes de membrana sinovial (SAKAGUCHI, SEKYA et al.; 2005). Dentre as várias fontes e variações de células-tronco mesenquimais uma revisão de Mannello (2007) ressalta que entre os pesquisadores os protocolos e meios de cultura variam e isso pode gerar diferenças na quantidade e potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais.

Desde então, diversos grupos de pesquisa iniciaram seus trabalhos em busca de compreender a biologia básica e possível aplicação em terapias das CTM, contudo não havia padrão quanto ao fenótipo e protocolo de isolamento (WAGNER, 2007), desta forma a fim de padronizar as pesquisas com células-tronco mesenquimais a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabeleceu os seguintes critérios mínimos para se trabalhar com célula-tronco mesenquimal: formato fibroblastóide; adesão ao plástico, quando cultivada em cultura; as células devem expressar marcadores de superfície positivos CD105, CD90 e CD73 e não expressar os marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b ou, CD79 α ou moléculas da superfície das células CD19 e HLA-DR e finalmente se diferenciar três tipos celulares distintos osteoblasto, adipócitos e condroblastos, que são as células diferenciadas principais dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (DOMINICI, Le BLANC et al, 2006).

A terapia celular é uma proposta terapêutica que, por meio de infusão de células, visa agir na regeneração de órgão e tecidos. A questão dentro deste contexto seria a avaliação de qual perfil de célula-tronco seria ideal para tal fim. De acordo com dados do *National Institute of Health* a fração mais utilizada em ensaios clínicos para tratamento de doenças crônicas de origem não hematológica corresponde às células mononucleares de medula óssea. As fontes de células-tronco mesenquimais em ensaios clínicos com finalidade terapêutica mais utilizada atualmente são medula óssea e sangue de cordão umbilical em seguida tecido adiposo, placenta e células-tronco cardíacas. Os mecanismos de ação destas células no reparo tecidual ainda são controversos, os autores sugerem capacidade de transdiferenciação: capacidade de uma célula diferenciada se diferenciar em outra célula especializada do tecido onde foi injetada; e/ou capacidade de fusão: fenômeno caracterizado pela fusão de uma célula-tronco injetada com uma célula especializada do tecido hospedeiro, levando a formação de uma célula híbrida. Associados a isso os autores também relatam a ação parácrina para realização do processo de reparo e regeneração tecidual (CARVALHO, 2012). Segundo YARAK (2010) o que ainda limita as aplicações terapêuticas das CTMs é a não compreensão de fatores regulatórios de sua diferenciação *in vivo* (controladas por genes específicos), sua diferenciação *in vitro* nas linhagens mesodérmicas foram descritas com sucesso por

pesquisadores como Kern S (2006). Caplan (2008) e sua equipe publicaram uma revisão demonstrando indícios que as células-tronco mesenquimais podem ocupar um nicho perivascular e que elas podem desempenhar o papel de liberar substâncias imunoregulatórias que inibem a presença de células T e agrupam algumas células de defesa no local de reparação tecidual. Essa regulação protege o local lesionado de uma resposta autoimune sensível, inibe também a entrada de miofibroblastos formadores de cicatrizes, inibe apoptose das células e as estabiliza para a formação de angiogênese no local. Algumas células identificadas por Caplan (2008) de pericitos possuem também a capacidade de realizar angiogênese, mas não se diferenciam em outros tecidos e não devem ser confundidos com as CTMs locais. As células perivasculares são também chamadas de células murais e células de Rourget (AGUIAR apud HIRSCHI E D'AMORE, 1996), elas podem ser encontradas na membrana basal de pequenos vasos ou células vasculares de músculo liso (AGUIAR apud EGGINTON, HUDLICKA, et al.;1996).

No Brasil, com a finalidade de incorporar terapia celular à prática médica, o Ministério da Saúde investiu recursos financeiros em uma rede de Centros de Tecnologia Celular, cujo principal objetivo é produzir células-tronco que poderão vir a ser utilizadas em clínicas. Foram criados oito destes centros: Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia. Eles apresentam a missão de isolar e expandir diversas fontes de células-tronco, no caso de células-tronco mesenquimais as principais fontes são: tecidos neonatais (placenta, cordão umbilical e líquido amniótico), polpa dentária, gordura e medula óssea (CARVALHO, 2012).

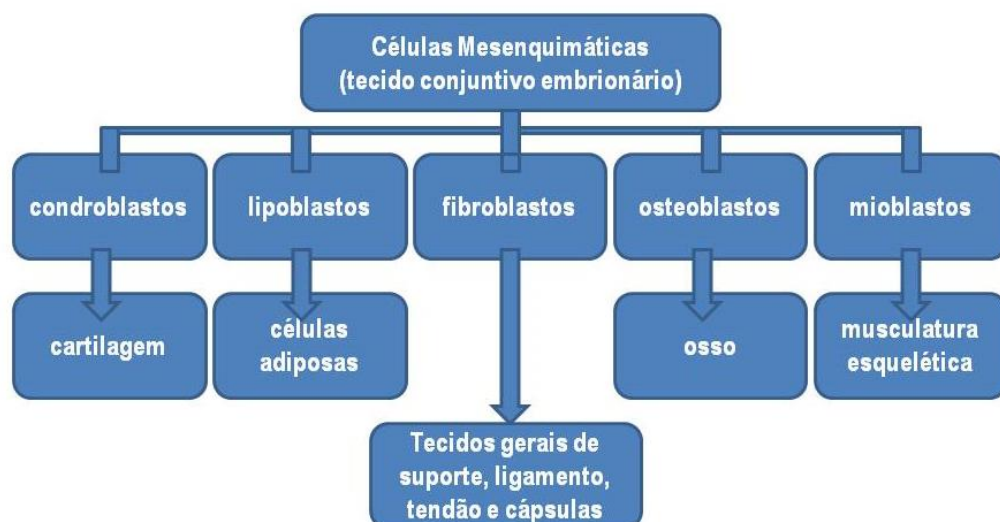
2.2 Células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo

O tecido conjuntivo confere suporte e conservação do organismo. Esse nome implica em um papel estrutural e suas complexas interações com outros tecidos geram uma função dinâmica no desenvolvimento, crescimento e homeostase corporal (BRAY, RAFF et al.; 2011). Cada autor classifica o tecido conjuntivo de uma maneira, pois a dificuldade em compreender o leque de tecidos de suporte ou conjuntivo envolve desde componentes líquidos, como o plasma sanguíneo até componentes sólidos como osso e dentina (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). As células mesenquimáticas são fundamentais na classificação de tecidos de suporte, pois se autorreplicam e podem se diferenciar em qualquer célula do tecido conjuntivo (KERR, 1998). O termo mesênquima implica em um estado imaturo, esperando um estímulo para se diferenciarem em células com funções específicas

(KERR, 1998). Estas células em estado imaturo são denominadas células-tronco adultas mesenquimais, devido ao leque de células com função específica que elas são capazes de gerar (Figura 1).

As células adiposas, gordurosas ou lipócitos parecem se desenvolver de células tipo mesenquimáticas, o lipoblasto seria um tipo intermediário e a partir de uma linhagem comum tenha se diferenciado em dois tipos de adipócitos: o unilocular, também chamado de gordura branca ou amarela e o multilocular, conhecido por gordura parda ou marrom (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Gimble e colaboradores (2007) descrevem, macroscopicamente, pelo menos cinco tipos de tecido adiposo e cada um com função biológica distinta: medula óssea, mamário, mecânico, marrom e branco. O tecido adiposo possui duas populações celulares: adipócitos maduros e outra população heterogênea, chamada fração estroma-vascular (SVF). O SVF contém diversos tipos celulares como músculo liso, células endoteliais, células perivasculares (AGUIAR, 2011) entre outras e as que se destacam são os pré-adipócitos (células indiferenciadas, mas já comprometidas com linhagem adipogênica) que participam da renovação celular e se diferenciam em adipócitos maduros de acordo com o balanço energético (AHIMA, 2000).

Figura 1 – Linhagens celulares mesenquimais: uma célula-tronco mesenquimal poderia gerar todas as células com funções específicas de sua linhagem.



Uma célula-tronco isolada de um tecido adiposo teria a capacidade de gerar uma célula com função específica de um tecido ósseo, visto que apresentam mesma origem embrionária.

Fonte: Adaptado de KERR, 1998.

No ser humano o desenvolvimento do tecido adiposo amarelo ocorre durante o último trimestre da vida intra-uterina. Quando o indivíduo nasce a gordura representa aproximadamente de 16% do peso corporal e em seres humanos adultos este tecido é disperso por todo o corpo nas regiões intra-abdominal (por volta do omento, intestinos e região perirrenal) e depósitos subcutâneos (nádegas, coxas e abdômen). Os depósitos de gordura em outras regiões como face e medula óssea podem representar grandes diferenças nas propriedades metabólicas e padrões de expressão gênica e relação com diferentes estados patogênicos, a atividade parácrina poderia explicar algumas dessas diferenças (GESTA, 2007). Assim como músculo e osso, o tecido adiposo foi geralmente considerado de origem mesodérmica, mas Billon (2007) relatou que linhagens de células adiposas podem se originar a partir da crista neural durante o desenvolvimento. Com esse relato poderíamos concluir que tanto neuroectoderma e mesoderma poderiam dar origem a tecidos adiposos locais. O que poderia explicar essa relação entre as linhagens adiposas e endoteliais seria a presença de um marcador de superfície CD34, uma proteína também presente na superfície de células imaturas e células endoteliais (PLANAT-BERNARD, 2004).

O tecido adiposo sempre foi reconhecido com função de fornecer e armazenar energia, mas cientistas destacam que ele exerce bem mais funções do que esta (GREGOIRE, SMAS et al.; 1998). Os adipócitos sintetizam e liberam uma variedade de peptídeos e não peptídeos e expressam outros fatores além de sua capacidade de mobilizar e depositar colesterol, retinóides e triglicerídeos (WAJCHENBERG, 2000). Ele é local de armazenamento de esteroides sexuais, posteriormente foi descoberto que as células adiposas secretam várias substâncias regulatórias, como leptina e outras adipocinas (citocinas) que o envolve em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos que o classifica como órgão endócrino que se comunica com o sistema nervoso central (KERSHAW, 2004). Em resumo ele coordena uma série de processos: metabolismo energético, atividade neuroendócrina e atividade imunológica (CARVALHO, 2012).

Em indivíduos adultos a distribuição do tecido adiposo marrom é praticamente ausente e o tecido adiposo amarelo está distribuído em várias regiões como subcutânea e até envolvendo órgãos (FRUHBECK, 2001). O adipócito marrom apresenta no seu citoplasma o núcleo centralizado, diversos vacúolos lipídicos pequenos e uma quantidade bem elevada de mitocôndrias. Apresenta altas concentrações de enzimas citocromo-oxidases presentes nas mitocôndrias o que contribui para sua coloração escurecida, sua presença está associada à transferência de energia dos alimentos em calor (CANNON, NEDERGAARD, 2004). O adipócito branco apresenta um grande e único vacúolo lipídico, fazendo com que o núcleo o

mitocôndrias sejam deslocados para a periferia do citoplasma (CURI, 2002). Em regra geral denominamos o tecido adiposo interno de gordura visceral (TAV) e o mais superficial de gordura subcutânea (TAS). Além das células adiposas o tecido adiposo amarelo possui matriz de tecido conjuntivo, células nervosas, células de estroma vascular, nódulos linfáticos, células de defesa, fibroblastos e células-tronco (OSBOARNE, 2000).

O tecido adiposo amarelo é a principal reserva de energia em mamíferos, o triacilglicerol é armazenado em períodos de excesso de energia e mobilizado em períodos de escassez energética (GREOGOIRE, SMAS, SUL, 1998). A OMC classifica a obesidade baseando-se no IMC (índice de massa corporal) e no risco da mortalidade associada. Um indivíduo é considerado obeso se seu IMC for acima de 30 kg/m^2 . A OMC define como grau I quando a IMC está entre 30 a $34,9 \text{ kg/m}^2$, grau II (severa), IMC: 35 a $39,9 \text{ Kg/m}^2$ e grau III (mórbida), IMC: ultrapassa 40 Kg/m^2 . Ao longo da evolução os padrões de vida humana geraram uma epidemia de obesidade devido a diversos fatores ainda não totalmente compreendidos, como uma série de alterações ambientais, especialmente de hábitos alimentares e de atividade física (LUFT, 2010). Assim, a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2009) estimava em 2009 que mais de 400 milhões de adultos estavam obesos de acordo com o Índice de massa corporal ($\text{IMC} > 30 \text{ Kg/m}^2$) e esse índice aumentou em 2011, segundo a Cruz Vermelha Brasileira o número de obesos chega a 1,5 bilhões de pessoas em todo o mundo superando o número de pessoas desnutridas (CRUZ VERMELHA, 2011). Com base nesse aumento dramático na incidência de obesidade os cientistas buscam entender quais impactos físicos, fisiológicos e principalmente patológicos estão associados a esse quadro.

A obesidade é desencadeada por acúmulo de tecido adiposo subcutâneo e visceral. O tecido adiposo, além de suas funções de metabolismo energético, também exerce função de regulação endócrina através de hormônios específicos secretados pelo próprio tecido são denominadas adipocinas (CANNON, NEDERGAARD, et al.; 2004). Se há um acúmulo de tecido adiposo há também, por consequência, um acúmulo na liberação dessas adipocinas e um desequilíbrio hormonal. A função fisiológica das adipocinas é altamente variada. Elas podem ser agrupadas de acordo com a sua função principal: endócrina, como a adiponectina; cardiovascular, metabólica ou imunológica como a adipisina (XU, 2003). O alto acúmulo de gordura corporal eleva a quantidade liberada dessas substâncias regulatórias, pois a quantidade de células locais é maior e causa um desequilíbrio regulatório que muitas vezes pode ser maléfica para o organismo. As relações de causa e efeito não são totalmente estabelecidas, mas as evidências indicam que a gordura visceral possui um efeito deletério

sobre os parâmetros metabólicos e representa um elo importante no diagnóstico de um quadro de síndrome metabólica (BERGMAN, 2006), como resistência a insulina (LEE, 2005), intolerância a glicose (GOODPASTER, 2003; HERMANS, 2005), a hipertensão arterial e as dislipidemias (CARNEIRO, 2003). A obesidade visceral é considerada fator de risco independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (NICKLAS, 2006) e sua presença está relacionada a alguns tipos de câncer como próstata, cólon e de mama (VON HAFE, 2004).

As doenças metabólicas originam principalmente a partir de disfunções do tecido adiposo. E segundo Baglioni (2012) isso pode ter alguma relação entre a distribuição anatômica das gorduras viscerais e subcutâneas. Em sua pesquisa com biópsias abdominais humanas avaliou-se proliferação, diferenciação e atividades funcionais de células-tronco derivadas de tecido adiposo estromal e foi observada uma grande diferença na proliferação e no potencial adipogênico entre as fontes de células-tronco mesenquimais de origem subcutâneas (S-ASC) e as células-tronco mesenquimais de origem visceral (V-ASC). Observou-se melhor organização e funcionalidade da S-ASC, secretam melhor adiponectina (que regula principalmente a glicemia) e suscetibilidade a lipólise reduzida. Os resultados sugerem que a S-ASC e V-ASC originam diferenças funcionais ao nível das células-tronco mesenquimais que mantém uma memória de origem do nicho tecidual e que estas diferenças entre as células-tronco mesenquimais podem ser responsáveis por diferentes depósitos de tecido adiposo ao desenvolvimento de disfunção metabólica e isso pode representar um alvo na abordagem específica terapêutica. Gimble (2007) sugere que os modelos de estudo *in vivo* possam explicar a relação das células-tronco com a obesidade, devido ao fato de um indivíduo após perda de volume adiposo através de dieta, exercício ou cirurgia reestabeleça o volume de tecido adiposo, não só pelo aumento de reserva dos adipócitos preexistentes como também por meio de geração de novos adipócitos a partir de um progenitor ou pool de células-tronco.

A fim de entender melhor a importância fisiológica e papel de uma célula, é vital conhecer e compreender o seu desenvolvimento. O tecido adiposo é altamente complexo, suas funções não foram totalmente desvendadas nem o impacto que seu desequilíbrio causa no organismo, sabe-se que a presença de outras células como fibroblastos, músculos lisos, células endoteliais e células de defesa presentes nesse tecido tem seu papel vital, mas não há conhecimento aprofundado de como é estabelecida estas relações fisiológicas. A análise da adipogênese (processo de diferenciação do tecido adiposo) tem o intuito de desvendar a base celular e molecular do desenvolvimento do tecido adiposo (FRUHBECK, 2001).

Uma descoberta dedicada á população de adipócitos brancos maduros, afirma que essas células possuem a habilidade de perder lipídio e reverter a um fenótipo proliferativo mais primitivo, chamando-as de células de gordura desdiferenciadas (DFAT) (TODA, 2009). Quando submetidas a condições específicas de cultura de células não aderentes, estas células deixam de expressar os marcadores de adipócitos e passam a expressar características multipotentes (SONODA, 2008). O tecido adiposo vem se tornando alvo de pesquisas por apresentar um nicho de células-tronco mesenquimais, aparentemente maior em número celular do que as fontes obtidas de medula óssea (DE UGARTE DA, 2003). Ainda que o maior índice de utilização das células-tronco mesenquimais em aplicações clínicas seja proveniente de medula óssea o baixo número de células viáveis e o processo de obtenção invasivo e doloroso se faz necessária à investigação de fontes alternativas de células-tronco mesenquimais (ZUK et al.; 2002). O isolamento das CTM á partir do tecido adiposo é um processo relativamente simples. Zuk (2001) descreveu a presença de CTM em lipoaspirado humano, sua rápida multiplicação *in vitro* e descreveu também a diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica, miogênica, e linhagem condrogênica quando estimulados com substâncias específicas. O protocolo de purificação de pré-adipócitos foi descrito pela primeira vez na década de 60 e era semelhante ao usado para purificar as CTMs de osso (GIMBLE, 2007). Esses pré-adipócitos foram posteriormente demonstrados ser multipotentes e foram nomeados CTMA ou ADSC (ZUK et al, 2002). Pesquisadores descrevem que as células-tronco multipotentes são abundantes no tecido adiposo branco murino, a taxa celular e o potencial de diferenciação são reduzidos no tecido adiposo marrom (SCHAFFLER, 2007). Em humanos foi relatado maior obtenção de células-tronco nos depósitos de tecido adiposo amarelo subcutâneo no braço, quando comparados ao abdome e peito. No entanto não há estudos comparativos entre as fontes de tecido adiposo que possuem um melhor rendimento (GIMBLE, 2007). Apesar de a capacidade de aderência e proliferação ser mais estudada em doadores mais jovens, a capacidade de diferenciação parece ser mantida com a idade (SHI, 2005).

2.3 Aspectos evolutivos das células-tronco (CT)

Muitos animais podem regenerar partes perdidas do seu corpo ou tecido. Um exemplo estudado por Jordan (1958) e confirmado por Tochinal (2004) são anfíbios da espécie *Xenopus laevis* que em estágio larval possuem a capacidade de regenerar partes perdidas de seu telencéfalo. Segundo Onal (2012), as conhecidas planárias de água-doce tem a

capacidade de regeneração á partir de células-tronco pluripotentes (neoblastos) em animais adultos. Em mamíferos a regeneração não é muito bem compreendida, sabe-se que em humanos o fígado regenera-se parcialmente ativado por uma série de vias reguladoras (RIEHLE, 2006), acreditava-se que as complexas células do tecido nervoso não tinham essa capacidade, mas em 1980 Vescovi (apud NERI, 2004) e outros cientistas demonstraram que as células nervosas podem dar origem até á células musculares, entre outras. Atualmente sabe-se que o tecido adiposo representa um papel muito importante na sobrevivência, evolução e capacidade adaptativa no mundo animal, também tem grande potencial de reparação tecidual. O tecido adiposo marrom, o que confere maior reserva energética do que o tecido adiposo branco, provavelmente seja resultado de um desenvolvimento evolutivo dos mamíferos. Esse resultado evolutivo pode ser argumentado pela presença de uma proteína presente nesse tecido chamada proteína desacopladora – 1 (UCP1, thermogenin) que apresenta um papel importante no processo de respiração celular. Para sobreviver ao estresse causado por períodos noturnos ou frios intensos e também promover a sobrevivência de indivíduos com dietas pobres em macronutrientes essenciais, essa proteína pode ter sido uma das únicas vantagens evolutivas dos mamíferos (SAMEC, 1998).

A regeneração de tecidos nas espécies pode ser distinta devido à complexidade do organismo de cada uma. O estudo das células-tronco proporcionou uma visão diferente dos mecanismos que levam a iniciar o processo de regeneração no indivíduo. Trata-se de um fenômeno complexo ainda não totalmente compreendido, pois as células-tronco são estudadas fora do ambiente natural e podem expressar um comportamento diferente *in vitro* (NERI, 2004).

2.4 A Bioética e Aspectos terapêuticos das células-tronco (CT)

O desenvolvimento de órgãos e tecidos do corpo humano tende a perder sua total capacidade de funcionamento, por doenças ou processo normal de envelhecimento celular (PEREIRA, 2008). A demanda de reposição desses órgãos, no caso de doença, é atendida por programas de transplante de órgãos. Por diversas razões, esses programas atendem uma fração muito pequena de pacientes, no caso do Brasil esse dado varia de 70% para rins e fígado, 15% para coração e apenas 5% para pulmões (GARCIA, 2013; FERNANDES, SAMANO, et al.; 2008). Dentre essas razões podemos destacar a escassez de doadores, a incapacidade de transplante como nervoso e muscular, além disso os transplantes no Brasil têm alto custo o que requer maior atenção por parte do Ministério da Saúde (GARCIA, 2013).

Nesse contexto, a terapia celular se apresenta como uma potencial fonte de tecidos para transplante, ou mesmo uma alternativa de regeneração total ou parcial de um órgão doente (PEREIRA, 2008). Apesar da grande expectativa do uso terapêutico destas células, questões éticas e de segurança precisam ser superadas.

O debate sobre as células-tronco inicia em 1998, nos Estados Unidos, quando a empresa privada de Biotecnologia *Geron Corporation* anuncia o sucesso do isolamento de células-tronco humanas de origem embrionária e fetal. A discussão, além de questões religiosas e éticas como a destruição de embriões e incentivo ao aborto, gerada entre o fundo de investimentos públicos de pesquisa e as empresas privadas que detiveram informações de saúde pública em prol do lucro (NERI, 2004). Entre os presidentes que assumiam o poder cada qual observava a situação ao seu modo até que ficou estabelecido o poder dos pesquisadores públicos em utilizar linhagens de células-tronco isoladas de embriões supranumerários e que todas as informações obtidas em pesquisas, sejam elas públicas ou privadas, deveriam ser publicadas em um banco público de informações (NERI, 2004). Mesmo antes da liberação, as pesquisas com células-tronco deram início em 1981, onde os cientistas as isolaram de embrião de rato. Elas se proliferaram *in vitro*, mas não se diferenciaram, pois eles tinham a finalidade de estudar comportamento de doenças cardíacas. Em novembro de 1998 a equipe de James Thomson isolou células-tronco de embriões humanos há partir de fecundação *in vitro*. No início do século XX foi descrito, a partir de um estudo com neurônios de uma região do cérebro chamada hipocampo, que tecidos adultos poderiam apresentar células-tronco em um estado imaturo e que células do sistema nervoso poderiam gerar células musculares ou outras células que não da mesma origem embrionária. (FERNANDES, SAMANO, et al.; 2008). Aqui no Brasil em 24 de Março de 2005 foi aprovada no Congresso Nacional a Lei 11.105/05 de biossegurança, que em seu artigo 5º permite a pesquisa com células-tronco embrionárias com a finalidade terapêutica obtida de embriões humanos produzidos por fertilização *in vitro* e não utilizados nos procedimentos. Estes embriões, para poderem ser utilizados em pesquisa, precisam atender as seguintes condições: sejam embriões inviáveis congelados há três anos ou mais a partir da data de congelamento. A inviabilidade do embrião pode ser entendida como parada completa do desenvolvimento, alterações genéticas diagnosticadas do embrião, falhas técnicas ou quando a transferência uterina não resulta em gravidez (DONADIO, 2005). Nos últimos anos a descoberta que as células-tronco poderiam ser encontradas em tecidos adultos e se desenvolverem em laboratório tão bem quanto às embrionárias (ZUK, et al.; 2001), se tornou uma alternativa viável no estudo destas células.

A totipotência (capacidade de diferenciação de muitos tipos celulares) das células-tronco embrionárias (CTE) representa uma grande fonte de transplante celular, em termos de segurança isso é um problema, pois as células podem se diferenciar descontroladamente e gerar teratomas. Além disso, é necessária a compatibilidade entre as CTE e o paciente a fim de eliminar entre outros problemas a rejeição imunológica, o que se demonstra uma tarefa extremamente difícil demonstrado pelos bancos de medula óssea (PEREIRA, 2008). Atualmente as pesquisas com células-tronco embrionárias utilizam a técnica de transferência do núcleo de uma célula adulta para um óvulo sem núcleo, para depois retirar CT do blastocisto do embrião assim formado (Mc GEE, CAPLAN, 2001). As células-tronco pluripotentes induzidas (*IPs cells*) podem unir a plasticidade das CTE com células-tronco adultas, o que representa um avanço na medicina regenerativa, ainda que em fase de teste (TACHIBANA, et al.; 2013). Outra fonte de células-tronco muito estudada e utilizada são as células-tronco adultas (CTA). Elas podem ser encontradas em indivíduos adultos em vários tecidos, sua função no organismo é a regeneração de alguns tecidos e autorrenovação celular de células mortas ou envelhecidas (ZUK, et al.; 2001). Ao contrário das CTE, as células-tronco adultas podem ser retiradas do próprio paciente adulto, com seu consentimento e de forma não invasiva com a finalidade de expansão e diferenciação *in vitro*.

As CTA humanas mais utilizadas em terapia celular são provenientes de medula óssea. Porém, as CTA eram vistas tradicionalmente como restritas em seu potencial de diferenciação a somente células do tecido onde residem (ZUK, et al.; 2002). Uma das primeiras indicações de que as CTA de medula óssea poderiam se diferenciar em tecidos diferentes do hematopoiético veio de um estudo de modelo animal para distrofia muscular de Duchenne, doença muscular degenerativa causada por mutações no gene da distrofina, uma proteína da parede muscular (GUSSONI, SONEOKA, et al.; 1999). Depois de transplantados, os animais afetados apresentaram células derivadas de medula óssea do doador que se incorporaram ao músculo dos animais distróficos. Dois anos mais tarde, Krause e colaboradores (2001) demonstraram a enorme capacidade de diferenciação das células-tronco adultas de medula óssea *in vivo*. A partir desse momento vários grupos iniciaram estudos terapêuticos das células-tronco adultas de medula óssea em doenças não hematológicas (KRAUSE, et al.; 2001).

Transplantes de CTAs são realizadas desde a década de 1950 na forma de transplantes de medula óssea para tratamento de diferentes doenças hematopoiéticas (WIESSMAN, 2000). A partir do final da década de 1980, o sangue de cordão umbilical e placentário de recém-nascidos tornou-se uma fonte alternativa de células-tronco

hematopoiéticas (BARKER, WAGNER, et al.; 2003). Em recém-nascidos, essas células ainda não migraram para o interior dos grandes ossos e se encontram no sangue circulante, não necessita de uma compatibilidade completa entre doador e receptor e está disponível quando necessário (PEREIRA, 2008). Em 1993, inaugurou-se o primeiro banco de sangue de cordão para uso público nos Estados Unidos (New York Blood Center, N.Y.) para complementar os bancos de doadores de medula óssea. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) foi pioneiro na criação de um banco público de sangue de cordão em 2001. Em 2004, foi criada pelo Ministério da Saúde uma rede nacional de bancos de sangue de cordão (Rede Brasil Cord), composta inicialmente pelo INCA, Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), Hemocentro de Ribeirão Preto e UNICAMP.

Apesar dos avanços em estudos clínicos com CTA de medula óssea e de tecidos extra-embrionários, há limitações em sua utilização terapêutica.

Uma das barreiras na utilização terapêutica das células-tronco adultas é a obtenção de um grande número de células para sua diferenciação, visto que esse número de células presente no organismo é reduzido. É necessária a expansão *in vitro* com padrões definidos, tais como fatores de crescimento neutro (TAMAMA et al, 2006; TAMAMA et al, 2010) além da realização de expansão celular sem utilização de suplementos animais como soro fetal bovino (SFB), com intuito de ação terapêutica nos pacientes. No entanto, mesmo se o número de células de barreira é superada, apesar do potencial de diferenciação das células estaminais inata, a maioria dos efeitos terapêuticos atualmente atribuído às células são baseadas na capacidade de “volta para casa” nos locais de lesão, dos fatores tróficos e supressão da inflamação (PROCKOP et al, 2010) em vez de geração direta dos tecidos. A partir dos obstáculos enfrentados com doações de medula óssea, como escassez de doadores e o processo doloroso de obtenção das células, testes iniciais com tecidos extra-embrionários surge à possibilidade de obtenção de novas fontes de células-tronco adultas. Em 1964 Rodbel e colaboradores descreveram o primeiro relato de isolamento de células adiposas obtidas de ratos para uma série de estudos de metabolismo do tecido adiposo, o sedimento celular obtido foi chamado de células vasculares estromais. Em 2001 Zuk e colaboradores isolaram células-tronco adultas mesenquimais de tecido adiposo, a partir de lipoaspirado humano, e descobriram sua diferenciação em linhagens adipogênicas, osteogênicas, condrogênicas e miogênicas. A partir deste período muitas pesquisas surgiram utilizando fontes de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo: Zuk (2002) fez um estudo comparativo entre fontes de células-tronco de medula óssea e tecido adiposo estromal, Rangappa (2003) relatou indução cardiomiogênica, Rehman (2004) investigou seu potencial angiogênico,

Hwangbo (2010) avaliou o tratamento de células-tronco adiposas humanas em ratos experimentalmente infartados e entre outros estudos as CTA provenientes de tecido adiposo que vem se mostrando uma grande aliada em estudos terapêuticos. A vantagem clínica evidente da utilização deste tecido, além da fácil, é de permitir que uma grande retirada de células seja possível, sem o comprometimento do estado clínico do paciente. Além disso, a possibilidade do seu uso em transplante alogênico amplia o seu interesse terapêutico sustentando a hipótese de que as células enxertadas poderiam ser toleradas, minimizando assim a necessidade de terapia imunossupressora (GIMBLE, 2007; ZUK, 2001, 2002; SCHAFFLER, 2007; MEYERROSE, 2007; NAKAGAMI, 2006).

2.5 Técnicas de isolamento celular

As células de animais e de humanos, isoladas de tecidos vivos, podem crescer *in vitro* se houver nutrientes e todos os outros fatores necessários para sua sobrevivência, crescimento e proliferação forem fornecidos corretamente. Quando este processo é realizado em laboratório com condições controladas de temperatura, umidade, oxigênio e gás carbônico se estabelece uma cultura celular (PERES, 2005). Dependendo do tecido de origem as células de uma cultura celular podem crescer suspensas no meio de cultura, quanto aderidas formando monocamadas na superfície da garrafa em que estão sendo cultivadas. As células em suspensão derivam de linhagens que originalmente não necessitam de adesão ao substrato para proliferação, tais como células hematopoiéticas. Já as células aderidas, necessitam ligar-se ao substrato para se dividir e crescer e esta ligação é essencial, uma vez que se estas células perdem a ancoragem ao substrato, elas param de proliferar e morrem. Exemplos de células aderidas são fibroblastos e células epiteliais, entre outras (MOLINARO, CAPUTO, et al.; 2010). As culturas podem ser de três tipos: primárias, finitas ou contínuas.

Culturas de células primárias são produzidas a partir de células retiradas de um tecido por processos de desagregação por métodos mecânicos, enzimáticos ou químicos. A célula dissociada do tecido pode utilizar um protocolo de corte do tecido, isolamento celular e descarte do tecido restante ou pode-se cortar uma fina camada do tecido, de modo a se obter um explante primário a ser subdividido (FRESHNEY, 2005). As células individualizadas e separadas das demais e de sua matriz podem ser acondicionadas em garrafa de cultura ou biorreatores (LEO et al, 2008). As culturas primárias são, portanto formadas a partir células que sobrevivem aos processos de desagregação, aderem-se ao substrato da garrafa de cultura (ou mantêm-se em suspensão) e proliferam. As células primárias possuem morfologia

semelhante ao do tecido das quais se originam. A cultura primária permite pouco número de divisões (ou passagens) celulares, após as quais entram em estado de senescência e morrem (COMINETI, 2000). As culturas finitas são aquelas produzidas após a proliferação celular a partir da cultura primária, por se tratarem de células do próprio tecido vivo elas proliferam até certo período e morrem. Estas células podem se tornar permanentes, o que chamamos de células transformadas ou imortalizadas, com adição de genes virais, substâncias químicas ou agentes químicos: como a luz ultravioleta. Esses transformantes alteram geneticamente a célula o que permite mutações em genes que controlam o ciclo celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor). Essas mutações podem inativar os supressores de tumor ou a superexpressão dos proto-oncogenes. Durante o processo normal do ciclo celular, uma parte do telômero (porção final dos seus cromossomos) e a principal mudança causada por essa mutação é a telomerase ativa. A telomerase repõe o telômero perdido permitindo que a célula se divida indefinidamente sem que perca um pedaço do seu DNA codante (PERES, 2005). As células transformadas também podem ser obtidas de tecidos tumorais, como exemplo a HeLa oriunda de tumor de cérvix uterina humana (MASTERS, 2002).

As células imortalizadas são fáceis de trabalhar, mas podem não demonstrar o padrão exato de comportamento e fisiologia de uma célula *in vivo*. As células em cultivo são um modelo de função contraditório devido a perda das características no desenvolvimento da cultura. Características como adesão celular e adesão à matriz é reduzida e não possui características de uma arquitetura tridimensional do tecido *in vivo* se o seu meio hormonal é modificado. Por esse motivo as pesquisas devem se estender ao comportamento celular *in vivo*, o que em células humanas isso poderia se tornar inviável e o estudo com cultura primária de células-tronco se torna uma ferramenta de estudo em diversas áreas da medicina (COMINETI, 2000). A cultura de células primárias como modelo experimental auxiliaria também a diminuição de experimentos com animais e por se tratar de uma célula humana teria uma maior semelhança com estudos *in vivo* (PEREZ, 2005). Um fator limitante da utilização da cultura primária são as contaminações por fungos e bactérias. Quando presentes nos meios empregados estes microorganismos crescem em uma taxa muito maior que em outras células animais e comprometem o desenvolvimento podendo causar a morte da cultura. A adição de antibióticos em meio de cultura em 1940 e uso de fluxo laminar nos anos 70 forneceram um meio asséptico para utilização desta forma de cultura celular (UNCHERN, 1999).

Entre as técnicas de isolamento celular da cultura primária podemos destacar a cultura de explante, isolamento enzimático e isolamento por dissociação mecânica (KLINGBEIL, 2006 e INÁCIO, 2010).

O método de cultura de explante foi primeiramente desenvolvido e utilizado por Harrison em 1907 e posteriormente por Carrel em 1910, período de introdução das técnicas de cultura celular (CARREL, 1910). O objetivo desse método é promover a liberação e a migração das células do tecido na direção centrífuga, a partir do fragmento posicionado na superfície do cultivo. Segundo Freshney (2000) essa técnica é utilizada quando há pouca quantidade de tecido para realizar a cultura primária, risco apresentado por culturas mecânicas e enzimáticas. Sua desvantagem está na adesividade do fragmento sobre a superfície do cultivo e na seleção de células migratórias provenientes do tecido (JAAKLOLA, 1998; MACKENZIE, 1983 e FRESHNEY, 2005).

O isolamento enzimático é realizado através da ação de uma enzima específica. Enzimas são proteínas catalíticas que aceleram a velocidade de uma reação química, industrialmente as fontes de enzimas são produzidas a partir de microorganismos. Eles são considerados fontes atrativas e de baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em um tempo relativamente curto (ZIMMER, BORRÉ et al.; 2009). As enzimas são utilizadas em meio cotidiano há muitos anos sabe-se a sua função e conceito exato para sua utilização. Em relatos históricos destacam a utilização de fermentação láctica para produção de queijo pelos gregos, produção de cerveja na Babilônia em 6000 a.C (JAY, 2000), e a fabricação de pão pelos egípcios utilizando microorganismos como o *Saccharomyces cerevisiae* (CARBALLO, 2002). No final do século XIX Eduardo Buchner recebeu o prêmio Nobel por elucidar que as enzimas permanecem ativas mesmo fora do organismo que as produziu (BUCHNER, 1907). Em 1955, Sanger desenvolveu o primeiro método para determinar a estrutura primária de proteínas, sendo a insulina a primeira a ser sequenciada (SANGER, 1958) e ainda no século XIX o uso terapêutico das brutas enzimas pancreáticas de suínos como auxiliares digestivos se iniciaram (CRUZ et al.; 2008). Durante os muitos anos as enzimas têm sido utilizadas em indústrias de alimentos, produtos de limpeza e entre outros podemos destacar a sua utilização terapêutica e em laboratórios de pesquisa (ZIMMER, BORRÉ et al.; 2009). Um tipo de enzima mais utilizada para dissociação celular é a collagenase. As collagenases são enzimas capazes de hidrolisar as ligações peptídicas de vários tipos de colágeno, a proteína mais abundante nos mamíferos. Nos organismos, suas fibras resistentes são clivadas em fragmentos menores pelas collagenases para posterior degradação dos fragmentos peptídicos por outras enzimas. Essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de diferentes tipos de colágeno e fazem parte do grupo das metaloproteinases de matriz (MMPs), endopeptidases dependentes de forte ligação com zinco para apresentarem suas atividades catalíticas (BIRKE-DAL-HANSEN et al.; 1993). Os

microorganismos também produzem enzimas collagenolíticas, a mais conhecida é *Clostridium histolyticum* e alguns autores também relatam que a *Candida albicans* também exerce atividade collagenolítica (LIMA et al.; 2009). Vários autores relatam a utilização das collagenases em técnicas de cultura de tecidos e células animais como: isolamento de células endoteliais de cérebro, células-tronco, células cardíacas e da pele tanto em estudos com animais como em humanos (Li et al., 2007; ZORN- PAULY et al., 2004; SUPP, WILSON-LANDY, BOYCE, 2002).

A técnica de isolamento celular através da dissociação mecânica não é descrita na literatura como uma forma única de uso. Sabe-se que é uma técnica livre de ação enzimática, mas os protocolos são adaptados de acordo com o tipo de tecido utilizado. Há descrição de isolamento celular por dissociação mecânica em cortes ovarianos por um aparelho denominado tissue chopper que inicia cortes seriados em intervalos de 200 micromêtros, em cortes longitudinais, transversais e oblíquos (RODRIGUES, et al.; 1998). Inácio (2010) utiliza a técnica de dissociação mecânica através de cortes (com tesoura) das amostras e de dissociação longitudinal com auxílio de duas agulhas de seringas, arrastando a amostra em formato de Z ao longo da placa de petri. Em seguida o filtrado passa por um filtro celular, onde somente as células irão passar.

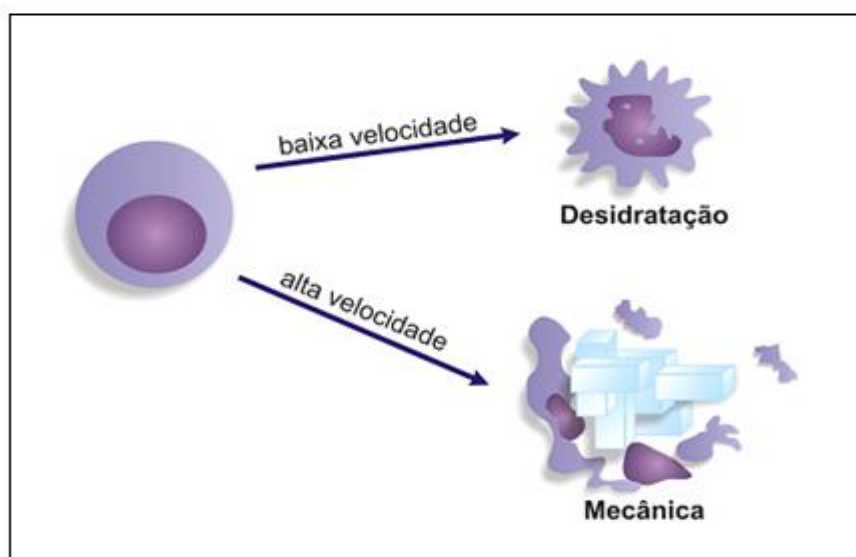
As células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo (CTMA) foram primeiramente isoladas por Rodbell e colaboradores (1966) em ratos obesos e posterior em humanos. Os autores isolaram tecidos de ratos por meio da ação de uma proteína enzimática derivada da *Clostridium histolyticum* e esta técnica tem sido utilizada para isolamento de CTMA humanas. Zuk e colaboradores (2000), pioneiro no isolamento de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo, descrevem um protocolo simples de isolamento celular utilizando collagenase para isolar células de lipoaspirado humano. Freshney (2005) descreve a dissociação enzimática de tecidos através da adição de tripsina e EDTA, em geral quando se aumenta a pureza do agente obtém-se maior controle e menor toxicidade para as células e aumento da especificidade, porém isso pode acarretar menor atividade de desagregação. Quando se utiliza uma enzima, qualquer atividade residual de sua ação deve ser neutralizada imediatamente por uma solução tampão que contenha cálcio em sua formulação, qualquer meio contendo soro fetal bovino pode exercer essa função (KLINGBEIL, 2006). Outra técnica livre de ação enzimática é a feita por dissociação mecânica e já descrita em ratos e coelhos. O autor conclui que a viabilidade celular entre dissociação mecânica e dissociação enzimática é a mesma, a diferença está no tempo de isolamento celular em que a dissociação enzimática se estabelece em menor tempo (INÁCIO, 2011). Devido ao alto custo

da utilização enzimática e os bons resultados de viabilidade celular, a técnica de dissociação mecânica se torna uma alternativa viável e de baixo custo para fins de isolamento celular a partir de cultura primária de tecido.

2.9 Criopreservação

Os indivíduos se adaptam ao meio ambiente por meio de mutações genéticas. Esse procedimento descrito por Darwin ocorre em todos os seres vivos, inclusive em células cultivadas. A partir do momento em que as células de cultura primária estão fora do seu ambiente natural elas também tendem a se adaptar para se estabelecer como uma linhagem (BRAY, JOHNSON, et al.; 2011). As características de células cultivadas por longos períodos acabam perdendo suas características fenotípicas devido à grande probabilidade de ocorrerem mutações em seu DNA após várias divisões celulares (JOSEPHON, 2006). Manter estas células criopreservadas pode atrasar esse processo por anos, sendo que tais alterações são dispensáveis para laboratórios fornecedores de linhagens de grandes bancos mundiais (HUBEL, NORMAN, et al.; 1999). O resfriamento celular em temperaturas celulares pouco superiores a 0°C reduz seu metabolismo, mas não o elimina e as células podem sofrer um processo de deterioração progressiva em menor velocidade, o que pode acarretar perda da viabilidade celular tendo essa exposição. Os efeitos do resfriamento podem variar de diminuição da atividade da bomba de sódio, precipitação de substâncias à mudanças nas fases lipídicas da membrana podendo interferir nas funções enzimáticas (MERYMAN, 1971). Aparentemente quando o resfriamento ocorre de maneira rápida a célula sofre o processo que chamamos de “choque térmico” o que pode ocasionar lesão ou morte celular. O procedimento de congelamento celular deve ser lento, com diminuição aos poucos da temperatura, pois acarreta solidificação da água que se encontra em meio de cultura (Figura 2). Por processo osmótico a saída de água da célula faz com que ela murche e, com o congelamento lento, impede que os cristais de água formados no exterior da célula rompam a membrana celular, mas não protege a célula contra a desidratação (SANTIS, 2009; MAZUR, 1963). Basicamente para evitar lesões celulares deve-se levar em conta a velocidade de congelamento ideal para a célula em questão, empregar substâncias crioprotetoras que minimizem a formação de cristais de gelo e diminuam a desidratação celular, bem como a concentração de células nos tubos crioprotetores e a previsão de uso clínico (MASSUMOTO, 1997). As células em cultura são congeladas geralmente em nitrogênio líquido em uma temperatura de – 196°C que impede qualquer alteração nas células criopreservadas e paralisa todas as reações bioquímicas.

Figura 2 – Tipos de lesões celulares nos processos de criopreservação



Fonte: Adaptado de SANTIS, 2009. O processo de criopreservação celular de ser lento, com diminuição gradual de temperatura para evitar formação de cristais de gelo no interior da célula impedindo a lesão ou morte celular.

O congelamento celular é um processo agressivo para a cultura e mesmo com a variação de temperatura sendo de 1°C a 2°C por minuto, a viabilidade se torna reduzida. Para auxiliar na perda de viabilidade celular são utilizadas substâncias crioprotetoras que defendem as membranas celulares dos cristais, além de aumentar o número de células em cada tubo crioprotetor (1 a 10 x 10⁶ células por tubo). Os mais utilizados são o Dimetilsulfóxido (DMSO) e o glicerol, mas o DMSO é uma substância tóxica para a célula e deve ser retirado no processo de descongelamento (TEMMERMAM et al, 2008) e (MASSUMOTO, 1997). O glicerol foi o primeiro crioprotetor para espermatozóides de aves (POLGE, 1949) e que se mostrou eficiente, também para criopreservação de plaquetas, hemácias e outras células nucleadas, entretanto apresenta lenta penetração celular.

Os crioprotetores estão subdivididos em penetrantes, os quais desempenham seu mecanismo de ação no meio extra e intracelular. Os crioprotetores não-penetrantes atuam somente no meio extracelular (ALVARENGA, PAPA, et al.; 2005). Os não-penetrantes são representados por macromoléculas com alto peso molecular, tais como açúcares, lipoproteínas da gema do ovo e alguns aminoácidos, que atuam através de um efeito osmótico: induz a saída de água do interior da célula, prevenindo a formação de cristais de gelo no interior da célula (AMANN, PICKETT, 1987). Entre as substâncias que podem ser utilizadas como agentes crioprotetores estão álcoois: etanol, etilenoglicol, glicerol, metanol e poli-etilenoglicol e também as amida: acetamida e lactamida (ASHWOOD-SMITH, 1988). Em células

espermáticas foi descrito que sua ação envolve a ligação de hidrogênios com moléculas de água redirecionando-as e transformando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA, GRAHAM, 1997). Os crioprotetores também se envolvem com componentes da membrana celular estabilizando seus componentes (ROWE, 1966,1968). Um bom crioprotetor deve possuir um baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade (FULLER, 2004 apud NASH, 1966). A seguir um quadro de outros agentes crioprotetores.

Quadro 1 – Agentes crioprotetores

Composto	Representantes	Peso molecular
Sulfóxidos	Dimetil-sulfóxido	78,13
Alcoóis hidratados	Metanol	32,04
	Etanol	46,07
Trióis	Glicerol	92,09
Proteínas/ Peptídeos	Albumina (soro)	66×10^3

Fonte: Adaptado de SANTIS, PRATA, 2009.

O protocolo de criopreservação deve ser avaliado para cada tipo celular. Sabe-se que esses agentes crioprotetores podem apresentar efeitos tóxicos para a célula e isso se torna um fator limitante para seu uso (FAHY, 1986). Apesar de se mostrar um grande potencial crioprotetor em congelamento de sêmen de diferentes espécies (SILVA, et al.; 2003) o glicerol apresenta alto peso molecular e toxicidade á célula (ROTA, et al.; 2006). Fahy e colaboradores (1990) destacam que essa toxicidade pode resultar na desnaturação de proteínas, alterações de interações da actina e indução da liberação das proteínas do seu local na membrana. Outro crioprotetor empregado em cultura celular é a Dimetilformamida (C_3H_7NO), se comparadas ao glicerol ela pode se ligar ao hidrogênio da água em três sítios de ligação. No entanto as amidas possuem uma maior viscosidade e solubilidade á água em

relação ao glicerol, permitindo-as uma maior penetração (NASH, 1996). Keith (1998, 2004) relata uma maior motilidade de espermatozoides criopreservados com várias formas de amidas.

A criopreservação é uma técnica extremamente importante no estudo com células-tronco. As células devem permanecer viáveis para sua utilização em terapia celular. Segundo Gunning (2005) as células-tronco congeladas de cordão umbilical são viáveis durante algum tempo, mas o número de células-tronco fornecidas pelo cordão é insuficiente para reconstituir alguns tecidos doentes, como a medula óssea (WADLOW, PORTER, 2002). Visto a necessidade de estabelecer novas fontes de células-tronco, se estabeleceu os Bancos de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário (BSCUP) que são organizações presentes em todo o mundo, podendo ser pública ou privada (ENGELFRIET et al., 1998). Os bancos de sangue de cordão umbilical envolvem um número de passos que exigem aderência às boas práticas laboratoriais e de produção para assegurar que sangue de cordão eficaz e seguro possa ser oferecido em centros de transplantes. Todo o processo de armazenamento e criopreservação deve ser otimizado para conservar a qualidade e viabilidade das células-tronco hematopoiéticas (WARWICK, ARMITAGE, 2004). Logo após a coleta, o sangue de cordão é transportado para o laboratório de criopreservação, juntamente com albumina humana e solução fisiológica as células são criopreservadas com solução de DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e em seguida as células são colocadas em um congelador programável controlado por computador (RUBINSTEIN et al., 1995). O registro da primeira amostra de sangue de cordão tem 15 anos e está intacta, em teoria, armazenadas dessa maneira as células-tronco permanecem viáveis por décadas (GUNNING, 2005). Devido à taxa reduzida de células-tronco viáveis oriundas de medula óssea e a dificuldade de terapia celular provida de doadores pela rejeição imunológica, os pesquisadores procuram fontes alternativas de células-tronco adultas. Além da criopreservação de células-tronco hematopoiéticas o tecido adiposo humano é uma fonte de células-tronco ideal para as terapias à base de células autólogas. (CHOUDHERY, BADOWSKI, et al.; 2013). Os protocolos de isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo (CTMA) utilizam fontes de lipoaspirado humano (ZUK, et al 2001; BARRY, 2004; YARAK, 2010). Segundo Gonda e colaboradores (2008) o protocolo de criopreservação de CTMA utilizando DMSO garante a viabilidade celular após 6 meses criopreservadas. A literatura não descreve a utilização de outros agentes crioprotetores, bem como a criopreservação de tecido adiposo provenientes de outras fontes que não lipoaspirado humano.

3 – JUSTIFICATIVA

Por muitos anos nos deparamos com a crescente onda do quadro de obesidade humana em todo o mundo. No decorrer do processo evolutivo, o estoque de tecido gorduroso que nos ajudou a sobreviver em períodos de escassez de alimentos se tornou um problema na população humana. A disponibilidade e a facilidade dos humanos em conseguir alimentos nos deu uma desvantagem evolutiva, ingerimos uma grande quantidade de calorias, muito maior do que a necessária para realizarmos todas as nossas funções fisiológicas. Como o organismo não sabe o que fazer com a grande quantidade de reserva energética, ocorre um grande acúmulo de gordura principalmente visceral o que acaba acarretando uma série de distúrbios metabólicos e fisiológicos que leva o indivíduo há um quadro de constante processo inflamatório e várias doenças associadas. Por outro lado, as pesquisas com células-tronco isoladas a partir de medula óssea ou células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo de lipoaspirado apresentam sucesso com uso de terapia celular. Contudo, são ausentes ou poucas as pesquisas com células-tronco onde o foco é a obtenção de células de portadores de distúrbios metabólicos como a obesidade. Desta forma é necessário estudar os protocolos de isolamento, expansão e caracterização das CTMs deste tipo de indivíduo, a fim de avaliar se é viável a retirada das células do próprio paciente e expansão *in vitro*. Espera-se com o desenvolvimento deste projeto o conhecimento básico de crescimento celular das células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo estromal de pacientes obesos para suas possíveis futuras aplicações.

3.1 OBJETIVOS

Gerais

Isolar e expandir *in vitro*, a fim de analisar a viabilidade de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo estromal de pacientes obesos submetidos à cirurgia metabólica, bem como relatar a diferença de viabilidade de células-tronco mesenquimais de diferentes fontes de tecido adiposo do mesmo indivíduo.

Específicos

Comparar qual a melhor técnica de isolamento celular: cultura de explante, dissociação mecânica e dissociação enzimática.

Delimitar qual região entre tecido adiposo subcutâneo, tecido adiposo mesentérico e tecido adiposo de omento possui maior taxa de crescimento celular de CTMA.

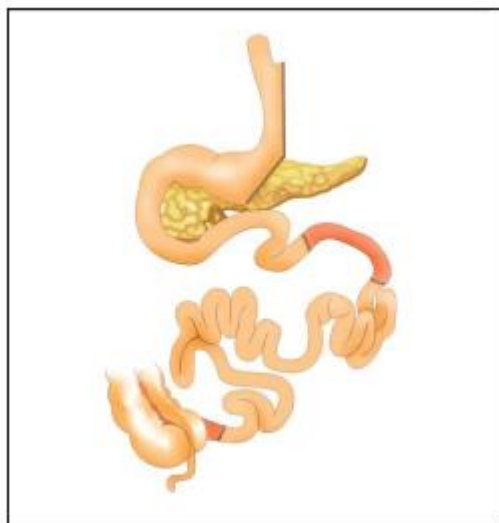
Elencar qual a concentração e qual a substância que melhor preserva a viabilidade celular na criopreservação de tecido adiposo e preservação das células-tronco mesenquimais pré-existentes: Solução 1: DMSO, Solução 2: Dimetilformamida e Solução 3: Acetona + Ácido fórmico, nas concentrações 3%, 4% e 5%.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Foram selecionados 10 indivíduos obesos que se submeteram à cirurgia bariátrica do tipo Gastrectomia Vertical com interposição ileal (Figura 3) no hospital Vicentino – Unidade São Camilo, Ponta Grossa, PR. Segundo a OMS apresentavam quadro de obesidade grau II e III associado à comorbidades (hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes tipo II, apneia do sono entre outros), ambos os sexos com idades entre 30 e 45 anos. Os indivíduos ou familiares/responsáveis deveriam aceitar participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (T.C.L.E) (Apêndice 1).

Figura 3 - Gastrectomia Vertical com interposição ileal



Corte do fundo do estômago, transposição ileal. Rever.

Fonte: Adaptado de RODRIGUES, 2012.

Estes parâmetros seguiram o protocolo aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Ponta Grossa (COEP – UEPG), protocolo número 189.893, parecer 04/02/2012.

4.2 Coleta das Amostras

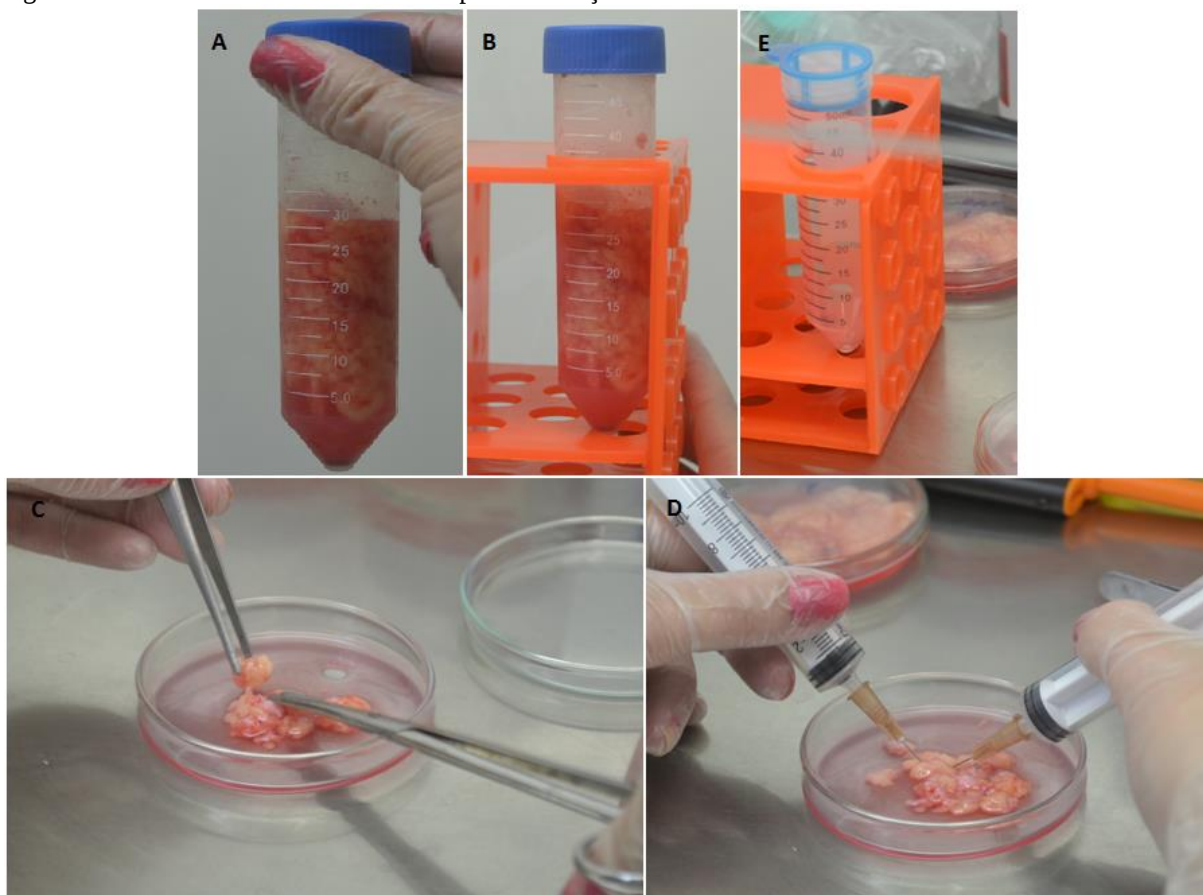
A coleta do material foi realizada no centro cirúrgico do hospital Vicentino – Unidade São Camilo. Foram retiradas amostras de 1 a 10g de tecido adiposo subcutâneo, tecido adiposo visceral mesentérico e tecido adiposo visceral omento. As amostras foram condicionadas em tubo estéril de 50mL (BD Falcon™, San José, California, EUA). contendo meio RPMI 1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) com L-glutamina, 50µL de antibiótico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml streptomina, armazenadas em gelo e encaminhadas ao laboratório (figura – 4A e B), para processamento em até 4h.

4.3 Isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo (CTMA)

O protocolo de isolamento de CTMA de murino foi proposto por Inácio (2011) e adaptado para a presente pesquisa com CTMA humana. As amostras de tecido foram colocadas em placas de petri estéreis (Rodac 60x10mm) e pesadas em balança analítica de precisão (Shimadzu). Adicionou-se 3 mL de meio RPMI 1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India), as amostras foram cortadas em pedaços menores com auxílio de uma tesoura (figura – 4C) e realizou-se a dissociação mecânica por meio de duas seringas com agulhas (Descarpack) em formato de Z por 5 minutos, para o desprendimento celular (figura – 4D).

O tecido sobrenadante foi retirado, as células dissociadas no meio foram aspiradas e passadas em filtro celular (figura – 4E) de 40 μm (Cell Strainer; BD FalconTM, San José, California, EUA). Em seguida, o meio com as células foi centrifugado por 7 min a 1.800 RPM para a formação de um pellet, que foi ressuspenso e uma alíquota retirada para contagem em câmara de Neubauer e mensuração da viabilidade celular com uso do corante Azul de Trypan. O número de células viáveis foi determinado pela técnica de exclusão de células não viáveis coradas pelo corante. Logo após a contagem as células foram condicionadas em garrafas de cultura de 25cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) na presença de meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB (Sigma) e antibiótico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), (100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml streptomomicina) e finalmente incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂ (HEPA Class 100, series II (Thermo Scientific)).

Figura 4 – Isolamento das CTMA humana por dissociação mecânica



A e B – A amostra de tecido adiposo visceral mesentérico coletada em tubo falcon com meio RPMI 1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India), meio com L-glutamina, com 20% de Soro fetal bovino e solução de antibiótico, 100 IU/ml de penicilina e 0,1 mg/ml streptomycina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). C – após a pesagem, a amostra de tecido foi colocada em placa de petri esteril, adicionou-se 3 mL de meio completo e foi cortada em pedaços menores. D – realizou-se dissociação mecânica com auxílio de seringa com agulhas realizando movimentos em formato de Z por aproximadamente 5 minutos. E – filtrou-se o meio, contendo as células dissociadas, com filtro celular de 40 μm (Cell Strainer; BD Falcon™, San José, California, EUA)
Fonte: a autora, 2013.

4.3.1 Manutenção, repique e purificação celular

Os cultivos celulares derivados de tecido adiposo foram mantidos em meio de cultivo RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) com L-Glutamina suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e antibiótico (100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomycina), (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Cultivados em garrafas de 25 cm^2 (TPP, Trasadingen, Switzerland) e incubados em estufa de CO_2 (HEPA Class 100, series II (Thermo Scientific) á 37° C. As trocas de meios de cultura ocorriam duas a três vezes por semana.

O repique celular era realizado quando a monocamada celular atingia 80% da confluência. Em condições assépticas, seguiu-se a retirada e descarte do meio de cultivo e colocou-se uma solução para individualização celular, solução de 0,025% de tripsina

(Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) em 0,02% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após o deslocamento e individualização celular, foi adicionado meio de cultivo contendo soro fetal bovino para inativação da enzima tripsina e seguiu-se homogenização da suspensão celular. Realizou-se a contagem e avaliação da taxa de crescimento celular com o uso do corante azul de trypan 0,4% (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). As células foram plaqueadas na densidade de $0,2 - 0,5 \times 10^4$ células/cm². Em todos os experimentos foram utilizadas células entre as passagens de 1 a 3. As células indesejadas como eritrócitos, não aderentes, eram eliminadas nas trocas de meio.

4.4 Técnicas de isolamento celular

4.4.1 Dissociação enzimática

As amostras coletadas foram colocadas em placas de petri (Rodac 60x10mm) com identificação. Após a pesagem, colocou-se 3mL de meio RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) com L-Glutamina e as amostras foram cortadas com tesoura. Preparou-se uma solução de 30mg de Colagenase Tipo I (Invitrogen), em concentração de 3mg/mL. Em seguida o tubo falcon permaneceu em banho maria, temperatura de 40°C por 45 minutos para ativação da colagenase e desprendimento das células. Em seguida o tubo foi centrifugado para a formação de um pellet de células. O meio foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1mL de meio RPMI. As células foram condicionadas em garrafas de cultura de 25cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland) na presença de meio RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) com L-Glutamina suplementado com 20% de SFB e antibiótico 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e finalmente incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂.

4.4.2 Dissociação mecânica

Descrição no item 4.3 Isolamento e expansão celular

4.4.3 Cultura de explante

As amostras coletadas foram colocadas em placas de petri com identificação. Após a pesagem, colocou-se 3mL de meio RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) e as amostras foram cortadas com tesoura. Foram retirados pedaços maiores de tecido. O meio contendo as células foi centrifugado para a formação de um pellet de células. O meio foi descartado e o pellet ressuscitado em 1mL de meio. Logo após a contagem as células foram condicionadas em garrafas de cultura de 25cm²(TPP, Trasadingen, Switzerland) juntamente com explantes do tecido, na presença de meio RPMI suplementado com 20% de SFB e antibiótico 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e finalmente incubadas em estufa a 37° C e 5% de CO₂.

4.5 Criopreservação

4.5.1 Criopreservação de Tecido adiposo

Foram avaliadas 4 substâncias em 3 concentrações para criopreservação de tecido adiposo: Solução 1 - DMSO, Solução 2 - Dimetilformamida e Solução 3 - Acetona + Ácido Fórmico.

Aproximadamente 3g de amostra de tecido adiposo mesentérico foi condicionado em tubo Falcon (BD FalconTM, San José, California, EUA) de 15mL, 1g para cada solução da seguinte forma:

Amostra 1 – DMSO (Solução 1) 10% + SFB 90% = DMSO 1,5 mL + SFB 13,5 mL

Amostra 2 – Dimetilformamida (Solução 2) 5% + SFB 95% = Dimetilformamida 0,75 mL + SFB 14,25mL

Amostra 3 – Solução 3 = Acetona 8% + Ácido fórmico 2% + SFB 90% = Solução 1 1,5mL + SFB 13,5 mL

Os tubos foram armazenados em temperatura – 20° C por 2 horas e em seguida armazenados em – 80°C. Após 1 mês foram descongelados, dissociados mecanicamente e armazenados em garrafa de cultura 25cm²(TPP, Trasadingen, Switzerland) com meio RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) + 20% de SFB e antibiótico 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

4.5.2 Criopreservação de Células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo

Foram avaliadas 4 substâncias em 3 concentrações para criopreservação de CTMA de tecido adiposo: Solução 1 - DMSO, Solução 2 - Dimetilformamida e Solução 3 - Acetona + Ácido Fórmico.

Aproximadamente 2g de amostra de tecido foi dissociado mecanicamente (conforme item 4.3 Isolamento e expansão das células), aproximadamente 2 semanas após aderência celular das CTMA, as células foram individualizadas para criopreservação. Em condições assépticas, seguiu-se a retirada e descarte do meio de cultivo e colocou-se uma solução para individualização celular, solução de 0,025% de tripsina (Gibco™ Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, EUA) em 0,02% de EDTA (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após a individualização celular foi adicionado meio de cultivo contendo soro fetal bovino para inativação da enzima tripsina e seguiu-se homogenização da suspensão celular. Realizou-se a contagem e avaliação da viabilidade celular com o uso do corante azul de trypan 0,4% (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA). Adicionou-se 1mL da solução a ser criopreservada em tubo eppendorf (Eppendorf Safe-Lock Tube 1.5 ml) da seguinte forma:

Amostra 1 – DMSO (Solução 1) 10% + SFB e células 90% = DMSO 100 µL + SFB e células 900 µL

Amostra 2 – Dimetilformamida (Solução 2) 5% + SFB 95% = Dimetilformamida 50 µL + SFB e células 950 µL

Amostra 3 – Solução 3 = Acetona 8% + Ácido fórmico 2% + SFB 90% = Solução 1 100 µL + SFB e células 900 µL

Os tubos foram armazenados em temperatura – 20° C por 2 horas e em seguida armazenados em – 80°C, os tubos foram envoltos por algodão para evitar o rápido congelamento. Após 1 mês foram descongelados rapidamente em banho maria à 37°C e armazenados em garrafa de cultura 25cm²(TPP, Trasadingen, Switzerland) com meio RPMI-1640 (Himedia Laboratories PVT. LTD, India) + 20% de SFB e antibiótico 100 UI/ml de penicilina e 0,1 mg/ml de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA).

4.5.3 Análise estatística

Para a realização dos testes foi utilizado o programa GraphPad InStat 3.0. Os resultados foram submetidos ao teste t test para avaliação de viabilidade celular e ANOVA para testes de criopreservação. O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Os dados

foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão.

5 RESULTADOS

5.1 Padronização do protocolo de isolamento e cultivo de CTMA humana

Na primeira etapa do projeto, foram feitos ensaios piloto para avaliar qual a melhor metodologia a se trabalhar: dissociação enzimática, dissociação mecânica ou cultura de explante. Foram utilizadas 4 amostras de tecidos adiposos viscerais mesentéricos, os quais demonstraram alta taxa de crescimento celular e apresentava maior quantidade de amostra. Segue a Tabela 1 na qual demonstra os resultados obtidos no ensaio.

Tabela 1 – Comparativo do isolamento celular entre dissociação enzimática, dissociação mecânica e cultura de explante.

Paciente	Explante	Dissociação Enzimática	Dissociação
		Colagenase tipo I	Mecânica
1	NÃO	SIM	SIM
2	NÃO	NÃO	SIM
3	NÃO	ND	NÃO
4	NÃO	ND	NÃO

SIM: Sucesso no isolamento celular. NÃO: Insucesso no isolamento celular. ND: Não determinado.
Fonte: A autora, 2013.

Em comparação com as técnicas utilizadas na Tabela-1 o protocolo que melhor se adapta ao isolamento de CTMA é a dissociação mecânica. Após dois dias após o isolamento celular foi observado que o explante do tecido adiposo permanecia parte submersa e parte sobrenadante, formou-se uma porção fibrosa no tecido o que propiciava a migração celular e a não aderência à garrafa de cultura.

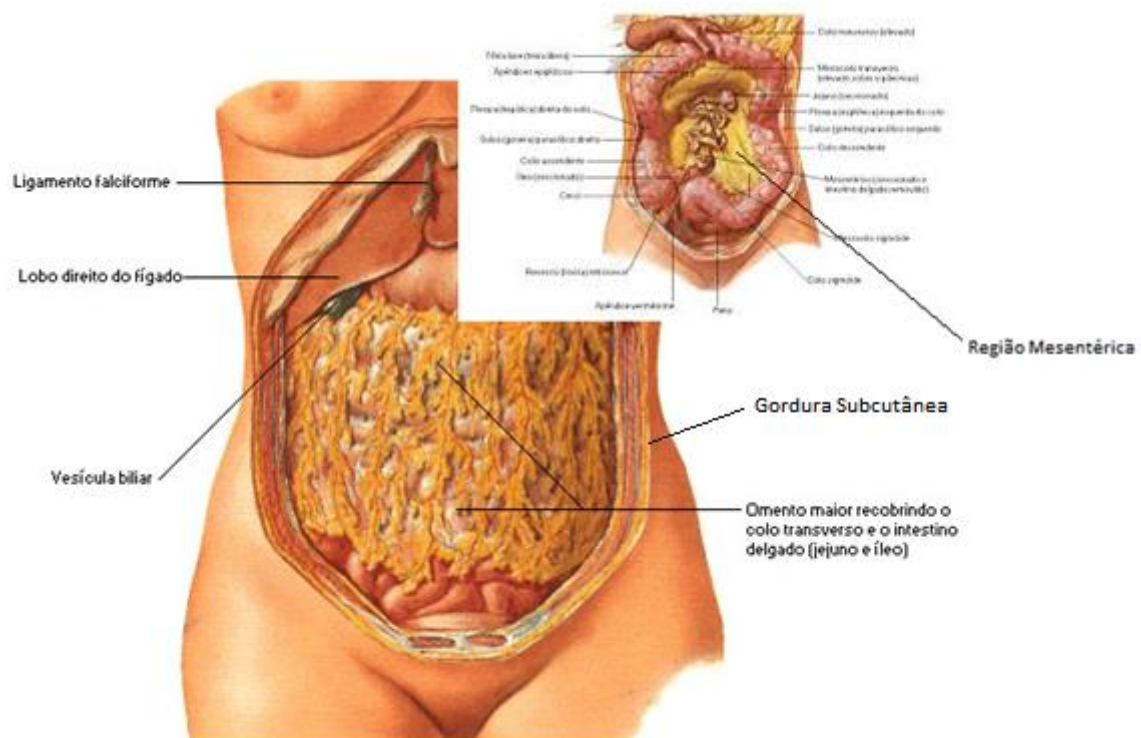
A técnica de isolamento celular de CTMA pelo procedimento de dissociação enzimática obteve 25% de sucesso. A técnica de isolamento celular pelo procedimento de dissociação mecânica obteve sucesso em 50% das amostras, optou-se pela utilização desta técnica para as demais etapas da realização do projeto, por apresentar menor custo e uma

menor influência de substâncias enzimáticas para utilização em terapia celular. O protocolo inicial de Inácio (2011) utilizado para isolamento de CTMA de animais foi adaptado para o isolamento de CTMA humanas.

5.2 Isolamento da CTMA pela técnica da dissociação mecânica

Definido a fonte de tecido a se isolar as células-tronco e o protocolo de isolamento das CTMA, foram avaliadas três regiões que possivelmente poderiam ser retiradas amostras de tecido adiposo de acordo com a possibilidade de não haver um processo invasivo no doador. As amostras definidas foram: 1 - tecido adiposo visceral da região mesentérica, 2 - tecido adiposo visceral da região de omento maior, uma rede de tecido adiposo que recobre o intestino e 3 – tecido adiposo subcutâneo, abaixo da derme como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Esquema demonstrativo de fontes de tecido adiposo humano.



A gordura subcutânea se localiza em uma região denominada hipoderme, abaixo da derme. O tecido subcutâneo é composto principalmente por tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo. O mesentério é um ligamento em forma de leque, formado por membrana serosa de tecido conjuntivo denso com função de suporte ao jejuno e íleo. Em indivíduos obesos o mesentério apresenta grande porção de gordura. O Omento maior é um delgado avental que pende sobre o cólon transverso e as alças do intestino delgado. Está inserido ao longo da curvatura maior do estômago e da primeira porção do duodeno que se estende até o fígado.

Fonte: Adaptado de NETTER, F.H. Atlas de Anatomia Humana, 2ªed. Artmed. Porto Alegre. 2000.

Todos os pacientes submetidos à pesquisa eram obesos e com comorbidades associadas: hipertensão e diabetes, não há relatos de tabagismo e de consumo alcoólico nem de outras doenças associadas. Seguem descritas na Tabela 2 os dados dos doadores que obtiveram sucesso no isolamento celular das CTMA.

Tabela 2 – Dados dos pacientes doadores das amostras de tecidos adiposos.

Sexo	Idade	Altura	Peso	IMC
Homem (P1)	34	1,75 m	135,50Kg	43,4 Kg/m ²
Homem (P2)	45	1,71 m	123,40 Kg	42,2 Kg/m ²
Mulher (P3)	32	1,62 m	108,600 Kg	41,38 Kg/m ²
Mulher (P4)	40	1,54 m	103,800 Kg	43,77 Kg/m ²

Fonte: A autora, 2013.

Observou-se nas coletas que os tecidos de mesma origem variavam de formato, aspecto e peso de um paciente para outro. Observou em P2 que o tecido adiposo visceral mesentérico apresentava-se em uma camada mais delgada que o mesmo tecido em P1, P3 e P4. O quadro de obesidade é estabelecido observando o Índice de Massa Corporal (IMC). Quando ele ultrapassa o valor de 40 Kg/m² o indivíduo é considerado obeso mórbido. Observou-se que P1 apresentou menor quantidade de acúmulo de gordura visceral do que P1, P2 e P3. Após três dias de isolamento celular a troca de meio se fazia necessária, devido a grande concentração de células indesejadas, como eritrócitos e plasma sanguíneo.

Sendo feita a primeira troca de meio, as próximas trocas ocorriam de acordo com o número de células na garrafa e de maneira geral era feita de 2 a 3 vezes por semana. Após o 7º dia de isolamento foi possível observar poucas células aderidas com formato fibroblastóide (Figura 6). Em avaliação da cultura, observou grande quantidade de células arredondadas e algumas células em formato fibroblastóide. Após 20 dias de cultura foi estabelecida confluência celular da monocamada de 70%.

Figura 6 – Cultura celular de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo humano.

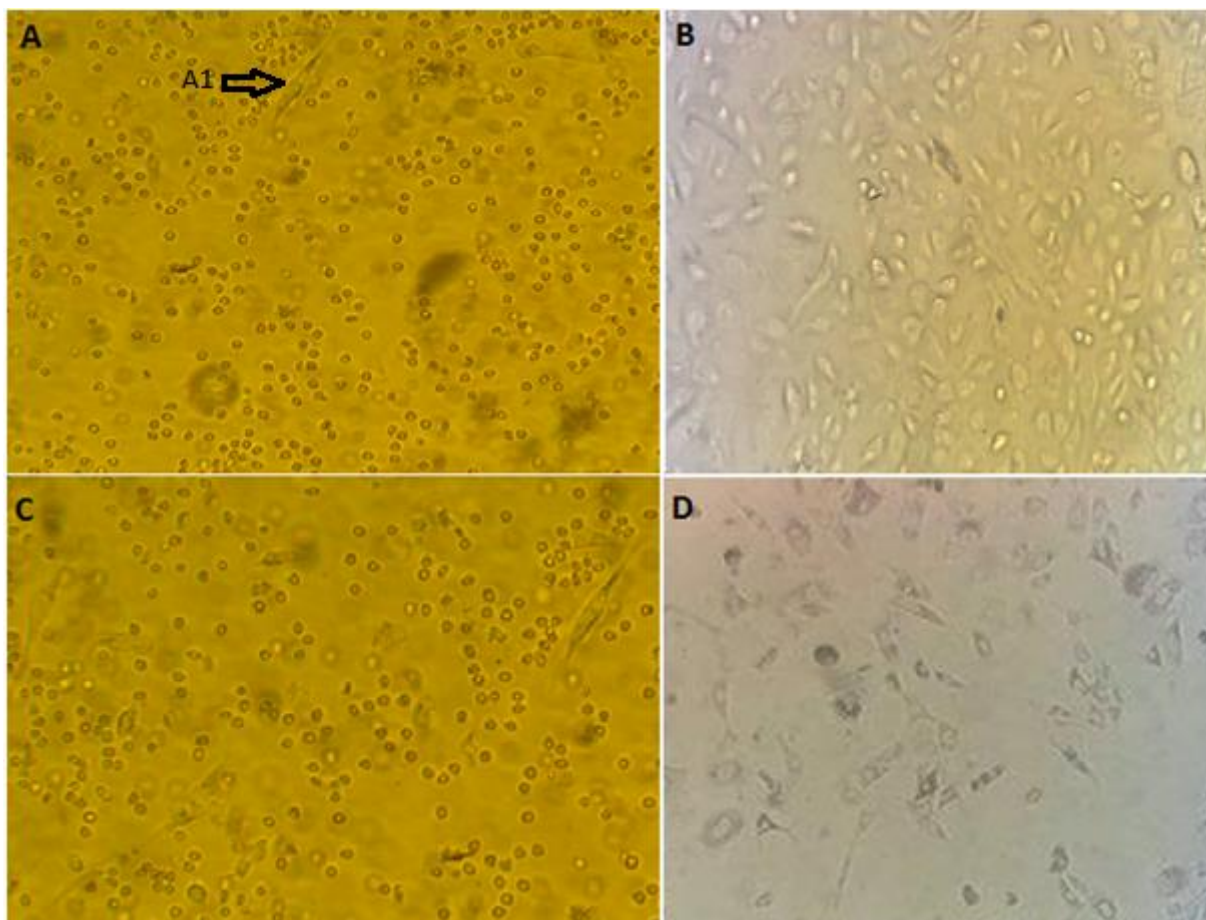


Figura A e C – Cultura de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo visceral mesentérico, 6º dia de isolamento. Figura A1 – célula-tronco mesenquimal. Figura B – Cultura de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo visceral de omento, 22º dia de isolamento. Figura D – Cultura de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo visceral de omento, 14º dia de isolamento.

Fonte: A autora, 2013.

Após o 24º dia de isolamento se fez necessário o repique celular. O meio foi descartado realizou-se dissociação da monocamada com tripsina, mensurou-se a viabilidade celular através da contagem na câmara de Neubauer com corante azul de trypan. A contagem das células é demonstrada na Tabela 3.

Tabela 3 – Crescimento celular em passagem 1 da cultura celular de CTMA humana

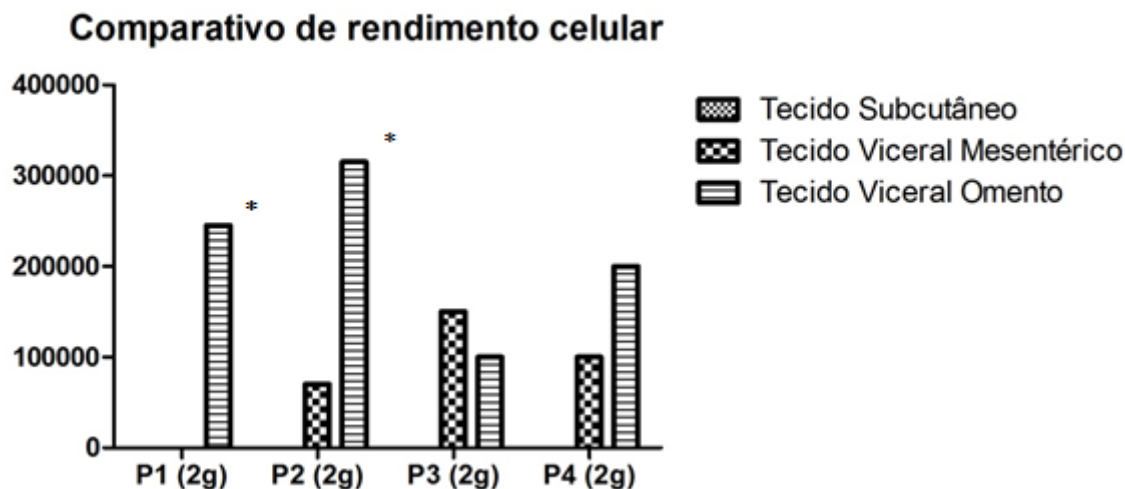
Paciente	Tecido Isolado	Tecido Isolado	Tecido Isolado
	Adiposo Subcutâneo	Adiposo Visceral Mesentérico	Adiposo Visceral Omento
P1	NS	NS	2,45x10 ⁵ c/mL
P2	NS	7x10 ⁴ c/mL	3,15x10 ⁵ c/mL
P3	NS	1,5x10 ⁵ c/mL	1x10 ⁵ c/mL
P4	NS	1x10 ⁵ c/mL	2x10 ⁵ c/mL

NS: Não significativo

Fonte: A autora, 2013.

Observa-se pelos dados da tabela que com a mesma pesagem de tecido, de 1 a 2g, as CTMA variam muito pouco, cerca de 10 a 20mil células de diferença. As CTMA variam muito pouco de um paciente para outro, mas as CTMA isoladas do tecido em comum se mantêm constante. O tecido isolado que apresentou maior crescimento celular, número de células vivas por mL, foi o tecido adiposo visceral omento, em seguida o tecido adiposo visceral mesentérico e o tecido adiposo subcutâneo nos pacientes P2 e P3 não obtiveram sucesso no isolamento e em P2 as células aderidas eram muito raras e não se estabeleceram como cultura. No gráfico 1 é demonstrado o número de células obtido para as amostras avaliadas. Amostras de tecido adiposo em P1 não estão demonstradas no gráfico devido ao dado não significativo nas amostras de tecido adiposo subcutâneo e tecido adiposo visceral mesentérico.

Gráfico 1 – Comparativo entre diferentes fontes de CTMA de tecido adiposo.



Amostras de tecido adiposo subcutâneo não obtiveram dados significativos. O tecido adiposo visceral de omento apresentou maior número de células em relação ao tecido adiposo visceral mesentérico. O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2013.

5.3 – Criopreservação

5.3.1 – Criopreservação de tecido adiposo visceral de omento

O tecido a ser criopreservado foi determinado pela maior viabilidade celular isolada a fresco. O tecido que representou maior viabilidade celular foi o tecido adiposo visceral de omento. Após as etapas de criopreservação as amostras de tecido foram rapidamente descongeladas em banho-maria á 37°C para posterior dissociação mecânica e estabelecer-se como cultura. Após 7 dias de cultura as células estabeleceram 50% de confluência. Foi mensurada a viabilidade celular das CTMAs pelo corante azul de trypan. Os dados de criopreservação estão representados na tabela 4, 5 e 6.

Tabela 4 – Crescimento celular com diferentes concentrações da Solução 1

Paciente	Substância Crioprotetora	Concentração da substância Crioprotetora	Contagem Celular
1	DMSO	3%	$2,2 \times 10^3$ cel/mL
2		4%	$3,3 \times 10^3$ cel/mL
3		5%	4×10^4 cel/mL

Fonte: A autora, 2013.

Tabela 5 – Crescimento celular com diferentes concentrações da Solução 2

Paciente	Substância Crioprotetora	Concentração da substância Crioprotetora	Contagem Celular
1	Dimetilformamida	3%	$1,9 \times 10^3$ cel/mL
2		4%	$2,4 \times 10^3$ cel/mL
3		5%	$3,5 \times 10^4$ cel/mL

Fonte: A autora, 2013.

Tabela 6 – Crescimento celular de diferentes concentrações da Solução 3

Paciente	Substância Crioprotetora	Concentração da substância Crioprotetora	Contagem Celular
1	Àc. Fórmico + Acetona	3%	1×10^3 cel/mL
2		4%	$0,5 \times 10^3$ cel/mL
3		5%	$0,6 \times 10^4$ cel/mL

Fonte: A autora, 2013.

Entre as substâncias utilizadas tanto DMSO como Dimetilformamida obtiveram sucesso como agentes crioprotetores de tecido adiposo. A concentração da solução de DMSO que obteve maior sucesso em relação ao número de células foi de 5%. A concentração da solução de Dimetilformamida que obteve maior sucesso na viabilidade celular foi de 5%. Nenhuma das concentrações da solução de Ácido fórmico + Acetona promoveu viabilidade celular significativa.

5.3.2 – Criopreservação de CTMA humana

O tecido adiposo visceral mesentérico foi dissociado mecanicamente, estabeleceu-se como cultura e após 10 dias de cultura foi realizado o teste de criopreservação. O teste piloto de criopreservação de CTMAs humanas é descrito na tabela 7.

Tabela 7 – Teste piloto de contagem celular criopreservada de CTMA

Controle	Substância Crioprotetora	Concentração da substância Crioprotetora	Contagem Celular
2,45 x 10 ⁵ cel/mL	DMSO	5%	1,34 x 10 ⁵ cel/mL
2 x 10 ⁴ cel/mL	Dimetilformamida	5%	1 x 10 ⁴ cel/mL
4 x 10 ⁴ cel/mL	Ác.fórmico+ Acetona	5%	0,5 x 10 ³ cel/mL

Fonte: A autora, 2013

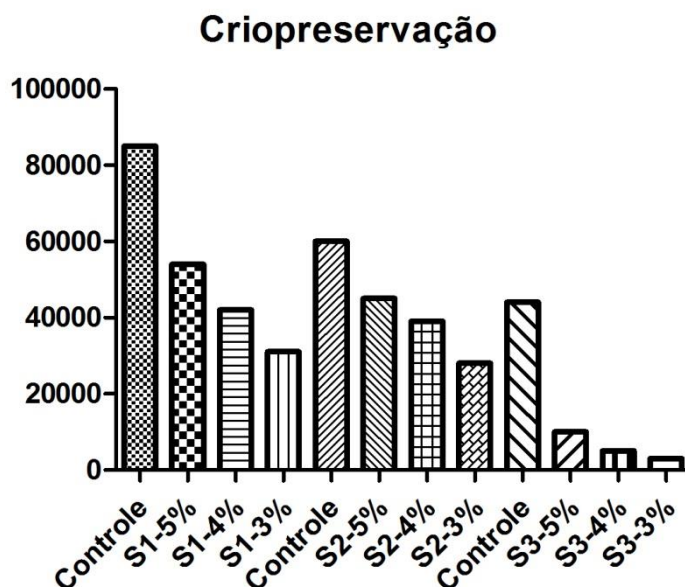
A solução crioprotetora de DMSO apresentou maior viabilidade celular em comparação com a Dimetilformamida e Ác.fórmico+ Acetona. O segundo teste crioprotetor avaliou o potencial das três soluções em três concentrações distintas. Segue os dados do teste na tabela 8 e no gráfico 2.

Tabela 8 – Contagem celular criopreservada de CTMA

Controle	Substância Crioprotetora	Concentração da substância Crioprotetora	Contagem Celular
8,5 x 10 ⁴ cel/mL	DMSO	3%	3,1x 10 ⁴ cel/mL
	DMSO	4%	3,7 x 10 ⁴ cel/mL
	DMSO	5%	4,2 x 10 ⁴ cel/mL
4,4 x 10 ⁴ cel/mL	Dimetilformamida	3%	2,8 x 10 ⁴ cel/mL
	Dimetilformamida	4%	1,9 x 10 ⁴ cel/mL
	Dimetilformamida	5%	3,6 x 10 ⁴ cel/mL
6 x 10 ⁴ cel/mL	Ác. Fórmico + Acetona	3%	1 x 10 ⁴ cel/mL
	Ác. Fórmico + Acetona	4%	0,5 x 10 ⁴ cel/mL
	Ác. Fórmico + Acetona	5%	0,3 x 10 ⁴ cel/mL

Fonte: A autora, 2013

Gráfico 2 – Crescimento celular de CTMA criopreservada



S1 – Solução de DMSO, em concentrações de 5%, 4% e 3 %. S2 – Solução de Dimetilformamida, em concentrações 5%, 4% e 3%. S3 – Solução de Ácido Fórmico + Acetona, em concentrações 5%, 4% e 3%. O limite de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Fonte: A autora, 2013.

O teste crioprotetor foi realizado com três diferentes grupos controle apontado no gráfico – 2. Segundo os dados, a substância que melhor preservou a viabilidade celular foi o DMSO em concentração 5%, em segundo a Dimetilformamida em concentração 5%. O crioprotetor Ácido Fórmico + Acetona não apresentou dados significativos de preservação de viabilidade celular.

6 – DISCUSSÃO

6.1 Padronização do protocolo de isolamento e cultivo de CTMA humana

A revisão de Carvalho (2012) relata que muitos pesquisadores adaptam o protocolo de cultura primária, de células-tronco mesenquimais, de acordo com o tipo celular a ser trabalhado. Bernardi (2009) associa dissociação enzimática com collagenase tipo I à dissociação mecânica para isolamento de células-tronco provenientes de dentes decíduos humanos. Zuk (2001) trabalha com células-tronco mesenquimais de lipoaspirado humano, não com um tipo de tecido isolado, utiliza técnica enzimática de dissociação e Gimble (2007) associa dissociação mecânica com dissociação enzimática.

Em comparação com as técnicas utilizadas na Tabela-1 o protocolo que melhor se adapta ao isolamento de CTMA é a dissociação mecânica. Segundo Aguiar (2011) a técnica de cultura de explante com isolamento enzimático para linhagens mesenquimais de pericítos cardíacos humanos obteve um sucesso de 85%. Em isolamento enzimático de cordão umbilical em Cutias, Pessoa (2002) relata o sucesso de 89% da viabilidade de células-tronco mesenquimais de cordão. Inicialmente a cultura de explante forneceu indícios de que seria a melhor técnica de isolamento celular a ser trabalhada, devido ao desprendimento das células do tecido, migração e adesão ao substrato do frasco de cultura. Após dois dias foi observado que o explante do tecido adiposo permanecia parte submersa e parte sobrenadante, formou-se uma porção fibrosa no tecido o que propiciava a migração celular e a não aderência à garrafa de cultura. Outra hipótese do insucesso da técnica para isolamento das CTMAs pode ser explicado pela influência dos ácidos graxos na resposta imune e de cicatrização. Estes efeitos têm sido estudados desde o início dos anos 70. Sabe-se que esses metabólitos interferem em diversos passos do processo inflamatório como contração vascular, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular, sendo que a maioria desses eventos ocorre via derivados

do ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (MAY, CALDER, 1993; ZIBOH et al., 2000; O'SHEA, 2004). Por se tratarem de pacientes obesos, a dificuldade de se estabelecer a cultura de CTMA por cultura de explante, pode ter sido influenciada levando em consideração a dieta rica em ácidos graxos dos pacientes. Dietas ricas em ácidos graxos causam diminuição na produção de fatores de crescimento, adesão celular, inibem a proliferação de linfócitos isolados do linfonodo mesentérico. Vale ressaltar também que a falta de ácidos graxos essenciais acarreta disfunções no processo de cicatrização (CALDER, et al., 1991, 2003).

A técnica de isolamento celular de CTMA pelo procedimento de dissociação enzimática obteve 25% de sucesso. Segundo Aguiar (2010), a utilização da técnica em isolamento celular de linhagens mesenquimáticas de pericitos cardíacos utilizando colagenase tipos I e II obtiveram média de 42% de sucesso. Crepaldi e colaboradores (2013) não relatam em porcentagem, mas descrevem sucesso no co-cultivo de neurônios e células-tronco progenitoras, descritas como neuroesferas, utilizando dissociação enzimática: dissociação por Tripsina associado à dissociação mecânica com auxílio de pipeta. As amostras dos pacientes 3 e 4 obtiveram algumas células isoladas, porém ao passar das trocas de meios de cultura as células com formatos fibroblastóides (primeira característica de célula-tronco mesenquimal) eram inexistentes ou muito poucas que não se estabeleceram como cultura.

A técnica de isolamento celular pelo procedimento de dissociação mecânica obteve sucesso em 50% das amostras, optou-se pela utilização desta técnica para as demais etapas da realização do projeto, por apresentar menor custo e uma menor influência de substâncias enzimáticas para utilização em terapia celular. O protocolo inicial de Inácio (2011) utilizado para isolamento de CTMA de animais foi adaptado para o isolamento de CTMA humanas.

6.2 Isolamento da CTMA pela técnica da dissociação mecânica

A fonte de células-tronco adultas humanas mais bem estudadas e utilizadas em terapia celular são as provenientes de medula óssea. Contudo a opção de se trabalhar com células-tronco provenientes de tecido adiposo estromal humano foi devido à taxa de viabilidade celular de células-tronco em medula óssea extremamente baixa, 0,01 – 0,001%, em relação à viabilidade celular proveniente da fonte tecido adiposo de 0,5% (DE UGARTE, 2003; CARVALHO, 2012). Outro fator importante é o acesso facilitado à fonte, visto que em cirurgia bariátrica com a técnica utilizada, a gordura visceral de omento e mesentérica são normalmente descartadas. Isso torna uma coleta não invasiva ao doador. Segundo a Cruz

Vermelha Brasileira (2011) a população de obesos ultrapassa 1,5 bilhões de pessoas, o que impulsionou a presente pesquisa básica a fim de elucidar futuras aplicações de terapia celular a pacientes não somente obesos, mas na maioria dos casos com comorbidades associadas. De acordo com a Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabologia (SBCBM), em 2003 foram realizadas 16.000 cirurgias no país, enquanto, que em 2010, este número alcançou 60.000 operações. Mais de 300% em sete anos (BAPTISTA, 2013). Devido ao grande número de cirurgias realizadas em todo o país, os tecidos descartados podem ser reaproveitados e se tornam uma fonte viável de estudos com células-tronco de pacientes com o perfil da presente pesquisa

Todos os pacientes submetidos à pesquisa eram obesos e com comorbidades associadas: hipertensão e diabetes, não há relatos de tabagismo e de consumo alcóolico nem de outras doenças associadas. Na literatura há pouco ou nenhum relato de isolamento de CTMA de pacientes com este perfil. Segundo Zuk (2001,2002), Gimble (2007), Barry (2004) e Carvalho (2012) a população residente de células-tronco mesenquimais, isoladas de lipoaspirado humano e medula óssea humana, podem variar de acordo com idade, sexo, entre outros fatores e a capacidade de diferenciação destas células parece ser mantida de acordo com a idade (SHI, 2005).

Observou-se nas coletas que os tecidos de mesma origem variavam de formato, aspecto e peso de um paciente para outro. Observou em P2 que o tecido adiposo visceral mesentérico apresentava-se em uma camada mais delgada que o mesmo tecido em P1, P3 e P4. O que pode representar um menor acúmulo de gordura visceral na região mesentérica. O quadro de obesidade é estabelecido observando o Índice de Massa Corporal (IMC). Quando ele ultrapassa o valor de 40 Kg/m^2 o indivíduo é considerado obeso mórbido, mas nem sempre esse índice pode representar a taxa real de gordura corporal. Há diferenças entre idades, diferenças nas regiões que acumulam tecido gorduroso entre homens e mulheres e diferenças em relação à pré-disposição á doenças de acúmulo de gordura em regiões subcutâneas e viscerais. Suplicy (2000) relata que em indivíduos obesos o acúmulo de gordura visceral, em torno de órgão e tecidos vitais, o que torna um risco á doenças metabólicas e principalmente cardíacas. O acúmulo de gordura visceral é associado também ao câncer de próstata, cólon e mama (VON HAFE, 2004). Em média a pré-disposição ao acúmulo de gordura visceral em homens é maior do que em mulheres. As mulheres tendem a acumular mais gordura subcutânea do que visceral e em regiões do corpo como nádegas e abdome (LUFT, 2010). Outra relação de risco do acúmulo de gordura visceral é a pré-disposição de doenças como síndrome metabólica, diabetes, hipertensão entre outros

(BERGMAN, 2006; GOODPASTER, 2003; HERMANS, 2005; CARNEIRO, 2003). Cannon e colaboradores (2004) relatam a relação tanto do acúmulo de gordura visceral como gordura subcutânea com disfunções metabólicas e endócrinas entre outras. Em dados da pesquisa P1 apresentou menor quantidade de acúmulo de gordura visceral do que P1, P2 e P3 e todos os pacientes, sendo obesos, apresentam doenças como hipertensão e diabetes, além de outras não mencionadas pelos pacientes corroborando com dados dos autores citados. O tecido adiposo é altamente complexo, suas funções não foram totalmente desvendadas nem o impacto que seu desequilíbrio causa no organismo, sabe-se que a presença de outras células como fibroblastos, músculos lisos, células endoteliais e células de defesa presentes nesse tecido tem seu papel vital, mas não há conhecimento aprofundado de como é estabelecida estas relações fisiológicas (FRUHBECK, 2001). Com dados da pesquisa pode-se avaliar que há diferenças entre os pacientes em relação ao acúmulo de gordura visceral e a relação da obesidade com doenças associadas, mas se faz necessária à investigação futura a nível molecular a fim de elucidar relações diretas de obesidade, acúmulo de gordura visceral e impacto deste quadro em relação às doenças. A relação da obesidade com a distribuição de tecido adiposo no organismo é sugerido pelo estudo com células-tronco provenientes de tecido adiposo que, segundo Baglioni (2012), podem ter relação com o aumento da taxa celular adiposa no tecido. Gimble (2007) relata a possível proliferação de células adiposas a partir de um pool de células-tronco, investigando pacientes que sofreram drástica redução de peso por cirurgia, dieta ou exercício e que retornaram ao seu peso inicial. Segundo a pesquisa não somente o volume adiposo teve aumento como a quantidade de células adiposas no local. Além destes estudos Osborne (2000), Toda (2009) e Sonoda (2008) defendem a relação da adipogênese com atividade funcional das células-tronco residentes.

As culturas de células de todos os pacientes demoravam certo tempo para que se atingisse a confluência da monocamada. Pesquisas de CTMA isoladas em lipoaspirado (YARAK, 2010), (ZUK, 2001) apontavam confluência em 7 dias diferentemente das amostras de pacientes obesos que apontaram de 20 a 30 dias para atingir seu estado confluyente. Observa-se pelos dados da tabela que com a mesma pesagem de tecido, de 1 a 2g, as CTMA variam muito pouco, cerca de 10 a 20mil células (mL) de diferença. As CTMA variam muito pouco de um paciente para outro, mas as CTMA isoladas do tecido em comum se mantêm constante. O tecido isolado que apresentou maior viabilidade celular foi o tecido adiposo visceral omento, em seguida o tecido adiposo visceral mesentérico e o tecido adiposo subcutâneo nos pacientes P1 e P3 não obtiveram sucesso no isolamento e no P2 as células aderidas eram muito raras e não se estabeleceram como cultura. Segundo Gimble (2007) não

há estudos que descrevam qual fonte de células-tronco mesenquimais têm maior rendimento. Sua pesquisa relatou que em humanos as CTMAs apresentam maior taxa celular em fontes subcutâneas na região do braço do que abdome e peito.

Das 10 tentativas de isolamento celular, obteve-se sucesso em 40% das amostras. Dentre as técnicas utilizadas, a técnica de isolamento celular por dissociação mecânica demonstrou melhor desempenho comparada à técnica de isolamento celular com enzima collagenase tipo 1. A dissociação por collagenase obteve um desprendimento das células do tecido, mas a grande quantidade de ácidos graxos, provenientes da reserva celular, livres no meio dificultaram o crescimento e desenvolvimento da cultura de alguma forma. As amostras que não obtiveram sucesso apresentaram os seguintes problemas: adaptação aos diferentes tipos de meios de cultura (DMEM, α -MEM, DMEM-F12) até se estabelecer meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina, muito pouca quantidade de tecido e principalmente contaminação por fungos ou bactérias. Conforme estabelecida a cultura celular a diferença no tempo de confluência foi um fator significativo. Segundo Yarak (2010) e Zuk (2001) o tempo de confluência das células-tronco provenientes de lipoaspirado humano é estabelecida em sete dias sendo que na presente pesquisa a confluência foi atingida de 20 a 30 dias. Os autores têm como hipótese que o quadro fisiológico inflamatório = aumento da liberação de citocinas pelas células adiposas acumuladas, perfil dos pacientes da pesquisa, possa dificultar processos de cicatrização, expansão celular e de desenvolvimento destas células tanto *in vivo* (XU, 2003) como *in vitro*. Segundo Bergman (2006) as citocinas liberadas em excesso pelo acúmulo de tecido adiposo pode interferir no metabolismo, atividades do sistema nervoso entre outros mecanismos hormonais e fisiológicos do indivíduo. As culturas de CTMAs se mantiveram como cultura até a 3 passagem, ou seja, a célula isolada de uma cultura primária está em passagem p0, quando a cultura atinge confluência de 70% é realizado o primeiro repique celular. É dividido o número de células em outras 2 garrafas de cultura, então dizemos que a cultura está em passagem p1, na próxima p2 e assim por diante. Células-tronco embrionárias podem ser trabalhadas em até 60 passagens ou mais (DONADIO, 2005). Não há relatos de quantas passagens CTMA de lipoaspirado pode chegar, mas o que se sabe é que com o aumento da divisão celular pode haver mudanças nas características fenotípicas das células devido às mutações. Pode ocorrer também envelhecimento precoce celular devido ao encurtamento do telômero no processo de divisão celular (JOSEPHON, 2006).

6.3 – Criopreservação de tecido adiposo visceral de omento e CTMA humana

As células-tronco mesenquimais mais utilizadas em terapia celular são provenientes de medula óssea (CHODHERY, BADOWSKI, et al.; 2013). A utilização das células-tronco mesenquimais tem um tempo de vida útil, quando cultivadas em laboratório. Buscando novas fontes de células-tronco mesenquimais os bancos de sangue de cordão umbilical envolvem um número de passos que exigem aderência às boas práticas laboratoriais e de produção para assegurar que sangue de cordão eficaz e seguro possa ser oferecido em centros de transplantes. Todo o processo de armazenamento e criopreservação deve ser otimizado para conservar a qualidade e viabilidade das células-tronco hematopoiéticas (WARWICK, ARMITAGE, 2004). O processo de criopreservação celular reduz seu metabolismo à quase zero, mas não o elimina por completo o que pode tornar-se uma alternativa viável para otimizar a viabilidade celular e disponibilizar a utilização destas células em terapias celulares por anos. Segundo Gunning (2005) a primeira amostra coletada de cordão permanece intacta por 15anos.

Para que o processo de criopreservação celular obtenha sucesso se faz necessária a avaliação e otimização do protocolo para cada tipo celular a ser criopreservado. Além da técnica é necessário avaliar os agentes crioprotetores, que poderão impedir a morte celular e preservar a viabilidade celular. Um bom crioprotetor deve possuir um baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e principalmente uma baixa toxicidade (FULLER, 2004 apud NASH, 1966). Nos ensaios de criopreservação celular o crioprotetor mais utilizado é o DMSO. Ele é um poderoso agente penetrante na membrana celular. Em células espermáticas foi descrito que sua ação envolve a ligação de hidrogênios com moléculas de água redirecionando-as e transformando um ambiente menos nocivo para as células (DALIMATA, GRAHAM, 1997), mas ele apresenta alta citotoxicidade (ASHWOOD-SMITH, 1988). O ácido fórmico é um constituinte natural dos tecidos animais e do sangue, importante nos processos de transferência de unidades de carbono geradas principalmente no metabolismo de aminoácidos é solúvel em água (VIOLA, 2006). Apesar de tóxica, a acetona pode ser encontrada no ambiente nas mais diferentes formas como em água, fumo e até algumas plantas praticamente em condições estáveis em condições ambientais. Solúvel em água e em doses moderadas o organismo humano desenvolveu mecanismos de eliminá-la (RIBEIRO, 2012). Outra substância com potencial crioprotetor é a dimetilformamida. Muito utilizada em criopreservação de sêmen animal, ela se destaca por preservar a motilidade nos flagelos de espermatozoides (KEITH, 2004). A dimetilformamida pode apresentar até três sítios de

ligação com a água, maior solubilidade e maior poder de penetração celular (NASH, 1996). Não é descrito em literatura, agentes crioprotetores de CTMAs de fontes diferentes de lipoaspirado humano, nem criopreservação de tecido adiposo a fim de isolamento celular de células-tronco.

Observando os resultados dos agentes crioprotetores, a solução de ácido fórmico + acetona não demonstrou dados significativos nas três concentrações. Os crioprotetores, DMSO e dimetilformamida mostraram potencial crioprotetor tanto em preservação da viabilidade de células-tronco isoladas como no tecido. Em criopreservação tecidual tanto o DMSO como a dimetilformamida obtiveram sucesso em concentração 5%. Em criopreservação celular a solução de DMSO apresentou sucesso de 49% e a solução de dimetilformamida apresentou sucesso de 81%. A queda de viabilidade celular após criopreservação pode ser explicada pela quantidade de células criopreservadas ter sido abaixo de 1×10^6 , quantidade recomendada para criopreservação (NASH, 1996). A dimetilformamida mostrou um alto potencial crioprotetor de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo estromal.

6.4 – Perspectivas e impactos esperados

A doação de órgãos em todo país pode minimizar o quadro de pacientes que aguardam um transplante, mas ele por si só não irá extinguir o problema da escassez de doadores para as mais diversas situações que requerem o transplante de órgãos. Desta forma, a escassez de doadores, incompatibilidade, rejeição imunológica e um alto custo governamental (GARCIA, 2013) são algumas das limitações ao transplante. A terapia celular pode representar um grande potencial para transplantes, regeneração tecidual (PEREIRA, 2008), além de terapia celular associada a outros procedimentos terapêuticos. Células-tronco isoladas de medula óssea representam grande sucesso em terapia celular, mas nem sempre as barreiras de compatibilidade e baixa taxa celular é superada.

As pesquisas básicas de novas fontes de células-tronco se fazem importantes para minimizar essas barreiras. Com a possibilidade de isolamento celular de fontes do próprio paciente, a barreira de compatibilidade é quebrada. O tecido adiposo possui taxa de viabilidade superior ao de medula óssea e pode representar maior disponibilidade de células-tronco para terapia celular. A técnica de dissociação mecânica se mostrou eficiente no isolamento de células-tronco e pode ser utilizada na tentativa de isolamento de outras células, visto que é uma técnica barata. Se faz necessário estudos futuros de otimização da viabilidade

celular, para expansão em grande escala e possibilidade de terapia, além de estudos básicos de crescimento e viabilidade de células-tronco de pacientes obesos e ou com doenças associadas. Devem ser realizados testes futuros de caracterização das células-tronco de pacientes obesos a fim de confirmar os dados. A presente pesquisa norteia o enfoque da terapia celular aplicada á pacientes portadores de distúrbios metabólicos como a obesidade. As células-tronco destes pacientes apresentam a possibilidade de crescimento e expansão celular *in vitro*, mas o desenvolvimento da cultura e impactos fisiológicos de futuras terapias necessita de estudos complementares.

7 – CONCLUSÃO

O isolamento de células-tronco provenientes de tecido adiposo de pacientes obesos se mostrou possível em laboratório, nosso estudo demonstrou o melhor método para obtenção de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo foi à dissociação mecânica com sucesso de isolamento celular em 40% das amostras avaliadas. A taxa de crescimento celular de células-tronco mesenquimais provenientes de tecido adiposo visceral apresentou maior taxa em relação ao tecido adiposo subcutâneo. A dimetilformamida mostrou potencial alternativo crioprotetor tanto em CTMAs isoladas como em tecido adiposo. O DMSO apresentou bom potencial crioprotetor como já descrito em literatura.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, A.M.; Isolamento, caracterização, ativação e diferenciação em linhagens mesenquimais de pericitos cardíacos humanos. **Tese**. Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual do Paraná. 2011.

ALVARENGA, M.; PAPA, F.O.; LADIM-ALVARENGA, F.C.; MEDERROS, A.S.L.; Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*. n.89, p.105-113, 2005.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S.; Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metabolic**. n.11, p. 327 – 332, 2000.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W.; Principles of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of equine Veterinary Science*. v.7, p. 145-173, 1987.

ASHWOOD-SMITH, M.J.; MORRIS, G.W.; FOWLER, R.; APPLETON, T.C.; ASHORN, R.; Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedures. **Human reproduction**. v.3, p.795-802, 1988.

BARRY, F.P.; MURPHY, J.M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol**. n. 36, p. 568-841, 2004.

BAPTISTA, L.S.; SILVA, K.R.; PEDROSA, C.S.G.; SILVA, C.C.; CARNEIRO, J. R.I.; ANICETO, M.; COELHO, V.M.; TAKIYA, C.M.; ROSSI, M.I.D.; BOROJEVIC, R.; Adiposo tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in Blood Vessel content and resident mesenchymal stem cell population. 2013.

BARKER, J.N.; WAGNER, J.E.; Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. **Nature Reviews**. n.3, p.526-532, 2003.

BERNARDI, L.; Células-tronco da polpa de dentes decíduas humanas isolamento relacionado á rizólise dentária. **Pesquisa em base de dados: Biblioteca virtual em saúde**. Porto Alegre. 2009.

BIEBACK, K.; HECKER, A.; KROCAO, A.; HEINRICH, L.; SCHALLMOSER, K.; STRUNK, D.; Human of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**. n.27, p.2331-2341, 2009.

BIRKEDAL-HANSEN.; Matriz Mettaloproteinases: A review. **Critical Review in Oralbiology and Medicine**. v.4, n.2, p.197-230, 1993.

BUCHNER, E.; Cell-free Fermentation. Nobel Lecture, 1907. Elsevier Publishing Company. Disponível em: <<<http://nobelprize.org/nobel-prizes/chemistry/laureates/1907//buchner-lecture.html>>> Acesso em: 06/07/2013.

BLAGLIONI, S.; CANTINI, G.; POLI.; FRANCALANCI, M.; SQUECCO, R.; DI FRANCO, A.; BORGOGNI, E.; FRONTERA, S.; NESI, G.; LIOTTA, F.; LUCCHESI, M.; PERIGLI, G.; FRANCINI, F.; FORTI, G.; SERIO, M.; LUCONI, M.; Functional Differences in Visceral and Subcutaneous Fat Pads Originate from Differences in the Adipose Stem Cell. **Journal list, Published online**. n.5, v. 7, 2012.

BRAY, A.; JOHSON, H.; RAFF, L.; WALTER, R.; **Fundamentos da Biologia Celular**. 3ª edição. Editora Artmed. 2011. P.100-120.

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

CALDER, P.C.; BEVAN, S.J.; NEWSHOLMG, E.A.; The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid – independent mechanism. **Imunology**. n.75, p.108-115, 1991.

CALDER, P.C.; Long-Chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. n.36, p.433-446, 2003.

CREPALDI, C.R.; MERIGHE, G.K.F.; LAURE, H.J.; ROSA, J.C.; MEIRELLES, F.V.; CESAR, M.C.; Isolamento e cultivo de neurônios e neuroesferas de córtex cerebral aviar. **Pesq. Vet. Brasileira**. n.33, p.45-50, 2013.

CARBALLO, J.; Biotecnologia e alimentos transgênicos. Ciência e Tecnologia Alimentaria, Sociedade Mexicana de Nutrição y Tecnología. v.3, n.5, p.314-321, 2002.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J.; Brown Adipose tissue: Function and Physiological Significance. **Physiological Reviews**. v. 84, p.277-359, 2004.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **J Cell Biochem**. n. 98, p. 1076-1084, 2006.

CARREL, A.; BURROWS, M.T.; Cultivation of adult tissues and organs outside the body. **JAMA**. v.55, p.1379-1381, 1910.

CARVALHO, A.C.C.; GOLDENBERG, R.C.S.; **Células-tronco Mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações**. Atheneu, São Paulo, 2012. p. 2 – 31, p. 80 – 101.

CHAVALI, S.R.; ZHONG, W.W.; FORSE, R.A.; Dietary alpha-linolenic acid increases TNF-alpha and decreases IL-6, IL-10 in response to LPS effects of sesamin on the delta-5 desaturation of omega6 and omega3 fatty acids in mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. n.58, p.185-191, 1998.

CHONG, J.J.H.; YANG, X.; DON, C.W.; MINAMI, E.; LIU, Y.W.; WEYERS, J.J.; MAHONEY, W.M.J.; BIBER, B.V.; PALPANT, N.J.; GANTZ, J.A.; FUGARETE, J.A.; MUSKHELI, V.; GOUGH, G.M.; VOGEL, K.W.; ASTLEY, C.A.; HOTCHKISS, C.E.; BALDESSARI, A.; PABON, L.; REINECKE, H.; GILL, E.A.; NELSON, V.; KIEM, H.P.; LAFAMME, A.; MURRY, C.E.; Human embryonic stem-cell derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. **Nature**. v.000, 13233-13249, 2014.

CHOUDHERY, M.S.; BADOWSKI, M.; MUISE, A.; PIERCE, J.; J HARRIS, D.T.; Cryopreservation of whole adipose tissue for future use in regenerative medicine. **Journal of surgical research**. n.187, p.24-35, 2013.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Manole. São Paulo, 2002. p. 5 – 15.

CRUZ, M.E.M.; MARTINS.; M.B.; CARMO, M.L.; GASPAR, M.M.; OLIVEIRA, E.M.M.; FERRARA, M.A.; **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro. Editora Interciência. p. 307-331, 2008.

CRUZ VERMELHA, Número de obesos no mundo supera o de famintos. **Ciência e Saúde**. 2011. Disponível em: [http: <www.cvb.org.br/média>](http://www.cvb.org.br/média) Acesso em: 22/11/2013.

DALIMATA, A.M.; GRAHAM, J.K.; Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetomide in combination with thehalose and methyl cellulose. **Theriogenology**. n.49, p.831-841, 1997.

DELLAVALLE, A.; Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. **Nature Cell**. v.9, n.3, p.255-267, 2007.

DE LUCA, P.; ROSSETI, R.G.; ALAVIAN, C.; KARIM, P.; ZURIER, R.B.; Effects of gammalinolenic acid on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha secretion by stimulated human peripheral blood monocytes. **Journal Investig. Medicine**. n.47, p.246-250, 1999.

DE UGARTE, D.A.; ALFONSO, Z.; ZUK, P.A.; ELBARBARY, A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. **Immunol Lett**. n. 89, p. 267 – 270, 2009.

DOMINICI, M. LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER – CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. Greenville, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

ENGELFRIET, C.P.; Use of cord blood progenitor cells as an alternative for bone marrow transplantation. **Vox Sanguinis**. v.75, p.156-172, 1998.

FAHY, G.M.; The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. **Cryobiology**. v.23, p.1-13, 1986.

FERNANDES, P.M.; SAMANO, M.N.; JUNQUEIRA, J.J.; WAISBERG, D.R.; NOLETO, G.S.; JANETE, F.B.; Perfil do doador de pulmão disponibilizado do estado de São Paulo, Brazil em 2006. **Jornal Brasileiro Pneumologia**. N.34, p.497-505, 2008.

FLEMING, D.R.; RAYENS, M. K.; GARRISON, J.; Impact of obesity on allogeneic stem cell transplant patients: A matched case-controlled study. **American Journal of Medicine**. v.102, p.265-268, 1997.

FRAGA, A.M.; SUKOYAN, M.; RAJAN, P.; BRAGA, D.P.A.F.; LACONELLI, A.J.; FRANCO, J.G.J.; BORGES, E.J.; PEREIRA, L.V.; Establishment of a Brazilian Line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell transplantation**. v.20, p. 431-440, 2010.

FRESHNEY, R.I.; **Culture of animal cells, a manual of basic technique**. Ed. Hoboken, 5ª edição. 2005. p-100-120.

FRIENDSTEIN. AJ, PIATEZKY, S.; PETRAKOVA, K,V. Osteogenesis in transplants of BM cells. **J Embryol Exp Morphol**. v.16, p. 381–90, 1966.

GARCIA, V.D.; RBT – **Registro Brasileiro de Transplantes**. 2009. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov02/portugues/populacao/rbt/anoXV_n3/index.aspx?idcategoria=2>> Acesso em: 14/04/2013.

GIMBLE, J.M.; KATZ, A.J.; BUNNELL, B.A.; Adipose – derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation Research**. n. 100, p. 1249-1260, 2007.

GREGOIRE, F.M.; SMAS, C.M.; SUL, H.S.; Understanding Adipocyte Differentiation. **American Physiological Reviews**. v.78, p.783-809, 1998.

GUNNING, J.; Umbilical cord cell banking-implications for the future. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.207, p.538-543, 2005.

GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C.D.; BUZNEY, E.A.; KHAN, M.K.; FLINT, A.F.; KUNKEL, L.M.; MULLIGAN, R.C.; DYSTROPHIN.; Expression in the max mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**. n.401, p.390-394, 1999.

GONDA, K.M.D.; SHIGEURA, T.M.S.; SATO, T.M.S.; MATSUMOTO, D.M.D.; SUGA, H.M.D.; INOUE, K.M.D, AOI, N.M.D.; KATO, H.M.D.; SATO, K.M.D.; MURASE, S.; KOSHIMA, I.M.D.; YOSHIMUDA, M.D.; Preserved proliferative capacity and multipotency of human adipose-derived stem cells after long-term. **Cryopreservation Plastic e Reconstructive Surgery**. v.121.p.401-410, 2008.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R.; Review article nuclear reprogramming and pluripotency. **Nature**. v.441, p.1061-1067, 2006.

HORWITZ, E.; M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER – LAPER – CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.; J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v.7, p. 393-395, 2005.

HUBEL, A.; NORMAN, J.; DARR, T.B.; Cryobiophysical characteristics of genetically modified hematopoietic progenitor cells. **Cryobiology**. P.140-153, 1999.

JAAKKOLA, P.; KOUTUSARI, S.; KAUPPI, T.; MART, A.; JALKANEN, M.; Wound reepithelialization activates a growth factor responsive enhancer in migrating keratinocytes. **The FASEB Journal**. v. 12, p.959-969, 1998.

JAY, J.M.; **Modern food microbiology**. 6ª Edição. Aspen Publication. 2000. p.200-213.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.; Hemocitopoiese. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 1990. p. 188 – 199.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan. 7ª ed. 2008. p. 240-320.

KAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAYA, T.; AOI, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N.; YAMANAKA, S.; Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nature biotechnology**. n.26, p.101-106, 2008.

KATZ, A.; J.; THOLPADY, S.S.; SHANG, H.; OGLE, R.C. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. **Stem Cells**. n. 23, p. 412-423, 2005.

KEITH, H.; Genetic integrity of cryopreserved plant cells: A review. **Cryolletters**. v. 28, n.1, p.3-22, 2004.

KEIRSTEAD, H.S.; NISTOR, G.; BERNAL, G.; TOTOIO, M.; CLOUTIER, F.; SHARP, K.; STEWARD, O.; Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. **The Journal of Neuroscience**. n.25, p. 4694-4705, 2005.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**. n. 24, p. 294 – 301.

KERR, J.B. **Atlas de Histologia Funcional**. Artes Médicas LTDA. 1º Edição. São Paulo. 1998. p. 59 – 81.

KLINGBEIL, M.F.G.; Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos. **Tese**. Instituto de pesquisas energéticas e nucleares de São Paulo. p.35-40, 2006.

KRAUSE, D.S.; THEISE, N.D.; COLLECTOR, M.I.; HENEGARIU, O.; HWANG, S.; GARDNER, R.; NEUTZEL, S.; SHARKIS, S.J.; Multi-organ, multilinage engraftment by a single bone marrow-derived stem-cell. **Cell**. n.105, p.369-377, 2001.

LÉO, P., GALESI, A., SUAZO, C., MORAES, A. **Células animais: conceitos básicos. Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica**. São Paulo: Roca; 2008. p. 15-41.

LI, W.; A novel method of isolation, preservation and expansion of human corneal endothelial cells. *Investigative Ophthalmology*. **Visual Science**. v. 48, n.2, p. 614-620, 2007.

LIMA, C.A.; Production of a collagenase from *Candida albicans*. **Biochemical Engineering Journal**. v.43, p.315-320, 2009.

LUFT, V.C.; Obesidade e Diabetes: Contribuição de processos inflamatórios e adipocitocinas e a potencial importância de fatores nutricionais. **Tese**. Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

LUGER, S.; SACKS, N. Bone marrow transplantation for myelodysplastic syndrome - who? when? and which?. **Bone Marrow Transplantation**. v.30, n.4, p. 199-206.

MACKENZIE, I.C.; FUSENINGE, N.E.; Regeneration of Organized epithelial structure. **The Journal of investigative dermatology**. n.81, p. 189-194, 1983.

MANNELLO, F.; TONTI, G.A.; Concise Review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture conditioned medium, feeder layer, or feeder-free: medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad Hoc formula? All That Glitters is not gold!. **Stem Cells**. v.25, p.1603-1609, 2007.

MANUTENÇÃO DE LINHAGENS DE CÉLULAS ANIMAIS. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual da qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

MASTERS, J.R.; Hela cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature**. *Revi. Cancer*. n.2, p.315-319, 2002.

MAZUR, P.; Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal Physiology**. P.347-369, 1963.

MAY, C.L.; CALDER, P.C.; Unsaturated fatty acids inhibit lymphocyte protein Kinase C activity. **Biochem Soc. Trans**. n.21, p.377-400, 1993.

MAZUR, P.; Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. **Journal gen. physiology**. p.347-369, 1963.

Mc GEE, G.; CAPLAN, A.; **Human embryonic stem cell debate: Science, ethics and public policy**. Basic biolthics. Series Editorial Board. 2001. p.100-120

MERYMAN, H.T.; Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. **Criobiology**. p.489-500, 1971.

MOLINARO, E.M.; CAPUTO, L.F.G.; AMENDOEIRA, M.R.R.; **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Instituto Oswaldo Cruz. v.2, p.180-189, 2000.

NASH, 1966. FULLER, B.; PAYNTER, S.; **Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine**. v.9, p.680-691, 2004.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Stem cells: scientific progress and future research directions**. p. 222, 2001. Disponível em: <
<http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/fullrptstem.pdf> >. Acesso em março de 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. **Regenerative Medicine**. 2006. 106 p. Disponível em: <
http://stemcells.nih.gov/staticresources/info/scireport/PDFs/Regenerative_Medicine_2006.pdf >. Acesso em julho de 2012.

NERI,D. **A Bioética em Laboratório: células-tronco, clonagem e saúde humana**. Loyola. São Paulo. 2004. p. 23 – 158.

NETTER, F.H.; **Atlas de Anatomia Humana**. 5ªEdição. Editora: Elsevier. 2011. p.200-222.

OSBOARNE, T.F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPS): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action. **J Biol Chem**. n. 275, p. 32379-82. 2000.

O'SHEA, M.; BASSAGANYA, R.; MOHEDE, I.C.; Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. **Journal Clin. Nutri**. n.79, p.1199-1206, 2004.

PLANAT – BERNARD, V.; SILVESTRE, J.S.; COUSIN, B.; ANDRE, M.; NIBBELINK, M.; TAMARAT, R.; CLERGUE, M.; MANNEVILLE, C.; SAILLAN-BARREAU, C.; DURIEZ,M.; TEDGUI, A.; LEVY, B.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**. n. 109, p. 656-663, 2004.

PEREIRA, L.V.; A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.13, n.1, 2008.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.283. 2005.

PESSOA, G.T.; ALVES, F.R.; CARVALHO, V.K.P.; CARVALHO, M.A.M.; Expansão, cultivo e caracterização in vitro de CTM de cordão umbilical de Cutias (*Dasyprocta prymnolopha*, Wagler 1831). **Tese**. UFPI. 2002.

PITTENGER, M.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.; D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D.; W.; CRAIG, S. MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. Cambridge, n. 5411 v. 284, p. 143-7, 1999.

PHINNEY, D.G.; PROCKOP, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells** n.25, p.2896-2902, 2007.

REBELATTO, C.K., AGUIAR, A.M.; MORRETAO, M.P.; SENEGAGLIA, A.C.; HANSEN, P.; BARCHIK, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V.F.; BROFMAN, P.S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO.; L.S.; CORREA, A.; Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from Bone Marrow, umbilical cord blood and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**. v.233, n.7, p. 901-913, 2008.

RIBEIRO, A.F.; Alterações histopatológicas causadas pelo efeito da acetona cianidrina em fígado, rins, coração e pulmão de camundongos. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2012.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; BEM, A.R.; Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**. v.28, n.3, p.477-482, 1998.

ROGER, P.C.; MEACHAM, L.R.; OEFFINGER, K.C.; HENRY, D.W.; LANGE, B.J.; Obesity in pediatric oncology. **Pediatric Blood e Cancer**. v.45, p.881-891, 2005.

ROWE, A.W.; EYSTER, E.; KELLNER, A.; Liquid nitrogen preservation of red blood cells for transfusion: A low glycerol-rapid freeze procedure. **Cryobiology**. n.5, p. 680-691, 2004.

RUBINSTEIN, P.; Processing and cryopreservation of placenta/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. **Medical Sciences**. v.92, p.10119-10122, 1995.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ – ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHALL, V.S.; JONES, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. **Science**. n. 282, p. 1145 – 1147, 1998.

SAKAGUCHI, Y.; SEKIYA, I.; YAGISHITA, K.; MUNETA, T.; Comparasion of human stem cells derived from varius mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. **Arthrits e Rheumatism**. v.52, p. 2521-2529, 2005.

SANTIS, G.C.; PRATA, K.L.; **Criopreservação de células progenitoras hematopoiéticas**. Medicina de Ribeirão Preto. n.42, p. 36-47, 2009. Disponível em: <<<http://fmpr.usp.br/revista>>> Acesso em: 14/02/2013.

SOLMENSKEY, L.; LEFLER, S.; JACOB-HIRSCH, J.; BULYIK, S.; RECHAVI, G.; WEIL, M.; Serum free cultured bone marrow mesenchymal stem cells a plataform to characterize the effects of specific molecules. **PLos ONE**. n.5, p.12689-12722, 2010.

SONODA, E.; AOKI, S.; UCHIHASHI, K.; SOEJIMA, H.; KANAJI, S.; IZUHARA, K. A new organotypic culture of adipose tissue fragments maintains viable mature adipocytes for a long term, together with development of immature adipocytes and mesenchymal stem cells-like cells. **Endocrinology**. n. 149, p. 149 – 153, 2008.

SUPLICY, H.L.; Obesidade visceral, resistência á insulina e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**. v.7, n.2, 2000.

SUPP, D.M.; WILSON-LANDY, K.; BOYCE, S.T.; Human dermal microvascular endothelial cells form vascular analogs in cultured skin substitutes after grafting to athymic mice. **FASEB Journal**. v. 16, n.8, p.797-804, 2002.

TACHIBANA, M.; AMATO, P.; SPARMAN, M.; GLUTIERREZ, N.M.; TIPPNERHEDGES, R.; MA, H.; KANG, E.; FULATI, A.; LEE, H.S.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MASTERSON, K.; LARSON, J.; EATON, D.; SADLER-FRED, K.; BATTAGLIA, D.; LEE, D.; WU, D.; JENSEN, J.; PATTON, P.; GOKHALE, S.; STOUFFER, R.L.; WOLF, D.; MITALIPOV, S.; **Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer**. 2013. Disponível em: <<<http://cex.doi.org/10.1016/j.cell2013.05.006>>> Acesso em: 12/02/2014.

TODA, S.; UCHIHASHI, K.; AOKI, SONODA, E.; YAMASAKI, F.; PIAO, M. Adipose tissue – organotypic culture system as a promising model for studying adipose tissue biology and regeneration. **Organogenesis**. n. 5, p. 50 – 56, 2009.

TILL, J.E.; Mc CULLOCH, E.A.; A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Pubmed**. p. 213-222, 1961.

UNCHERN, S.; **Basic techniques in animal cell culture**. Drug Delivery System Workshop. 19- 20 ago. Bangkok, 1999.

VERFALIE, C.M.; Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in Cell Biology**. v.12, p.502-508, 2002.

VIOLA, E.S.; Uso de acidificantes em dietas de frango de corte: resíduo do trato digestivo e efeitos sobre o desempenho animal e morfologia intestinal. **Tese**. Zootecnia. Porto Alegre. 2006.

ZUK, P.; MIZUNO, Z.M.; HUANG, H.J.; Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**. n. 7, p.211 – 228, 2001.

ZUK, P.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAİM, P.; HEDRICK, M.H.; Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**. v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

WADLOW, R.C.; PORTER, D.L.; Umbilical cord blood transplantation: where do we stand? **Biology of blood and marrow transplantations**. v.8, n.12, p.637-647, 2002.

WARWICH, R.; ARMITAGE, S.; Cord blood banking. **Best Practice e Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**. v.18, n.6, p.995-1011, 2004.

WEISSMAN, I.L.; Translating stem and progenitor biology to the clinic: barriers and oppotunites. **Science**. n.287, p.1442-1446, 2000.

XU,H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C.J. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**. n. 112 p. 1821-30, 2003.

YARAK, S.; OKAMOTO, O.K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. n. 85, p. 647 – 56, 2010.

ZIMER, K.R.; BORRE, G.L.; TRENTIN, O.S, WOICICKOSKI, C.J.; FRASSON, A.P.; GRAEFF, A.A.; GOMES, P.; MACEDO, A.J.; Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. UFRGS, **Revista Liberato**. Novo Hamburgo. v.10, n.14, p.123-137, 2009.

ZIBOH, V.A.; MILLER, C.C.; CHO, V.; Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of anti-inflammatory and antiproliferative metabolites. **Journal Clin.Nutri**. n.71, p.361-376, 2000.

ZORN-PAULY, K.; L-type na T-type Co2 + current in cultured ventricular guinea pig myocytes. **Physiology Research**. v.53, n.4, p. 369-377, 2004.

APÊNDICE 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA -COEP

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (T.C.L.E)
PESQUISAS COM SERES HUMANOS**

“CULTURA DE EXPANSÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO PROVENIENTES DE DIFERENTES
TECIDOS ADIPOSOS HUMANO”

Pesquisador responsável: Dr. Giovani Marino Favero

Nome do paciente: _____

Idade: _____ RG: _____

Endereço: _____

A presente pesquisa tem como objetivo utilizar o material de descarte cirúrgico, mais especificamente a gordura, para obtenção de células tronco para estudos laboratoriais.

Paciente será orientado quanto à pesquisa pelo pesquisador, depois será submetido ao procedimento cirúrgico, que não envolve pesquisa, onde ocorrerá coleta do material que seria descartado.

Benefícios estão relacionados ao conhecimento da ampliação dos estudos sobre células tronco de tecidos adultos..

Fica garantido ao paciente o esclarecimento de possíveis dúvidas sobre sua participação na pesquisa bem como se retirar da pesquisa em qualquer momento.

Todas as informações colhidas durante a pesquisa serão sigilosas zelando pela privacidade do paciente e garantindo que sua identificação não será exposta nas conclusões ou publicações.

Giovani Marino Favero

Tel: 91280063 ou 3220-3167

Daiana Milena Bronoski de Freitas

Tel: 99088555

Paciente

Membro Equipe Pesquisa