HELENA DEBIAZI ZOMER

Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida
a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos

São Paulo
2013

HELENA DEBIAZI ZOMER

**Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células
tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos**

São Paulo

2013

HELENA DEBIAZI ZOMER

**Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células
tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2904
FMVZ

Zomer, Helena Debiazi

Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos / Helena Debiazi Zomer. -- 2013.
97 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. iPS. 2. ADSC. 3. MSC. 4. Células tronco mesenquimais. I. Título.

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos", protocolado sob o nº 2560/2012, utilizando 6 (seis) coelhos e 6 (seis) camundongos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 14/3/2012.

We certify that the Research "Establishment of cultured induced pluripotent stem cells from adipose derived stem cells of rabbits", protocol number 2560/2012, utilizing 6 (six) rabbits and 6 (six) rats, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/14/2012.

São Paulo, 28 de maio de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZOMER, Helena Debiazi

Título: Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Antonio e Rose,
por todo amor e carinho.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

Esta é, sem dúvidas, uma das partes mais importantes da minha dissertação. Primeiro, porque, sem a ajuda e cooperação do grupo do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e colaboradores, este trabalho sequer teria saído do papel. Segundo, porque, sem a força, segurança e carinho da minha família, este mestrado não poderia ter sido concluído. E por fim, porque, sem a alegria e distração com meus amigos, não teria eu equilíbrio para continuar.

Desta forma, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, que me apresentou ao grupo que hoje faço parte e ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por me receber como orientanda e me permitir fazer parte da sua equipe.

A Dra. Fabiana Bressan desempenhou papel fundamental no andamento do meu projeto, e por isto serei eternamente grata. Da mesma forma, toda a equipe de iPS do LMMD também merece meus agradecimentos: Msc. Natalia Nardelli, Msc. Pedro Ratto e Msc. Laís Pessoa.

Agradeço à Msc. Aline Fernanda Souza por toda a paciência com que me ensinou diversos protocolos de células tronco mesenquimais. Ao colega Msc. Atanásio Vidane, por todos os artigos em equipe. À Msc. Juliana Casals pelos procedimentos cirúrgicos e à Msc. Thais Borges Lessa pelas colorações histológicas. À Dra. Lilian Oliveira e ao Msc. Rodrigo Barreto por toda a ajuda nas análises imunológicas. À equipe do abatedouro da Prefeitura do Campus de Pirassununga pelo fornecimento de amostras. Ao Maicon por toda a atenção para resolver todo e qualquer problema.

Aos colegas Juliano Sangali, Rafael, Gabriela, Naira, Arina (Nina), Kelly, Fábio Cury, Alessandra, Mariana Tres, Celina, Vanessa, Mariana Martucci, Maitê, Ana Carolina, Marquinhos, Juliano, Thiago, Ramon, João, Gabriel, Matheus, Tiago Milanin, Lídia, Debora, Carol, enfim, a todos que fazem parte do LMMD, pelos pequenos (mas fundamentais) favores prestados, ou apenas pelo “bom dia” dito no início de um dia difícil.

À Profa. Dra. Daniele Martins, pelas ótimas sugestões, e aos professores doutores Felipe Perecin, Deise Dellova e Angélica Tatarunas, pelo aprendizado que tive no Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE).

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao grupo do Laboratório de Biotecnologia, do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde tive o

prazer de passar alguns dias e fui muito bem recebida. Lá pude aprender muito com as Dras. Tathiane Malta e Aline Ferreira e passar bons momentos com elas e com a Profa. Dra. Simone Haddad, Dra. Virgínia Picanço e Castro, Isabela e Mauricio, além de outras pessoas especiais, das quais o curto período de convivência não me permitiu guardar os nomes.

Agradeço ao apoio técnico da Patrícia, do Laboratório de Citometria, e à Dra. Maristela, do Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto, por toda a ajuda na fase final do meu experimento. À Daniela, da UNIFESP, pela colaboração na citometria de fluxo.

O apoio da minha família foi fundamental. Passei por momentos muito difíceis que só eles acompanharam e, mesmo de longe, deram-me força para continuar. Antonio, Rose, Vó Alice, Ricardo, Clarissa e Marcelo me acalmaram quando estive estressada, me alegraram quando estive triste e me confortaram quando me senti sozinha. Esta conquista é por vocês.

Com a minha família distante, posso dizer que fui muito abençoada em conhecer o Vinícius. Não tenho palavras pra descrever o bem que ele me faz. Além de um amigo e companheiro em Pirassununga, ganhei também uma família aqui perto, em Monte Sião. Ali pude me sentir em casa nos finais de semana na casa da Dalva e do Zé Américo, em companhia da Carol, da Vó Eta e das lindas Vitória e Lorena, além de toda a família Godoy.

Gostaria de agradecer ainda a todos os meus amigos, aos que se mantiveram presentes mesmo com a grande distância, e aos que deixaram meus dias pirassununguenses mais felizes.

Assim, agradeço às amigas Maíra, Nathalia, Marina e Izadora, pelas mais de duas décadas de amizade. Podemos ficar meses sem nos ver, mas quando volto para casa sei que será como antes, quando nos víamos todos os dias. Amizades assim são difíceis de formar, por isso valorizo muito o que temos, e aonde vou, levo-as comigo em meu coração.

Agradeço às companheiras da República Curinga, Innaê, Fernanda, Priscila, Ana Paula, Alyne e Jéssica e às amigas e amigos do futsal. Ao amigo Atanásio, por sempre me cumprimentar com um sorriso, e às amigas Aline e Gabriela, por todas as conversas, passeios, jantares, enfim, por todos os bons momentos.

Agradeço a Deus por todas estas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho, com as quais pude aprender muito e crescer como pessoa.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao projeto nº 2012/04196-4.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

ZOMER, H. D. Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos. [Establishment of culture of induced pluripotent stem cells from adipose derived stem cells of rabbits]. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As células de pluripotência induzida (iPS) foram reportadas pela primeira vez em 2006 por Takahashi e Yamanaka e desde então vem sendo extensivamente estudadas. Por meio da técnica, células somáticas adultas adquirem comportamento muito semelhante às células tronco embrionárias, reduzindo as questões éticas relacionadas ao uso destas em pesquisas. Entretanto, os mecanismos biológicos das células iPS ainda não estão completamente elucidados. Ainda são necessárias pesquisas mais aprofundadas para garantir a segurança e eficácia de sua possível utilização em futuras terapias. Os coelhos, como modelos experimentais, são vantajosos tanto pelo seu tamanho ideal para procedimentos cirúrgicos quanto por sua manutenção fácil e econômica. As células tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) consistem em um tipo de célula tronco mesenquimal multipotente que se destaca pela facilidade, rapidez e segurança de coleta e processamento. As ADSC foram coletadas e caracterizadas por meio de análises de curva de crescimento celular, *doubling time*, viabilidade após criopreservação, capacidade de formação de colônias fibroblastoides, diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, imunocitoquímica e citometria de fluxo. Elas demonstraram possuir as características básicas de células tronco mesenquimais, destacando-se por uma alta e rápida capacidade proliferativa. A indução de pluripotência foi realizada nas ADSC de coelhos pela introdução de quatro fatores de transcrição (OCT4, SOX2, cMYC, e KLF4), pelo vetor lentiviral STEMCCA (Milipore). Cinco protocolos de indução foram testados. Células resultantes da indução foram caracterizadas quanto à atividade da fosfatase alcalina e perfil fenotípico por citometria de fluxo. A proliferação acentuada das ADSC parece ser um fator limitante para a eficácia da reprogramação. A partir destes dados, espera-se contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia brasileira ainda inédita em coelhos e adicionar informações importantes à literatura, acerca das propriedades das células iPS, visando sua utilização como modelo experimental para futuras terapias.

Palavras-chave: iPS, ADSC, MSC, células tronco mesenquimais.

ABSTRACT

ZOMER, H. D. **Establishment of culture of induced pluripotent stem cells from adipose derived stem cells of rabbits.** [Estabelecimento de cultura de células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos]. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Induced Pluripotent Stem (iPS) cells were first reported in 2006 by Takahashi e Yamanaka and has been intensively studied since then. Through the technique, adult somatic cells acquire behavior very similar to embryonic stem cells, reducing the ethical issues related to the use of such research. However, biological mechanisms of iPS cells are not yet fully elucidated. Thus, further research is needed to ensure the safety and efficacy for their possible use in future therapies. Rabbits, as experimental models, are advantageous by their ideal size for surgical procedures and easy and economic maintenance. Adipose Derived Stem Cells (ADSC) consists of multipotent mesenchymal stem cells that stand for ease, speed and safety of collection and processing. The ADSC were collected and characterized by analysis of cell growth curve, doubling time, viability after cryopreservation, ability of fibroblast colony formation, osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, immunocytochemistry and flow cytometry. They showed to have the basic characteristics of mesenchymal stem cells, standing out by a high and fast proliferative capacity. Induction of pluripotency was performed in rabbits ADSC by the introduction of four transcription factors (OCT4, SOX2, cMYC, and KLF4) by lentiviral vector STEMCCA (Millipore). Five protocols were tested and analyzed. The resulting cells after induction were characterized by alkaline phosphatase activity and phenotypic profile by flow cytometry. The great proliferation of ADSC seems to be detrimental for the reprogramming efficiency. From these data, it is expected to contribute to the development of a Brazilian technology still unpublished in rabbits, and to add important information to the literature about the properties of iPS cells, aiming their use as an experimental model for future therapies.

Key words: iPS, ADSC, MSC, mensechymal stem cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática dos vetores lentivirais utilizados para transdução.....	46
Figura 2 -	Fotos do procedimento de isolamento de ADSC.....	55
Figura 3 -	Fotomicrografias de células isoladas.....	56
Figura 4 -	Gráfico da curva de crescimento das ADSC.....	57
Figura 5 -	Gráfico do Doubling Time das ADSC.....	58
Figura 6 -	Análise de CFU-F das ADSC.....	59
Figura 7 -	Fotomicrografias das células submetidas a teste de viabilidade celular.....	60
Figura 8 -	Imunocitoquímica em ADSC em passagem zero.....	61
Figura 9 -	Imunocitoquímica em ADSC em sexta passagem	61
Figura 10 -	Gráficos resultantes da análise de citometria de fluxo das ADSC..	63
Figura 11 -	Fotomicrografias das células submetidas à diferenciação osteogênica e adipogênica.....	64
Figura 12 -	Diferenciação Condrogênica das ADSC.....	65
Figura 13 -	Colônias de células reprogramadas.....	67
Figura 14 -	Fotomicrografias de células ADSC com características de reprogramação.....	68
Figura 15 -	Fotomicrografias de células transduzidas, 14º dia de cultivo.....	69
Figura 16 -	Fotomicrografias de células ADSC após 14 dias da transdução,	

	mantidas na presença de LIF.....	70
Figura 17 -	Fotomicrografias de fibroblastos após 14 dias de transdução.....	70
Figura 18 -	Fotomicrografias de aglomerados celulares após 14 dias de transdução de fibroblastos com o STEMCCA RED OKS.....	71
Figura 19 -	Fotomicrografias de formações celulares de aglomerados retorcidos, após 18 dias em cultura.....	72
Figura 20:	Fotomicrografias de uma mesma colônia por 4 dias.....	73
Figura 21:	Fotomicrografias de células em primeira passagem, após 6 dias do repique manual.....	74
Figura 22 -	Fotomicrografias de células submetidas à detecção da atividade da fosfatase alcalina.....	75
Figura 23 -	Gráficos resultantes da análise de citometria de fluxo dos fatores em separado.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Expressão de marcadores moleculares em células ADSC em diferentes espécies.....	30
Tabela 2 -	Composição do meio de cultura utilizado para ADSC.....	39
Tabela 3 -	Composição do meio de congelamento de células ADSC e fibroblastos.....	41
Tabela 4 -	Composição do meio de cultura utilizado no período de reprogramação.....	48
Tabela 5 -	Tipos e quantidades de células submetidas ao <i>Protocolo I</i>	49
Tabela 6 -	Quantidade de Colônias fibroblastoides formadas na análise de CFU-F.....	59
Tabela 7 -	Determinação da viabilidade celular através da contagem de células vivas e mortas após criopreservação.....	60
Tabela 8 -	Resultados obtidos na análise de citometria de fluxo das células transduzidas separadamente com os fatores de pluripotência.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Anticorpos utilizados para análise de expressão de marcadores moleculares.....	44
Quadro 2 -	Vetores conjugados a proteínas fluorescentes utilizados para transdução das células ADSC.....	51
Quadro 3 -	Informações sobre as coletas de tecido adiposo e fragmentos de orelha.....	53
Quadro 4 -	Informações sobre os experimentos de indução de pluripotência e seus respectivos resultados.....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 Gerais.....	25
3.2 Específicos.....	25
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4.1 Características Gerais das Células Tronco.....	27
4.2 Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo.....	28
4.3 Células de Pluripotência Induzida.....	31
4.4 Terapia Celular.....	33
4.5 O Coelho como Modelo Experimental.....	35
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 Obtenção dos Animais.....	37
5.2 Coleta de Gordura e Fibroblastos.....	37
5.2.1 Procedimento I.....	37
5.2.2 Procedimento II.....	38
5.3 Isolamento de Células tronco derivadas do tecido adiposo.....	38
5.4 Isolamento de Fibroblastos.....	40
5.5 Repiques de Culturas.....	40

5.6 Congelamento de Células.....	40
5.7 Caracterização das Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo.....	41
5.7.1 Curva de Crescimento Celular.....	41
5.7.2 Doubling Time.....	42
5.7.3 Unidades formadoras de Colônias.....	42
5.7.4 Viabilidade Celular.....	43
5.7.5 Imunocitoquímica.....	43
5.7.6 Citometria de Fluxo.....	44
5.7.7 Diferenciação Celular.....	45
5.8 Indução de Pluripotência.....	46
5.8.1 Fibroblastos embrionários murinos para monocamadas celulares de suporte.....	47
5.8.2 Partículas Lentivirais.....	47
5.8.3 Transdução Celular.....	48
5.8.3.1 Protocolo I.....	48
5.8.3.2 Protocolo II.....	49
5.8.3.3 Protocolo III.....	49
5.8.3.4 Protocolo IV.....	50
5.8.3.5 Protocolo V.....	50
6 RESULTADOS.....	52
6.1 Coleta, Isolamento e Congelamento de ADSC e Fibroblastos.....	53
6.2 Caracterização das Células tronco derivadas do tecido adiposo.....	56
6.2.1 Análise da Curva de Crescimento.....	56
6.2.2 Doubling Time.....	57
6.2.3 Análise das Unidades Formadoras de Colônias.....	58

6.2.4 Viabilidade Celular.....	59
6.2.5 Imunocitoquímica.....	60
6.2.6 Citometria de Fluxo.....	62
6.2.7 Diferenciação Celular.....	64
6.3 Indução de Pluripotência.....	65
6.3.1 Protocolo I.....	67
6.3.2 Protocolo II.....	69
6.3.3 Protocolo III.....	71
6.3.4 Protocolo IV.....	71
6.3.5 Protocolo V.....	75
7 DISCUSSÃO.....	77
7.1 Células Tronco derivadas do Tecido Adiposo.....	78
7.2 Indução de Pluripotência.....	79
8 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO:

As células de pluripotência induzida (iPS) foram reportadas pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka (2006) e desde então vem sendo intensivamente estudadas. Por meio da técnica, células somáticas adultas adquirem comportamento muito semelhante ao das células tronco embrionárias, reduzindo as questões éticas relacionadas ao uso destas em pesquisas. Entretanto, os mecanismos biológicos das células iPS ainda não estão completamente elucidados.

As células iPS vem sendo produzidas a partir de várias espécies animais, como cães (LUO et al., 2011, GONÇALVES et al., 2012), camundongos (HAMILTON et al., 2009; ESTEBAN et al., 2009; RAJARAJAN et al., 2012) ratos e suínos (RAJARAJAN et al., 2012), e também em humanos (HUANGFU et al., 2008; SUN et al., 2009; WARREN et al., 2010), sendo a maioria delas realizada a partir de fibroblastos. Honda e colaboradores (2010) não obtiveram sucesso na utilização de fibroblastos para gerar células iPS em coelhos, provavelmente pela excepcional velocidade de proliferação destas, as quais rapidamente atingiam confluência, descontinuando a indiferenciação. Entretanto, puderam gerar linhagens estáveis de células iPS de coelhos a partir de células do fígado e do estômago. Após a inserção de quatro fatores de transcrição humanos, a pluripotencialidade das células foi comprovada pela formação de teratomas e expressão de marcadores de pluripotência (HONDA et al., 2010). Recentemente, a alta proliferação foi descrita como fator limitante para a reprogramação (XU et al., 2013).

Como fonte alternativa, células tronco derivadas do tecido adiposo foram utilizadas para gerar células iPS em camundongos (SUGII et al., 2011) e humanos (SUN et al., 2009; SUGII et al., 2011). As células tronco derivadas do tecido adiposo são multipotentes. Após a indução, estas adquirem pluripotência, a qual pode ser comprovada pela expressão positiva de marcadores de pluripotência como fosfatase alcalina, Nanog e SSEA1, formação de corpos embrióides *in vitro* e teratomas *in vivo* (SUGII et al., 2011).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo são acessíveis e abundantes, de forma que a sua coleta é mais fácil e causa menos dor ao animal, apresentando possibilidade de se obter grande quantidade de células com baixos riscos para o paciente (HOUSMAN et al., 2002). Para Sun et al. (2009), o estabelecimento de células iPS a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo humano ocorre de forma mais eficiente e rápida do que a partir de

fibroblastos, baseando-se na morfologia e na quantidade de células positivas para o TRA-1-60.

O objetivo deste estudo foi esclarecer os mecanismos envolvidos na indução de pluripotência utilizando células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos.

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

A indução de pluripotência em células somáticas resulta em células tronco pluripotentes muito semelhantes às células tronco embrionárias. Esta técnica reduz as questões éticas relacionadas ao uso de células embrionárias em pesquisas, consistindo em um modelo promissor. Elas foram produzidas pela primeira vez em 2006 por Takahashi e Yamanaka e desde então vem sendo muito estudadas, visando o esclarecimento de seu mecanismo biológico. Pesquisas mais aprofundadas são necessárias para garantir a segurança e eficácia de sua possível utilização em futuras terapias.

Os coelhos, como modelos experimentais, são vantajosos por serem dóceis e fáceis de manipular, além disso, o seu tamanho permite o trabalho com um grande número de animais, e a possível padronização genética e ambiental. A manutenção dos coelhos é relativamente econômica e seu tamanho é ideal para procedimentos cirúrgicos experimentais, quando comparado a outros modelos animais. Coelhos também não requerem muito espaço e se adaptam facilmente.

A utilização das células tronco derivadas do tecido adiposo demonstra-se adequada pela facilidade, rapidez e segurança na coleta, isolamento e processamento, além do que, a indução de pluripotência em células tronco mesenquimais ocorre com uma maior eficiência em relação à indução em células somáticas (SUN et al., 2009).

A geração de células iPS de coelhos foi publicada apenas uma vez, no Japão. A criação no Brasil, de uma linhagem de células iPS de coelhos visa contribuir para o desenvolvimento da biotecnologia nacional.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estabelecer protocolo adequado para a produção de células iPS, a partir de células-tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos. Caracterizar as células-tronco derivadas do tecido adiposo e as células de pluripotência induzida de coelhos.

3.2 Específicos

- Coletar, isolar e multiplicar células-tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos.
- Caracterizar as células-tronco derivadas do tecido adiposo para marcadores de multipotência e diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica.
- Produzir células de pluripotência induzida a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo de coelhos.
- Realizar teste de marcadores de pluripotência Oct3/4 e Nanog e atividade da fosfatase alcalina para as células iPS de coelhos.
- Realizar teste de diferenciação *in vitro*, verificando a formação de corpos embrióides a partir das células iPS de coelhos.
- Realizar teste de diferenciação *in vivo*, verificando a formação de teratomas a partir das células iPS de coelhos.
- Realizar análise comparativa entre células tronco derivadas do tecido adiposo e células de pluripotência induzida de coelhos por meio dos resultados obtidos nos testes de perfis fenotípicos e diferenciação *in vitro* e *in vivo*.

Revisão de Literatura

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Características gerais das células tronco

De maneira geral, o termo célula tronco refere-se a células capazes de se auto-replicar por períodos indefinidos durante toda a vida de um indivíduo, e que podem dar origem a células especializadas quando em condições apropriadas, processo denominado diferenciação (BREVINI et al., 2007; KUIJK et al., 2010).

De acordo com o grau de diferenciação, as células tronco são classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. Células totipotentes tem a capacidade de gerar todos os tipos de células, inclusive tecidos embrionários e extraembrionários. Células pluripotentes podem originar progenitores dos três folhetos embrionários, isto é, mesoderme, endoderme e ectoderme (BREVINI et al., 2007; KUIJK et al., 2010). Quanto maior a especialização da célula, mais limitado o seu potencial de diferenciação (SELL, 2004).

Células tronco totipotentes e pluripotentes correspondem às células tronco embrionárias, sendo as totipotentes encontradas no zigoto até os primeiros dias (embrião com até 32 células) e as pluripotentes na massa interna do blastocisto, (entre 32 a 64 células) (SCHWINDT et al., 2005). Recentemente, foram criadas as células tronco de pluripotência induzida, que consistem em células tronco pluripotentes derivadas de células somáticas adultas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Células tronco multipotentes estão presentes em vários órgãos adultos, podendo se diferenciar em diversos tipos celulares, geralmente provenientes do mesmo folheto embrionário, como as células tronco mesenquimais e as células tronco hematopoiéticas (NARDI; MEIRELLES, 2006). Células oligopotentes tem menor poder de diferenciação e as unipotentes originam apenas um único tipo celular maduro. Estas duas últimas são denominadas células progenitoras (SCHWINDT et al., 2005).

O isolamento de células tronco embrionárias humanas foi reportado pela primeira vez em 1994, quando se verificou a formação espontânea *in vitro*, de estruturas multicelulares conhecidas como “corpos embrióides”. Estas estruturas possuem elementos dos três folhetos germinativos e podem dar origem a diversos tipos de células especializadas, como cardiomiócitos, neurônios, progenitores hematopoiéticos e outros (VERFAILLIE et al., 2002; EVANS et al., 2003).

As células tronco embrionárias podem ser amplamente expandidas em cultura, sem que ocorra perda aparente da “toti” ou pluripotência e da capacidade de auto-renovação, desde que sejam utilizados fatores que impeçam a sua diferenciação (LODISH et al., 2005). Assim, uma das vantagens do uso destas células consiste na sua habilidade em se proliferar indefinidamente e sua capacidade de gerar uma grande variedade de grupos celulares. Estas características permitem a manipulação *in vitro*, com a finalidade de produzir precursores de uma linhagem celular específica para o tratamento de diversas enfermidades (WEISSMAN, 2000; VERFAILLIE et al., 2002).

Embora as células tronco embrionárias possuam considerável potencial terapêutico, ainda existem alguns obstáculos, como a falta de homogeneidade das células após a indução de diferenciação. Tal característica, clinicamente, poderia resultar em teratomas, isto é, tumores derivados de células pluripotentes. Além disso, diversas questões éticas e religiosas são levantadas quanto ao uso das células tronco embrionárias (DOSS et al., 2004).

As células tronco encontradas no indivíduo adulto possuem plasticidade e capacidade de diferenciação mais restrita do que as células tronco embrionárias, porém, a sua utilização não apresenta problemas éticos pela sua natureza não controversa (LAM; LONGAKER, 2012). No organismo, essas células respondem a estímulos específicos, apresentando funções de manutenção da homeostase tecidual e substituição de células mortas, sendo específicas para cada tecido em que se encontram (MEIRELLES et al., 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; SACHS et al., 2012).

As células tronco mesenquimais presentes no indivíduo adulto podem ser isoladas a partir de diversos tecidos (NARDI; MEIRELLES, 2006), entre eles gordura, medula óssea (KERN et al., 2006; TAKEMITSU et al., 2012; STRIOGA et al., 2012), cordão umbilical (KERN et al., 2006), polpa dentária (XIAO; TSUITSUI, 2013) e músculo (KISIEL et al., 2012).

4.2 Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo:

Entre as fontes de células tronco mesenquimais, o tecido adiposo se destaca pela acessibilidade e segurança na coleta e abundância de células isoladas (HOUSMAN et al., 2002; CHERUBINO et al., 2010; DU et al., 2010; KIM et al., 2011; LAM; LONGAKER, 2012). Cada coleta resulta em aproximadamente 100 vezes mais células do que a coleta a

partir da medula óssea, (DEY; EVANS, 2011), sendo o processo bem menos doloroso para o indivíduo (SACHS et al., 2012).

Estas células apresentam uma morfologia fibroblastoide e são aderentes à placa de cultura. Possuem um crescimento rápido em meios de cultura simples e acessíveis. Podem ser mantidas *in vitro* por diversas passagens, sem alteração no seu cariótipo (YANG et al., 2011; SACHS et al., 2012; REICH et al., 2012).

As ADSC são alvos de extensiva pesquisa, tendo sido caracterizadas em diversos animais, como cães (KISIEL et al., 2012; REICH et al., 2012; CHUNG et al., 2013), coelhos (ARRIGONI et al., 2009; ABDUSAIMI et al., 2011; CHEN et al., 2011; BAHN et al., 2012; SUNNAY et al., 2013), ovinos (FADEL et al., 2011; HEIDARI et al., 2013), camundongos (CHANG et al., 2013), equinos (CARVALHO et al., 2009) e humanos (ZUK et al., 2002; DICKER et al., 2005; YANG et al., 2011; WU et al., 2012).

As ADSC não apresentam um imunofenotipo definitivo, sendo classificadas como células heterogêneas (DEY; EVANS, 2011). Além disto, seu perfil imunológico pode mudar em diferentes passagens. Alguns marcadores de superfície são utilizados em conjunto para caracterizar as células tronco multipotentes; entretanto, a expressão de marcadores varia entre as espécies. As células humanas expressam CD29, CD73, CD105, CD44 e CD166 e não expressam os marcadores CD45, CD14 e CD31 (YANG et al., 2011; SACHS et al., 2012). Diversos autores divergem sobre a expressão de determinados marcadores, como o CD34 em humanos (YANG et al., 2011; SACHS et al., 2012), o CD44 nos ovinos (BARRY et al., 1999; FADEL et al., 2011) e o CD44 e CD105 nos coelhos (MARTINEZ-LORENÇO et al., 2009; SUNAY et al., 2013). As expressões imunofenotípicas das ADSC encontram-se detalhadas na tabela 1.

Tabela 1 - Expressão de marcadores moleculares em células ADSC em diferentes espécies

	CD73	CD90	CD105	CD44	CD166	CD31	CD45	CD34	Referências:
								+low	SACHS et al., 2012
Humanos	+	+	+	+	+	-	-	-	YANG et al., 2011 MARTINEZ-LORENÇO et al., 2009
Camundongos			+	+			-	-	ZHAO et al., 2013 SUNG et al., 2008 MARTINEZ-LORENÇO et al., 2009
	-		-	-	+low				
Coelhos		+low				-	-	-	SUNAY et al., 2013 CHEN et al., 2011 BAHN et al., 2012 FADEL et al., 2011
	+		+	+	+				
				+					BARRY et al., 1999
Ovinos				-	+	-	-	-	MARTINEZ-LORENÇO et al., 2009
									REICH et al., 2012
Cães		+		+low				-	KISIEL et al., 2012
				+					TAKEMITSU et al., 2012
Equinos		+		+					CARVALHO et al., 2009

Embora sejam classificadas como multipotentes, as ADSC expressam um grau relativamente alto dos marcadores de pluripotência com expressão relacionada a células embrionárias, OCT4, NANOG e SOX2 (KISIEL et al., 2012; REICH et al., 2012; SACHS et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2012). O OCT4 é expresso no desenvolvimento inicial dos mamíferos e é essencial para a formação da massa celular interna do embrião e manutenção das células tronco embrionárias (NICHOLS et al., 1998). O Sox2 regula a expressão do OCT4 e mantém a pluripotência de células tronco embrionárias. Já o Nanog é requerido na manutenção do estado indiferenciado e auto-renovação das células tronco (TAKEMITSU et al., 2012). Estes fatores de transcrição fazem parte dos mecanismos moleculares que regulam a multipotência, a auto-renovação e a proliferação das ADSC (KISIEL et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2012).

As ADSC podem se diferenciar em diversos tipos celulares provenientes do folheto embrionário mesodérmico, como adipócitos, osteócitos e condrócitos (SACHS et al., 2012; DU et al., 2012). Alguns autores produziram a diferenciação em tipos celulares de outras origens embrionárias, como neurônios (KRAMPERA, 2007), que possuem origem ectodérmica e hepatócitos (AURICH, 2009), originados no endoderma. Entretanto, a

diferenciação em tecidos não mesodérmicos permanece controversa, devido à falta de resultados *in vivo* (STRIOGA, 2012).

4.3 Células de Pluripotência Induzida:

A reprogramação epigenética de células somáticas para um estado pluripotente pode ser realizada mediante transplante nuclear, fusão celular ou reprogramação direta por meio da expressão de fatores de transcrição, isto é, células de pluripotência induzida (iPS) (HANNA et al., 2011).

As iPS foram reportadas pela primeira vez em 2006 por Takahashi e Yamanaka e desde então vem sendo intensivamente estudadas. São produzidas por meio de reprogramação nuclear utilizando quatro fatores de transcrição: OCT4, SOX2, cMYC, e KLF4, chamados de fatores de Yamanaka ou OKSM. Assim, células somáticas adultas adquirem comportamento muito semelhante às células tronco embrionárias, o que pode significar na eliminação de questões éticas e problemas de rejeição após transplantes, visto que estas podem ser coletadas do próprio paciente, ampliando as possibilidades de pesquisa (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; LAM; LONGAKER, 2012).

Embora os fatores de Yamanaka sejam os mais utilizados, outras combinações de fatores foram testadas com êxito, como a substituição do cMYC e KLF4 por Nanog e LIN28 (YU et al., 2007) ou a exclusão do fator cMYC (XU et al., 2013). Quando os genes de pluripotência exógenos são introduzidos na célula, induzem a expressão dos genes endógenos de pluripotência (JAENISCH; YOUNG, 2008). Por sua vez, a regulação positiva dos fatores endógenos induz o silenciamento dos genes exógenos por meio da metilação dos promotores (HOTTA; ELLIS, 2008).

A transdução dos fatores às células é realizada por sistemas de vetores virais, como retrovírus (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), lentivírus (PICANÇO-CASTRO et al., 2011) ou adenovírus (STADTFELD et al., 2008); ou por sistemas não virais, isto é, por meio de plasmídios (OKITA; YAMANAKA, 2008), proteínas (ZHOU et al., 2009) ou RNAs mensageiros (WARREN et al., 2010).

A pluripotência das células iPS pode ser atestada pela capacidade de causar teratomas *in vivo*, e a formação de corpos embrióides *in vitro*. Além disso, possuem morfologia semelhante às células tronco embrionárias, isto é, forma redonda, nucléolos grandes e citoplasma escasso.

Apesar dessas características, Takahashi e Yamanaka (2006) descobriram que as células iPS são muito similares, porém, não idênticas às células-tronco embrionárias.

Nas células somáticas, os promotores de genes de pluripotência estão altamente metilados, refletindo um estado transcricional reprimido. A formação das iPS envolve a ativação destes genes, e a demetilação dos mesmos é utilizada para monitorar o sucesso da reprogramação (MIKKELSEN et al., 2008). Assim, as células iPS apresentam perfil molecular muito semelhante às células tronco embrionárias, expressando os marcadores de pluripotência OCT4, Nanog, SOX2, SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81, além de atividade da fosfatase alcalina (LEWITZKY; YAMANAKA, 2007; SCHEPER; COPRAY, 2009; WANG et al., 2010).

Esta nova tecnologia vem sendo produzida a partir de várias espécies animais, como cães (LUO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2012), camundongos (HAMILTON et al., 2009; ESTEBAN et al., 2009; RAJARAJAN et al., 2012), ratos e suínos (RAJARAJAN et al., 2012), e também em humanos (HUANGFU et al., 2008; SUN et al., 2009; WARREN et al., 2010), sendo a maioria delas realizada a partir de fibroblastos. Honda e colaboradores (2010) não obtiveram sucesso na utilização de fibroblastos para gerar células iPS em coelhos, provavelmente pela excepcional velocidade de proliferação destas, as quais atingiam confluência rapidamente, descontinuando a indiferenciação. Entretanto, puderam gerar linhagens estáveis de células iPS de coelhos a partir de células somáticas do fígado e do estômago (HONDA et al., 2010).

Como fonte alternativa, células tronco derivadas do tecido adiposo foram utilizadas para gerar células iPS em camundongos (SUGII et al., 2011) e humanos (SUN et al., 2009; SUGII et al., 2011). As células tronco derivadas do tecido adiposo são multipotentes. Após a indução, estas adquirem pluripotência, a qual pode ser comprovada pela expressão positiva de marcadores de pluripotência, formação de corpos embrióides *in vitro* e teratomas *in vivo* (SUGII et al., 2011).

O estabelecimento de células iPS a partir de células tronco derivadas do tecido adiposo humano ocorre de forma 200 vezes mais eficiente e rápida do que a partir de fibroblastos, considerando a morfologia e quantidade de células positivas para o TRA-1-60. Estas células são indistinguíveis das células embrionárias humanas e mantêm seu cariótipo normal e estável por ao menos três meses de cultura (SUN et al., 2009).

Mesmo utilizando diferentes metodologias, apenas uma pequena fração das células transduzidas consegue se reprogramar adequadamente em células iPS, o que ocorre no mínimo entre 5 e 10 dias (JAENISCH; YOUNG, 2008). A baixa eficiência na produção das

iPS consiste em uma das maiores adversidades encontradas. Segundo Suggi et al. (2011), a eficiência está relacionada ao título de retrovírus, eficiência de transdução, viabilidade celular e estado de proliferação, escolha do meio, fatores de crescimento, matriz e células alimentadoras.

4.4 Terapia Celular

Diversos trabalhos vem sendo realizados buscando a identificação, caracterização e diferenciação de células tronco das mais variadas fontes (DE BARI, 2001; NARDI; MERELLES, 2006). A partir do isolamento, quantificação e expansão destas células, busca-se a utilização das células tronco na terapia celular, como tentativa de tratamento para patologias que afetam os animais e o homem (BARKER; WAGNER, 2003).

No organismo adulto, as células tronco normalmente presentes contribuem para o desenvolvimento pós-natal por meio de substituição das células perdidas devido a injúrias, apoptose programada ou “turnover” fisiológico (DEBARI et al., 2001; SACHS et al., 2012). Mediante aplicação terapêutica, as células promovem o reparo físico de tecidos com injúrias e o apoio por meio de fatores secretados (NARDI; MEIRELLES et al., 2006).

Quanto mais indiferenciada for uma célula, maior será o seu potencial de uso em múltiplas aplicações (BYDLOWSKI et al., 2009), de forma que a plasticidade das células tronco faz destas uma ferramenta terapêutica promissora para o tratamento de doenças (GROTTO; NORONHA, 2003). Neste contexto, as células iPS podem significar uma possibilidade de utilização de células pluripotentes, sem os problemas éticos relacionados ao uso de células tronco embrionárias.

As células tronco ideais para a realização de transplantes devem ser imunologicamente inertes, provenientes de fontes de fácil acesso, possuir rápida expansibilidade em cultivo, apresentar capacidade de sobrevivência em longo prazo e de integração no sítio hospedeiro, além de serem propícias à transfecção e expressão de genes exógenos (AZIZI et al., 1998). Tanto as células iPS como as ADSC podem ser coletadas do próprio paciente. O uso de células autólogas é preferível, pois evita os riscos de rejeição (SACHS et al., 2012).

As células podem ser transplantadas sistemicamente por via intravenosa ou arterial, por injeção no local de lesão ou com o auxílio de scaffolds, isto é, uma estrutura base para manter as células aderidas ao sítio alvo. No entanto, até o momento parece não haver um consenso

sobre a via de aplicação mais eficaz. Lam e Longaker (2012), afirmam que células injetadas se dissipam ou morrem no organismo, sendo que a adesão das células está diretamente relacionada ao seu crescimento e diferenciação. Neste contexto, as ADSC se aderem à diferentes materiais testados, mais facilmente do que as células iPS (LAM; LONGAKER, 2012). O uso de biomateriais colonizados com células pré-diferenciadas acelera e melhora a regeneração tecidual (REICH et al., 2012).

Entretanto, diversos autores obtiveram sucesso ao utilizar as células tronco por via intravenosa (LEE et al., 2006) e injeção local (KAMADA et al., 2009; ABDUSAIMI et al., 2011; KIM et al., 2011), sendo descrita uma rápida migração das ADSC ao sítio de lesão (REICH et al., 2012).

A utilização terapêutica das ADSC é indiscutivelmente promissora. Essas células vêm sendo estudadas para diversas enfermidades humanas e animais. Elas exercem um efeito terapêutico parácrino por meio da secreção de fatores de crescimento como o BGF, EGF e BDNF (BAHN et al., 2012). Além disso, atuam diretamente se diferenciando em células específicas dos tecidos que habitam. Na cicatrização de feridas cutâneas, os resultados são promissores pela inibição da resposta inflamatória, diferenciação em células da pele, estimulação da angiogênese, além da secreção de fatores de crescimento (FALANGA et al., 2007; LUO et al., 2010; CHERUBINO et al., 2011). Studeny et al. (2002) verificaram com sucesso a imunossupressão de cânceres do tipo melanoma, e o grupo de Abdusaimi (2011) descreveu a formação de novos vasos e tecido ósseo após injeção autóloga de ADSC na necrose avascular da cabeça do fêmur em coelhos.

Neste contexto, as células iPS apresentam-se como uma nova tecnologia para o desenvolvimento de modelos *in vitro* de diversas doenças humanas e animais. Desta forma, Christoforou et al. (2013) geraram progenitores cardíacos e cardiomiócitos capazes de formar tecidos biossintéticos e Burkhardt et al. (2013) produziram um modelo celular da Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS). Atualmente, a investigação de fisiopatologias, o desenvolvimento de drogas e estudos toxicológicos constituem as maiores aplicações destas células (MEYER, 2008).

Recentemente, testes pré-clínicos vem utilizando as iPS pré-diferenciadas *in vitro* na terapia de afecções, como regeneração da função neural (YUAN et al., 2013) e regeneração periodontal em ratos (HYNES et al., 2013). Futuramente, espera-se que as células iPS possam ser utilizadas na terapia de doenças até então sem cura.

4.5 O Coelho como Modelo Experimental

Modelos animais são utilizados em várias áreas de pesquisa. Neste contexto, o coelho, como modelo experimental, é promissor por ser facilmente encontrado e apresentar diversas vantagens. Além disto, há muita informação sobre eles disponível em literatura.

Os coelhos são descendentes do Coelho Selvagem Europeu *Oryctolagus cuniculus*, e são classificados como lagomorfos (CHEEKE, 1987). Entre as vantagens da sua utilização em pesquisa, pode-se citar que são dóceis e fáceis de manipular e seu tamanho permite o trabalho com um grande número de animais, além da possível padronização genética e ambiental. Em adição, possuem ciclos vitais curtos (gestação, lactação e puberdade) e há a possibilidade de transplante e transmissão de tumores (CALASANS-MAIA et al., 2009). A manutenção dos coelhos é relativamente econômica e seu tamanho é ideal para procedimentos cirúrgicos experimentais, quando comparado a outros modelos animais, (MAPARA et al., 2012). Também não requerem muito espaço e se adaptam facilmente (CHEEKE, 1987).

O coelho demonstra-se extremamente útil para uma grande variedade de áreas de pesquisa, como testes pré-clínicos, fertilização in vitro, desenvolvimento embrionário e organogênese, neurofisiologia, oftalmologia e cardiologia. Também são utilizados para estudos toxicológicos, análises de efeitos de drogas e do sistema imunológico (PUSCHEL et al., 2010).

Linhagens estáveis de células tronco embrionárias de coelhos foram produzidas por Wang et al. (2007) e Honda et al. (2008) e consistem em ótimos modelos de estudos para terapias de transplante celular, podendo ser combinadas com terapias gênicas no futuro. A geração de células iPS de coelhos foi realizada pelo mesmo grupo em 2010, sendo uma promissora alternativa para a utilização de células pluripotentes em pesquisa.

Materialis e Métodos

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos Animais

Este experimento foi julgado e aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 2560/2012.

Um coelho macho da raça Nova Zelândia, de aproximadamente 45 dias, foi comprado em agropecuária, especialmente para a coleta do tecido adiposo. O animal foi mantido sob condições ideais de manejo até o final do experimento e então doado como animal de estimação. Em outro momento, um coelho Nova Zelândia macho adulto, doado por uma clínica veterinária local, foi utilizado para coleta de gordura. Nesses animais, foi realizada coleta cirúrgica, descrita como *Procedimento I*.

As demais amostras foram coletadas em abatedouro de coelhos administrado pela Prefeitura do Campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo, campus Pirassununga. Os coelhos eram machos e fêmeas, da raça Nova Zelândia, com média de 5 meses de idade e peso variando entre 2,5 a 3,5 kg. Nesses animais, a coleta foi realizada nas carcaças, descrito como *Procedimento II*.

5.2 Coleta de Gordura e Fibroblastos de Coelhos

5.2.1 Procedimento I

Este procedimento foi realizado por uma médica veterinária treinada (Dra. Juliana Casals). O coelho foi anestesiado com uma associação de quetamina (40 mg/Kg intramuscular) e xilazina (10 mg/kg). Sob procedimento cirúrgico de laparoscopia, foi coletado aproximadamente 1 grama de tecido adiposo intraperitoneal por meio de incisão na região abdominal esquerda. Ao final da cirurgia, foram administrados 10 mg/kg de

enrofloxacin intramuscular, 5mg/kg de cetoprofeno e 25mg/kg de dipirona subcutânea. A ferida foi tratada com rifampicina spray a cada 8 horas, por 2 dias.

5.2.2 Procedimento II

Este procedimento foi realizado sete vezes e obteve eficácia variável em cada coleta. Durante o abate de coelhos no matadouro-escola da FZEA, foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo da região inguinal de coelhos da raça Nova Zelândia. Nessas ocasiões, foram coletadas amostras de fragmento de orelha (aproximadamente 2 cm²) de diferentes animais. Todos os materiais coletados foram armazenados individualmente em frascos estéreis com PBS 1X e 5% antibiótico (penicilina e estreptomicina), mantidos em isopor com gelo e levados em seguida ao laboratório para isolamento das células tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) e fibroblastos da orelha.

O objetivo de se coletar o fragmento de orelha de coelhos foi estabelecer uma linhagem de fibroblastos para servir de fonte alternativa para indução de pluripotência.

O procedimento para coleta de gordura foi reformulado devido à alta contaminação obtida na técnica previamente descrita. Assim, as amostras (aproximadamente 1,5 gramas) foram coletadas do tecido adiposo intra-abdominal e armazenadas imediatamente em frascos cônicos estéreis, contendo DMEN F12 (LGC), suplementado com 3% de penicilina e estreptomicina, 1% de gentamicina e 3% de anfotericina B, e mantidos em isopor com gelo.

5.3 Isolamento de Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo

Para o isolamento das células tronco derivadas do tecido adiposo, primeiramente foi utilizado o protocolo descrito por Chen et al. (2011) executado em coelhos. Assim, as amostras foram lavadas com PBS 1x + 5% de antibiótico e transferidas individualmente para placas de Petri, onde foram seccionadas finamente com o auxílio de bisturi e tesoura cirúrgica. Após este procedimento inicial, as amostras foram transferidas para tubos cônicos de 15 mL, para adição da collagenase, e armazenadas por duas horas em estufa a 37°, para

digestão da matriz extracelular. Passado esse tempo, a collagenase foi neutralizada pela adição da mesma quantidade de meio completo. A solução foi centrifugada a 1200 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio de cultura. Para uma maior purificação, este último procedimento foi repetido, e então as células foram plaqueadas.

Após alguns eventos de contaminação das colônias primárias, tanto provenientes de abatedouro quanto por coleta cirúrgica, reformulamos o protocolo de isolamento, baseando-se na técnica demonstrada pelo Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), durante o curso de Células Tronco realizado pelo CBAB – 2012, sob coordenação da Profa. Dra Andrea Trentin, na cidade de Florianópolis, SC. A técnica consiste em lavar as amostras individualmente com PBS autoclavado e transferi-las diretamente para uma placa de cultura de 60 mm, contendo 2 mL de collagenase (1 mg/ml), suplementado com 1% de antibiótico. Aguardamos 5 minutos e iniciamos a secção mecânica dos tecidos. Desta forma, enquanto a collagenase agia pela digestão enzimática, o tecido sofria a digestão mecânica pelo bisturi. Após 5 minutos seccionando finamente cada amostra, a placa era incubada na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por mais 5 a 10 minutos. Após este período o conteúdo das placas era transferido para tubos cônicos de 15 mL com auxílio de pipetas de Pasteur. Então era adicionado meio completo para bloqueio da collagenase e centrifugado a 1200 rpm, para separar o pellet celular do restante de tecido. Após 5 minutos, o sobrenadante era descartado e o pellet ressuspensionado em meio de cultura, sendo plaqueado em placas de 60 ou 100 mm. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura utilizado está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura utilizado para ADSC

Componente	Porcentagem	Para 50 mL
DMEM/F12 (LGC)	86%	46 mL
SFB (Sigma)	10%	5 mL
Aminoácidos não essenciais (Sigma)	1%	500 µL
L-glutamina (Sigma)	1%	500 µL
Penicilina e Estreptomicina (Sigma)	0,5%	250 µL

Após o preparo, o meio era filtrado com membranas de 22µm (Millipore). O meio era armazenado em geladeira por até uma semana, evitando assim a perda da eficácia do antibiótico e antifúngico.

5.4 Isolamento de Fibroblastos

As amostras de orelhas foram lavadas com PBS contendo 5% antibiótico e em seguida a epiderme e os pelos foram retirados com o auxílio de um bisturi. O tecido restante foi seccionado finamente e digerido pela solução de colagenase por 2 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado, em seguida, foi adicionado meio de cultura (o mesmo utilizado para as ADSC).

5.5 Repiques de Culturas

Quando as placas atingiam confluência de 80 a 90%, era realizado o procedimento de repique das células. O meio era retirado com a pipeta e a tripsina era adicionada, sendo a quantidade de acordo com o tamanho da placa: para uma placa de 60mm, foi utilizado 2 mL de tripsina. As placas com tripsina eram incubadas em estufa a 37°C por 7 minutos, sendo que, após este período, as placas eram examinadas sob microscópio, para verificar se as células haviam se soltado do fundo. Assim que isso acontecia, a solução era transferida para tubos cônicos de 15 mL e meio de cultura era adicionado para desativar a tripsina. Os tubos eram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet era ressuspensionado em meio de cultura, para replaqueamento em concentração menor e realização de análises diversas, ou ressuspensionado em meio de congelamento, para conservação das células.

5.6 Congelamento de Células

Para este procedimento, o meio utilizado está descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Composição do meio de congelamento de células ADSC e fibroblastos

Componente:	Porcentagem	Para 1 mL:
DMEM (Sigma)	40%	400µL
SFB (Sigma)	40%	400 µL
Dimetil-Sulfóxido (DMSO)	20%	200 µL

As ADSC e fibroblastos foram congelados em diversas passagens entre zero e 10 para posteriores estudos de indução de pluripotência e análises de caracterização das ADSC.

O pellet celular resultante da centrifugação das células descrito anteriormente era ressuspendido em 1 mL de meio de congelamento. Em seguida, a solução era transferida para criotubos especiais de congelamento, identificados com tipo de célula, nome, data e passagem. Os tubos eram rapidamente acondicionados em recipientes “Misterfrost” especiais para resfriamento lento das células. Estes potes eram colocados no freezer -80°C e após 24 horas os tubos eram transferidos para galões de nitrogênio líquido.

5.7 Caracterização das Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo

5.7.1 Curva de Crescimento Celular

As células foram plaqueadas em primeira passagem na quantidade de 1×10^3 células por poço de 2 placas de 6 poços. Foi contado um poço a cada 24 horas, até as células atingirem confluência. O meio de cultura era trocado a cada 3 dias. Os valores obtidos foram anotados e demonstrados graficamente.

Para a contagem das células, o meio era retirado e 2 mL de tripsina era adicionado, aguardando 7 minutos em estufa (período suficiente para que todas as células se soltassem do fundo da placa). As soluções eram transferidas para tubos cônicos de 15 mL e era então adicionado 2 mL de meio de cultura para inativação da tripsina. Os tubos sofriam 5 minutos de centrifugação a 1200 rpm, com posterior descarte do sobrenadante e suspensão do pellet celular em 1 mL de meio.

Com auxílio de uma pipeta, a solução era homogeneizada e 10 µL eram coletados para contagem celular em Câmara de Neubauer. Os quatro quadrados grandes das extremidades da

câmara eram contados e o valor total dividido por 4, sendo que o resultado obtido significa a quantidade de células ($\times 10^4$) presentes em 1 mL.

Após a contagem, as quantidades encontradas eram devidamente anotadas para posterior análise gráfica. O restante das células, quando significativo, era congelado conforme descrito previamente. Este procedimento foi realizado por 3 vezes para aumentar a acurácia dos resultados.

5.7.2 Doubling Time

Os valores obtidos com a curva de crescimento foram utilizados para o cálculo do tempo de duplicação das células, segundo protocolo descrito por REICH et al., (2012). Desta forma, os números de células em cada tempo foram plotados em um gráfico semi-logarítmico e uma linha de regressão foi traçada. O Doubling Time (DT) foi calculado pela fórmula $DT = \log_{10} 2/m$, onde m é a inclinação da linha de regressão.

5.7.3 Unidades Formadoras de Colônias

Para esta análise, foram plaqueadas ADSC em primeira passagem. Utilizamos nove placas de 60 mm com diferentes concentrações celulares: 3 placas 1×10^4 , 3 placas 2×10^4 e 3 placas 3×10^4 . As células foram monitoradas e o meio de cultura trocado apenas após 7 dias. Como as células de todas as placas atingiram confluência rapidamente, refizemos a análise utilizando placas de cultivo maiores (100 mm), plaqueando ADSC em segunda passagem em concentração de 1×10^4 em 3 placas. Novamente, as células atingiram confluência antes de 7 dias de cultivo. Realizamos o experimento pela terceira vez, utilizando células descongeladas, em terceira passagem, mas desta vez utilizando a concentração de 10^3 células, em 3 placas de 100 mm. Desta feita, as células atingiram confluência após 10 dias de cultivo.

Por fim, foi estabelecido um novo protocolo para se adequar a rapidez proliferativa das células. Três placas de 100 mm foram cultivadas com 10^3 células em primeira passagem. As placas foram observadas diariamente e após 7 dias realizamos a contagem das colônias. Para este procedimento, o meio de cultura foi retirado e as placas foram lavadas com PBS 1x

autoclavado. Em seguida, foram adicionados 5 mL de Paraformol 4% em cada placa e estas incubadas por 30 minutos. Após este período, o paraformol foi descartado e as placas novamente lavadas com PBS. Então, foi adicionado 5 mL de corante Azul de Toluidina e aguardado 1 minuto. Ao final, as placas foram lavadas para retirar o excesso de corante, possibilitando a visualização das colônias em coloração roxa. As colônias com mais de 200 células foram contadas e fotomicrografadas.

5.7.4 Viabilidade Celular

Para definir a viabilidade celular, células em primeira passagem foram dispostas em alíquotas de 10^5 células por tubo criogênico em um total de três tubos. Os tubos foram congelados como descrito previamente. Após uma semana, as células foram descongeladas em temperatura ambiente e transferidas para tubos cônicos de 15 mL com adição de meio de cultura completo, para inativar a toxicidade do DMSO. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultura. As células foram homogeneizadas e 10 μ L de cada amostra foram coletados e adicionados de 10 μ L de Azul de Tripán. A solução foi homogeneizada e contada em câmara de Neubauer. Como o corante Azul de Tripán entra nas células mortas, corando as mesmas, foi possível calcular as porcentagens de células vivas e mortas por meio da visualização das células tingidas.

5.7.5 Análise Imunocitoquímica

Para a caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais, foram utilizadas placas de 6 poços com culturas com 70% de confluência em passagem zero e seis. As placas foram lavadas com PBS 1x autoclavado e fixadas com paraformaldeído a 4% por 12 minutos. Elas foram novamente lavadas com PBS por 2 vezes de 1 minuto cada.

O bloqueio foi efetuado com 2% de BSA por 30 minutos, em temperatura ambiente, para posterior incubação overnight a 4°C, com anticorpo primário diluído na proporção de 1:100, em tampão BSA a 0,2%. As etapas subsequentes foram realizadas na ausência de luz.

Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a uma substância fluorescente, diluído em tampão BSA a 0,2%, durante 2 horas, em temperatura ambiente. Por fim, foi efetuada a marcação específica do núcleo com 10 µg/ml Hoechst 33342 por 8 minutos. As células foram visualizadas sob microscopia de fluorescência. Foram analisadas as expressões de marcadores para células tronco mesenquimais CD90+, CD73+ e ausência de fluorescência para os marcadores hematopoiéticos CD45- e CD34-. Informações detalhadas sobre os anticorpos utilizados encontram-se na Tabela 4.

5.7.6 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo consiste em uma tecnologia para analisar as células individualmente, caracterizando subpopulações presentes em populações heterogêneas, como é o caso das células tronco mesenquimais. Para esta análise, ADSC em 2ª passagem foram cultivadas e testadas para os marcadores de superfície CD34, CD45, CD73, CD90 e nucleares Nanog, Sox2 e Oct4. Os anticorpos utilizados estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados para análise de expressão de marcadores moleculares

Anticorpo	Produzido em	Imunoglobulina	Marcador de	Positivo em	Empresa
CD 90	goat	IgG	membrana	Medula óssea, células tronco hematopoiéticas e pluripotentes.	Santa Cruz
CD 73	goat	IgG	membrana	Células endoteliais, células B e T, células tronco mesenquimais.	Santa Cruz
CD 34	mouse	IgG	membrana	Células hematopoéticas	Santa Cruz
CD 45	mouse	igG2A	membrana	Células hematopoéticas	Santa Cruz
Nanog	rabbit	igG	núcleo	Células pluripotentes	Santa Cruz
Sox2	rabbit	igG	núcleo	Células pluripotentes	Santa Cruz
Oct 4	rabbit	igG	núcleo	Células pluripotentes	Santa Cruz

Para os marcadores de membrana celular, 10^5 células foram ressuspensas em PBS + 0,1% BSA (Tampão) e centrifugadas a 8 min a 8G. O sobrenadante foi descartado e adicionamos 500 μ L de tampão e centrifugamos novamente. Após retirar o sobrenadante, incubamos com 50 μ L de anticorpo primário (1:100) por 1 hora, em temperatura ambiente. Após este período, ressuspendemos em tampão e centrifugamos, por duas vezes. Então, incubamos com o anticorpo secundário por 1 hora, na ausência de luz. O procedimento de ressuspensão em tampão e centrifugação foi realizado mais duas vezes. Para finalizar, as amostras foram fixadas com 200 μ L PFA 4%, e mantidas no escuro até passar no citômetro.

Para os marcadores nucleares, 2×10^5 células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise (FACS Lysing Solution, BD), diluído 1:10 em água, por 10 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Os pellets foram ressuspensos em 2 mL de PBS 1x e centrifugados por 3 min, a 1.800 rpm. O sobrenadante era descartado e o pellet ressuspendido em 300 μ L de Solução de permeabilização (PERM2, BD), diluído 1:10 em água, com o anticorpo primário diluído 1:100. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspendido em PBS 1x. As amostras eram submetidas à nova centrifugação, e o pellet era ressuspendido com o anticorpo secundário. A partir deste momento, as amostras foram mantidas na ausência de luz. Após 10 minutos, as amostras eram lavadas e ressuspensas em 200 μ L de PBS e então passadas no citômetro.

5.7.7 Diferenciação Celular

Para os testes de diferenciação celular osteogênica, adipogênica e condrogênica, foram utilizados os Kits StemXVivo Human/Mouse da empresa R&D Systems, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Desta forma, para as diferenciações adipogênica e osteogênica, placas de 35 mm contendo ADSC em 100% e 70% de confluência, respectivamente, foram mantidas por 30 dias, com o meio de indução específico trocado a cada 3 dias. No caso da diferenciação condrogênica, as células foram mantidas em forma de pellet, em tubos cônicos de 15 mL. As análises foram realizadas em triplicata, além do controle para cada tipo de diferenciação, em que foi utilizado apenas o meio base, sem indução de diferenciação.

As diferenciações foram detectadas por meio de colorações específicas. A matriz óssea e osteócitos foram corados com Alizarin Red e os adipócitos foram corados com Sudan Black. Os pellets resultantes da diferenciação condrogênica foram fixados por 30 minutos em paraformaldeído a 4% e depois imersos em parafina, dentro de cassetes. Os blocos foram cortados em seções de 5 μm , com auxílio de um micrótomo. As lâminas foram coradas com Alcian Blue, Tricoma de Masson e Picrossirus e fotomicrografadas sob microscópio de luz polarizada, para visualização de fibras colágenas.

5.8 Indução da Pluripotência

Foram utilizados vetores integrativos lentivirais policistronicos excisáveis STEMCCA - *Stem cell cassette*, (SOMMER et al., 2009), contendo o cDNA de OCT4, SOX2, cMYC e KLF4 humanos (hSTEMCCA) ou murinos (mSTEMCCA) e os plasmídeos auxiliares contendo as sequências TAT, REV, Hgpm2 e VSVG. Apenas para o *Protocolo III*, foi utilizado o STEMCCA RED OKS, em que o cMYC foi substituído pela proteína fluorescente mCherry (Figura 1).

Para a indução de pluripotência, foram fundamentais os suportes prestados pela Dra. Fabiana Fernandes Bressan, além da equipe do Laboratório de Biotecnologia do Hemocentro de Ribeirão Preto (Dra. Tathiane Malta e Dra. Aline Ferreira).

Figura 1 - Representação esquemática dos vetores lentivirais utilizados para transdução

Fonte: Adaptado de Somers et al., 2010.

5.8.1 Fibroblastos embrionários murinos para monocamadas celulares de suporte

Os fibroblastos embrionários murinos (MEFs) utilizados foram produzidos em nosso laboratório. Para este procedimento, fêmeas e machos de camundongos *Swiss* com três a cinco meses de idade foram acasalados e a cópula confirmada pela observação da presença de tampão vaginal (*plug*). Após 13,5 dias, as fêmeas foram sacrificadas em câmara de CO₂ e os úteros gravídicos retirados e imediatamente alocados em solução de PBS suplementado com antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (anfotericina). Após lavagens em PBS, os úteros foram dissecados e os fetos coletados. Foram retirados cabeça, membros, órgãos torácicos e abdominais, sendo o tecido restante picotado e incubado com colagenase IV. Após 3 horas de incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo completo IMDM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone) e antibióticos Penicilina e Streptomicina (Gibco).

As células foram plaqueadas em uma proporção de aproximadamente uma garrafa de cultivo de 75cm² para cada 4 embriões dissecados. Após confluência de 80%, as células eram congeladas para uso posterior. Para utilização das MEFs, garrafas de cultivo de 75cm² com 80% de confluência eram incubadas com 10 mg/ mL de mitomicina (Sigma) por 3 horas, a 37°C. Após este período, os cultivos eram lavados com PBS, tripsinizados e replaqueados em placas de cultivo na concentração de $1,2 \times 10^5$ células por placa de 35 mm.

5.8.2 Partículas Lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas por meio da lipofecção de células 293FT (Invitrogen) com lipofectamina 2000 (Invitrogen) pelas doutoras Fabiana Bressan (*Protocolos I, II, III e V*) e Tathiane Malta e Aline Ferreira (*protocolo IV*). Foram utilizadas 5×10^6 células 293FT, após 24 horas de cultivo em placas de 100 mm, de modo que apresentassem 90% de confluência no momento da transfecção. Foram utilizados 12 mg dos vetores STEMCCA e 2 mg de cada vetor auxiliar, com exceção do plasmídeo VSVG, que foi utilizado 2,4 mg (protocolo adaptado de Darrell N. Kotton e Gustavo Mostoslavsky, Center For Regenerative Medicine – CReM, Boston University, apresentado pela Dra. Fabiana Fernandes Bressan). Após 12 a 16 horas de lipofecção, o meio foi trocado. O sobrenadante (meio de cultivo) foi

recolhido e trocado após 24, 48 e 72 horas da transdução, filtrados e mantidos a 4°C. Para o *protocolo IV*, o sobrenadante total foi concentrado em ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h40min, a 48960g no rotor SW28. As partículas virais foram utilizadas no mesmo dia ou congeladas e mantidas a -80°C, sendo utilizadas quando necessário, com o cuidado de não recongelar partículas virais.

5.8.3 Transdução Celular

Células tronco derivadas do tecido adiposo ou fibroblastos foram cultivados por 24 horas em placas de 6 poços, em diferentes quantidades e passagens. As células eram mantidas em estufas a 38,5°C sob 5% de CO₂. Foram adicionados 50 µL do concentrado viral acrescido de 8 ng/mL de polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma). O meio de cultivo foi trocado após 12 a 16 horas. Até 5 a 6 dias pós-transdução, o meio utilizado foi o mesmo das ADSC. Após este período, as células foram transferidas para MEFs, e então o meio utilizado foi o descrito abaixo (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição do meio de cultura utilizado no período de reprogramação

Componente	Quantidade
DMEM/F12 Knockout (Invitrogen)	80%
Knokout Serum Replacement – KSR (Invitrogen)	20%
Glutamina (Invitrogen)	1%
β-mercaptoetanol (Invitrogen)	0,1%
bFGF (Peprotech)	0,1%
Penicilina & Estreptomicina (Sigma)	1%

Testamos a utilização de diversos protocolos, cada um contendo variações, buscando padronizar a metodologia. Os protocolos estão descritos a seguir:

5.8.3.1 Protocolo I

Foram testadas as transduções por fatores humanos, murinos ou a combinação dos dois. Em cada combinação, foram testadas a presença ou ausência do Fator Inibidor de

Leucemia Humano (Human Leukemia Inhibitory Factor – LIF, 1000U/mL, Millipore), iGSK3 (inibidor da via de sinalização da glicogênio sintase quinase 3,3 μ M, Stemgent) e iMEK (inibidor da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogeno quinase (1 μ M, Stemgent).

Este protocolo foi repetido por seis vezes utilizando ADSC e duas vezes com fibroblastos em diferentes quantidades e passagens, conforme tabela 5 abaixo.

Tabela 5 - Tipos e quantidades de células submetidas ao *Protocolo I*

Células	Quantidade
ADSC Pzero	5×10^5
Fibroblastos P1	5×10^5
ADSC P1	5×10^4
Fibroblastos P1	5×10^4
ADSC Pzero	1×10^4
ADSC P1	1×10^4
ADSC P1	1×10^3
ADSC P4	5×10^3

5.8.3.2 *Protocolo II*

Foram testadas as transduções por STEMCCA humano, murino ou a combinação dos dois. Em cada combinação, foi testada a presença ou ausência do LIF, (1000U/mL, Millipore). Neste protocolo, não foram utilizados inibidores. Foi realizado uma vez, com 5×10^3 ADSC em 4ª passagem.

5.8.3.3 *Protocolo III*

Foi testada a exclusão do cMYC, por meio da transdução por STEMCCA RED OKS murino (Milipore), além da presença ou ausência do LIF (1000U/mL, Millipore). Este

protocolo foi realizado uma vez em 5×10^3 ADSC em 4ª passagem e 5×10^3 fibroblastos em 2ª passagem.

5.8.3.4 Protocolo IV

Foram testadas as transduções por duas linhagens lentivirais com fatores humanos produzidos no Laboratório de Biotecnologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, denominados RP v1 e RP v2. As culturas foram mantidas em presença ou ausência do LIF, (1000U/mL, Millipore). Este protocolo foi realizado duas vezes, com 5×10^3 ADSC em 2ª passagem.

As células resultantes deste protocolo foram submetidas a teste da atividade da fosfatase alcalina. Para esta análise, foi utilizado o kit de detecção de fosfatase alcalina (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma), segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Desta forma, as células foram fixadas e incubadas em solução alcalina de naftol AS-BI e *fast red violet* LB. A coloração vermelha indica sítios de atividade da fosfatase alcalina.

5.8.3.4 Protocolo V

Neste protocolo, foram testadas as transfecções com os fatores OCT4, SOX2, KLF4 e cMYC em separado, além da combinação OCT4+SOX2, em 5×10^3 ADSC em 4ª passagem. Os vetores foram conjugados a proteínas fluorescentes, descritas no quadro 2. Cada poço de uma placa de 6 poços foi transduzida com um fator, ou a combinação de OCT4+SOX2, e um poço foi deixado como controle. Estas células foram cultivadas em meio IMDM completo, expandidas e analisadas por citometria de fluxo. O objetivo deste protocolo foi verificar se os fatores conseguiram se integrar adequadamente nas células.

Quadro 2 - Vetores conjugados a proteínas fluorescentes utilizados para transdução das células ADSC

Vetor	Proteína
OCT4	vexGFP
cMYC	mCerulean
SOX2	mCitrine
KLF4	mCherry

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Coleta e Isolamento de ADSCs e Fibroblastos de Coelhos

As coletas de gordura foram realizadas em 33 animais, sendo 2 por método cirúrgico e 31 por coleta de amostras em abatedouro. Estas coletas resultaram no estabelecimento de 17 diferentes linhagens de ADSC. Os fibroblastos foram coletados em abates e resultaram em seis linhagens viáveis que foram congeladas e utilizadas para a produção de células iPS.

O resultado das coletas foi variável e está demonstrado no quadro 3.

Quadro 3 - Informações sobre as coletas de tecido adiposo e fragmentos de orelha

Data da coleta	Tipo de Coleta	Tecido	Amostras	Resultado	Utilização
17/04/2012	Cirúrgica	Gordura Intra-abdominal	1	Eficaz	Isolamento e ADSC, Curva de Crescimento, CFU, Congelamento.
27/04/2012	Abatedouro	Gordura Subcutânea	3	Contaminação	X
25/05/2012	Abatedouro	Gordura Subcutânea	3	Contaminação	X
22/06/2012	Abatedouro	Gordura Subcutânea	3	Contaminação	X
28/06/2012	Cirúrgica	Gordura Intra-abdominal	1	Contaminação	X
27/07/2012	Abatedouro	Gordura Subcutânea	3	Contaminação	X
24/08/2012	Abatedouro	Gordura Subcutânea	3	Contaminação	X
24/08/2012	Abatedouro	Orelha	3	2 viáveis, 1 contaminada	Isolamento de Fibroblastos e congelamento
28/09/2012	Abatedouro	Gordura Intra-abdominal e subcutânea	6	Eficaz	Isolamento de ADSC, Curva de Crescimento, Viabilidade Celular, Citometria de Fluxo, Imunocitoquímica, iPS e congelamento.
28/09/2012	Abatedouro	Orelha	4	Eficaz	Isolamento de Fibroblastos e iPS e congelamento.
23/11/2012	Abatedouro	Gordura Intra-abdominal	10	Eficaz	Curva de Crescimento, CFU, Imunocitoquímica, diferenciação celular, iPS e congelamento.

Foi possível estabelecer culturas de ADSC e fibroblastos utilizando a primeira metodologia proposta, porém a segunda técnica apresentou melhores resultados em relação à

proliferação celular e ausência de contaminação. O novo protocolo levou apenas 30 minutos, contra 3 horas do anterior e resultou em uma quantidade significativa de células aderentes após poucos dias de cultivo. Desta forma, reduziu-se o tempo de manipulação das células, reduzindo a possibilidade de contaminação. Além disso, as células ficaram menos tempo expostas à ação da collagenase. As placas foram visualizadas e fotomicrografadas sob microscópio óptico em diferentes tempos de cultivo e passagens. A figura 2 resume o procedimento de isolamento das ADSC e a Figura 3 evidencia as culturas de ADSC e fibroblastos em diferentes passagens.

Figura 2 - Fotos do procedimento de isolamento de ADSC

Legenda: a) Armazenamento das amostras coletadas; b) Amostras na capela de fluxo laminar; c) Amostras em collagenase; d) Amostras após secção por bisturi; e) Incubação das amostras na estufa; f) Amostras após ação da collagenase; g) Centrifugação das amostras; h) Separação das amostras em frações, com o botão celular no fundo do tubo; i) Placa de cultura; j) Incubação das placas em estufa.

Figura 3 - Fotomicrografias de células isoladas

Legenda: a) Cultura primária de ADSC com 24 horas; b) ADSC em 3ª passagem; c) ADSC em 10ª passagem; d) Fibroblastos em 3ª passagem.

6.2 Caracterização das Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo

6.2.1 Análise da Curva de Crescimento

As células em primeira passagem foram plaqueadas em placas de 6 poços e um poço por dia foi contado até atingirem confluência de 100%, o que ocorreu após 8 dias. Assim os resultados obtidos formam uma curva crescente da proliferação celular, conforme demonstrado no gráfico abaixo (Figura 4).

Figura 4 - Gráfico da curva de crescimento das ADSC

Legenda: Y: número de células; X: tempo em cultura. As células atingiram confluência após 8 dias em cultura.

6.2.2 Doubling Time

Pelo cálculo do *Doubling Time*, verificamos que após uma fase lag (dois primeiros dias), as células começaram a se proliferar rapidamente, mantendo o seu tempo de duplicação relativamente estável (Figura 5).

Figura 5 - Gráfico do Doubling Time das ADSC

Legenda: Y: tempo de duplicação, X: tempo em cultura (x).

6.2.3 Análise das Unidades Formadoras de Colônias

As placas de cultura de ADSC estabelecidas para contagem das Unidades Formadoras de Colônias fibroblastoides (CFU-F) apresentaram confluência completa em 3, 5 e 7 dias, variando com a concentração inicial plaqueada. Desta forma, não foi possível proceder à análise. Utilizando uma baixa concentração (1×10^4 células) em uma placa maior (100mm), as células novamente atingiram total confluência após cinco dias. Por fim, utilizamos 10^3 células descongeladas em terceira passagem em placas de 100mm e após 10 dias, estas apresentaram confluência.

Após a adaptação do protocolo a estas células, que se proliferam muito rapidamente, foi possível fazer a contagem das células após 7 dias, quando utilizadas 10^3 células em placas de 100mm. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 6 e as fotografias macro e microscópicas na figura 6.

Tabela 6 - Quantidade de Colônias fibroblastoides formadas na análise de CFU-F.

Placa	Quantidade de Colônias
1	231
2	241
3	209
Média	227

Figura 6 - Análise de CFU-F das ADSC

Legenda: a) Fotografia das colônias coradas; b), c) e d) Fotomicrografias de colônias de ADSCs coradas com azul de toluidina.

6.2.4 Viabilidade Celular

As células foram descongeladas e coradas com Azul de Tripan. Os resultados obtidos estão na tabela 7.

Tabela 7 - Determinação da viabilidade celular por meio da contagem de células vivas e mortas após criopreservação

Placa	Total de células	% Mortas	% Vivas (Viabilidade Celular)
A	$6,25 \times 10^4$	18	82
B	$6,375 \times 10^4$	19,6	80,4
C	$5,875 \times 10^4$	17	83
Média	$6,16 \times 10^4$	18,19	81,81

As culturas foram mantidas até a 12ª passagem, para demonstrar que as células congeladas são viáveis por longos períodos após o descongelamento (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografias das células submetidas a teste de viabilidade celular

Legenda: a) Contagem das células na câmara de Neubauer. É possível visualizar células mortas coradas em azul de Tripán (seta branca), diferentes das vivas, vistas em amarelo (seta preta); b) cultivo viável de células após congelamento seguiu a formatação das figuras anteriores.

6.2.5 Análise Imunocitoquímica

As análises dos resultados imunocitoquímicos foram realizadas por meio de microscópio de fluorescência (Zeiss AXIO Imager. A1, Carl Zeiss, Germany; e Nikon Eclipse Ti-S, Nikon, Japão).

A análise das células em passagem zero foi realizada duas vezes e as células em sexta passagem foram analisadas por três vezes. Em todas as análises foi possível verificar que as ADSC apresentam fluorescência para os marcadores CD90 e CD73 e ausência de fluorescência para os marcadores hematopoéticos CD45 e CD34 (Figuras 8 e 9).

Figura 8 - Análise imunocitoquímica em ADSC em passagem zero

Legenda: Fotomicrografias das células em passagem zero submetidas à imunocitoquímica sob microscopia de fluorescência, mostrando os anticorpos analisados com os respectivos controles à direita.

Figura 9 - Análise imunocitoquímica em ADSC em sexta passagem

Legenda: Fotomicrografias das células em sexta passagem submetidas à imunocitoquímica sob microscopia de fluorescência, mostrando os anticorpos analisados com os respectivos controles à direita.

6.2.6 Citometria de Fluxo

A análise da citometria de fluxo foi realizada por meio do programa FCS Express 4 Flow Research Edition. Aproximadamente 50% das ADSC expressaram o CD90 e CD73 enquanto que menos de 4% expressaram marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 (Figura 10A e 10B). As células expressam um nível relativamente alto (mais de 50%) dos marcadores de pluripotência OCT4 SOX2 e NANOG (Figura 10C).

Figura 10 - Gráficos resultantes da análise de citometria de fluxo das ADSC

Legenda: No quadro A, células marcadas com anticorpos anti-goat (CD73 e CD90) e seu controle. No quadro B, células marcadas com anticorpos anti-mouse (CD45 e CD34) e seu controle. No quadro C, células marcadas com anticorpos anti-rabbit (OCT4, SOX2 e Nanog) e seu controle.

6.2.7 Diferenciação Celular

As células submetidas às diferenciações osteogênica e adipogênica foram visualizadas diariamente por meio de microscopia óptica e fotografadas. A partir do 3º dia, foi possível visualizar leves alterações na morfologia das células, as quais foram se modificando gradativamente, apresentando características de osteoblastos e adipócitos. Após 18 dias em cultura, as placas osteogênicas foram coradas com Alizarin Red e as adipogênicas com Sudan Black. Assim, foi possível visualizar a matriz óssea corada em vermelho pelo Alizarin Red e adipócitos em preto pelo Sudan Black. O controle não se diferenciou ao longo do tempo e não reagiu com a coloração (Figura 11).

Figura 11 - Fotomicrografias das células submetidas a diferenciação osteogênica e adipogênica.

Legenda: Fotomicrografias das células submetidas a diferenciação osteogênica (acima) e adipogênica (abaixo). a e b) diferenciação osteogênica corada com Alizarin Red; c) controle; d) e e) diferenciação adipogênica corada com Sudan Black; f) controle.

Após uma semana, os tubos contendo as células da diferenciação condrogênica já continham um pellet bem formado, visível a olho nu (Figura 12C), exceto pelo controle que não formou aglomerado celular até o final do experimento. Pelo reduzido tamanho dos pellets condrogênicos, os cortes histológicos ficaram com dobras. Foram realizadas colorações de Alcian Blue (Figura 12A) e Tricoma de Masson, onde se veem fibras colágenas coradas em

azul (Figura 12B). Foi possível visualizar, sob luz polarizada, tecido cartilaginoso com diferentes tipos de fibras colágenas nas lâminas coradas com Pricrossirus (Figura 12D).

Figura 12 - Diferenciação condrogênica das ADSC

Legenda: A) Fotomicrografia de secção do pellet condrogênico corado com Alcian Blue. B) Coloração com Tricomo de Masson. As fibras colágenas são visualizadas em azul. C) Visualização macroscópica dos pellets condrogênicos após 30 dias em cultura. D) Fotomicrografia da análise de diferenciação condrogênica corada com Pricrossirus (detalhe) e visualizada por microscópio de luz polarizada. A coloração vermelha indica fibras colágenas tipo I.

6.3 Indução da Pluripotência

Foram realizadas diversas tentativas de indução de pluripotência utilizando ADSC e fibroblastos, porém obtivemos reprogramação apenas uma vez (baseando-se nas características morfológicas), com as ADSC, e esta não perdurou. Em cada experimento

modificamos diversos pontos, como por exemplo a quantidade de células plaqueadas, e uso de suplementos, para tentar aperfeiçoar a metodologia. O quadro 4 resume o andamento de cada experimento.

Quadro 4 Informações sobre os experimentos de indução de pluripotência e seus respectivos resultados

Data	Experimento	Células utilizadas	Resultados
Set/12	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores.	5 x 10 ⁵ ADSC Pzero. 5 x 10 ⁵ fibroblastos P1.	Negativo.
Out/12	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores.	5 x 10 ⁴ ADSC Pzero. 5 x 10 ⁴ fibroblastos P1.	Negativo.
Nov/12	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores.	10 ⁴ ADSC em Pzero.	Colônias reprogramadas instáveis.
Mar/13	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores.	10 ⁴ ADSC em P1.	Negativo.
Abr/13	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores.	10 ³ ADSC P1.	Negativo.
Mai/13	Fatores em separado: OCT, SOX, KFL4, cMYC, SOX + OCT e controle.	5 x 10 ³ ADSC P4.	Analizadas por citometria de fluxo.
Mai/13	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF	5 x 10 ³ ADSC P4.	Negativo.
Jun/13	mSTEMCCA RED (Ausência de cMYC).	5 x 10 ³ ADSC P4. 5 x 10 ³ Fibroblastos P2.	Negativo com formação de aglomerados celulares não reprogramados.
Ago/13	hSTEMCCA RP v1 e RP v2: ausência ou presença de LIF.	5 x 10 ³ ADSC P2.	Formação de grandes aglomerados retorcidos.
Set/13	hSTEMCCA RP v1: ausência ou presença de LIF.	5 x 10 ³ ADSC P2.	Formação de grandes aglomerados retorcidos.
Out/13	hSTEMCCA, mSTEMCCA ou h+m com ausência ou presença de LIF + inibidores ou apenas inibidores.	5 x 10 ³ ADSC P2.	Células parcialmente reprogramadas.

6.3.1 Protocolo I

Apenas na terceira repetição do protocolo I, a indução de pluripotência nas ADSC em passagem zero resultou na formação de colônias celulares características da reprogramação celular, após 14 dias da transdução. Tanto as placas infectadas com STEMCCA humano, como as placas com STEMCCA murino, e as placas com associação de ambos apresentaram colônias. Da mesma forma, tanto as placas com LIF e inibidores quanto as placas sem eles. As placas foram fotomicrografadas, onde mais colônias puderam ser visualizadas nas placas com a combinação de fatores humanos e murinos, e com uso combinado de LIF + Inibidores (Figura 13).

As ADSC não reprogramadas atingiram confluência rapidamente, de forma que as colônias de células reprogramadas não conseguiram se desenvolver por muito tempo. Foi tentado tripsinizar e realizar o repique das células, porém após este procedimento não foi mais possível visualizar nenhuma colônia.

Figura 13: Colônias de células reprogramadas

Legenda: a, b, c, d) Fotomicrografias de colônias de células reprogramadas com utilização de Lif + Inibidores com características de células pluripotentes.

Em uma nova repetição, foram plaqueadas menos células transduzidas por poço (10^4 células). Após 12 dias da infecção, algumas células demonstraram sinais de reprogramação (Figura 14), porém no 14º dia não foi mais possível visualizá-las.

Figura 14: Fotomicrografias de células ADSC com características de reprogramação

Legenda: A) Após dias 18 da infecção com STEMCCA human + murino, com uso de LIF e inibidores. B) e C) Após 15 dias da infecção com STEMCCA murino, sem uso de LIF e inibidores. D) Após 12 dias da infecção com STEMCCA murino, com utilização de LIF e inibidores.

Em todas as repetições do *Protocolo I*, foi possível verificar várias tentativas de reprogramação, que não resultaram em culturas com morfologia característica das iPS. Além disso, pode-se ver uma diferença significativa na quantidade de células quando presentes e ausentes LIF e inibidores (Figura 15). As células mantidas na ausência de LIF e inibidores se soltaram da placa de cultura após 15 a 28 dias de cultivo sobre as MEFs.

Figura 15: Fotomicrografias de células transduzidas, 14º dia de cultivo

Legenda: Em a) célula transduzidas com STEMCCA humano com uso de LIF e inibidores e em b) as mesmas células, porém sem LIF e inibidores. Em c) células transduzidas com STEMCCA murino com uso de LIF e inibidores e em d) as mesmas células sem o uso de LIF e inibidores.

6.3.2 Protocolo II

Após 14 dias da transdução, foi possível visualizar aglomerados celulares nas culturas de ADSC quando utilizados STEMCCA humano (Figura 16A) e murino (Figura 16B) na presença de LIF.

Figura 16: Fotomicrografias de células ADSC após 14 dias da transdução, mantidas na presença de LIF

Legenda: A) STEMCCA humano. B) STEMCCA murino.

Neste mesmo período, aglomerados celulares se formaram nas culturas de fibroblastos transduzidos com STEMCCA humano + LIF (Figura 17A) e murino + LIF (17B) e também nas culturas em que o LIF estava ausente (Figura 17C e Figura 17D).

Figura 17 - Fotomicrografias de fibroblastos após 14 dias de transdução

Legenda: mantidos na presença de LIF (A e B) e na ausência de LIF (C e D). A e D: STEMCCA humano. B e D: STEMCCA murino.

Estes aglomerados celulares não apresentaram características típicas de células iPS, como bordos bem definidos e células arredondadas. Elas foram mantidas em cultura até o 28º dia, quando as MEFs soltaram-se das placas.

6.3.3 Protocolo III

Após 14 dias da transdução com o STEMCCA RED OKS, foi possível visualizar aglomerados celulares nas culturas de fibroblastos mantidos na presença (Figura 18A) ou ausência (Figura 18B) de LIF. Estas formações não foram visualizadas nas culturas de ADSC.

Figura 18 - Fotomicrografias de aglomerados celulares após 14 dias de transdução de fibroblastos com o STEMCCA RED OKS

Legenda: A) com LIF; B) sem LIF.

Estes aglomerados não formaram características de colônias reprogramadas, não possuindo bordos definidos e células arredondadas. Estas culturas foram mantidas por 28 dias, quando as MEFs desprenderam-se das placas.

6.3.4 Protocolo IV

Após 18 dias, as transduções com as duas linhagens de STEMCCA humano produzidas no laboratório de Biotecnologia do Hemocentro de Ribeirão Preto resultaram na

formação de aglomerados celulares tridimensionais retorcidos, tanto na presença quanto na ausência do LIF (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografias de formações celulares de aglomerados retorcidos, após 18 dias em cultura

A e B) com LIF; C e D) sem LIF.

Estes aglomerados se formaram pelo crescimento contínuo e acelerado das células, que tensionaram as MEFs, causando fissuras na monocamada. Desta forma, as ADSC e as MEFs se retorceram, formando os aglomerados visualizados. Estas células foram submetidas à citometria de fluxo para marcadores moleculares mesenquimais, hematopoéticos e de pluripotência, porém não foi possível obter resultados conclusivos, devido à baixa quantidade de células. Uma colônia foi selecionada e destacada com um círculo à caneta no fundo da placa, e seu desenvolvimento foi acompanhado e fotomicrografado por 4 dias. Seu desenvolvimento ocorreu rapidamente. Inicialmente, as células da colônia apresentavam uma morfologia semelhante à células em reprogramação, porém, foram se modificando no decorrer dos dias (Figura 20).

Figura 20 - Fotomicrografias de uma mesma colônia por 4 dias

Legenda: Dias 21 a 24 da transdução, colônia mantida com LIF.

Duas colônias de cada combinação (RP v1 e RP v2 com LIF, e RP v1 e RP v2 sem LIF) foram selecionadas aleatoriamente e repicadas manualmente para novas placas sobre MEFs previamente mitomicinizadas. Estas colônias foram observadas e fotomicrografadas por 10 dias (Figura 21). Após este período, elas perderam suas características e a placa atingiu 100% de confluência com células fibroblastoides (provavelmente ADSC não reprogramadas).

Figura 21 - Fotomicrografias de células em primeira passagem, após 6 dias do repique manual

Legenda: A e B) sem LIF, C e D) com LIF.

A atividade da fosfatase alcalina foi testada nas culturas iniciais (Pzero) e nas culturas repicadas (P1) e não houve reatividade nas colônias, embora algumas raras células fibroblastoides tenham sido fortemente marcadas (Figura 22).

Figura 22 - Fotomicrografias de células submetidas à detecção da atividade da fosfatase alcalina

Legenda: A e B) Cultivo primário; C) Células em primeira passagem. D) Célula fibroblastoide corada.

6.3.5 Protocolo V

As células cultivadas separadamente com os fatores de pluripotência OCT4, SOX2, cMYC e KLF4 foram submetidas à citometria de fluxo (Tabela 8). O OCT4 apresentou 57,2% de células positivas (Figura 23), enquanto o cMYC esteve presente em 78,2% das células. O SOX2 não foi detectado nas análises das populações transduzidas e a análise da expressão do KLF4 não foi possível por não haver leitor disponível ou não ter sido detectada expressão por meio dos leitores avaliados.

Tabela 8 - Resultados obtidos na análise de citometria de fluxo das células transduzidas separadamente com os fatores de pluripotência

Fator	% Positiva
OCT4	57,2
cMYC	78,2
SOX2	Não detectado
KFL4	Indeterminado

Figura 23 - Gráficos resultantes da análise de citometria de fluxo dos fatores em separado.

Legenda: À esquerda, a população total de células submetidas à citometria. À direita, em azul, células positivas para o OCT4.

Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1 Células Tronco Derivadas do Tecido Adiposo

O protocolo utilizado para coleta das ADSC de coelhos foi eficaz, demonstrando que amostras obtidas em abatedouro podem ser uma boa fonte de tecido adiposo, evitando assim, o sofrimento desnecessário de animais submetidos a cirurgias. Após adequação do protocolo de isolamento, conseguimos isolar ADSC em um procedimento de apenas 30 minutos no total, sendo 15 minutos de digestão em collagenase. Este é um grande avanço na área, já que os protocolos-padrão descritos em literatura requerem de 30 min a 2 horas de digestão enzimática (BRAUN et al., 2010; CHEN et al., 2011; REICH et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2012).

O isolamento das ADSC resultou em células fibroblastoides aderentes à placa de cultura, com rápida proliferação e estáveis por pelo menos doze passagens. A viabilidade celular atingiu 82% após criopreservação, demonstrando que estas linhagens podem ser mantidas congeladas por longos períodos. Analisando a curva de crescimento, verificamos uma fase lag nos dois primeiros dias, seguida por uma rápida proliferação, atingindo confluência após oito dias em cultura. O tempo de duplicação destas células permaneceu relativamente estável e o ensaio de CFU-F resultou em uma grande quantidade de colônias após apenas 7 dias. Estes achados sugerem que as ADSC de coelhos possuem uma alta e rápida proliferação, como descrito previamente em literatura (ARRIGONI et al., 2009).

O perfil fenotípico das ADSC de coelhos não é descrito de forma uniforme na literatura. Sunay et al. (2013) descrevem que 99% das ADSC de coelho expressam o CD73. Já Martinez-Lorenzo et al. (2009) analisaram ADSC humanas, de coelhos e de ovelhas, sendo que a expressão de marcadores diferiu muito nos coelhos em relação às outras duas espécies pesquisadas, apresentando-se negativas para CD34 e D73 e baixa expressão de CD90 e CD 105. Nossas análises de caracterização fenotípica resultaram em marcação positiva para o CD90 e CD73 e ausência de expressão dos marcadores hematopoéticos CD34 e CD45, características condizentes com as de células tronco mesenquimais (TYNDALL et al., 2007). Entretanto, os resultados obtidos podem ter influência dos anticorpos utilizados (policlonais anti-cabra e anti-camundongo), que não foram específicos para a espécie alvo (coelho).

Embora classificadas como multipotentes, nossas análises demonstram que as ADSC de coelhos expressam os marcadores de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG. Diversos autores relataram a expressão destes três fatores pelas ADSC, e sua importância na regulação da multipotência, auto-renovação e proliferação das ADSC (KISIEL et al., 2012; REICH et al., 2012; SACHS et al., 2012; TAKEMITSU et al., 2012).

Os testes de diferenciação *in vitro* demonstraram a capacidade das ADSC em se diferenciar em diversos tipos celulares de origem mesenquimal, comprovando sua plasticidade. Desta forma, as células isoladas apresentaram todas as características necessárias para serem classificadas como células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

7.2 Indução de Pluripotência

O primeiro protocolo (*Protocolo I*) testado nesta pesquisa foi eficaz na produção de células iPS a partir de fibroblastos e ADSC de humanos, bovinos, cães e cavalos em nosso laboratório. Entretanto, não obtivemos sucesso na reprogramação quando utilizando ADSC e fibroblastos de coelho. Diversas questões podem ser discutidas em relação ao por que deste resultado.

O isolamento e manutenção de linhagens estáveis de células embrionárias de coelhos permaneceram por muito tempo improdutíveis, tendo sido estabelecidos apenas recentemente (WANG et al., 2007; HONDA et al., 2008). A produção de células iPS de coelhos foi realizada apenas uma vez, no Japão, pela equipe do Dr. Honda, em 2010. Estes fatos podem esclarecer a dificuldade encontrada por nosso grupo em gerar células iPS a partir de células de coelhos.

Em adição, Honda et al. (2011), relataram que não foram capazes de produzir iPS de coelhos a partir de fibroblastos devido a rapidez proliferativa destas células. De fato, Xu et al. (2013) concluíram que a hiperproliferação celular pode afetar negativamente a reprogramação. Tanto nossas células ADSC quanto os fibroblastos compartilham desta alta proliferação, sendo um possível problema para chegarmos a colônias estáveis.

Buscamos utilizar um número cada vez menor de células por placa, visando controlar a proliferação acentuada das mesmas. Da mesma forma, o uso dos inibidores iGSK3 β e iMEK pareceu controlar a velocidade com que as células atingiram confluência total nas placas.

Os inibidores são pequenas moléculas que atuam inibindo vias de sinalização nas células. O inibidor GSK3 β bloqueia a via de sinalização da proteína glicogênio sintase quinase e estimula a via WNT, responsável pela manutenção da proliferação e auto-renovação de células pluripotentes. O inibidor MEK bloqueia a via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogeno quinase, relacionada à inibição de células tumorais. O iMEK demonstrou aumentar a eficiência de reprogramação de fibroblastos humanos em iPS (LIN et al., 2009).

Diversas vias de sinalização estão relacionadas direta ou indiretamente com a manutenção da pluripotência. Wang et al. (2008), afirmaram que a ativação das vias FGF, WNT e TGF β /Activin/Nodal são necessárias para manutenção das células embrionárias de coelhos. Eles sugerem que o FGF atua na manutenção do estado indiferenciado das células. De fato, diversos autores descrevem a necessidade do FGF para a geração das iPS. Hsieh et al. (2011) testaram o efeito do FGF e LIF separadamente e combinados na derivação e manutenção de células tronco embrionárias de coelhos e concluíram que a utilização combinada dos dois fatores resulta em maior expressão de marcadores de pluripotência.

O LIF (Leukemia Inhibitory Factor) é um importante mediador da manutenção da pluripotência de células tronco embrionárias pela sinalização da via Stat3 (YING et al., 2008). Entretanto, sua importância em cultura não ficou bem estabelecida em nossa pesquisa.

Shimada et al. (2010) utilizaram LIF e os inibidores iGSK3 e iMEK para produzir iPS a partir de fibroblastos embrionários caninos, entretanto, diversos grupos de pesquisa não os utilizaram e ainda assim obtiveram sucesso na reprogramação celular em cães (GONÇALVEZ et al., 2012), coelhos (HONDA et al., 2011), humanos (PARK et al., 2007) e camundongos (HAMILTON et al., 2009). Como não obtivemos resultados promissores com a utilização dos inibidores no *Protocolo I*, excluímos sua utilização nos protocolos subsequentes. Entretanto, a proliferação celular pareceu ficar ainda mais acentuada.

O cMYC é um oncogene importante na indução da reprogramação por meio da ativação e manutenção de genes de pluripotência, aceleração do ciclo celular e prevenção da senescência (CARTWRIGHT et al., 2005; MEYER; PENN, 2008; SRIDHARAN et al., 2009). Neste contexto, Xu et al. (2013) observaram que a exclusão do cMYC na combinação OSKM reduziu a taxa de proliferação das células transduzidas enquanto aumentou a taxa de geração de células iPS. Os autores sugerem uma correlação negativa entre a proliferação e a eficiência de reprogramação, sendo que o cMYC induz a hiperproliferação das células somáticas.

A exclusão do cMYC foi testada no *Protocolo III* deste experimento, visando o controle da proliferação das ADSC e aumento da eficiência de reprogramação. Nossos experimentos não resultaram em células iPS, entretanto, esta estratégia poderia ser repetida futuramente testando combinações com inibidores e outros artifícios, como por exemplo incubação em hipóxia.

Honda et al. (2010) utilizaram a incubação em hipóxia (5% de oxigênio) por 14 dias no período de reprogramação das células somáticas para geração de células iPS de coelhos. A hipóxia aumenta a eficácia de geração e previne a diferenciação de células iPS (YOSHIDA et al., 2009). Estes efeitos se devem ao fato de que células tronco embrionárias encontram-se no organismo em nichos com 3 a 5% de oxigênio, e fatores induzidos pela hipóxia regulam a pluripotência celular (SZABLOWSKA-GADOMSKA et al., 2011). Entretanto, diversas pesquisas, inclusive em nosso grupo, geraram células iPS sem a limitação de oxigênio (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; HAMILTON et al., 2009; RAJARAJAN et al., 2012). Não foi possível realizar a incubação em hipóxia neste experimento por questões momentâneas de infraestrutura, mas espera-se testar esta técnica em futuros protocolos.

O sobrenadante lentiviral foi ultracentrifugado para maior concentração do vetor no *Protocolo VI*. As vantagens da ultracentrifugação não estão bem elucidadas, já que o procedimento diminui a viabilidade do vírus. Diversos autores utilizaram a ultracentrifugação (HONDA et al., 2010; RAJARAJAN et al., 2012; XIONG et al., 2013), mas em nosso laboratório, foram estabelecidas linhagens de células iPS de cães, bovinos, equinos e humanos sem o uso desta tecnologia. Não foi possível determinar a importância da ultracentrifugação lentiviral para a geração de células iPS de coelhos, pois o crescimento acelerado das ADSC foi um fator limitante para a reprogramação.

O nível de expressão dos marcadores de pluripotência é determinante da eficiência de reprogramação (NAGY, 2013). O *Protocolo V* testou a eficácia de transdução dos fatores de pluripotência nas células alvo. Os resultados obtidos indicam que ao menos o OCT4 e o cMYC foram eficazes em se integrar nas ADSC. O KLF4 não pode ser analisado pelos lasers utilizados, de forma que a sua eficácia de integração não pode ser verificada. O motivo pelo qual o SOX2 não foi detectado não ficou claro. Espera-se repetir o experimento em breve para elucidar estas questões.

Para que ocorra a reprogramação total das células, é necessário que haja o silenciamento total dos fatores exógenos. Quando isto acontece, a manutenção da pluripotência é realizada pelo circuito transcricional endógeno. Células parcialmente reprogramadas dependem da ação dos fatores externos para manter sua pluripotência

(HOTTA; ELLIS, 2008). Células em estágios intermediários de reprogramação apresentam populações muito heterogêneas, de forma que análises de expressão gênica ou epigenéticas podem não ser adequadas (HANNA et al., 2010). Evidentemente, as células resultantes de nossos experimentos não atingiram um estado completo de reprogramação, porém, em alguns momentos foi possível visualizar células em aparente estado intermediário de reprogramação, com base em suas características morfológicas. As circunstâncias pelas quais as induções não resultaram em células iPS permanecem desconhecidas.

A rápida proliferação parece ser o grande revés da utilização das ADSC e fibroblastos de coelhos para geração de células iPS. No entanto, supomos que a reprogramação celular possa finalmente ocorrer, quando se descobrir meios mais eficazes de controle da proliferação destas células.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

O coelho, como modelo experimental, apresentou-se vantajoso pela facilidade de obtenção de amostras provenientes de animais de abatedouro. As células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo são fáceis de coletar, isolar e proliferar e podem ser mantidas estáveis *in vitro* por longos períodos. Apresentam-se viáveis após criopreservação, e compartilham das mesmas características morfológicas e fenotípicas que outras células tronco mesenquimais, destacando-se pela rápida proliferação.

Apesar de produzir algumas colônias reprogramadas instáveis e muitas células em estágios intermediários de reprogramação, a indução de pluripotência em células ADSC de coelhos não resultou em células iPS estáveis quando utilizados os protocolos testados. A utilização ou não do LIF e dos inibidores MEK e GSK3 se mostrou indiferente para a geração de células iPS. Da mesma forma, a exclusão do fator cMYC não resultou em controle da proliferação ou maior eficácia de reprogramação. A ultracentrifugação viral também não apresentou melhora dos resultados. Assim, os mecanismos que inibem a reprogramação destas células não ficaram bem definidos.

A proliferação acentuada das ADSC parece ser o fator limitante para a geração de células iPS de coelhos, de forma que julga-se fundamental o controle desta proliferação para que ocorra adequada reprogramação. Com a utilização de novas estratégias, espera-se alcançar o estabelecimento de culturas de células de pluripotência induzida a partir de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

Referências

REFERÊNCIAS

ABUDUSAIMI, A.; AIHEMAITIJANG, Y.; WANG, Y.H.; CUI, L.; AIMAITIMING, S.; ABULIKEMU, M. Adipose-derived stem cells enhance bone regeneration in vascular necrosis of the femoral head in the rabbit. **The Journal of international medical research**, v. 39, n. 5, p. 1852-60, 2011.

ARRIGONI, E.; LOPA, S.; DE GIROLAMO, L.; STANCO, D.; BRINNI, A. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. **Cell and tissue research**, v. 338, n. 3, p. 401–11, 2009.

AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWASSER, P.; VETTER, M.; WEISE, A.; LIEHR, T.; BRULPORT, M.; HENGSTLER, J. G.; DOLLINGER, W. E.; FLEIG, W. E.; CHRIST, B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, v. 58, n. 1, p. 570–581, 2009.

AZIZI, S. A.; STOKES, D.; PROCKOP, D. J. Survival, migration and engraftment of bone marrow stromal cells into the striatum of the adult rats. **Experimental Neurology**, v. 153, n. 2, p. 374-375, 1998.

BAHN, J. J.; CHUNG, J. Y.; WOOSEOK, I. M.; KIM, M.; KIM, S. H. Suitability of autologous serum for expanding rabbit adipose-derived stem cell populations. **Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 4, p. 413–417, 2012.

BARBOSA, O. R.; SCAPINELO, C.; MODENUTI, M. I. Desempenho de coelhos da raça nova Zelândia branco, criados em diferentes tipos de instalações durante as estações de verão e inverno: 2-Parâmetros hematológicos. **Revista brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 21, n. 5, p. 787-796, 1992.

BARKER, J. N.; WAGNER, J. E. Umbilical cord transplantation: current practice and future innovations. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 48 n. 1, p. 35- 43, 2003.

BARRY, F. P.; BOYNTON, R. E.; HAYNESWORTH, S.; MURPHY, J. M.; ZAIA, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 265 p. 134–139, 1999.

BRAUN, J.; HACK, A.; WEIS-KLEMM, M.; CONRAD, S.; TREML, S.; KOHLER, K.; WALLISER, U.; SKUTELLA, T.; AISHER, W. K. Evaluation of the osteogenic and

chondrogenic differentiation capacities of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 10, p. 1228–1236, 2010.

BREVINI, T. A. L.; TOSETTI, V.; CRESTAN, M.; ANTONINI, S.; GANDOLFI, F. Derivation and characterization of pluripotent cell lines from pig embryos of different origins. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 54-63, 2007.

BURKGARDT, M. F.; MARTINEZ, F. J.; WRIGHT, S.; RAMOS, C.; VOLFSO, D.; MASON, M.; GARNES, J.; DANG, V.; LIEVERS, J.; SHOUKAT-MUNTAZ, U.; MARTINEZ, R.; GAI, H.; BLAKE, R.; VAISBERG, E.; GRSEKOVIC, M.; JOHNSON, C.; IRION, S.; BRIGHT, J.; COOPER, B.; NGUYEN, L.; GRISWOLD-PRENNER, I.; JAVAHERIAN, A. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 56, n.1, p. 355-64, 2013.

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

CALASANS-MAIA, M. D.; MONTEIRO, M. L.; ASCOLI, F. O.; GRANJEIRO, J. M. The rabbit as an animal model for experimental surgery. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 325–328, 2009.

CARTWRIGHT, P.; MCLEAN, C.; SHEPPARD, A.; RIVETT, D.; JONES, K.; DALTON, S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. **Development**, v. 132, n. 5, p. 885–896, 2005.

CARVALHO, M. A.; ALVES, A. L.; GOLIM, M.A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; OLIVEIRA, P. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, n. 2-4, p. 303-6, 2009.

CHANG, H.; DO, B.R.; CHE, J. H.; KANG, B. C.; KIM, J.H.; KWON, E.; KIM, J.Y.; MIN, K.H. Safety of adipose-derived stem cells and collagenase in fat tissue preparation. **Aesthetic Plast Surg**, v. 37, n. 4, p. 802-8, 2013.

CHEEKE, P. R. **Rabbit Production**. 6. ed. Danville, Illinois: The Interstate Printers & Publishers; INC. 1987. 472 p.

CHEN, L.; PENG, E. J.; ZENG, X. Y.; ZHUANG, Q. Y.; YE, Z. Q. Comparison of the Proliferation, Viability, and Differentiation Capacity of Adipose-Derived Stem Cells from Different Anatomic Sites in Rabbits. **Cells, Tissues, Organs**, v. 196, n. 1, p. 13-22, 2011.

CHERUBINO, M.; RUBIN, J. P.; MILJKOVIC, N.; KERMENDI-DOKO, A.; MARRA, K. G. Adipose-Derived Stem Cells for Wound Healing Applications. **Annals of Plastic Surgery**, v. 66, n. 2, p. 210-215, 2011.

CHRISTOFOROU, N.; LIAU, B.; CHAKRABORTY, S.; CHELLAPAN, M.; BURSAC, N.; LEONG, K. W. Induced pluripotent stem cell-derived cardiac progenitors differentiate to cardiomyocytes and form biosynthetic tissues. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. 1-17, 2013.

CHUNG, C. S.; FUJITA, N.; KAWAHARA, N.; YUI, S.; NAM, E.; NISHIMURA, R. A comparison of neurosphere differentiation potential of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells and adipose-derived mesenchymal stem cells. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 7, p. 879-86, 2013.

DE BARI, C.; DELLACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis Rheumatism**, v. 44, n.1, p. 1928-42, 2001.

DEY, D.; EVANS, G. R. D. Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Nuclear Reprogramming. **Stem cells international**, v. 2011, n. 1, p. 1-11, 2011.

DICKER, A.; LE BLANC, K.; ASTRÖM, G.; HARMELENA, V. V.; GOTRERSTROMB, C.; BLOMQVISTA, L.; ARNERA, P.; RYDE, M. Ryden. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. **Experimental Cell Research**, v. 308, n. 2, p. 283–90, 2005.

DOSS, M. X.; KOEHLER, C. I.; GISSEL, C.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. **Journal of Cellular and Molecular**, v. 8, n. 4, 465-473, 2004.

DU, Y.; ROH, D. S.; FUNDERBURGH, M. L.; MANN, M. M.; MARRA, K. G.; RUBIN, P.; LI, X.; FUNDERBURGH, J. L. Adipose-derived stem cells differentiate to keratocytes in vitro. **Molecular Vision**, v. 16, n. 1, p. 2680–2689, 2010.

ESTEBAN, M. A.; WANG, T.; QIN, B.; YANG, J.; QIN, D.; CAI, J.; LI, W.; WENG, Z.; CHEN, J.; NI, S.; CHEN, K.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, F.; HE, W.; LABUDA, K.; SONG, Y.; PETERBAUER, A.; WOLBANK, S.; REDL, H.; ZHONG, M.; CAI, D.; ZENG, L.; PEI, D. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 1, p. 71-9, 2010.

EVANS, M. J.; NOTARIANNI, E.; LAURIE, S.; MOOR, R. M. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 33 n. 1, p. 125-128, 2003.

FADEL, L.; VIANA, B. R.; FEITOSA, M. L.; ERCOLIN, A. C.; ROBALLO, K.C.; CASALS, J. B.; PIEIRI, N.C.; MEIRELLES, F. V.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E. Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 267–273, 2011.

FALANGA, V.; IWAMOTO, S.; CHARTIER, M.; YUFIT, T.; BUTMARC, J.; KOUTTAB, N.; SHRAYER, D.; CARSON, P. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1299-312, 2007.

GONÇALVES, N.; BRESSAN, F.; SOUZA, A.; MARTINS, D. S.; MIGLINO, M. A.; MEIRELLES, F. V.; PERECIN, F. P.; AMBROSIO, C. E. Canine Fibroblasts Expressing Human Transcription Factors: What is in the Route for the Production of Canine Induced Pluripotent Stem Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 84–87, 2012.

GROTTO, H. Z. W.; NORONHA, J. F. A. Identificação de células tronco hematopoiéticas: citometria de fluxo convencional versus contador hematológico automatizado. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 3, p. 169-172, 2003.

HAMILTON, B.; FENG, Q.; YE, M.; WELSTEAD, G. G. Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming mouse embryonic fibroblasts with a four transcription factor, doxycycline inducible lentiviral transduction system. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 1, n. 33, p. 1-5, 2009.

HANNA, J. H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Somatic cell reprogramming and transitions between pluripotent states: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 508–525, 2010.

HEIDARI, B.; SHIRAZI, A.; AKHONDI, M. M.; HASSANPOUR, H.; BEHZADI, B.; NADERI, M. M.; SAVARI, A.; BORJIAN, S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 104-17, 2013.

HONDA, A.; HIROSE, M.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; SHIMOZAWA, N.; HATORI, M.; SHIMIZU, N.; MURATA, T.; HIROSE, M.; KATAYAMA, K.; WAKISAKA, N.; MIYOSHI, H.; YOKOYAMA, K. K.; SANKAI, T.; OGURA, A. Stable embryonic stem cell lines in rabbits : potential small animal models for human. **Reproductive Healthcare Ltd**, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge. v. 17, n. 5, p. 706-15, 2008.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUE, K.; OGURA, A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: potential experimental models for human regenerative medicine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31362-9, 2010.

HOUSMAN, T.S.; LAWRENCE, N.; MELLEN, B. G.; GEORGE, M. N.; FILIPPO, J. S.; CERVENY, K. A.; DEMARCO, M.; FELDMAN, S. R.; FLEISCHER A. B. The safety of liposuction: results of a national survey. **Dermatologic Surgery**, Metairie, v. 28, n. 11, p. 971-978, 2002.

HOTTA, A.; ELLIS, J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 4, p. 940-948, 2008.

HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELNBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W.; MELTON, D. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1269-75, 2008.

HYNES, K.; MENICANIN, D.; HAN, J.; MARINO, V.; MROZIK, K.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P. M. Mesenchymal Stem Cells from iPS Cells Facilitate Periodontal Regeneration. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 9, p. 833-9, 2013.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 567-82, 2008.

KAMADA, Y.; KISO, S.; YOSHIDA, Y.; CHATANI, N.; KIZU, T.; HAMANO, M.; TSUBAKIO, M.; TAKEMURA, T.; EXAKI, H.; HAYASHI, N.; TAKEHARA, T. Transplantation of basic fibroblast growth factor-pretreated adipose tissue-derived stromal cells enhances regression of liver fibrosis in mice. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, n. 2, p. 157-67, 2009.

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** (Dayton, Ohio), v. 24, n. 5, p. 1294-301, 2006.

KIM, J. H.; JUNG, M.; KIM, H. S.; KIM, Y. M.; CHOI, E. H. Adipose-derived stem cells as a new therapeutic modality for ageing skin. **Experimental Dermatology**, v. 20, n. 5, p. 383-387, 2011.

KISIEL, A. H.; MCDUFFE, L. A.; MASOUD, E.; BAILEY, T. R.; GONZALEZ, B. P. E.; NINO-FONG, R. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal

stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. **American Journal of Veterinary Research**, v. 73, n. 8, p. 1305–17, 2012.

KRAMPERA, M.; MARCONI, S.; PASINI, A.; GALIÈ, M.; RIGOTTI, G.; MOSNA, F.; TINELLI, M.; LOVATO, L.; ANGHILERI, E.; ANDREINI, A.; PIZZOLO, G.; SBARBATI, A.; BONETTI, B. Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 382–490, 2007.

KUIJK, E. W.; LOPES, S. M. C. S.; GEIJSEN, N.; MACKLON, N.; ROELEN, B. A. J. The different shades of mammalian pluripotent stem cells. **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 2, p. 254–27, 2010.

LAM, M. T.; LONGAKER, M. T. Comparison of several attachment methods for human iPS, embryonic and adipose-derived stem cells for tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.2012, n. 6, p. 80–86, 2012.

LEE, R.H.; SEO, M. J.; REGER, R. L.; SPEES, J. L.; PULIN, A. A.; OLSON, S. D.; PROCKOP, D. J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 46, p. 17438–17443, 2006.

LEWITZKY, M.; YAMANAKA, S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 5, p. 467-73, 2007.

LIN, T.; AMBASUDHAN, R.; YUAN, X.; LI, W.; HILCOVE, S.; ABUJAROUR, R.; LIN, X.; HANM, H. S.; HAO, E.; HAYEK, A.; DING, S. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. **Nature Methods**, v. 6, n. 11, p. 805-808, 2009.

LODISH, H.; KAISER, C. A.; BERK, A.; KRIEGER, M.; MATSUDAIRA, P. Origem, linhagem e morte celular. In: _____. **Biologia celular e molecular**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 896-906.

LUO, J.; SUHR, S. T.; CHANG, E. A.; WANG, K.; ROSS, P. J.; NELSON, L. L.; VENTA, P. J.; KNOTT, J. G.; CIBELLI, J. B. Generation of Leukemia Inhibitory Factor and Basic Fibroblast Growth Factor-Dependent Induced Pluripotent Stem Cells from Canine Adult Somatic Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 10, p.1669-78, 2011.

LUO, G.; CHENG, W.; HE, W.; WANG, X.; TAN, J.; FITZGERALD, M.; LI, X.; WU, J. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. **Wound Repair and Regeneration**, v. 18, n. 5, p. 506-513, 2010.

MAPARA, M.; THOMAS, B. S.; BHAT, K. M. Rabbit as an animal model for experimental research. **Dental Research Journal**, v. 9, n. 1, p. 111-18, 2012.

MARTINEZ-LORENZO, M. J.; ROYO-CANÁS, M.; ALEGRE-AGUARO, E.; ESPORTES, P.; CASTIELLA, T.; GARCIA-ALVAREZ, F.; LARRAD, L. Phenotype and Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Cells from Adipose Tissue of Different Species. **Journal of Orthopaedic Research** v. 27 n. 11, p. 1499-507, 2009.

MEIRELLES, S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MEYER, J. R. The significance of induced pluripotent stem cells for basic research and clinical therapy. **Journal of Medical Ethics**, v. 34, n. 12, p. 849–51, 2008.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 12, p. 976–990, 2008.

MIKKELSEN, T. S.; HANNA, J.; ZHANG, X.; KU, M.; WERNIG, M.; SCHORDERET, P.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R.; LANDER, E. S.; MEISSNER, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. **Nature**, v. 454, n. 7200 p. 49–55, 2008.

NAGY, A. Secondary cell reprogramming systems: as years go by. **Current Opinion in Genetics e Development**, v. 23, n. 1, p. 534-539, 2013.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells : isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 2006, n. 174, p. 249-282, 2006.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-391, 1998.

OKITA, K.; YAMANAKA, S. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 1, p. 103-11, 2006.

PARK, I. H.; ZHAO, R.; WEST, J. A.; YABUUCHI, A.; HONGGUANG, H.; INCE, T. A.; LEROU, P. H.; LENSCH, M. W.; DALEY, G. Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**, v. 451, n. 7175, p. 141-147, 2008.

PÜSCHEL, B.; DANIEL, N.; BITZER, E.; BLUM, M.; RENARD, J. P.; VIEBAHN, C. The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): a model for mammalian reproduction and early embryology. **Cold Spring Harbor Protocols**, v.1 n. 1, p. 1-5, 2010.

RAJARAJAN, K.; ENGELS, M. C.; WU, S. M. Reprogramming of mouse, rat, pig, and human fibroblasts into ips cells. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. 23, n. 15, p. 1-32, 2012.

REICH, C. M.; RAABE, O.; WENISCH, S.; BRIDGER, P. S.; KRAMER, M.; ARNHOLD, S. Isolation, culture and chondrogenic differentiation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparative study. **Veterinary research communications**, v. 36, n. 2, p. 139-48, 2012.

SACHS, P. C.; FRANCIS, M. P.; ZHAO, M.; BRUMELLE, J.; RAJ, R. R.; ELMORE, L. W.; SHAWN, E. H. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. **Cell and tissue research**, v. 349, n. 2, p. 505-515, 2012.

SCHEPER, W.; COPRAY, S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. **Stem Cell Research**, v. 5, n. 3, p. 204-23, 2009.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. Proliferar ou diferenciar ? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 2005.

SELL, S. What are they? Where do they come from? Why are they here? When do they go wrong? Where are they going? In:_____. **Stem cells handbook**. Totowa: Human Press, 2004. p. 1-18.

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of Canine-Induced Pluripotent Stem Cells by Retroviral Transduction and Chemical Inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 2, p. 1, 2010.

SOMERS, A.; JEAN, J. C.; SOMMER, C. A.; OMARI, A.; FORD, C. C.; MILLS, J. A.; YING, L.; GIANOTTI, S. M.; JEAN, J. M.; SMITH, B. W.; LAFYATIS, R.; DEMIERRE, M. F.; WEISS, M. F.; FRENCH, D. J.; GADUE, P.; MURPHY, G. J.; MOSTOSLAVSKY, G.; KOTTON, D. N. Generation of transgene-free lung disease-specific human iPS cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells**, v. 28, n. 10, p. 1728-1740, 2010.

SOMMER, C. A.; STADTFELD, M.; MURPHY, G. J.; HOCHEDLINGER, K.; KOTON, D. N.; MOSTOSLAVSKY, G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 543-549, 2009.

SRIDHARAN, R.; TCHIEU, J.; MASON, M. J.; YACHECHKO, R.; KUOY, E.; HORVATH, S.; ZHOU, Q.; PLATH, K. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 364–377, 2009.

STRIOGA, M.; VISWANATHAN, S.; DARINSKAS, A.; SLABY, O.; MICHALEK, J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 14, p. 2724–2752, 2012.

STUDENY, M.; MARINI, F. C.; CHAMPLIN, R. E.; ZOMPETTA, C.; FIDLER, I. J.; ANDREEFF, M. Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells as Vehicles for Interferon- β Delivery into Tumors. **Cancer Research**, v. 62, n. 13, p.3603-3608, 2002.

SUGGI, S.; KIDA, Y.; BERGGREN, W.; EVANS, R. Feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells. **Cell**, v. 6, n. 3, p. 346-358, 2011.

SUN, N.; PANETTA, N. J.; GUPTA, D. M.; WILSON, K. D.; LEE, A.; JIA, F.; HU, S.; CHERRY, A. M.; ROBBINS, R. C.; LONGAKER, M. T.; WU, C. J. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15720-5, 2009.

SUNAY, O.; CAN, G.; CAKIR, Z.; KOZANOGLU, I.; ERDIL, G.; YILMAZ, M.; BARAN, Y. Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 690-702, 2013.

SUNG, J. H.; YANG, H. M.; PARK, J. B.; CHOI, G. S.; JOH, J. W.; KWON, C. H.; CHUN, J. M.; LEE, S.K.; KIM, S.J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplant Proc**, v. 40, n. 8, p. 2649-2654, 2008.

SZABLOWSKA-GADOMSKA, I.; ZAYAT, V.; BUZANSKA, L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 71, n. 1, p. 86–93, 2011.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKEMITSU, H.; ZHAO, D.; YAMAMOTO, I.; HARADA, Y.; MICHISHITA, M.; ARAI, T. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. **BMC Veterinary Research**, v. 31, n. 8, p. 1-9, 2012.

TYNDALL, A.; WALKER, U. A.; COPE, A.; DAZZI, F.; DE BARI, F.; FIBBE, W.; GUIDUCCI, S.; JONES, S.; JORGENSEN, C.; LE BLANC, K.; LUYTEN, F.; MCGONAGLE, D.; MARTIN, I.; BOCELLI-TYNDALL, C.; PENNESI, G.; PISTOIA, V.; PITZALIS, C.; UCCELLI, A.; WULFFRAAT, N.; FELDMANN, M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 301, 2007.

VERFAILLIE, C. M.; PERA, A.; LANSDORP, P. M. Stem Cells: Hype and Reality. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2002, n. 1, p. 369-387, 2002.

WANG, S.; TANG, X.; NIU, Y.; CHEN, H.; LI, B.; LI, T.; ZHANG, X.; HU, Z.; ZHOU, Q.; JI, W. Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells. **Stem Cells** (Dayton, Ohio), v. 25, n. 2, p. 481-489, 2007.

WANG, Y.; MAH, N.; PRIGIONE, A.; WOLFRUM, K.; ANDRADE-NAVARRO, M.; ADJAYE, J. A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 6, n. 2, p. 282-296, 2010.

WARREN, L.; MANOS, P. D.; AHFELDT, T.; LOH, Y. H.; LI, H.; LAU, F.; EBINA, W.; MANDAL, P. K.; SMITH, Z. D.; MEISSNER, A.; DALEY, G. Q.; BRACK, A. S.; COLLINS, J. J.; COWAN, C.; SCHLAEGER, T. M.; ROSSI, D. J. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 5, p. 618-630, 2010.

WEISSMAN, I. L. Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1442-1446, 2000.

WU, D.; HAMILTON, B.; MARTIN, C.; GAO, Y.; YE, M.; YAO, S. Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming human fibroblasts with the stemgent human TF lentivirus set. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, v. 8, n. 34, p. 3-5, 2009.

XIAO, L.; TSUTSUI, T. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: Stem cells in the core. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2624-36, 2013.

XIONG, Z. M.; LADANA, C.; WU, D.; CAO, K. An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells. **Aging**, v. 5, n. 4, p. 288–303, 2013.

XU, Y.; WEY, X.; WANG, M.; ZHANG, R.; FU, Y.; XING, M.; HUA, Q.; XIE, X. Proliferation Rate of Somatic Cells Affects Reprogramming Efficiency. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 14, p. 9767–78, 2013.

YANG, X. F.; HE, X.; HE, J.; ZHANG, L. H.; SU, X. J.; DONG, Z. Y.; XU, Y. J.; LI, Y.; LI, Y. L. High efficient isolation and systematic identification of human adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 59 p. 1-9, 2011.

YING, Q. L.; WRAY, J.; NICHOLS, J.; BATLLE-MORERA, L.; DOBLE, B.; WOODGETT, J.; COHEN, P.; SMITH, A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 519–523, 2008.

YOSHIDA, Y.; TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 3, p. 237–241, 2009.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Thomson et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 1, p. 1917–19, 2007.

YUAN, T.; LIAO, W.; FENG, N. H.; LOU, Y. L.; NIU, X.; ZHANG, A. J.; WANG, Y.; DENG, Z. F. Human induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells survive, migrate, differentiate, and improve neurological function in a rat model of middle cerebral artery occlusion. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 4–10, 2013.

ZHAO, Z.; YU, H.; XIAO, F.; WANG, X.; YANG, S.; LI, S. Differentiation of adipose-derived stem cells promotes regeneration of smooth muscle for ureteral tissue engineering. **The Journal of Surgical Research**, v. 178, n. 1, p. 55–62, 2012.

ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J. Y.; ZHU, S.; HAN, D. W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H.R.; DUAN, L.; DING, S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 5, p. 381–384, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue

Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n.1, p. 4279–4295, 2002.