Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Clínica Médica

Thaís Valéria Costa de Andrade Pimentel

Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo

Ribeirão Preto

2015

THAÍS VALÉRIA COSTA DE ANDRADE PIMENTEL

Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa Oncologia Clínica Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de concentração: Células-tronco e Terapia celular.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Pimentel, Thaís Valéria Costa de Andrade

Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Ribeirão Preto, 2015.

113 p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Tadeu Covas, Dimas.

1. Células mesenquimais multipotentes.
2. Fatores de crescimento pró-angiogênicos.
3. Formação de colônias. 4. Potencial de diferenciação.
5. Tecido adiposo.

Nome: PIMENTEL, Thaís Valéria Costa de Andrade

Título: Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:_____

Banca examinadora

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr._____ Instituição:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Fernando* e *Vânia*,

por todos os pilares de amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Fernando e Vânia*, por todo o aprendizado, pelo amor incondicional, a paciência e dedicação, além de todos os seus esforços e muito apoio para que eu seguisse o meu caminho. Agradeço à eles pela minha vida, e agradeço à vida por tê-los como pais.

Ao meu irmão, *Victor*, por todo o companheirismo, amizade e amor, desde criança.

A toda a minha família, *Pimentel* e *Andrade*, pelo carinho de sempre.

Aos meus *professores*. Meus grandes mestres.

Ao Prof. Dr. *Dimas Tadeu Covas*, pela oportunidade que me proporcionou tanto aprendizado, pela confiança no desenvolvimento do projeto e pelo aperfeiçoamento do olhar científico.

À Profa. Dra. *Aparecida Maria Fontes*, por abrir as portas das atividades científicas e pelo aprendizado.

Aos amigos do Laboratório Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela convivência e amizade cotidiana enriquecedora e descontraída. Muito obrigada *Larissa*, *Daianne*, *Lucas*, *Ricardo*, *Angelo*, *Fernanda*, *Rafela e Raquel*.

Ao *Lucas Souza*, pela amizade, paciência e direcionamentos durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Profa. Dra. *Déborah Afonso Cornélio*, por todo o conhecimento e aprendizado passado, amizade, convivência e inspiração no início de minha carreira científica.

À Dra. *Danielle Magalhães* e *Josiane Serrano*, pela amizade e por todos os auxílios e orientações nos procedimentos de imunofluorescência, imunohistoquímica e microscopia confocal.

À Profa. *Dra. Simone Haddad*, à *Maristela Orellana*, *Kellen Malmegrin* e *Virgínia Picanço e Castro*, por todos os auxílios e ajudas sempre que precisei.

À *Cleide Silva*, por toda a atenção, dedicação e auxílio nos experimentos com animais. Você é demais, Cleide.

À *Patrícia Vianna*, *Camila Menezes* e *Daiane Santos*, pelo suporte às análises de citometria de fluxo.

À *Luiza Junqueira*, por disponibilizar amostras de linhagens celulares.

À todos os *funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto*, pelos cumprimentos e companhia cotidiana que tornam sempre o trabalho mais agradável.

À todos os *colegas do Hemocentro de Ribeirão Preto*, pelos momentos de distração e trocas de experiências.

À *Adriana*, secretária da pós-graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular, que sempre se mostrou disposta em auxiliar nas questões burocráticas.

Aos queridos amigos que fiz em Ribeirão Preto, *Larissa Guimarães*, *Melina Matthiesen*, *Ana Broggini*, *Mariana Queiroz*, *Fernando Filho*, *Jana Ross*, *Rafael Ruggiero*, *Jonilson Berlink* e *Matheus Rossignole*, pelos bons momentos de descontração e afinidade.

Aos meus queridos *amigos de Natal*, pelas conversas e apoio, mesmo à distância, e pela vivência, companheirismo e amor em diversos momentos da minha vida.

EPÍGRAFE

“Você pode estar certo e eu posso estar errado, e com um pequeno esforço nós podemos juntos chegar mais próximo da verdade.”

Karl Popper

RESUMO

PIMENTEL, T. V. C. A. **Influência de fatores de crescimento pró-angiogênicos na manutenção das características de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo.** 2015. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A manutenção do estado progenitor durante o cultivo de células mesenquimais progenitoras derivadas do tecido adiposo (MSCs-TA), caracterizado pelo potencial de diferenciação e da capacidade de autorrenovação, é atualmente um dos maiores desafios da terapia celular. Sabendo da influência da angiogênese no desenvolvimento de tecidos de origem mesenquimal, avaliamos se um ambiente pro-angiogênico mimetizado em cultura forneceria condições para manutenção de um estado progenitor durante o processo de expansão celular. Utilizando como modelo de um ambiente pró-angiogênico o cultivo no meio EGM-2, o qual é suplementado pelos fatores de crescimento EGF, FGF-2, IGF e VEGF, nós demonstramos que a presença de tais fatores pró-angiogênicos é fundamental para a manutenção do estado progenitor de MSCs-TA em cultura. Verificamos que a presença de tais fatores de crescimento possibilitaram às MSCs-TA apresentarem um alto potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico em comparação ao meio convencional DMEM/F12 e ao meio EBM, ausente de fatores. Além disso, o cultivo na presença de fatores pró-angiogênicos aumentou o potencial clonogênico das MSCs-TA, ao mesmo tempo em que aumentou a capacidade proliferativa destas células. Dentre os fatores de crescimento, EGF e FGF-2 foram responsáveis pelos efeitos mais robustos. Ao mesmo tempo, células cultivadas nas presença destas citocinas foram capazes de manter a morfologia fibroblastóide e apresentaram alta expressão do fator de pluripotência Klf-4. Em concordância com estes achados, o transplante subcutâneo de MSCs-TA cultivadas nestas condições mostrou que aquelas mantidas em EGM-2 geram um tecido semelhante ao tecido formado pela fração estromal vascular não cultivada. Estes resultados reforçam o papel do ambiente pró-angiogênico na manutenção do estado progenitor de MSCs-TA, e que tal estado foi proporcionado pela ação dos fatores de crescimento pró-angiogênicos EGF, FGF-2, IGF e VEGF nas células em cultivo, com destaque para as citocinas EGF e FGF-2. Em conclusão, o uso do ambiente pró-angiogênico no cultivo de MSCs-TA mostrou-se como uma abordagem promissora para a manutenção do estado progenitor destas células *in vitro*.

Palavras-chave: Células mesenquimais multipotentes; fatores de crescimento pró-angiogênicos; formação de colônias; potencial de diferenciação; tecido adiposo.

ABSTRACT

PIMENTEL, T. V. C. A. **Influence of pro-angiogenic growth factors in the maintenance of mesenchymal stem cells characteristics derived from adipose tissue.** 2015. Dissertation (Master). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The maintenance of the progenitor state in the culture of adipose tissue derived-mesenchymal progenitor cell (TA-MSCs), characterized by the differentiation potential and self-renewal capability, is currently one of the major challenges of cell therapy. The information that the angiogenesis influences the development of mesenchymal tissues, has led us to evaluate how a pro-angiogenic environment mimicked in culture would provide conditions for maintaining a progenitor state during the cell expansion process. We designe a model for a pro-angiogenic environment in which cells grown in EGM-2 supplemented with the following growth factors: EGF, FGF-2, IGF and VEGF, and demonstrated that the presence of such pro-angiogenic growth factors was crucial for maintenance of the progenitor of AT-MSCs in culture. We observed that the presence of such growth factors allowed to AT-MSCs a high potential of adipogenic and osteogenic differentiation compared to conventional DMEM/F12 medium and the EBM medium, in the absence of the factors. Furthermore, the culture in presence of pro-angiogenic growth factors increased the clonogenic potential of AT-MSCs and increased the proliferative capability of these cells. Among the growth factors, EGF and FGF-2 were responsible for most robust effects. At the same time, cells cultured in the presence of these cytokines were able to maintaining the fibroblastoid morphology and presented high expression levels of Klf-4 pluripotency factor. In agreement with these observations, the subcutaneous transplantation of AT-MSCs cultured under these conditions showed that those cells kept in EGM-2 generated a tissue-like to tissue formed by the stromal vascular fraction uncultivated. These results reinforce the role of the pro-angiogenic environment in the maintenance of the progenitor state of AT-MSCs, and that such a state was provided by the action of the pro-angiogenic growth factors EGF, FGF-2, IGF and VEGF in cultured cells, highlighting EGF and FGF-2 cytokines. In conclusion, we showed that the use of a pro-angiogenic environment in AT-MSCs culture is a promising approach to the maintain the progenitor state of these cells in vitro.

Keywords: multipotent mesenchymal cells; pro-angiogenic growth factors; colony forming; differentiation potential; adipose tissue.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CCL2	Quimiocina de "*motif*" C-C ligante 2
CCL5	Quimiocina de "*motif*" C-C ligante 5
CXCL12	Quimiocina de "*motif*" C-X-C ligante 12
DAPI	40,6-diamino-2-fenilondole
DMEM/F12	Meio essencial modificado de Dulbecco/Nutriente Ham F12
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGM-2	Meio de crescimento endotelial
FEV	Fração estromal vascular
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos 2
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfônico
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano DR
IDO	Idoliamina 2,3- dioxigenase
IGF	Fator de crescimento similar à insulina 1
IgG	Imunoglobulina
IL-10	Interleucina 10
IVIS	Sistema de processamento de imagem *in vivo*
MSCs	Células progenitoras mesenquimais
MSCs-TA	Células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina de tampão fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
PIBB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
ROI	Região de interesse
RPMI	Meio instituto memorial Roswell Park
RT-PCR	Reação de cadeia polimerase em tempo real
SBF	Soro fetal bovino
sHLA-G	Antígeno leucocitário humano G solúvel
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta
URE	Unidades relativas de expressão
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α-MEM	Meio essencial mínimo-alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do tecido adiposo. **26**
Figura 2. Diferenciação adipogênica em DMEM/F12 e EGM-2. ..... **53**
Figura 3. Diferenciação osteogênica em DMEM/F12 e EGM-2. ..... **54**
Figura 4. Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação adipogênico em EGM-2. ..... **56**
Figura 5. Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação osteogênico em EGM-2. ..... **57**
Figura 6. Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação adipogênico por meio de fatores pró-angiogênicos..... **59**
Figura 7. Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação osteogênico por meio de fatores pró-angiogênicos **60**
Figura 8. Fotomicrografia de contraste de fase de células em cultivo..... **61**
Figura 9. Morfologia. **63**
Figura 10. Organização dos filamento de actina..... **64**
Figura 11. Painel do perfil imunofenotípico..... **64**
Figura 12. Potencial de diferenciação adipogênico de MSCs-TA a partir do cultivo com fatores pró-angiogênicos..... **66**
Figura 13. Potencial de diferenciação osteogênico de MSCs -TA a partir do cultivo com fatores pró-angiogênicos..... **69**
Figura 14. Formação de colônias fibroblastóides. **71**
Figura 15. Gráfico da frequência de formação de colônias fibroblastóides. **72**
Figura 16. Tempo de duplicação……..... **72**
Figura 17. Análises de expressão gênica por PCR em tempo real. **76**
Figura 18. Processamento de imagem baseado em bioluminescência. **78**
Figura 19. Cortes histológicos e marcação por imunohistoquímica. **80**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 18

1.1. Células progenitoras mesenquimais: histórico, conceito e funções biológicas 18

1.2. Cultura celular: histórico e perspectivas 22

1.3. Tecido adiposo como fonte de MSCs: papel da angiogênese e do nicho na manutenção das características progenitoras de MSCs-TA 25

2. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL 30

3. MATERIAL E MÉTODOS 32

3.1. Principais reagentes 33

3.2. Aspectos éticos 34
3.2.1. Células Humanas 34
3.2.2. Linhagens celulares 35
3.2.3. Manuseio e manipulação de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) 35
3.2.4. Experimentos com animais 36

3.3. Isolamento e cultivo de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MSCs-TA) 36

3.4. Ensaios experimentais 38
3.4.1. Análises morfológicas 38
3.4.2. Análise da organização dos filamentos de actina 38
3.4.3. Análise do perfil imunofenotípico 39
3.4.4. Potencial de diferenciação 39
3.4.5. Coloração pelos métodos de *Oil Red* e *Alizarin Red* 40
3.4.6. Quantificação da coloração dos ensaios de diferenciação 41
3.4.7. Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação 42
3.4.8. Avaliação da proliferação celular *in vitro* 43
3.4.9. Ensaio de formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs) 43
3.4.10. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real 44
3.4.11. Caracterização *in vivo* 47

3.5. Análises estatísticas 49

4. RESULTADOS 52

4.1. MSCs-TA cultivadas em EGM-2 apresentam maior potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico em comparação ao meio de cultivo convencional DMEM/F12 52

4.2. Fatores de crescimento pró-angiogênicos recuperam o potencial de diferenciação adipogênico das MSCs-TA previamente cultivadas em meio DMEM/F12 54

4.3. Efeito dos fatores de crescimento angiogênicos nas características de MSCs-TA *in vitro* 60

4.4. Análise morfológica 61

4.4.1. Os fatores de crescimento EGF e FGF-2 induzem a aquisição de uma morfologia fusiforme nas MSCs-TA in vitro 62

4.4.2. Organização dos filamentos de actina 63

4.5. Fatores de crescimento pró-angiogênicos não alteram o perfil de expressão de marcadores de superfície em MSCs-TA 64

4.6. EGF e FGF-2 mantêm MSCs-TA com alto potencial de diferenciação em cultura 66

4.7. Fatores de crescimento pró-angiogênicos aumentam a capacidade de autorrenovação das MSCs-TA *in vitro* 70

4.8. Os fatores de crescimento EGF e FGF-2 aceleram a proliferação das MSCs-TA *in vitro* 72

4.9. Meios pró-angiogênicos EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2 aumentam expressão de genes envolvidos na adipogênese e associados à pluripotência 73

4.9.1. Cultivo de MSCs-TA na presença de fatores pró-angiogênicos aumentam a transcrição de genes envolvidos no processo inicial de diferenciação adipogênica 74

4.9.2. O cultivo de MSCs-TA em meio pró-angiogênico aumenta a expressão do fator de pluripotência Klf4 75

4.9.3. MSCs-TA cultivadas sob as diferentes condições não adquirem uma assinatura transcricional típica de pericitos ou miofibroblastos 75

4.10. Caracterização de MSCs-TA cultivadas em EGM-2, EBM + EGF, EBM + FGF-2 e DMEM/F12 *in vivo* 76

4.10.1. As diferentes condições de cultivo não alteram a sobrevida das MSCs-TA após transplante em camundongos imunodeficientes 77

4.10.2. O cultivo na presença de citocinas pró-angiogênicas retém o potencial de diferenciação in vivo de MSCs-TA..... 78

5. DISCUSSÃO..... 82

6. CONCLUSÃO..... 96

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 98

8. APÊNDICES..... 112

APÊNDICE A: Perfil imunofenotípico. 112

APÊNDICE B: Potencial de diferenciação entre amostras de tecido. 113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células progenitoras mesenquimais: histórico, conceito e funções biológicas

Células mesenquimais são células que formam os tecidos conectivos ao longo do corpo. Acredita-se que na composição dos tecidos conjuntivos distribuídos pelo corpo, e presentes na maioria dos tecidos e órgãos adultos, esteja presente uma pequena população de células progenitoras mesenquimais, também conhecidas como células mesenquimais multipotentes (MSCs, do inglês *Mesenchymal stem cells*), que se encontram em um estado indiferenciado. Tal estado permite que estas células sejam capazes de se diferenciar em outros tipos celulares de origem mesenquimal como por exemplo, condroblastos, osteoblastos e adipócitos, de acordo com o tecido em que residem. Assim como as células progenitoras, as MSCs também possuem capacidade de autorrenovação, produzindo clones responsáveis por manter o *pool* de células progenitoras no tecido. Devido a estas características, MSCs são células que participam da homeostase tecidual ao longo da vida do indivíduo, seja pela manutenção natural da composição dos tecidos ou em decorrência de processos induzidos por lesões, como ocorre na cicatrização de feridas[1].

As MSCs vêm sendo estudadas há mais de 40 anos a partir de trabalhos sobre a reconstituição da medula óssea, em 1968, em que Tavassoli e Crosby verificaram a formação de ossículos heterotópicos, com hematopoese funcional, a partir de fragmentos autólogos da medula enxertados em ratos, coelhos e cachorros. Tal estudo revelou a existência de um potencial de formação de tecido esquelético dentro da medula óssea[2]. Em seguida foi possível fazer o isolamento de células mesenquimais progenitoras a partir da medula óssea, de onde a fração total de MSCs foi separada da fração de células hematopoiéticas por adesão ao vidro. Essas células foram capazes de formar ossículo heterotópico *in vivo*,

demonstrando que este potencial de formação de tecido ósseo estava presente na fração estromal, e não na fração hematopoiética[3].

Seguinte à esses achados, os estudos subsequentes foram realizados cada vez mais com o intuito de definir a população de células responsável por tais efeitos. Em 1970, baseado na propriedade de células-tronco hematopoiéticas de formar colônias clonais, Friedeinstein conseguiu isolar células com morfologia fibroblastóide também capazes de formar colônias. A partir de um *pool* destas colônias, o grupo conseguiu formar osso heterotópico após transplantes em câmara de infusão[4], e, mais recentemente, Méndez-Ferrer e colaboradores[5] (2010) conseguiram tal feito a partir de uma única colônia de células fibroblastóides. Corroborando estes estudos, Sachetti *et al* (2007) demonstraram a formação de ossículo ectópico baseado no uso de tais progenitores clonogênicos, seguido de transplante secundário, provando a capacidade autorrenovadora destas células[6].

Paralelamente a estes estudos, baseado no modelo de células-tronco hematopoiéticas, Caplan nomeou, equivocadamente, a fração total destas células cultivadas *in vitro* como células-tronco mesenquimais, com o acrônimo MSCs, julgando estas células como progenitoras mesenquimais comuns à todos os tecidos de origem mesenquimal e capazes de se diferenciar em todos os tipos de células mesenquimais[7].

Tal conceito levou ao uso desenfreado do nome células-tronco mesenquimais para todas as células isoladas e cultivadas a partir das mais diversas fontes de tecidos, utilizando-se somente de ensaios *in vitro* para sua identificação e caracterização. Entretanto, tais células cultivadas não foram comprovadas serem progenitoras *bona fide*, como aconteceu com a população de MSCs isoladas da medula óssea, tratando-se, na verdade, de um conjunto de células heterogêneas que apresentam diferentes potenciais de diferenciação em cultivo, e que não foram comprovadas possuir potencial de diferenciação *in vivo*[8].

Diante deste cenário, surgiram diversos trabalhos publicados com resultados controversos, e que dificultaram ainda mais a identificação e

caracterização de MSCs. Com isso, em 2005, a *International Society for Cellular Therapy* – ISCT, postulou uma padronização para a nomenclatura de MSCs, reconhecendo as diferenças funcionais entre as chamadas células-tronco mesenquimais (população que apresenta características de células-tronco comprovadas através de ensaios *in vivo*) e células estromais mesenquimais multipotentes, se referindo à população heterogênea oriunda do cultivo. Contudo, mantiveram o acrônimo "MSC" em ambas as populações desde que sejam especificadas[9].

Assim, células estromais mesenquimais multipotentes, ou aqui referidas como células progenitoras mesenquimais (MSCs), são células progenitoras heterogêneas com capacidade de adesão ao plástico e que em cultivo apresentam potencial de diferenciação em três linhagens mesenquimais, osteogênica, adipogênica e condrogênica[10]. Por não apresentarem um marcador de superfície específico, as MSCs são caracterizadas por apresentar um perfil imunofenotípico comum a todas elas, definidos em humanos pela presença de CD73, CD90 e CD105, e ausência de marcadores de células hematopoiéticas CD11b, CD19, CD34 e CD45, de células endoteliais CD31 e de moléculas HLA-DR[11].

Com relação à localização *in vivo*, evidências apontam que seu nicho esteja localizado na região perivascular de vasos sanguineos[5,11,12]. Tal localização ajuda a explicar sua ampla distribuição no organismo, e seu isolamento a partir das mais diversas fontes de tecidos[13].

Acredita-se que as MSCs promovam a manutenção da homeostase tecidual por meio da secreção de diversos fatores solúveis com funções angiogênicas, antiapoptóticas e imunoregulatórias, que contribuem para suas habilidades pró-regenerativas, e auxiliam na interação com outras células progenitoras presentes no tecido[14]. Todavia, alguns poucos estudos têm mostrado também a capacidade regenerativa das MSCs através de diferenciação direta em tecido lesionado[15].

Devido a estas habilidades, da facilidade de coleta e de apresentarem vantagens imunológicas, como ausência de expressão de moléculas HLA-DR,

MSCs passaram a ser amplamente cotadas como ferramenta terapêutica com o intuito de aplicá-las clinicamente em uma gama de doenças, que vão desde regeneração tecidual à doenças autoimunes, como pode ser visualizado no site *www.clinicaltrials.gov*, que compila os ensaios clínicos em andamento e finalizados.

O potencial imunoregulatório das MSCs é atribuído à sua capacidade de interagir direta e indiretamente com praticamente todos os tipos celulares que compõem nosso sistema imunológico. Portanto, postula-se que elas possam atuar nas ações mediadas pelos sistemas inato e adaptativo. Segundo diversos grupos de pesquisadores[16,17,18,19], as MSCs podem inibir a proliferação de linfócitos T e B, bem como induzir a formação de células T reguladoras (Treg), atuar no balanço entre células *T helper* (Th) tipo 1 e tipo 2, na diminuição da citotoxicidade de células *natural killer* (NK), bloquear a maturação de monócitos em células dendríticas (DC), atuar na repolarização de macrófagos entre os fenótipos M1 e M2[20,21,22,23], na ativação e sobrevivência de neutrófilos, inibição de mastócitos, e até mesmo no funcionamento do sistema complemento[17]. Atraídas por quimiocinas liberadas no ambiente inflamatório, as MSCs seriam estimuladas a migrar para sítios de inflamação, onde secretariam diversos fatores solúveis como IDO, PGE2, sHLA-G5, HGF, IL-10, TGF-B, NO, CXCL-12, CCL5, CCL2, angiopoietina-1, VEGF, entre outros que iriam modular a resposta inflamatória e contribuir para o reparo tecidual[11,24, 25,26,27,28].

O efeito pró-angiogênico das MSCs também possuiria um papel importante na regeneração tecidual. A angiogênese é um processo em que novos microvasos são formados a partir de vasos pré-existentes, pela proliferação e migração de células endoteliais[29]. Nesse processo, as MSCs apresentariam um papel tanto de suporte estrutural, por sintetizar matriz extracelular que servirá como substrato para células endoteliais na região perivascular[30], como por interações parácrinas, por meio da secreção de fatores solúveis como fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2) e o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)[31].

Este conjunto de propriedades, se confirmados, tornariam as MSCs de fato bastante promissoras, apresentando diversas possibilidades de aplicação clínica. Entretanto, tais aplicações necessitam que as MSCs sejam expandidas *ex vivo* a fim de se alcançar um número de células suficiente para exercer seus efeitos[32].

1.2. Cultura celular: histórico e perspectivas

Os primeiros cultivos consistiam em pedaços de tecido embebidos no fluido de origem do próprio animal, de onde derivou o termo *tissue culture*, utilizado ainda hoje tanto para cultura de tecidos como cultura de células[33].

Assim, em 1907, Harrison colaborou com estudos iniciais de cultura de células ao dissecar a medula espinhal primitiva do embrião do sapo e cultivá-lo em sua linfa fresca. Harrison conseguiu manter as células *in vitro* por mais de uma semana em condições assépticas, o que ajudou a provar sua hipótese de formação de fibras nervosas a partir de células nervosas. Com isso, Harrison trouxe à tona a importância da metodologia de cultivo *ex vivo* para o descobrimento e compreensão de mecanismos fisiológicos do organismo, levando vários cientistas a se interessarem pela metodologia e passarem a praticá-la em seus laboratórios[33].

O cultivo de células vem sendo aperfeiçoado desde então, no qual foi sendo descoberta a necessidade de diversas práticas normalmente utilizadas hoje em dia, como a troca de meio[34], a tripsinização[35] e a adição de antibióticos mantendo o cultivo sem contaminação por mais tempo[36]. Com isso, houve gradualmente o estabelecimento de diversas linhagens celulares e, atualmente, o cultivo é um procedimento extremamente comum e amplamente utilizado em laboratórios do mundo inteiro.

Entretanto, durante o processo de cultivo e expansão as células são submetidas a ambientes artificiais, que não condizem com seu ambiente natural *in vivo*. De maneira que comparando ambos os ambientes podemos, citar como exemplo a estrutura bidimensional do ambiente na placa de cultura e

tridimensional no ambiente *in vivo*, diferenças na concentração de gases, além da ausência, no cultivo *ex vivo*, de toda uma complexa rede de interações e comunicações com outros tipos celulares, que influenciam em suas características e funções *in vivo*.

Devido à estas e outras diferenças, o ambiente de cultivo celular é responsável por modificar algumas características das células, como a expressão de marcadores de superfície, capacidade proliferativa, migração e envelhecimento celular[37]. Tais modificações comprometem a compreensão do comportamento celular, bem como afetam as suas funções, como demonstrado por outros estudos em que as MSCs em cultivo se diferenciam estocasticamente, levando à diminuição de sua capacidade multipotencial e de sua capacidade de autorrenovação[38].

Dentre os componentes que fazem parte da técnica de cultivo celular, o meio de crescimento é de extrema importância. É ele que fornece substâncias essenciais, como sais minerais, aminoácidos, vitaminas, entre outros, que contribuem para o crescimento e sobrevivência da célula *in vitro*. Por tanto, em sua composição, deve-se levar em consideração as mesmas vias metabólicas e bioquímicas do organismo[33].

Na década de 50, houve o desenvolvimento do primeiro meio definido basal α-MEM para o cultivo de células de mamíferos[39]. Hoje em dia, além de meios basais definidos, existem formulações comerciais específicas para diversos tipos celulares como por exemplo, o meio RM ou EpiLife utilizado em queratinócitos epidermais[40], o meio EGM-2 utilizado para o cultivo de células endoteliais, e o meio *Stem* Pro utilizado para o cultivo de células-tronco hematopoéticas[41].

Com tanta diversificação de meios de cultivo produzidos atualmente, a união entre um levantamento bibliográfico na literatura científica, e o conhecimento sobre o nicho celular e o microambiente no qual as células estão inseridas *in vivo*, pode auxiliar na identificação do meio de cultura mais adequado para o cultivo de determinado tipo celular.

Recentemente, um estudo fez um levantamento de diferentes protocolos de expansão de MSCs utilizados atualmente em 47 estudos pré-clínicos. Segundo os autores existe uma grande variação entre os protocolos de expansão utilizados[42], como consequência da ausência de um método padrão descrito. Somando a isto, outros grupos realizaram tentativas de otimizar o processo de expansão de MSCs, entretanto, a maioria das publicações apresentaram resultados vagos, alguns baseando-se apenas em perfis de transcriptoma e proteoma[43], além de muitos deles apresentaram células com uma de suas principais características, como potencial de diferenciação, pouco evidentes[44,45,46,47,48,49,50]. De fato, não existe uma metodologia de cultivo padrão para MSCs, e isto contribui para a ausência de uma caracterização e compreensão mais apuradas das células mesenquimais, seja em nível básico ou mais aprofundado.

Se verificarmos o que há em comum em quase todas as publicações com células mesenquimais, podemos destacar a presença dos meios definidos DMEM (Low-Glucose, High-Glucose ou F12) e α-MEM, suplementados somente com soro fetal e L-glutamina. Apesar de tais meios de cultivo apresentarem componentes essenciais ao cultivo de células de mamíferos, a presença de compostos adicionais, que participem da composição do microambiente *in vivo* e impeçam o envelhecimento celular, é indispensável para que suas características sejam mantidas durante o cultivo.

Sendo assim, compreender como estas células são reguladas *in vivo* afim de identificar componentes que possam tornar o ambiente de cultura favorável à manutenção de suas características é essencial para elaborar modelos fidedignos e obter dados que tenham correspondência com o comportamento no ambiente nativo, bem como utilizar este conhecimento em estratégias para fins terapêuticos e de pesquisa básica.

Dessa forma, existe uma preocupação com a tradução fidedigna do ambiente *in vivo* para o ambiente *ex vivo*, para que possamos manter a biologia básica e funcional destas células durante o processo de expansão em cultura.

1.3. Tecido adiposo como fonte de MSCs: papel da angiogênese e do nicho na manutenção das características progenitoras de MSCs-TA

Uma das fontes onde se pode extrair MSCs é o tecido adiposo (TA). Este é um tecido amplamente vascularizado, e pode ser obtido facilmente como subproduto em cirurgias de lipossucção e abdominoplastia, sendo geralmente descartados. Com seu nicho ao redor dos vasos[51], as MSCs compõem a fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo juntamente com células endoteliais, em que 20%-40% da FEV é composta por células endoteliais vasculares (CEVs-TA)[29] e o restante consiste da população heterogênea de células estromais dentre as quais encontram-se as células-tronco adipogênicas, designadas como MSCs-TA (Figura 1).

In vivo, as células localizam-se em seu nicho, um microambiente especializado e fornecedor de sinais que coordenam e regulam as funções, atividades e destino de células progenitoras[52,53]. Este microambiente é composto também por outros tipos celulares, moléculas de sinalização associados às superfícies celulares ou difusíveis, como fatores de crescimento, parâmetros físicos como a rigidez da matriz extracelular, tensão de oxigênio e de cisalhamento, entre outros. Tais componentes podem variar entre os tecidos, mas, em todos os casos, os sinais fornecidos interagem com as MSCs influenciando em suas ações, incluindo na escolha entre proliferação ou quiescência, autorrenovação ou diferenciação, migração ou retenção, morte celular ou sobrevivência[54].

A região perivascular é um ambiente que proporciona às MSCs uma íntima associação, anatômica e fisiológica, com as células que compõem o ambiente, como células endoteliais e outras células perivasculares[55]. Além disso, a vasculatura apresenta um papel de grande influência na modulação de tecidos mesenquimais, como o tecido adiposo[56]. Tal modulação atua inicialmente no

desenvolvimento do tecido adiposo, que é precedido pela angiogênese. Esta, contribui para a adipogênese através da suplementação de nutrientes e oxigênio presentes no sangue, necessários para o crescimento e, posteriormente, manutenção tecidual.

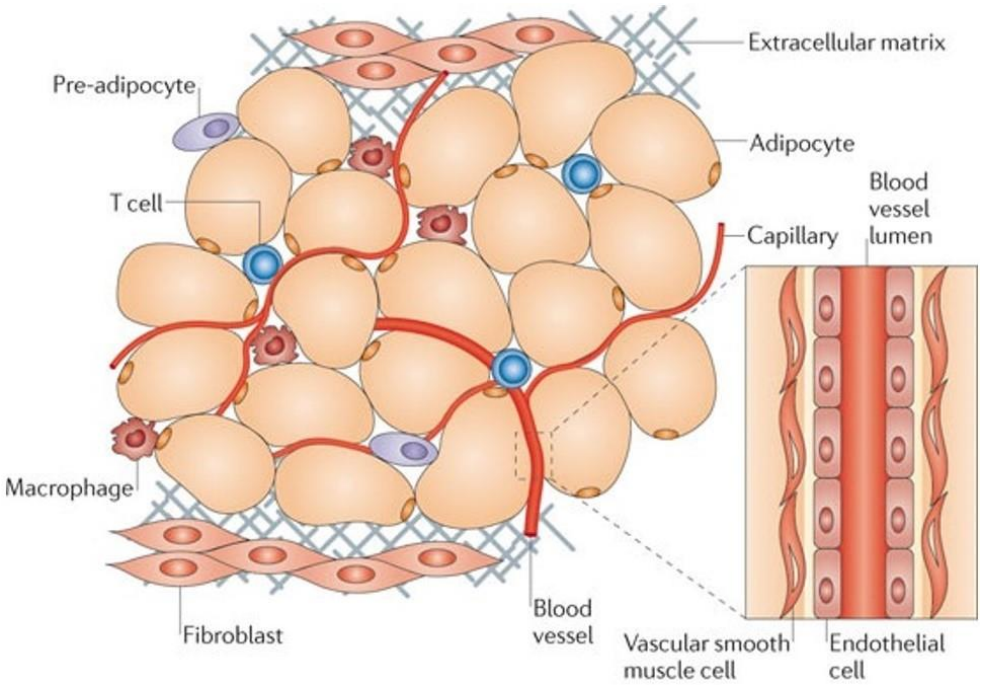


Figura 1. Estrutura do tecido adiposo. A imagem ilustra o ambiente que compõe o tecido adiposo, destacando a presença de vasos sanguíneos além de outros componentes como matriz extracelular e diferentes tipos celulares, como células progenitoras de adipócitos, fibroblastos e macrófagos. Evidências apontam a localização do nicho de células progenitoras mesenquimais ao redor dos vasos, desse modo, o tecido adiposo caracteriza-se como uma fonte abundante destas células. (Ouchi *et al*, 2011).

No processo de desenvolvimento de tecido adiposo epididimal em camundongos, um estudo demonstrou que células mesenquimais perivasculares coletadas na fase em que ocorria a angiogênese, ou seja, anteriormente à formação do tecido adiposo, não eram capazes de se diferenciar *in vitro*. Contudo, passado o período angiogênico e iniciado o momento de formação de tecido adiposo, estas

células foram capazes de se diferenciar *in vitro*. Isto pressupõe que durante o processo de angiogênese, células mesenquimais perivasculares podem ser mantidas em um estado indiferenciado ao mesmo tempo em que proliferam, mantendo o *pool* de células progenitoras, e acompanhando o crescimento vascular na região ao redor dos vasos. Somente após este estágio de proliferação é que as células progenitoras mesenquimais ativam o programa de diferenciação adipogênica[57].

Este conjunto de informações sugere que elementos presentes no ambiente pró-angiogênico, podem estimular a proliferação e ao mesmo tempo preservar o potencial de diferenciação das MSCs durante a cultura. A implicação evidente desta hipótese é que tal estratégia representaria o aumento da eficácia terapêutica das MSCs em pesquisas com fins de regeneração tecidual.

Estudos já vêm explorando a função do nicho em cultura, como por exemplo, para a expansão de células-tronco hematopoiéticas *in vitro* ao mesmo tempo em que mantém seu potencial de diferenciação. Em 2012, Butler e colaboradores demonstraram que células-tronco hematopoéticas (CTHs) $CD45^{+}/Lin^{-}/CD34^{hi+}/CD45RA^{-}/CD49f^{+}$ quando co-cultivadas com células endoteliais proliferavam 23 vezes mais em relação às CTHs cultivadas isoladamente[58]. Um outro grupo de pesquisadores demonstrou que interações parácrinas entre células endoteliais e células progenitoras adipogênicas atuam na manutenção destas células em um estado indiferenciado[59]. Na clínica também já é feita manipulação do nicho de CTHs, por meio de agentes mobilizadores, como o uso do fator de crescimento de granulócitos (G-CSF), que participam da ativação das CTHs promovendo sua migração para a circulação sanguínea[54].

No nicho, os suprimentos que atuam no desenvolvimento e manutenção do tecido adiposo são enriquecidos com fatores de crescimento e citocinas que desencadeiam sinais de crescimento e sobrevivência, mantendo as funções fisiológicas das células no tecido[30]. Além disso, sabe-se que o cultivo de células-tronco embrionárias é dependente de diversas moléculas solúveis, como citocinas

e fatores de crescimento, que interagem com as células-tronco embrionárias atuando na manutenção de sua pluripotência[60]. Portanto, a sinalização celular através de moléculas solúveis é um componente atrativo para a manutenção das características progenitoras de MSCs em cultivo.

No processo de neovascularização ocorre a liberação de diversos fatores de crescimento como angiopoietina-1 (Ang-1), FGF-2 e VEGF[61], e algumas outras citocinas como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) também tem sido descritos[62,63]. Tais fatores, com exceção de Ang-1, compõem o meio de crescimento comercial utilizado para o cultivo de células endoteliais EGM-2, o qual poderia ser utilizado para mimetizar, *in vitro*, um ambiente de crescimento vascular durante o cultivo de células mesenquimais.

Alguns pesquisadores avaliaram o uso de EGM-2 no cultivo de células mesenquimais. Segundo os autores, apesar de as células cultivadas em EGM-2 apresentarem um aumento na proliferação, não houve diferença no potencial de diferenciação em comparação às células cultivadas em meio DMEM/F12[64]. Entretanto, não há outros trabalhos que corroborem com tais resultados, sendo necessário mais estudos.

Ainda que os ensaios de diferenciação e formação de colônias *in vitro* sejam amplamente aceitos e utilizados para caracterizar as MSCs, a avaliação do comportamento destas células *in vivo* é a estratégia experimental mais rigorosa e, portanto, confiável para medir o potencial de diferenciação e a capacidade de autorrenovação[11]. Por meio de tecnologias como o processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB), é possível monitorar em tempo real as células que foram modificadas para expressar uma proteína repórter bioluminescente, como a luciferase, e obter informações sobre a sobrevida e biodistribuição das células após transplante.

Sendo assim, tendo em vista 1) as evidências de que as MSCs ocupam um nicho perivascular; 2) que o nicho possui um papel essencial nas funções celulares

e que diversos sinais fornecidos pelo nicho são fatores de crescimento; e 3) que a angiogênese precede o desenvolvimento de tecidos mesenquimais; nossa hipótese foi de que recriar um ambiente pró-angiogênico no cultivo de MSCs preserva suas características funcionais ao mesmo tempo que aumenta sua proliferação ao longo da cultura.

Nossos resultados demonstram que, ao contrário do cultivo em condições convencionais, a presença de fatores de pró-angiogênicos durante o cultivo de MSCs-TA é capaz de promover a manutenção de suas características progenitoras *in vitro*, e de seu potencial de diferenciação após transplante *in vivo*.

ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

2. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Para testar nossa hipótese, utilizamos o meio EGM-2 como uma abordagem para mimetizar o ambiente pró-angiogênico *in vitro*. Dessa forma, cultivamos MSCs-TA em meio EGM-2 e avaliamos sua capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, em comparação ao cultivo em meio convencional representado pelo meio DMEM/F12.

Para aprofundar nossas análises, sabendo que o meio EGM-2 é composto pelos 4 fatores de crescimento, FGF-2, IGF, EGF e VEGF, nos perguntamos o papel destes fatores na manutenção das características funcionais das MSCs. Para tanto, cultivamos MSCs-TA no meio EBM (meio base do EGM-2) na presença de cada uma das citocinas adicionadas separadamente, e realizamos uma série de experimentos de caracterização e análises funcionais, como:

- Análises morfológicas e organização dos filamentos de actina;
- Perfil de marcadores de superfície;
- Potenciais de diferenciação adipogênico e osteogênico *in vitro*;
- Formação de CFU-F;
- Tempo de duplicação;
- Análises de expressão gênica de genes envolvidos nas diferenciações adipogênica e osteogênica, pluripotência e senescência, e genes típicos de linhagens celulares pericíticas e de músculo liso.

Além disso, avaliamos também a sobrevida e o potencial de diferenciação *in vivo*, de algumas destas condições de cultivo, após transplantes em camundongos imunossuprimidos.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1. Principais reagentes:

MEIOS DE CULTURA

Meio padrão: Meio DMEM/F12 (Gibco) suplementado com 10% em volume de SBF (Hyclone), 14,2 mM de bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µM de estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

Meio pró-angiogênico: Meio EGM-2 SingleQuots (Lonza) composto pelo meio basal de células endoteliais (EBM) suplementado com SBF, hidrocortisona, ácido ascórbico, gentamicina, heparina, os fatores de crescimento FGF-2, IGF-1, EGF, VEGF, de acordo com as instruções do fabricante.

Meio pró-angiogênico suplementado com os fatores de crescimento separadamente:

- FGF-2: Meio EBM suplementado com SBF, hidrocortisona ácido ascórbico, gentamicina, heparina e o fator de crescimento hFGF-2;
- hEGF: Meio EBM suplementado com SBF, hidrocortisona ácido ascórbico, gentamicina, heparina e o fator de hEGF;
- R3-IGF-1: Meio EBM suplementado com SBF, hidrocortisona ácido ascórbico, gentamicina, heparina e o fator de crescimento IGF-1;
- VEGF: Meio EBM suplementado com SBF, hidrocortisona ácido ascórbico, gentamicina, heparina e o fator de crescimento VEGF.

Meio indutor de diferenciação em adipócitos: Meio DMEM High Glucose (Gibco) suplementado com 10% em volume de SBF, 44 mM de bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10 mM de HEPES (Sigma), 20 µg/mL de insulina (Sigma), 200 µM de indometacina (Sigma), 2 µM de dexametasona (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µM de estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação em osteoblastos: Meio DMEM Low Glucose (Gibco) suplementado com 10% em volume de SBF, 44 mM de bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10 mM de HEPES (Sigma), 400 µM de ácido ascórbico (Sigma), 20 mM de β-glicerolfosfato (Sigma), 2 nM de dexametasona (Sigma), 100 U/mL de penicilina (Gibco) e 100 µM de estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

ANTICORPOS

Anticorpos primários: anticorpos conjugados com fluoresceína (PE) anti-CD271, anti-CD140a, anti-NG2, anti-CD73 e anti-CD31; anticorpos conjugados com ficoeritrina (PercP) anti-CD117, anti-CD34, anti-CD-105; anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD146 e anti-CD90; anticorpos conjugados com aloficocianina (APC) anti-CD45, anti-CD44 (BD Pharmigen). Anticorpos não conjugados IgG de coelho anti-firefly luciferase (Abcam).

SUBSTRATO BIOLUMINESCENTE

D-luciferina (Caliper LifeSciences).

MATRIZ PARA INFUSÃO *IN VIVO*

Matrigel (BD Biosciences)

3.2. Aspectos éticos:

3.2.1. Células Humanas:

Todos os procedimentos com células do tecido adiposo humano foram realizados com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEP-HC-FMRP), parecer

nº 375.415/2013. As amostras foram coletadas a partir do tecido adiposo descartado após cirurgias de lipoaspiração da região do abdômen e abdominoplastias realizadas na Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) e no Hospital da Plástica, em Ribeirão Preto. As amostras remanescentes deste projeto estão sendo mantidas no banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto (processo HCRP 920/2009).

As amostras coletadas são de pacientes com idade entre 18 e 40 anos e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2.2. **Linhagens celulares:**

Para os experimentos de recuperação do potencial de diferenciação foram utilizadas linhagens Bj (fibroblastos de recém-nascidos humanos) como controle negativo. Estas linhagens foram cedidas gentilmente pela Mestre Luiza Junqueira (Hemocentro de Ribeirão Preto).

3.2.3. **Manuseio e manipulação de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs):**

O procedimento de manipulação de OGMs neste projeto é classificado como Classe de Risco 2 de acordo com a “Classificação de Risco dos Agentes Biológicos” do Ministério da Saúde (2006), utilizado como base no manual da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Centro de Hemoterapia de Ribeirão Preto: Orientações para Manuseio, Processamento e Descarte de Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). Os experimentos foram realizados de acordo com a aprovação da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), processo de número: 297/2014.018-02. Os manuseios

contendo OGMs correspondem à transdução de células de mamíferos (no caso MSCs-TA) para expressão de vetor lentiviral contendo gene da luciferase.

3.2.4. **Experimentos com animais:**

Todos os experimentos com animais foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal, protocolo nº 13.1.364.53.8. Foram utilizados 12 camundongos machos da linhagem *Nod Scid Gamma* (NSG) com 8-12 semanas de idade, compradas do *Jackson Laboratory* e expandidas no biotério do Hemocentro de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério do Centro Regional de Hemoterapia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno autoclavadas (30 cm x 20 cm x 13 cm – comprimento x largura x altura), com filtro de ar e mantidas em estantes ventiladas, em no máximo 4 animais por caixa, onde tiveram acesso a água filtrada, e ração autoclavada (Purina) *ad libitum*. As salas de aclimatação apresentam condições livres de patógenos e são dotadas de ciclos claro/escuro (12h/12h) e controle de temperatura (23°C).

Realizamos eutanásias através de asfixia por meio da administração de doses excessivas de CO_2.

3.3. Isolamento e cultivo de células progenitoras mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MSCs-TA):

Para o isolamento de MSCs-TA da fração estromal vascular (FEV), foram realizadas coletas de abdominoplastias e lipoaspirados após cirurgia. O material foi acondicionado em frascos de vidro autoclavados e encaminhados ao Laboratório de Transferência Gênica do Centro de Hemoterapia Regional de Ribeirão Preto. Após a coleta, o frasco contendo o tecido só foi aberto dentro de

cabine de fluxo laminar estéril. As amostras foram lavadas 3x com PBS 1x contendo 1% em volume de anti-anti (Antibiótico-Antimicótico, Gibco), para assepsia e retirada de sangue.

Amostras de abdominoplastia: Para isolamento de MSCs-TA decorrente de tecido sólido por cirurgia de abdominoplastia, o tecido adiposo foi separado do tecido epitelial e fibroso com a ajuda de tesouras cirúrgicas. A fração de tecido adiposo foi picotada mecanicamente em pequenos pedaços e digerida com colagenase tipo I (Sigma) em banho-maria à 37 °C durante 45 minutos, sob agitação à cada 10 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada à 500 g por 10 minutos. Os adipócitos foram descartados e o conjunto de células decantadas, consistindo na FEV, foi ressuspendido em PBS 1x e filtrada em filtros de 100 µm e em seguida em filtros de 45 µm. Em seguida as células viáveis foram contadas na câmara de Neubauer com azul de tripan, e plaqueadas a uma densidade de 1.10^6 células/cm^2 em garrafas de 75 cm^2 de diâmetro, contendo os meios:

-EGM-2;
-DMEM/F12.

E, em ensaios posteriores, incluímos as seguintes condições de cultura:

-EBM + FGF-2;
-EBM + IGF;
-EBM + EGF;
-EBM + VEGF;
-EBM.

Para amostras de lipoaspiração, após o conteúdo ser lavado em PBS 1x contendo 1% em volume de anti-anti, o material foi submetido à digestão com colagenase tipo I (Sigma) por 30 minutos em banho-maria à 37ºC, em seguida o

procedimento foi realizado nas mesmas condições do isolamento de MSCs-TA obtidos das amostras de abdominoplastia, como acima descrito.

Após alcançarem confluência de 80-90%, as células foram replaqueadas em outras garrafas, através de incubação por 5 minutos com tripsina-EDTA 0,05% à 37°C, onde elas se soltam da superfície da garrafa e ficam em suspensão. As células são submetidas à centrifugação e plaqueadas em novas garrafas de cultura. Cada tratamento com tripsina-EDTA caracteriza uma passagem em que p1 é a primeira passagem, p2 é segunda passagem, e assim por diante. As culturas foram mantidas em incubadoras a 37°C, 5% de CO_2, 95% de ar e 80% de umidade relativa. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

3.4. Ensaios experimentais:

3.4.1. Análises morfológicas

MSCs-TA foram plaqueadas a uma densidade de 1.10^6 células/cm^2 e monitoradas quanto à morfologia. Com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (IX71, Olympus) equipado com uma câmera fotográfica digital, as células foram fotografadas na p1, 24 h após serem plaqueadas a uma densidade de 1.10^5 células/cm^2.

3.4.2. Análise da organização dos filamentos de actina

Para verificar se as diferentes condições de cultivo causavam mudanças organizacionais dos filamentos de actina, 2.10^4 células foram plaqueadas em lamínulas de vidro circulares e foram mantidas em meio de cultivo por 24 horas.

Após este período as células foram fixadas em paraformaldeído 2% e marcadas com faloidina conjugada com o fluorocromo Texas Red.

As lâminas foram fotografadas por microscopia confocal no aparelho Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss), e analisadas pelo software ZEN 2008 (Carl Zeiss).

3.4.3. **Análise do perfil imunofenotípico**

MSCs-TA foram analisadas quanto ao perfil de expressão de proteínas de superfície por citometria de fluxo, a partir da terceira passagem. Para tanto, suspensões celulares contendo 2.10^5 células foram incubadas com 0,5 µg dos anticorpos anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-CD146, anti-CD271, anti-CD34, anti-CD44, anti-CD140a, anti-NG2, anti-CD31, anti-CD45, durante 15 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. Após este período as células foram lavadas em PBS 1x e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences).

3.4.4. **Potencial de diferenciação**

Neste ensaio as células cultivadas nas diferentes condições, desde o isolamento do tecido, foram induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica na terceira passagem.

Adipogênese: Para o ensaio de diferenciação em adipócitos, foram utilizadas placas de 24 poços em uma densidade de 4.10^4 células/poço para o grupo de diferenciação e 2.10^3 células/poço para o grupo controle. As células foram plaqueadas em seus respectivos meios, e após 24 horas o meio foi trocado para o meio indutor de adipogênese. O cultivo permaneceu por 15 dias, e no último dia os poços foram corados com corante *Oil Red.* O ensaio foi feito em quadruplicata onde um dos poços foi contra corado com hematoxilina de Harris, para melhor visualização e melhores imagens fotográficas.

Osteogênese: Para o ensaio de diferenciação osteogênica, 1.10^4 células/poço foram plaqueadas para o grupo de diferenciação e 2.10^3 células/poço

foram plaqueadas para o grupo controle. O ensaio foi feito em triplicata. As células foram plaqueadas em seus respectivos meios e 24h após o plaqueamento o meio foi trocado para o meio indutor de osteogênese. O cultivo permaneceu por 30 dias, e no último dia os poços foram corados com *Alizarin Red.*

Após os poços serem fotografados, a coloração foi quantificada por absorbância pelo equipamento SpectraMax M5 (Molecular Devices), como uma validação quantitativa.

Durante as induções o meio foi trocado a cada 3 dias.

3.4.5. **Coloração pelos métodos de *Oil Red* e *Alizarin Red***

Para verificar se ocorreu diferenciação adipogênica, MSCs-TA induzidas à adipogênese foram lavadas com PBS 1x e fixadas em paraformaldeído 10% durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida os poços foram lavados em água miliQ e fixados por 5 minutos em isopropanol 60%. Após o período de incubação foi adicionado 500 µL de *Oil Red* 60% por 1 hora, e em seguida, os poços foram lavados e deixados para secar por um dia, à temperatura ambiente, para o protocolo de quantificação do corante. O corante *Oil Red* cora depósitos lipídicos em cor vermelha. Para as imagens fotográficas um dos poços foi contra-corado com hematoxilina de Harris, por 1 minuto.

A diferenciação osteogênica foi avaliada por coloração com *Alizarin Red.* Para tanto, MSCs-TA induzidas à osteogênese foram lavadas com PBS 1x e fixadas com parafolmaldeído 10% por 1 hora. Em seguida os poços foram incubados com *Alizarin Red* no escuro, por 45 minutos. O corante *Alizarin Red* cora a matriz de cálcio depositada por osteoblastos diferenciados, em cor vermelha. Após fotografar os poços, estes foram deixados no freezer à -20°C, por no mínimo um dia, para o protocolo de quantificação da absorbância.

Após as colorações, em ambas as diferenciações, os poços foram lavados com água miliQ e deixados em PBS 1x para serem fotografados. As fotos foram

feitas no microscópio invertido (Axioscop 2 plus, Carl Zeiss) equipado com câmera digital (Axiocam, Carl Zeiss).

3.4.6. **Quantificação da coloração dos ensaios de diferenciação**

Para quantificar a coloração por *Oil Red*, os poços foram deixados secando à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 500 µL de isopropanol 100%, e as placas foram submetidas à agitação em *shaker* por 15 minutos em 200 rpm, à temperatura ambiente. Após a agitação, 100 µL do corante dissolvido no isopropanol foi transferido para os poços em placa de 96 poços, em duplicata. Isopropanol foi usado como controle branco, e as placas foram submetidas às leituras em comprimentos de onda de 500 nm.

Para a quantificação da coloração pelo *Alizarin Red*, foi adicionado aos poços 160 µL de ácido acético 10%. Em seguida as placas foram submetidas à agitação em um *shaker* à 200 rpm, por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a agitação, com o auxílio de uma ponteira, a camada de células de cada poço foi solta e transferida para tubos plástico de 1,5 mL. Os tubos foram agitados no vórtex por 30 segundos, e em cada amostra foi adicionado 100 µL de óleo vegetal. Em seguida, os tubos foram deixados em banho-seco, à 85°C por 10 minutos.

Após este período de incubação, os tubos foram passados rapidamente para um isopor contendo gelo, e deixados incubando por mais 5 minutos. Os tubos foram centrifugados, em centrifugação máxima, por 15 minutos. Após a centrifugação, é formado no tubo um conteúdo contendo três fases: óleo (fase superior), ácido acético (fase intermediária), e *pellet* celular (fase inferior do tubo). Foi retirado cuidadosamente 100 µL da fase intermediária de cada tubo e transferido para novos tubos de 1,5 mL. Nestes tubos foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônio 10%. Deste conteúdo 65 µL/poço foram transferidos para a placa de 96 poços, em duplicata. As placas foram submetidas à leituras com comprimentos de onda de 405 nm.

Os valores das absorbâncias referentes a cada tecido foram normalizados pela média dos valores obtidos das células cultivadas em DMEM/F12.

3.4.7. **Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação**

Para verificar se as diferenças no potencial de diferenciação entre as MSCs-TA cultivadas nos meios EGM-2 e DMEM/F12 eram devido à alterações na fisiologia celular ou se era decorrente da expansão de uma subpopulação celular, transferimos MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/F12 para o meio EGM-2 durante períodos curtos (3 dias e 7 dias) e avaliamos seu potencial adipogênico e osteogênico. Para tanto, fizemos análises do potencial de diferenciação das MSCs-TA cultivadas nas seguintes condições:

-Células cultivadas em EGM-2 e transferidas para cultivo em DMEM/F12 (E/D);
-Células mantidas em EGM-2 (E/E);
-Células cultivadas em DMEM/F12 e transferidas para cultivo em EGM-2 (D/E);
-Células mantidas em DMEM/F12 (D/D);
-Controle: Linhagem Bj, cultivadas em DMEM/F12 e transferidas para cultivo em EGM-2 (D/E);
-Controle: Linhagem Bj, mantidas em DMEM/F12 (D/D);

Após este ensaio, avaliamos também se os fatores de crescimento pró-angiogênicos presentes no meio EGM-2 teriam algum papel nos potenciais de diferenciação de células cultivadas previamente em DMEM/F12. Para tanto, após cultivo em DMEM/F12 as células foram submetidas ao cultivo nos seguintes meios por 3 dias:

-EBM + FGF-2 (D/FGF-2);
-EBM + EGF (D/EGF);

-EBM + IGF (D/IGF);
-EBM + VEGF (D/VEGF);
-EGM-2 (D/EGM-2);
-DMEM/F12.

Após os períodos de cultivo, as células foram induzidas à diferenciação osteogênica e adipogênica, conforme descrição feita no item 3.4.4.

3.4.8. **Avaliação da proliferação celular *in vitro***

Para avaliar a influência das diferentes condições de estudo na proliferação das MSCs-TA, as mesenquimais foram plaqueadas a uma densidade de 1.10^4 células/poço em placas de 6 poços, em triplicatas, e foram cultivadas até alcançar confluência de 80-90%. Em seguida, cada poço foi tripsinizado e contato separadamente com azul de tripan na câmara de Neubauer. A mesma quantidade de células iniciais foi replaqueada em novos poços, e o mesmo procedimento foi repetido da primeira (p1) até a terceira passagem (p3). O cálculo do tempo de duplicação das populações (TDP) foi realizado através da seguinte fórmula:

$$TDP= t \div 3,3\ [\log_{10}(N_i-N_f)]$$

3.4.9. **Ensaio de formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs)**

Para verificar se o cultivo de MSCs-TA nas diferentes condições poderia influenciar na formação de CFU-Fs, as células foram plaqueadas a uma densidade de 1.10^3 células/placa, logo após a extração do tecido (p0), em placas de 100 mm e em triplicatas. Durante 14 dias de cultivo a formação de colônias foi monitorada e, após este período, foi feita a contagem de colônias em cada placa.

Após a contagem, as placas foram tripsinizadas e o *pool* de colônias formadas foi replaqueado nas passagens seguintes à uma densidade de 1.10^2 células/garrafa, em garrafas T25 e em triplicatas. O mesmo procedimento foi repetido até a terceira passagem.

Apenas colônias com mais de 50 células foram contadas. Para uma melhor visualização das colônias, uma das placas de cada grupo (p0) foi corada com corante de *Leishman* por 5 minutos, adicionando gotas de água miliQ durante este tempo. Em seguida as placas foram lavadas 5x com água miliQ para serem fotografadas. O cálculo da porcentagem de frequência das colônias, foi feito através da seguinte fórmula:

$$\text{CFU-F}_{freq} = \text{Número de células inicial} \div \text{Número de colônias} \times 100$$

3.4.10. **Análise de expressão gênica por PCR em tempo real**

Selecionamos quatro meios de cultivo (EGM-2, DMEM/F12, EBM + EFG e EBM + FGF-2), e avaliamos de que maneira tais condições poderiam estar influenciando no nível de expressão de genes envolvidos na diferenciação adipogênica (FABP4, PPARɣ, C/EBPA, LEP e ADIPOQ), e osteogênica (SPARC, BGLAP e RUNX2); quanto à expressão de genes característicos das seguintes linhagens mesenquimais: pericíticas (nestina e desmina) e miofibroblastos (ACTA-2 e FSP-1). Além disso verificamos a expressão de genes envolvidos na senescência celular, como hTERT, e na pluripotência (Sox2, Klf4, Oct4 e Nanog).

Para tanto, as células foram plaqueadas, na p1, em garrafas T25, a uma densidade de 10^5 células/cm^2 e cultivadas até atingir confluência de 90%. Após alcançarem a confluência, o RNA total das amostras foi extraído através do kit RNeasy mini kit (Qiagen) acrescido da enzima DNase RNase-free DNase Set (Qiagen) a fim de evitar contaminação com DNA genômico. Foram utilizados 2

µg do RNA total para a síntese de cDNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Os cDNAs obtidos em cada amostra foram usados em duplicatas em reações de PCR em tempo real com o kit TaqMan Master PCR Mix (Applied Biosystems). A expressão dos genes foi normalizada pela expressão do gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A quantificação relativa dos transcritos, denominada unidades relativas de expressão (URE), foi feita pela seguinte fórmula:

$$URE = 10.000 \div 2^{(Ct\ gene\text{-}alvo - Ct\ GAPDH)}$$

Análises comparativas, conhecidas como *fold change*, também foram realizadas entre os grupos, onde os valores foram normalizados pela média dos valores obtidos do grupo DMEM/F12.

Os *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Lista das sondas utilizadas para reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvo. [1]Fator de transcrição proteína 4 de ligação à ácidos graxos, [2]Fator de transcrição receptor ativado por proliferador de peroxissoma gama, [3]Fator de transcrição proteína potencializadora de ligação alfa, [4]Proteína ácida secretada e rica em cisteína, [5]Proteína do osso contendo ácido carboxiglutâmico gama, [6]Fator de transcrição 2 relacionado a Runt, [7]Proteína alfa actina 2 do músculo liso, [8]Proteína específica de fibroblasto-1, [9]Enzima transriptase reversa da telomerase humana, [10,11,12,13]Fatores de transcrição da pluripotência Yamanaka, [14]Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase,

Nome do gene	Código Hs
FABP4	Hs01086177_m1
PPARɤ	Hs01115513_m1
CEBP/ α	Hs00269972_s1
Leptina (LEP)	Hs00174877_m1
Adiponectina (ADIPOQ)	Hs00605917_m1
SPARC	Hs00234160_m1
BGLAP	Hs0157814_g1
RUNX2	Hs00231692_m1
FSP-1	Hs00243202_m1
ACTA-2	Hs00909449_m1
Nestina	Hs04187831_g1
Desmina	Hs00157258_m1
hTERT	Hs00972656_m1
Sox2	Hs01053049_s1
Oct-4	Hs01895061_m1
Klf4	Hs00358836_m1
Nanog	Hs02387400_g1
GAPDH	Hs02758991_g1

3.4.11. **Caracterização *in vivo***

Utilizando as quatro condições de cultivo selecionadas, realizamos o biomonitoramento destas células *in vivo*. Para tanto as células foram modificadas a expressar o gene da luciferase (através do vetor lentiviral pMSCV_Luc2_T2A_Puro, que contém o gene puromicina N-acetiltransferase o qual confere resistência ao antibiótico puromicina), em seguida foram transplantadas subcutâneanente em camundongos NSG e monitoradas pelo aparelho IVIS Lumina System (Caliper LifeSciences) por 35 dias. Após este período a região do transplante foi retirada e congelada para análises histológicas e marcação por imunohistoquímica.

Células da FEV que não passaram por processo de cultivo também foram transplantadas.

I) Transferência do gene da luciferase para MSCs-TA humanas por transdução lentiviral

No procedimento é feita uma mistura contendo os meios específicos (EBM + EGF, EBM + FGF-2, EGM-2 e DMEM/F12), 1,5 mL de sobrenadante contendo vírions portadores do gene da luciferase (produzidos em nosso laboratório) e 5 µg/mL de polibreno (Sigma). Esta mistura foi então adicionada à placas de 100 mm, contendo as células cultivadas em cada meio respectivo. A mistura foi deixada nas células por 24 horas, após este período o meio foi trocado e foi adicionado seu respectivo meio de cultivo, sem conter a mistura. Em torno do terceiro dia após a troca de meio, foi adicionado 1 µg/mL de puromicina (Sigma), e as células foram expandidas neste meio seletivo eliminando as células que não apresentassem a integração do vetor. Após este período, as células passaram a ser chamadas de SVF EGF^{luc+}, SVF $FGF\text{-}2^{luc+}$, SVF $EGM\text{-}2^{luc+}$ e SVF $DMEM/F12^{luc+}$.

II) Modelo animal para infusão de MSCs in vivo

Para o ensaio *in vivo*, utilizamos uma densidade de 5.10^5 células em 300 µL de uma mistura de matrigel e PBS 1x na proporção 1:1. Tal mistura foi infundida subcutaneamente na região dorsal posterior de camundongos NSG (n=2-4 animais por grupo).

Após 35 dias de infusão, os animais foram mortos, a região do local da infusão foi retirada e analisada por PIBB *ex vivo*. Pedaços de pele foram utilizados como controle. Após o PIBB, os tecidos foram congelados para análises histológicas.

III) Processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB)

O PIBB foi realizado através do aparelho IVIS Lumina System (Caliper LifeSciences). Para o monitoramento foi sempre adicionado o substrato D-luciferina (Caliper LifeScience) que reage com a proteína luciferase, e as leituras da intensidade foram obtidas a partir de capturas de imagens que variaram de 10 segundos a 5 minutos dependendo da intensidade do sinal bioluminescente.

Para PIBB *in vivo*, os camundongos foram anestesiados com 2,5% de isolfurano (Forane, Laboratório Abbot) e infundidos com uma concentração de 150 mg/Kg de D-luciferina por via intraperitoneal. Após 15 minutos, os animais foram colocados no interior da câmara escura do IVIS e foram mantidos sob constante sedação em 1,5% de isoflurano, para a captura das imagens.

Para o PIBB *ex vivo*, no último dia da captura de imagens, os animais foram infundidos com 150 mg/Kg de D-luciferina, e após 15 minutos realizamos a captura de imagens. No dia seguinte, os animais foram mortos, e

as regiões que detectaram sinal bioluminescente foram removidas e colocadas em placas de cultivo contendo uma solução com 300 µg/mL de D-luciferina em PBS 1x, e foram submetidos à captura de imagens.

A quantificação da intensidade de bioluminescência foi realizada por meio da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do *software* Living Image 3.0. Através desta ferramenta, uma região de interesse foi desenhada em torno do sinal bioluminescente, cuja unidade da intensidade do sinal é medida pelo fluxo de fótons, expresso em fótons/s.

IV) Análise histológica e imunohistoquímica

Para analisar a estrutura formada nos camundongos, os tecidos foram incubados com solução fixadora Tissue-Tek (Sakura) e congeladas em acetona resfriada em gelo seco. Os materiais foram então cortados a uma espessura de 5 µm e foram submetidos a coloração com hematoxilina e eosina. Em seguida as lâminas foram analisadas em microscópio óptico convencional e fotografadas.

Para verificar a presença e localização das células humanas expressando luciferase nos tecidos retirados foi utilizada marcação por imunohistoquímica, pois esta técnica nos possibilita também uma melhor visualização das estruturas formadas. Para tanto foi utilizado o anticorpo primário anti-luciferase juntamente com o kit de marcação para imunohistoquímica HRP-Universal (Dako), de acordo com as instruções do fabricante.

3.5. Análises estatísticas

Os dados quantitativos estão expressos como média ± erro padrão. Para a comparação de médias foram utilizados os testes t de *Student* e análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Os gráficos foram

construídos por meio do software GraphPad 5.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. MSCs-TA cultivadas em EGM-2 apresentam maior potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico em comparação ao meio de cultivo convencional DMEM/F12

Para verificar se o meio de cultivo pró-angiogênico poderia influenciar na capacidade multipotencial de diferenciação, cultivamos MSCs-TA desde sua extração do tecido em meio EGM-2 e meio DMEM/F12, e induzimos tais células à diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro*.

Podemos observar uma maior quantidade de células com vesículas lipídicas coradas com *oil red* nas células que foram cultivadas no meio EGM-2 em comparação às células cultivadas no meio DMEM/F12 (Figura 2-A). A quantificação por absorbância da coloração com *oil red* confirmou estas observações. As MSCs-TA cultivadas em EGM-2 acumularam cerca de 7 vezes mais lipídios em relação às células mantidas em DMEM/F12 (Figuras 2-B e C).

Com relação à diferenciação osteogênica, as MSCs-TA cultivadas em EGM-2 apresentaram uma maior capacidade de sintetizar matriz extracelular calcificada do que as células mantidas em DMEM/F12, conforme demonstrado pela coloração com *alizarin red* (Figura 3-A). Estes dados foram confirmados após quantificação por absorbância do corante *alizarin red*, pois o valor da absorbância foi 13 vezes superior nas células cultivadas em EGM-2 em relação à DMEM/F12 (Figuras 3-B e C).

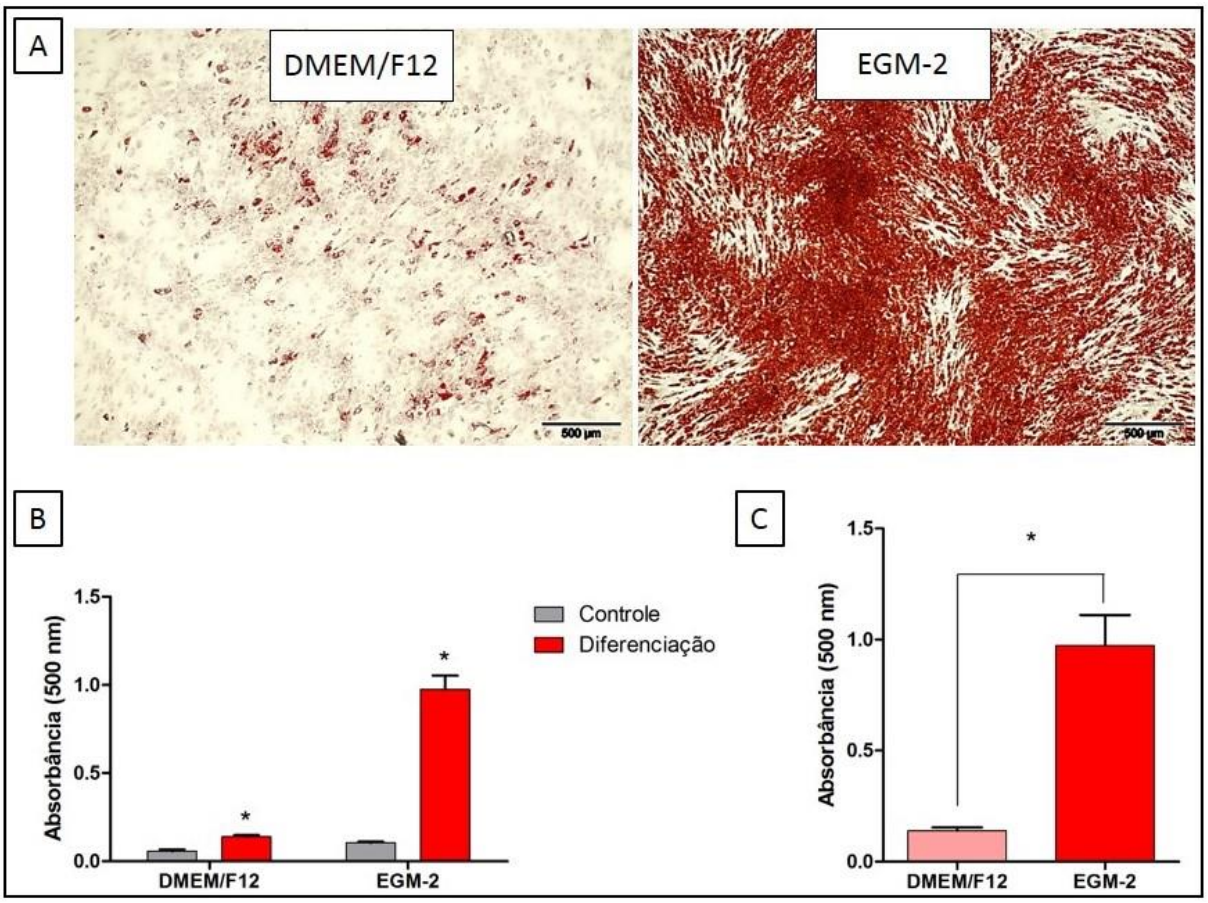


Figura 2: Potencial de diferenciação adipogênico entre MSCs-TA cultivadas em EGM-2 e DMEM/F12. A – Coloração com o corante *oil red*, após 15 dias de indução adipogênica; Absorbância: **B-** grupo controle *versus* grupo de diferenciação; **C-** diferenciação entre os grupos. Aumento de 40x. Teste estatístico t de *Student*. Valores de p: DMEM x controle *p<0,0027, EGM-2 x controle *p <0,0004; DMEM/F12 x EGM-2 *p< 0,0073. n= 3.

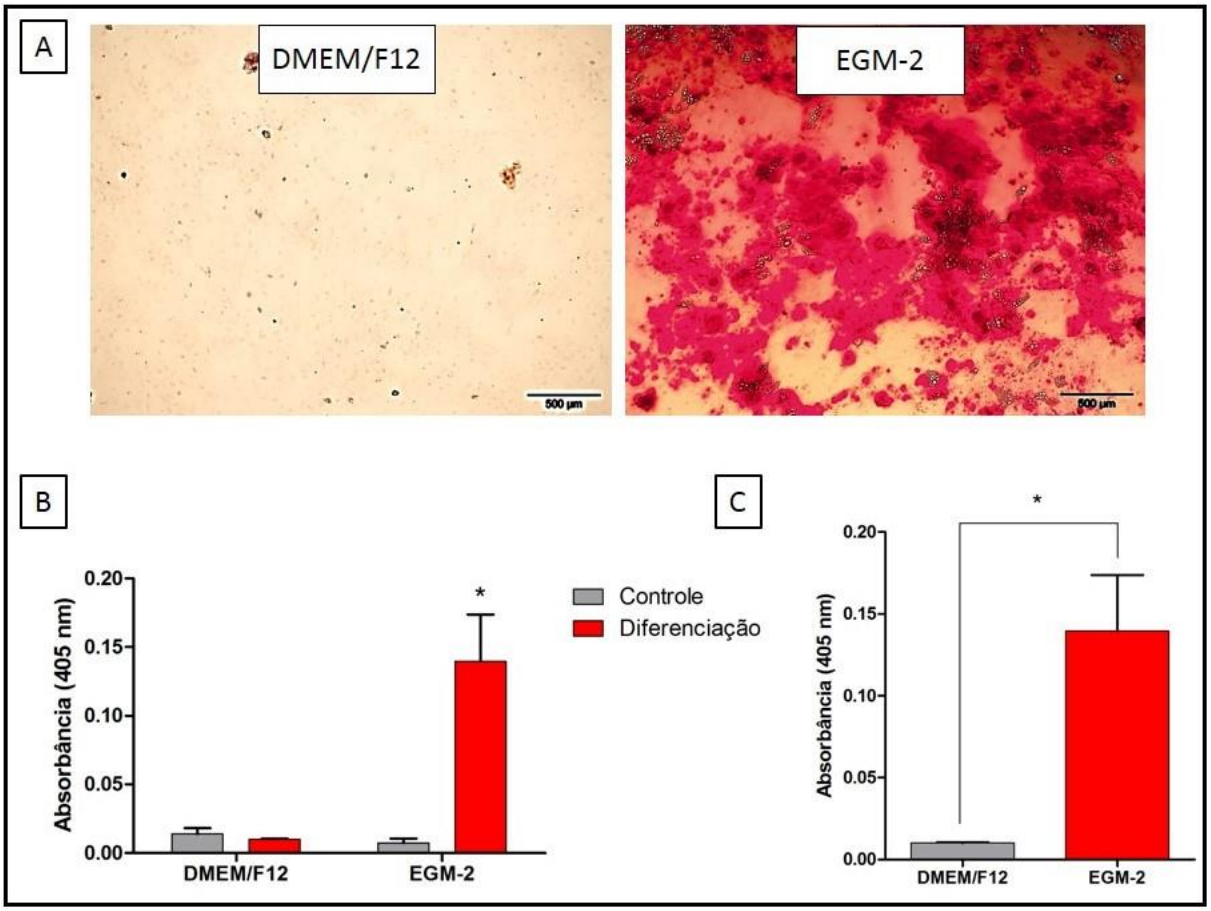


Figura 3: Potencial de diferenciação osteogênico entre MSCs-TA cultivadas em EGM-2 e DMEM/F12. A – Coloração com o corante *alizarin red*, após 30 dias de indução osteogênica; Absorbância: **B**- grupo controle *versus* grupo de diferenciação; **C**- diferenciação entre os grupos. Aumento de 40x. Teste estatístico t de *Student*. Valores de p: EGM-2 x controle: *p <0,0027; DMEM/F12 x EGM-2 *p< 0,0028. n= 3.

4.2. Fatores de crescimento pró-angiogênicos recuperam o potencial de diferenciação adipogênico das MSCs-TA previamente cultivadas em meio DMEM/F12

Para verificar se o alto potencial de diferenciação de MSCs-TA cultivadas em EGM-2 era proveniente da expansão de uma subpopulação celular já dotada com as referidas características, ou se esse resultado era devido a uma influência do meio EGM-2 na fisiologia celular da população total, transferimos MSCs-TA

previamente cultivadas em DMEM/F12 para o meio EGM-2 durante períodos curtos (3 dias ou 7 dias) e avaliamos seu potencial adipogênico e osteogênico.

MSCs-TA cultivadas previamente em meio DMEM/F12 apresentaram um aumento evidente em seu potencial adipogênico após serem incubadas em meio EGM-2 por 3 ou 7 dias (Figura 4-A, painel central superior). Este aumento da adipogênese foi corroborado pela quantificação do corante lipofílico *oil red*, que demonstrou um valor de absorbância 4,3 vezes superior em comparação ao das células mantidas em DMEM/F12 (Figuras 4-B e C).

A fim de avaliar se o meio DMEM/F12 diminui a capacidade multipotencial das MSCs-TA, também realizamos o experimento contrário. Cultivamos as células em meio EGM-2, desde seu isolamento do tecido adiposo, e trocamos o meio de cultivo para o meio DMEM/F12 por 3 ou 7 dias. Em seguida induzimos tais células à diferenciação adipogênica e osteogênica. Com isso, verificamos que esta transferência reduziu drasticamente a capacidade das MSCs-TA de formar vesículas lipídicas citoplasmáticas em relação às MSCs-TA que foram mantidas em meio EGM-2 durante todo o experimento (Figura 4-A, painéis inferiores esquerdo e central). Tal diminuição da capacidade adipogênica foi confirmada após a quantificação da incorporação do corante *oil red* (Figura 4-C), no qual podemos verificar que houve uma redução de 72% da absorbância do corante em comparação às células mantidas em EGM-2.

Além disso, os dados de absorbância demonstram que não houve diferença entre o potencial de diferenciação das MSCs-TA que foram incubadas durante 3 ou 7 dias nos respectivos meios substitutos (Figura 4-D).

Interessantemente, a incubação em EGM-2 recuperou apenas parcialmente (60%) o potencial adipogênico das MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/F12 (D/E) em comparação às MSCs-TA mantidas somente em EGM-2 (E/E), conforme a quantificação por absorbância (Figura 4-C, E/E vs. D/E).

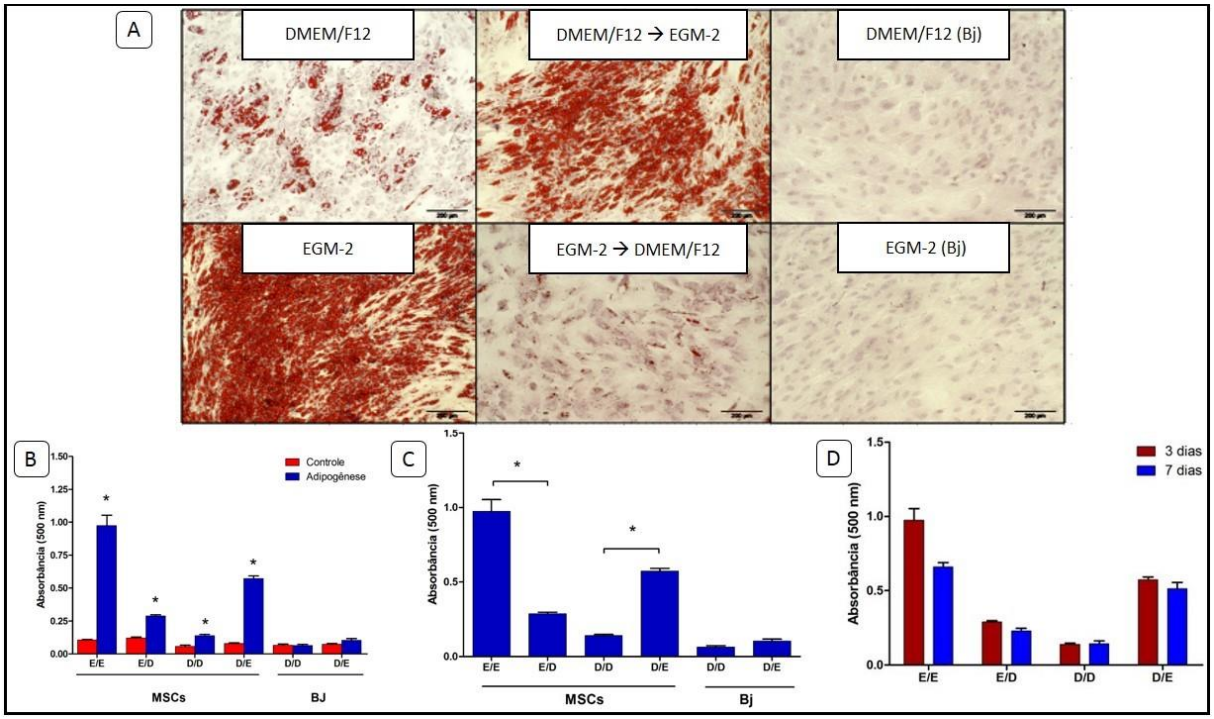


Figura 4: Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação adipogênico de MSCs-TA entre os meios de cultivo DMEM/F12 e EGM-2. A- Fotomicrografia de contraste de fase mostrando coloração com *oil red*: DMEM/F12 (D/D): mantidas em meio DMEM/F12; EGM-2 (E/E): mantidas em meio EGM-2; DMEM/F12 → EGM-2 (D/E): cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para EGM-2; EGM-2 → DMEM/F12 (E/D): cultivadas em meio EGM-2 e transferidas para DMEM/F12; Absorbâncias: **B-** grupo controle *versus* grupo diferenciação; **C-** comparação entre os grupos; **D-** comparação entre 3 e 7 dias. Aumento de 100x. Teste estatístico t de *Student*. Valores de p: E/E x E/D *p<0,001; D/D x D/E *p<0,0001. n= 3.

Com relação ao potencial de diferenciação osteogênico, apenas as MSCs-TA mantidas em EGM-2 foram capazes de se diferenciar. As células cultivadas inicialmente em meio DMEM/F12 quando transferidas para o meio EGM-2 (D/E) não foram capazes de produzir matriz extracelular calcificada quando induzidas à osteogênese (Figura 5-A, painel central inferior). Contudo, no processo contrário, células cultivadas inicialmente em EGM-2 que foram transferidas para o meio DMEM/F12 (E/D), perderam seu potencial de diferenciação osteogênico (Figura 5-A, painel central superior). Tal diminuição foi confirmada por quantificação do corante, pois houve uma redução de 93% da absorbância em comparação às

células mantidas apenas em EGM-2 (Figura 5-B, E/E vs. E/D). Tal como observamos para adipogênese não houve diferença no potencial de diferenciação osteogênico de MSCs-TA cultivadas por 3 ou 7 dias nas condições descritas (Figura 5-C).

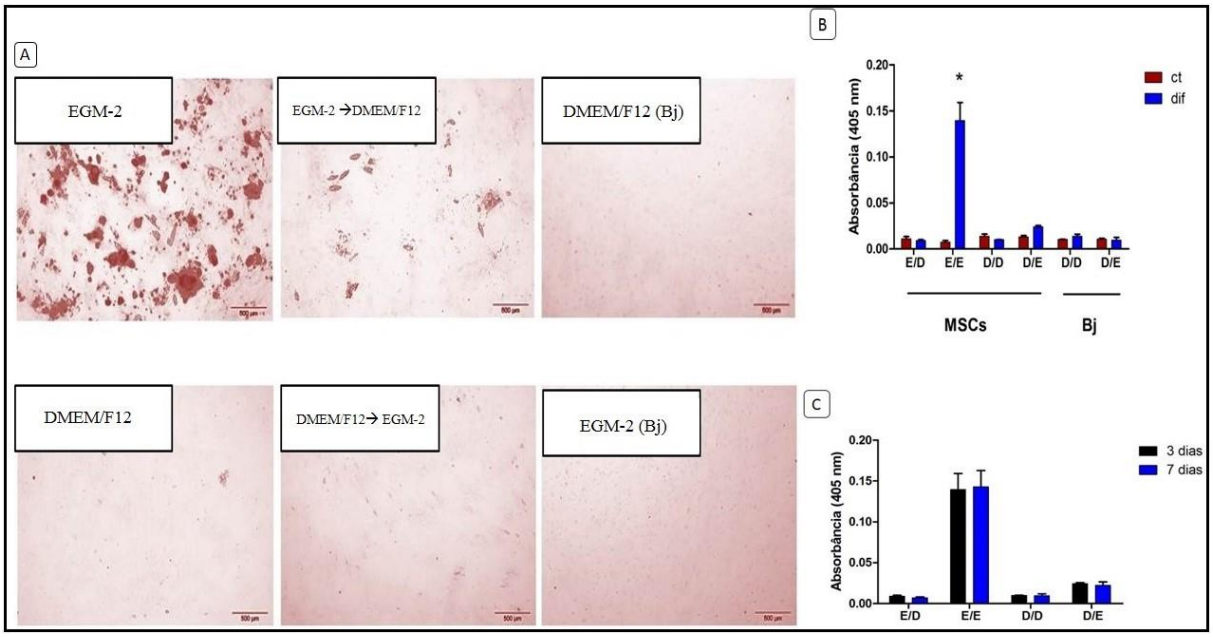


Figura 5: Ensaio de recuperação do potencial de diferenciação osteogênico de MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/F12 A-Fotomicrografia de contraste de fase demonstrando coloração com *alizarin red*: DMEM/F12 (D/D): mantidas em meio DMEM/F12; EGM-2 (E/E): mantidas em meio EGM-2; DMEM/F12 → EGM-2 (D/E): cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para EGM-2; EGM-2 → DMEM/F12 (E/D): cultivadas em meio EGM-2 e transferidas para DMEM/F12; Absorbâncias: **B**- grupo controle *versus* grupo diferenciação; **C**- comparação entre 3 e 7 dias. Aumento de 100x. Teste estatístico t de *Student*. Valor de p entre E/E x D/D *p<0,0028. n= 3.

Em seguida, avaliamos qual ou quais fatores de crescimento presentes no meio pró-angiogênico seriam responsáveis pela recuperação da capacidade de diferenciação adipogênica causada pela transferência das MSCs-TA cultivadas em meio DMEM/F12 para o meio EGM-2.

Para tanto cultivamos inicialmente as MSCs-TA em meio DMEM/F12 e as incubamos durante 3 dias em alíquotas de meio EBM suplementadas separadamente com cada um dos quatro fatores de crescimento que compõe o meio EGM-2 (a saber, EGF, FGF-2, IGF e VEGF). Dentre estes grupos, MSCs-TA transferidas para meio EBM + EGF e EBM + FGF-2 foram capazes de recuperar o potencial adipogênico das células cultivadas previamente em DMEM/F12, de maneira similar àquelas que foram transferidas para o meio EGM-2 (Figura 6-A, painéis superiores). Estas observações foram confirmadas pela quantificação do corante, pois os grupos apresentaram absorbância 3,8 vezes superior, em EGM-2, 4,6 vezes superior, em EBM + EGF, e 3,7 vezes superior, em EBM + FGF-2, em comparação às células mantidas em DMEM/F12 (Figura 6)

Em paralelo, também avaliamos o efeito de cada um dos fatores de crescimento na recuperação do potencial de diferenciação osteogênico. Nenhum dos fatores de crescimento foi capaz de recuperar ou aumentar o potencial de diferenciação osteogênico (Figura 7-A). Estas observações foram confirmadas por quantificação do corante, sendo que apenas as células mantidas exclusivamente em EGM-2, foram capazes de acumular matriz extracelular calcificada (Figura 7-B).

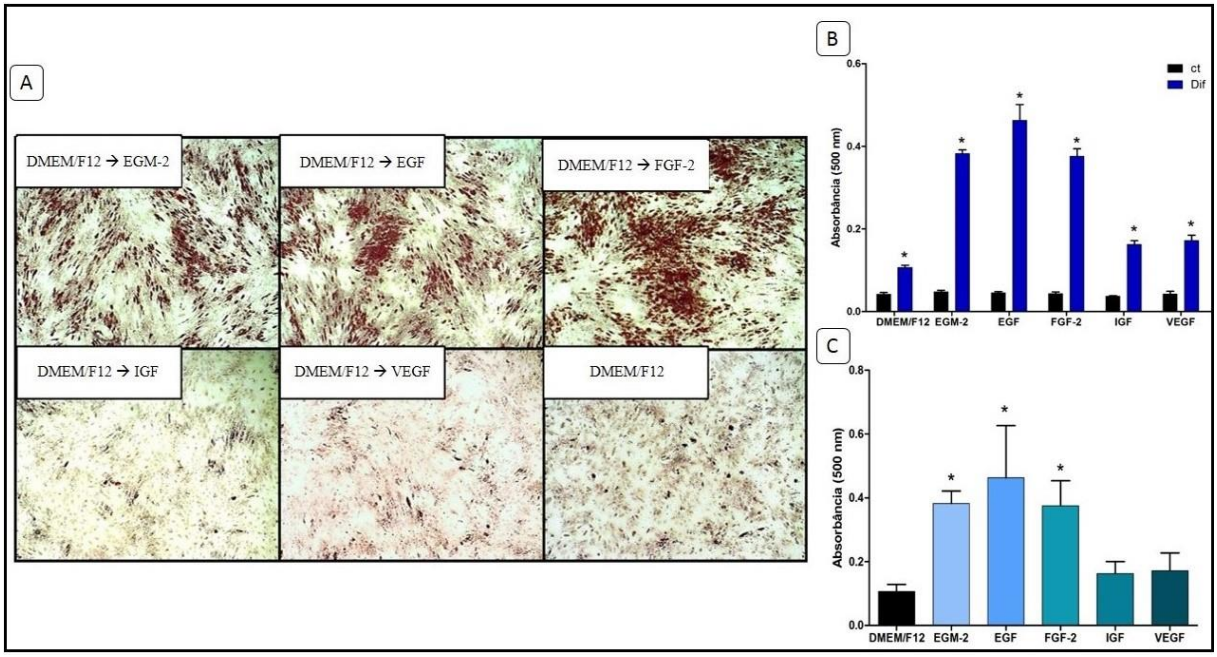


Figura 6: Papel dos fatores pró-angiogênicos na recuperação do potencial de diferenciação adipogênico de MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/12. A- Fotomicrografia de contraste de fase mostrando coloração com *oil red*: DMEM/F12 → EGM-2: cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para meio EGM-2 (D/EGM-2); DMEM/F12 → EGF: cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para meio EBM + EGF (D/EGF); DMEM/F12 → FGF-2: cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para meio EBM + FGF-2 (D/FGF-2); DMEM/F12 → IGF: cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para meio EBM + IGF (D/IGF); DMEM/F12 → VEGF: cultivadas em meio DMEM/F12 e transferidas para meio EBM + VEGF (D/VEGF); DMEM/F12: mantidas em meio DMEM/F12; Absorbâncias: **B**- grupos controle *versus* grupos diferenciação; **C**- comparação entre os grupos. Teste estatístico ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *p<0,0001. n= 3.

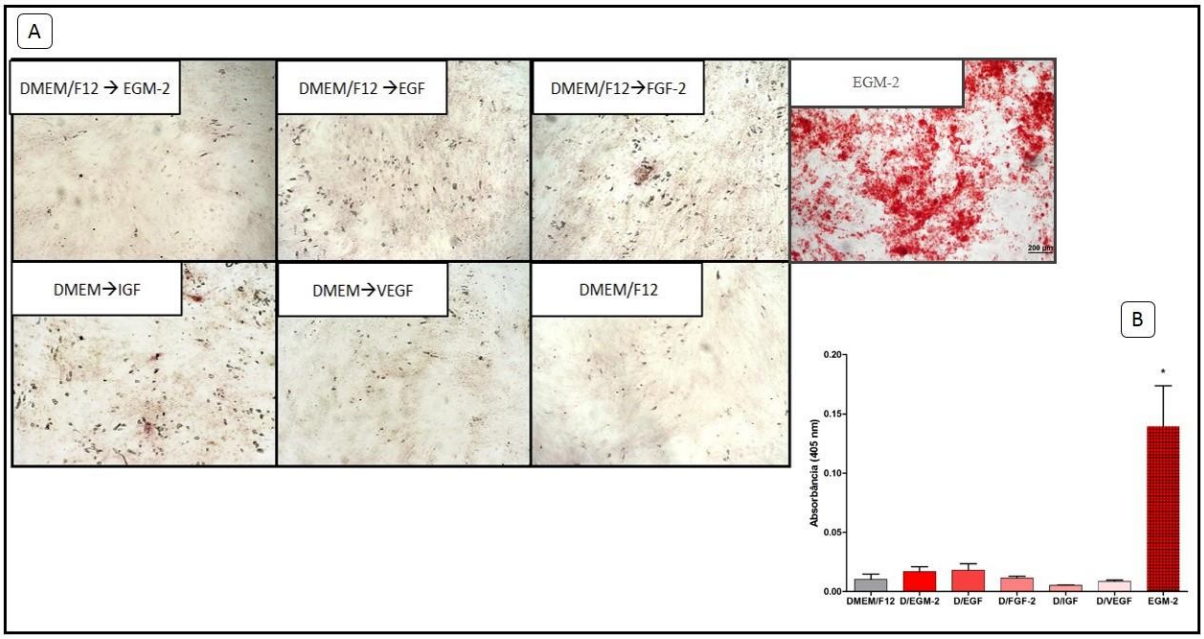


Figura 7: Papel dos fatores pró-angiogênicos na recuperação do potencial de diferenciação osteogênico de MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/12. A – Fotomicrografia de contraste de fase mostrando coloração com *alizarin red*: DMEM/F12 → EGM-2: cultivadas em meio DMEM/F12 seguido de EGM-2 (D/EGM-2); DMEM/F12 → EGF: cultivadas em meio DMEM/F12 seguido de meio EBM + EGF (D/EGF); DMEM/F12 → FGF-2: cultivadas em meio DMEM/F12 seguido de meio EBM + FGF-2 (D/FGF-2); DMEM/F12 → IGF: cultivadas em meio DMEM/F12 seguido de meio EBM + IGF (D/IGF); DMEM/F12 → VEGF: cultivadas em meio DMEM/F12 seguido de meio EBM + VEGF (D/VEGF); DMEM/F12: cultivadas somente em meio DMEM/F12; EGM-2: cultivadas somente em meio EGM-2. Absorbâncias: **B-** comparação entre os grupos. Teste estatístico ANOVA *one way*, seguido pelo pós-teste Bonferroni. *p<0,0001. n= 3.

4.3. Efeito dos fatores de crescimento angiogênicos nas características de MSCs-TA *in vitro*

As células extraídas do tecido adiposo e cultivadas nas diferentes condições listadas no item 2.3 foram capazes de aderir ao plástico em 24 horas e, durante a primeira semana de cultivo, observou-se a predominância de células com a morfologia característica de células mesenquimais. Assim, em quaisquer das

condições de cultivo utilizadas, obtivemos rapidamente culturas morfologicamente homogêneas, indicando a ausência de outros tipos celulares contaminantes e também aderentes como macrófagos e células endoteliais. (Figura 8).

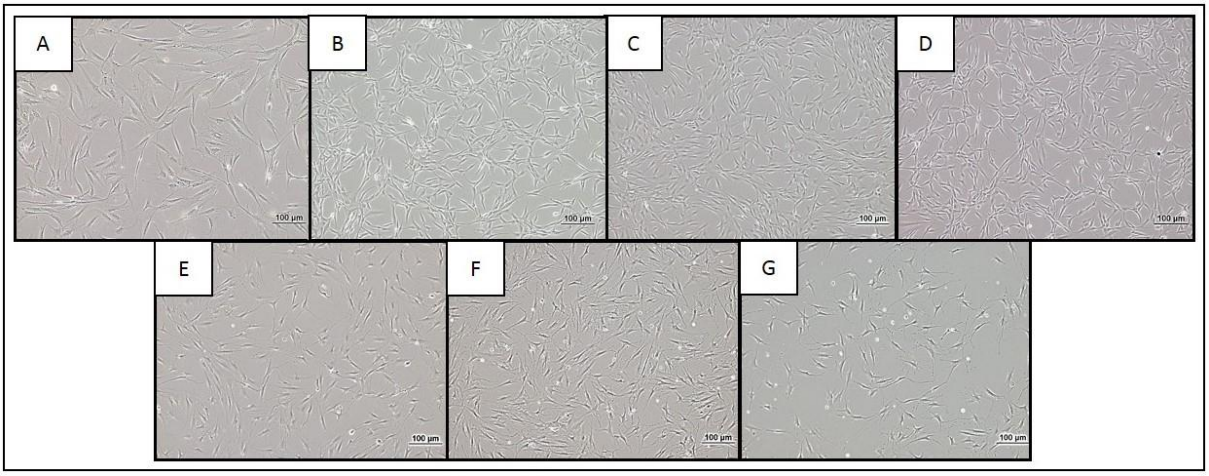


Figura 8: **Fotomicrografia de contraste de fase de MSCs-TA nas diferentes condições de cultivo. A –** cultivo em meio DMEM/F12**; B-** cultivo em meio EGM-2**; C –** cultivo em meio EBM + EGF**; D –** cultivo em meio EBM + FGF-2; **E –** cultivo em meio EBM + IGF; **F-** cultivo em meio EBM + VEGF; **G –** cultivo em meio EBM. Aumento de 100x.

4.4. Análise morfológica:

Postula-se que mudanças morfológicas estejam associadas a diversas características e funções biológicas como migração, estresse e senescência. Desse modo, avaliamos o efeito dos diferentes meios e fatores angiogênicos na morfologia e na organização do citoesqueleto de actina das MSCs-TA.

4.4.1. Os fatores de crescimento EGF e FGF-2 induzem a aquisição de uma morfologia fusiforme nas MSCs-TA in vitro

Na figura 9 (A-G) podemos observar que houveram diferenças morfológicas entre as células cultivadas nas diferentes condições. Tais alterações começaram a aparecer em torno do quinto dia de cultura, após o isolamento das células, e tornaram-se mais evidentes ao longo do cultivo.

As MSCs-TA cultivadas em meio EBM + EGF e EBM + FGF-2 (Figuras 9-C e D) apresentaram morfologia semelhante entre si, e com as células cultivadas em meio EGM-2 (Figura 9-B). Nestas condições as MSCsTA apresentaram uma morfologia fusiforme e fibroblastóide característica de células mesenquimais.

Interessantemente, células cultivadas nos meios EBM + IGF e EBM + VEGF também apresentaram morfologia semelhante entre si, mas distinta da morfologia observada nas células cultivadas em EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2. As MSCs-TA mantidas em EBM + IGF e EBM + VEGF apresentaram prolongamentos citoplasmáticos finos e alongados, resultando em uma morfologia estrelada, que foi semelhante à morfologia observada em células cultivadas em EBM sem a suplementação com qualquer citocina (Figuras 9-E, F e G).

Já as MSCs cultivadas em meio DMEM/F12, apresentaram uma morfologia distinta daquelas cultivadas nas condições descritas anteriormente. Neste caso, as MSCs-TA adquiriram uma morfologia poligonal, larga e achatada, sendo possível detectar estriações citoplasmáticas características das fibras de estresse (Figura 9-A).

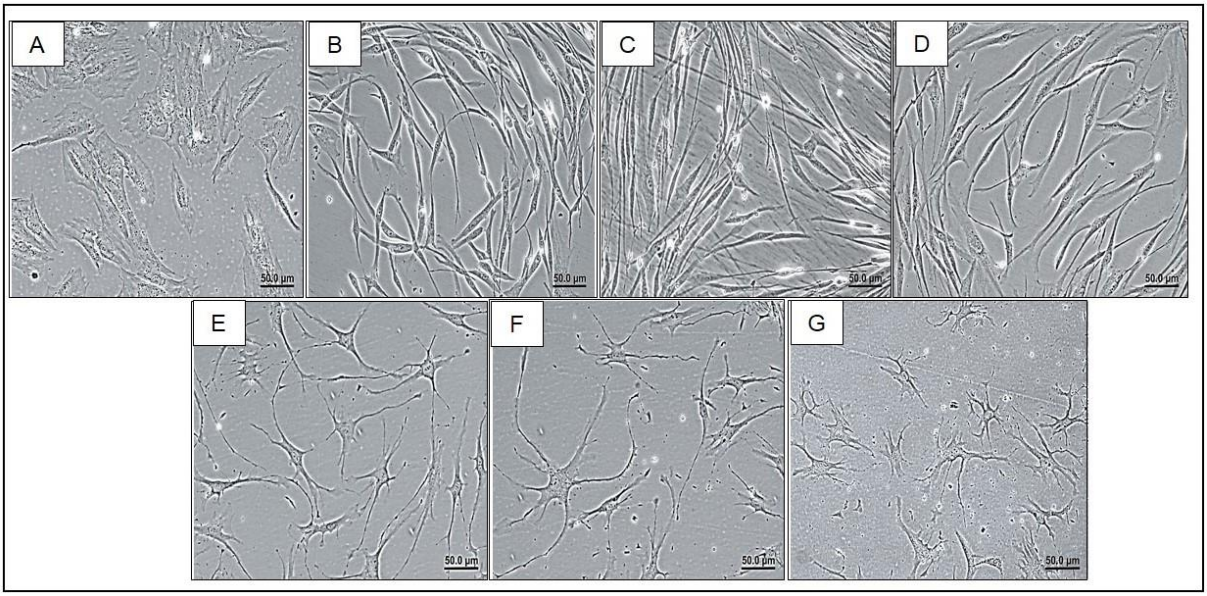


Figura 9: Fotomicrografia de contraste de fase mostrando as diferenças morfológicas em MSCs-TA cultivadas nos diferentes meios. A – cultivo em meio DMEM/F12; **B-** cultivo em meio EGM-2; **C** – cultivo em meio EBM + EGF; **D** – cultivo em meio EBM + FGF-2; **E** – cultivo em meio EBM + IGF; **F-** cultivo em meio EBM + VEGF; **G-** cultivo em meio EBM. Aumento de 200x.

4.4.2. Organização dos filamentos de actina

Devido às alterações morfológicas serem decorrentes da reorganização do citoesqueleto, avaliamos a distribuição dos filamentos de actina nas MSCs-TA cultivadas nas distintas condições. Após marcação com faloidina, observamos que os filamentos de actina nas MSCs-TA cultivadas em DMEM/F12 organizavam-se em feixes mais espessos, enquanto nos demais cultivos os filamentos de actina mostraram-se mais delgados e distribuídos de modo uniforme no citoplasma (Figura 10).

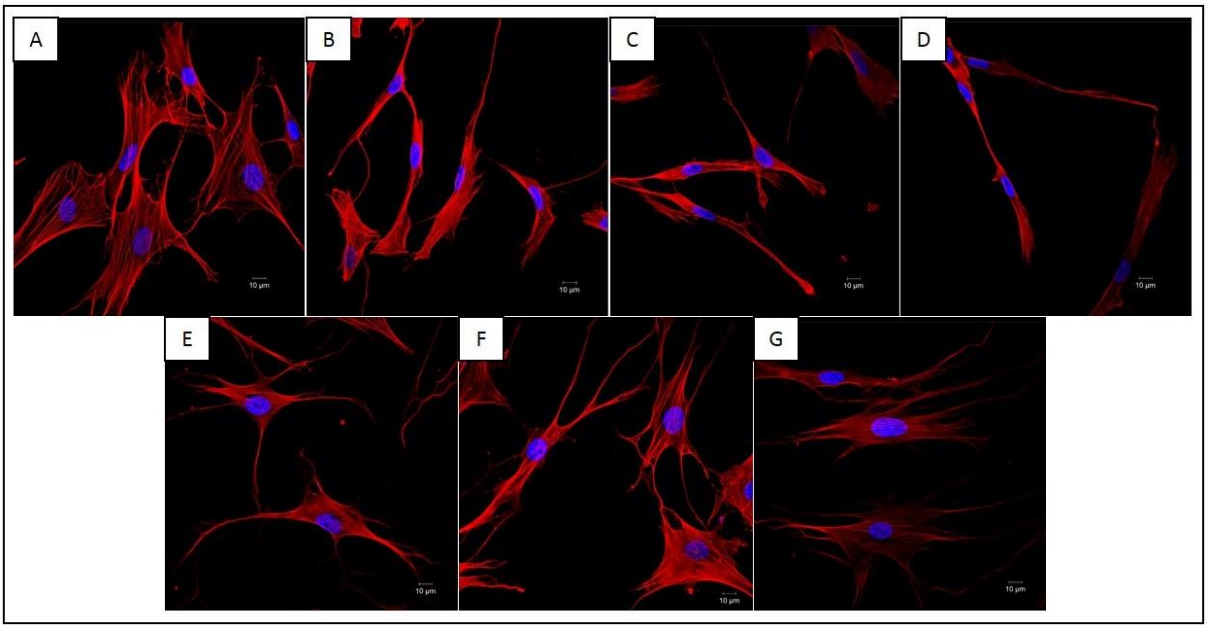


Figura 10. Fotomicrografia de contraste de fase mostrando as diferenças na organização dos filamentos de actina em MSCs-TA cultivadas nos diferentes meios. A – cultivo em meio DMEM/F12; **B**- cultivo em meio EGM-2; **C** – cultivo em meio EBM + EGF; **D** – cultivo em meio EBM + FGF-2; **E** – cultivo em meio EBM + IGF; **F**- cultivo em meio EBM + VEGF; **G**- cultivo em meio EBM. Aumento de 600x.

4.5. Fatores de crescimento pró-angiogênicos não alteram o perfil de expressão de marcadores de superfície em MSCs-TA

Em seguida, avaliamos se o cultivo na presença dos fatores de crescimento pró-angiogênicos alteravam a expressão de marcadores de superfície celular comumente utilizados para caracterizar as MSCs. Para tanto, MSCs-TA cultivadas durante 3 passagens em cada uma das condições de cultivo foram submetidas à marcação com anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície e analisadas por citometria de fluxo.

Os resultados demonstram que as células cultivadas nos diferentes meios possuem um perfil de marcadores de superfície característico de MSCs, e que foi

semelhante entre os grupos, com exceção de uma pequena diferença na expressão de CD146 e CD34 em células cultivadas em DMEM/F12 em comparação às outras condições de cultivo. Sendo assim, MSCs-TA cultivadas em todas as condições demonstraram alta porcentagem de células positivas para os marcadores CD140a e NG2; baixa porcentagem de células para os marcadores CD117, CD146, CD271 e CD34, marcadores utilizados para identificar células-tronco mesenquimais (Figura 11), alta porcentagem de células positivas para os marcadores CD44, CD90, CD73 e CD105, característicos de células mesenquimais, e ausência de expressão de marcadores específicos de células hematopoiéticas e endoteliais como CD45 e CD31, respectivamente (Apêndice I).

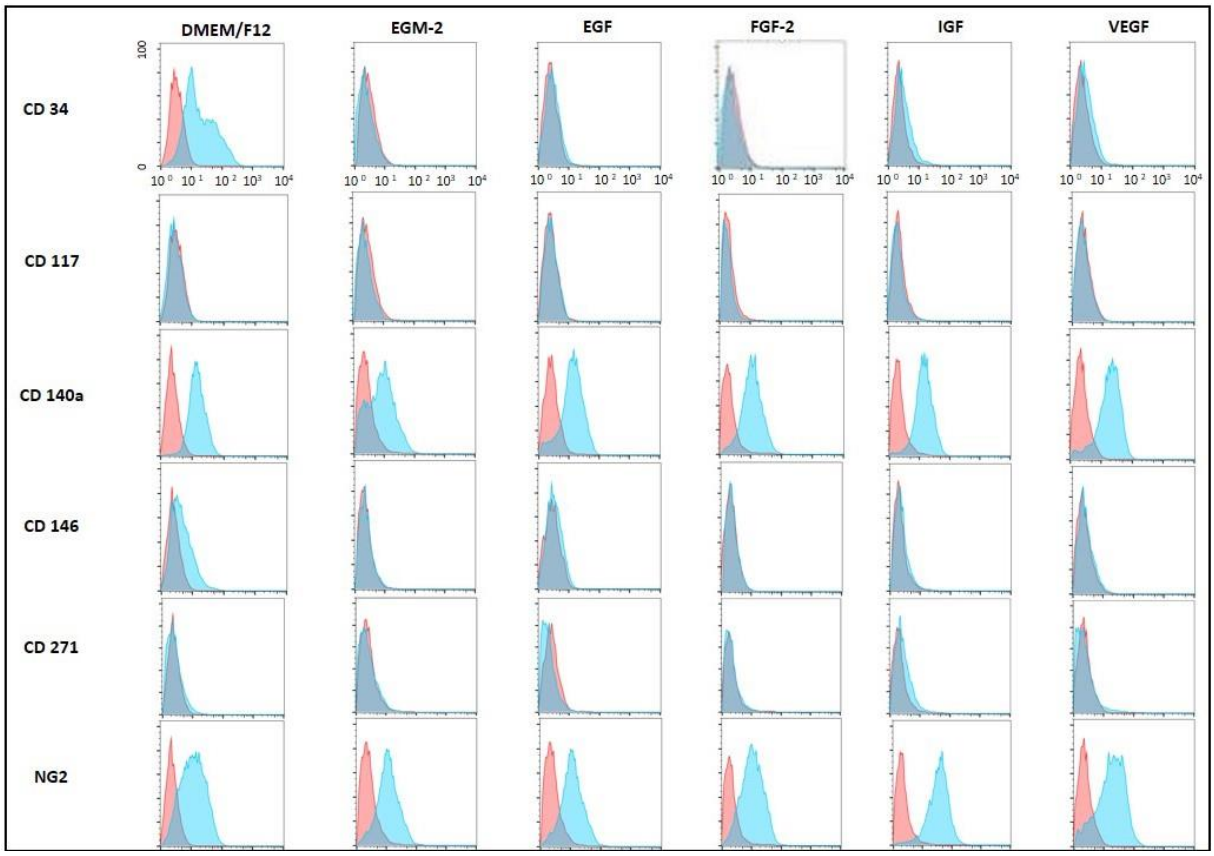


Figura 11. Painel do perfil imunofenotípico de MSCs-TA na terceira passagem. Os gráficos demonstram que não houve alteração do perfil imunofenotípico nas diferentes condições, para os marcadores CD140a, NG2, CD117 e CD271.

4.6. EGF e FGF-2 mantêm MSCs-TA com alto potencial de diferenciação em cultura

A fim de comparar a capacidade multipotencial de diferenciação das MSCs-TA cultivadas nas diferentes condições, desde seu isolamento, as mesmas foram induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica na terceira passagem.

Após o período de indução adipogênica observamos claramente que as células cultivadas em meio DMEM/F12 e meio EBM, apresentaram menor capacidade de diferenciação adipogênica em comparação às células cultivadas em EGM-2 e meio EBM na presença dos fatores de crescimento adicionados isoladamente (Figura 12-A). Além disso, dentre as citocinas, as MSCs-TA cultivadas na presença de EGF e FGF-2 apresentaram um maior potencial de diferenciação evidenciadas pela maior quantidade de células com acúmulo de vesículas lipídicas no citoplasma, em relação às demais citocinas (Figura 12, imagens III e IV).

A quantificação por absorbância da coloração corroborou estas observações, pois a incorporação do corante *oil red* nas MSCs-TA cultivadas em EGM-2 ou EBM suplementado com as citocinas isoladas foi em média 5,5 vezes superior em relação às células cultivadas em DMEM/F12 e 3,9 vezes superior em relação às células cultivadas em EBM (Figura 12-B). MSCs-TA cultivadas em EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2 apresentaram uma média de absorbância do corante 1,5 vezes superior às células cultivadas nas citocinas IGF e VEGF. Somado a isto, não houve diferença da absorbância do corante entre os cultivos realizados em meio EBM e DMEM/F12.

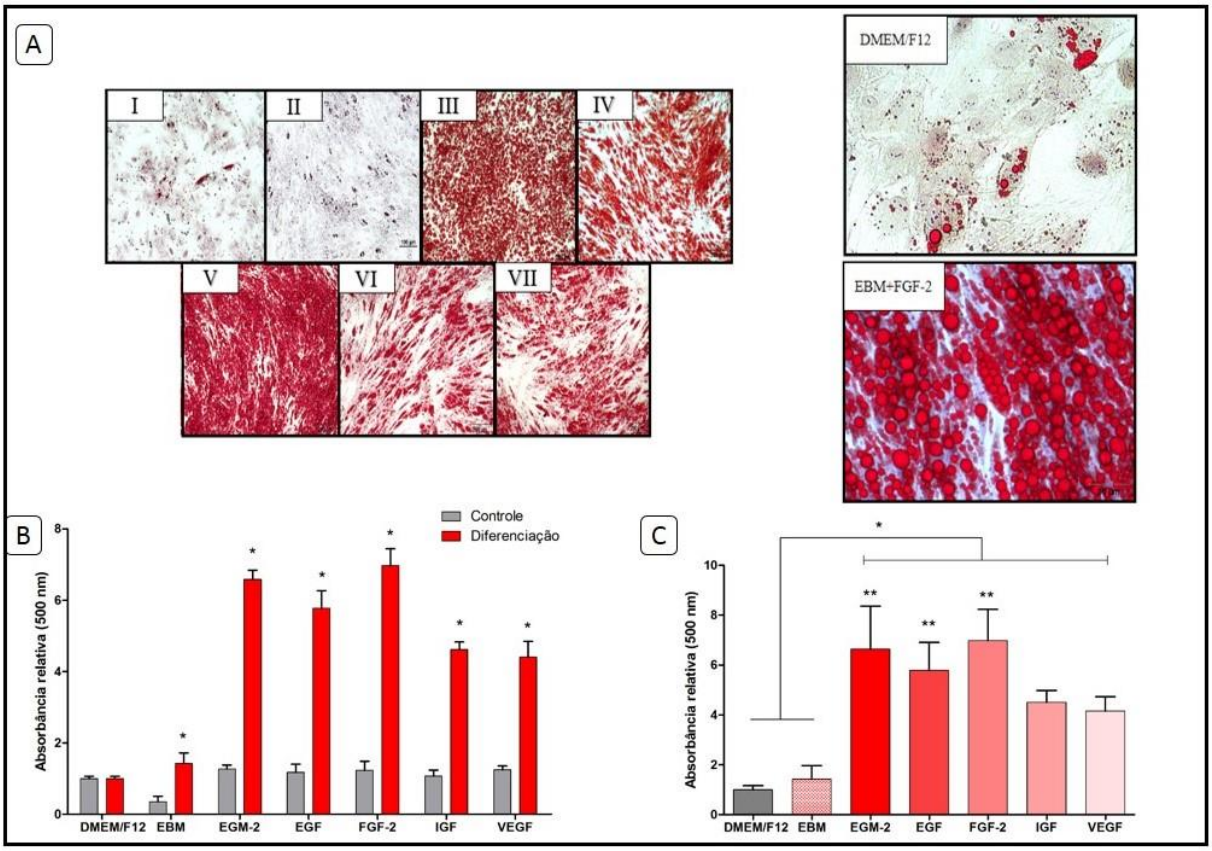


Figura 12. Fotomicrografia de contraste de fase e gráficos de absorbância mostrando o potencial de diferenciação adipogênico de MSCs-TA cultivadas nas diferentes condições. Nas imagens da figura **A**, à esquerda, podemos visualizar os cultivos em que as células apresentaram menor e maior potencial de diferenciação. Imagem **I** – cultivo em meio DMEM/F12; **II**- cultivo em meio EBM; **III** – cultivo em meio EGM-2; **IV** – cultivo em meio EBM + EGF; **V** – cultivo em meio EBM + FGF-2; **VI** - cultivo em meio EBM + IGF; **VII** - cultivo em meio EBM + VEGF. Aumento de 100x. Em seguida, ainda na figura **A**, à direita, imagens de células que foram cultivadas nos meios DMEM/F12 e EBM + FGF-2, mostrando o acúmulo de vesículas lipídicas coradas com *oil red*. Aumento de 400x. Na figura **B**, podemos visualizar a absorbância do corante em comparação aos respectivos controles; e na figura **C**, a intensidade da absorbância relativa à DMEM/F12. Teste estatístico t de *Students* entre os grupos com seus respectivos controles; Teste ANOVA *one way* seguido do pós-teste Bonferroni, entre os grupos. *, em relação à DMEM/F12 e EBM; **, em relação à IGF e VEGF. Valores de p do teste ANOVA: *p<0,0001, n=3.

Com relação à osteogênese, MSCs-TA cultivadas com as citocinas pró-angiogênicas (isoladas ou juntas, compondo o meio EGM-2) apresentaram um potencial de diferenciação 4,6 vezes superior em relação às MSCs-TA cultivadas em DMEM/F12 e EBM, evidenciado pela presença de matriz extracelular calcificada naqueles grupos (Figura 13).

Contudo, ao contrário do que observamos na adipogênese, as citocinas isoladas ou combinadas tiveram o mesmo efeito no aumento do potencial osteogênico, conforme verificado após a quantificação do corante *alizarin red* (Figura 13-B e C).

As imagens apresentadas nas figuras 12 e 13 representam as colorações de MSCs-TA oriundas de um tecido representativo, enquanto os gráficos ilustram a quantificação da coloração obtida de três amostras de tecidos independentes. As colorações adipogênicas e osteogênicas dos três tecidos podem ser visualizadas no apêndice II.

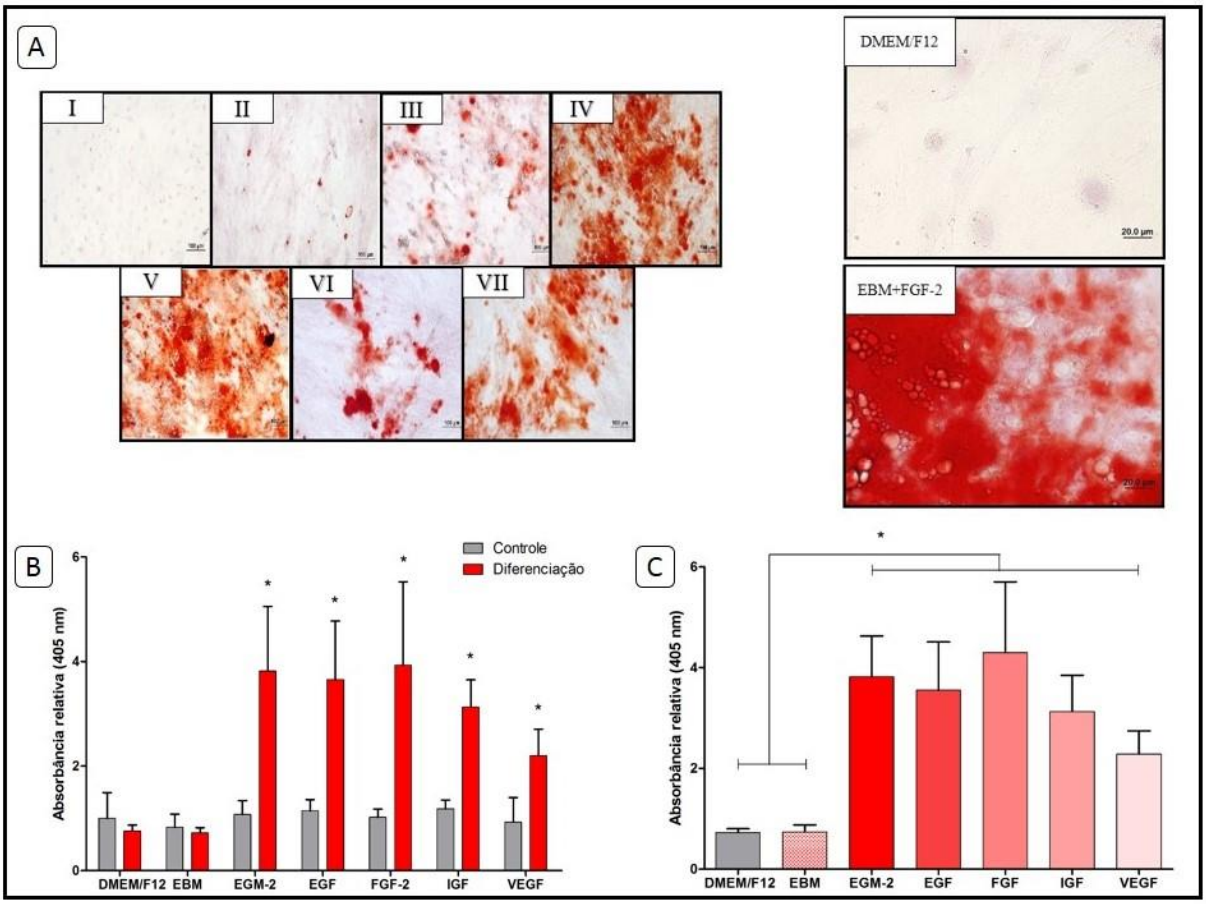


Figura 13: Fotomicrografia de contraste de fase e gráficos de absorbância mostrando o potencial de diferenciação osteogênico de MSCs-TA cultivadas nas diferentes condições. Nas imagens da figura **A**, à esquerda, estão as colorações após indução osteogênica. Imagem **I** – cultivo em meio DMEM/F12; **II**- cultivo em meio EBM; **III** – cultivo em meio EGM-2; **IV** – cultivo em meio EBM + EGF; **V** – cultivo em meio EBM + FGF-2; **VI** - cultivo em meio EBM + IGF; **VII** - cultivo em meio EBM + VEGF. Aumento de 100x. Em seguida, ainda na figura **A**, à direita, imagens de células que foram cultivadas nos meios DMEM/F12 e EBM + FGF-2, evidenciando matriz óssea corada com *alizarin red*. Aumento de 400x. Figura **B** - absorbância do corante em relação aos respectivos controles; Figura **C**- intensidade da absorbância relativo à DMEM/F12. Teste estatístico t de *Student* *, $p<0.01$. n=3.

4.7. Fatores de crescimento pró-angiogênicos aumentam a capacidade de autorrenovação das MSCs-TA *in vitro*

Para medir a capacidade de autorrenovação realizamos o ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) com MSCs-TA mantidas nas diferentes condições de cultivo desde seu plaqueamento após a extração do tecido (passagem 0, ou p0) (Figura 14) e em cada uma das três passagens subsequentes (p1,p2 e p3) até a terceira passagem (Figura 15).

Na p0, as MSCs-TA cultivadas em todas as condições contendo citocinas, com exceção do cultivo em EBM + VEGF, apresentaram frequência de colônias superior em relação ao cultivo em DMEM/F12, o qual apresentou uma frequência clonogênica de apenas 0,15%. Verificamos um aumento de formação de colônias de 11x em MSCs-TA mantidas em EBM, 14x em EGM-2, 13x em EBM + EGF, 11x em EBM + FGF-2 e 7x em EBM + IGF, comparados ao DMEM/F12 (Figura 15).

Interessantemente a primeira passagem (p1) foi a fase da cultura celular que apresentou maior número de CFU-F em quase todos os grupos, com exceção das MSCs-TA cultivadas em EBM + IGF e EBM + VEGF. Comparado à frequência de CFU-Fs entre a p0 e p1 respectiva de cada grupo, houve um aumento da frequência de colônias em todos os grupos que foi de aproximadamente 38x em DMEM/F12, 4x em EBM, 14x em EGM-2, 14x em EGF, 37x em FGF-2, 13x em IGF, e 30x em VEGF.

Em comparação ao DMEM/F12, na passagem p1, apenas os grupos EGM-2, EGF e FGF-2, apresentaram aumento na frequência de colônias sendo de 5x em EGM-2 e EGF, e 10x em FGF-2.

A partir da segunda passagem (p2), podemos verificar que em relação à p1 houve uma diminuição na frequência de formação de colônias nos grupos DMEM/F12, EBM, EGM-2, EGF e FGF-2, que foi de aproximadamente 75% em DMEM/F12, 59% em EBM, 63% em EGM-2, 45% em EGF, 70% em FGF-2.

A frequência de colônias foi mantida entre a p2 e a p3, onde todos os grupos contendo fatores de crescimento pró-angiogênicos apresentaram frequência de colônias em média 10 vezes superior em relação à frequência de células cultivadas em DMEM/F12 e 5,6 vezes superior em relação à EBM ausente de citocinas. Com exceção da p0, não houve diferença entre a frequência de colônias entre DMEM/F12 e EBM.

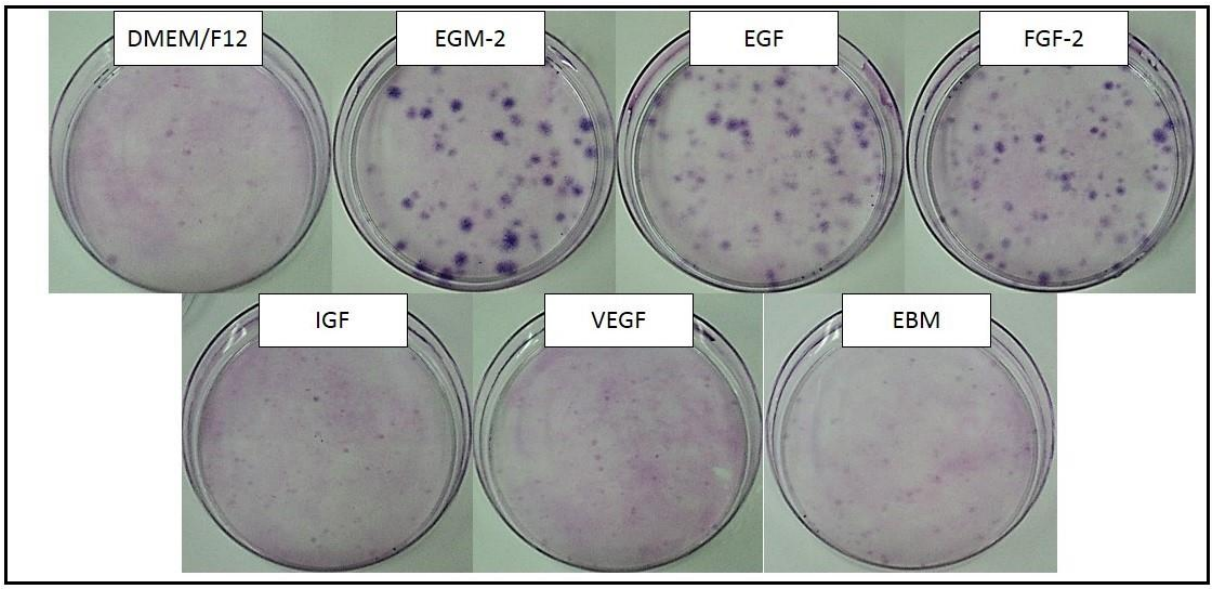


Figura 14. Imagem ilustrando a formação de colônias fibroblastóides entre os diferentes cultivos na p0. Nas figuras podemos verificar que células cultivadas em EGM-2, EGF e FGF-2, apresentaram maior potencial de formar CFU-Fs, comparado aos outros cultivos. Coloração: Leishmann.

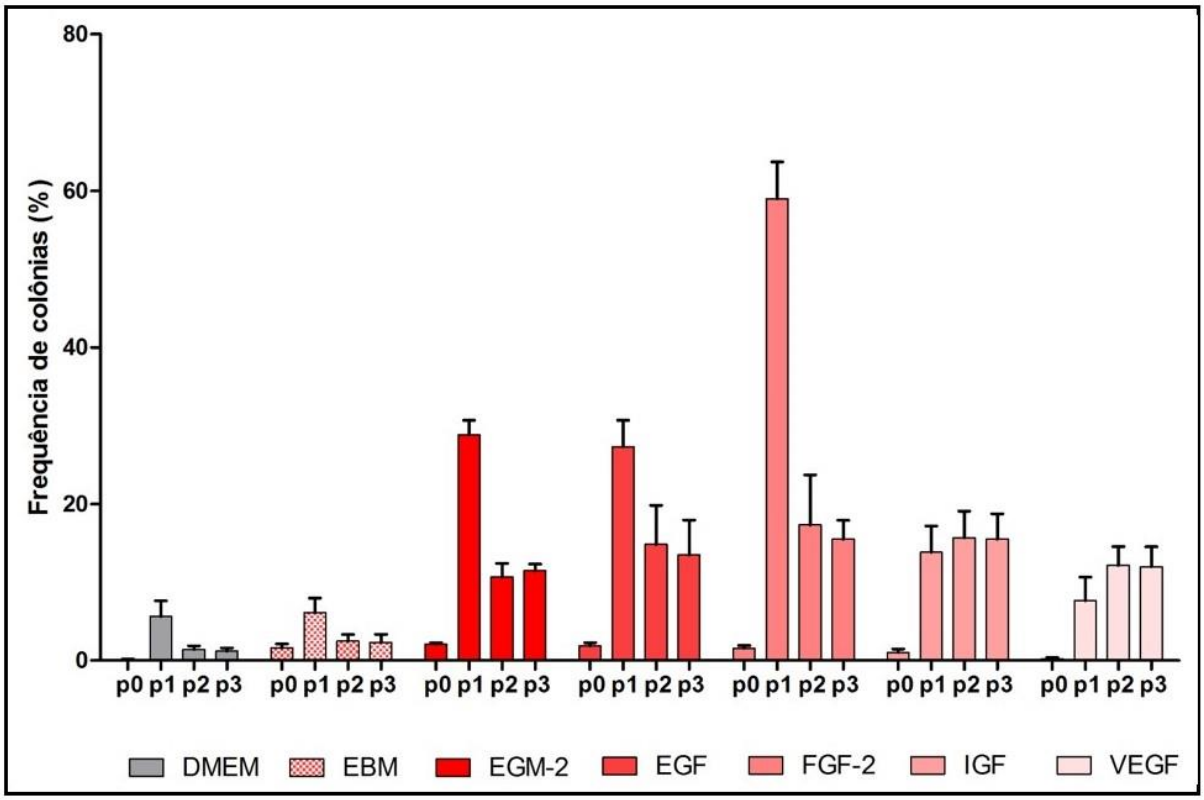


Figura 15: Frequência da formação de colônias fibroblastóides das MSCs-TA nos diferentes cultivos, ao longo de 3 passagens. p0- sem passagem; p1- primeira passagem; p2- segunda passagem e p3- terceira passagem. n=3.

4.8. Os fatores de crescimento EGF e FGF-2 aceleram a proliferação das MSCs-TA *in vitro*

A fim de verificar se os fatores pró-angiogênicos influenciam na proliferação de MSCs-TA, quantificamos tanto o número de duplicações quanto os tempos de duplicação celular durante o cultivo nas diferentes condições.

Podemos verificar que as células cultivadas em EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2 foram as que apresentaram maior número de gerações acumuladas em menos tempo, comparado aos outros grupos (Figura 16-A).

A partir dos dados sobre o número de gerações acumuladas pelo tempo de cultivo, calculamos o tempo de duplicação das MSCs-TA cultivadas nas diferentes condições (Figura 16-B). De acordo com os nossos resultados, todos os grupos, inclusive as células cultivadas em EBM, apresentaram tempo de duplicação em média, 42% inferior ao das células cultivadas em DMEM/F12. Dentre as citocinas, as células cultivadas em EBM + FGF-2, apresentaram uma redução de 37% do tempo de duplicação em comparação às células cultivadas em EBM.

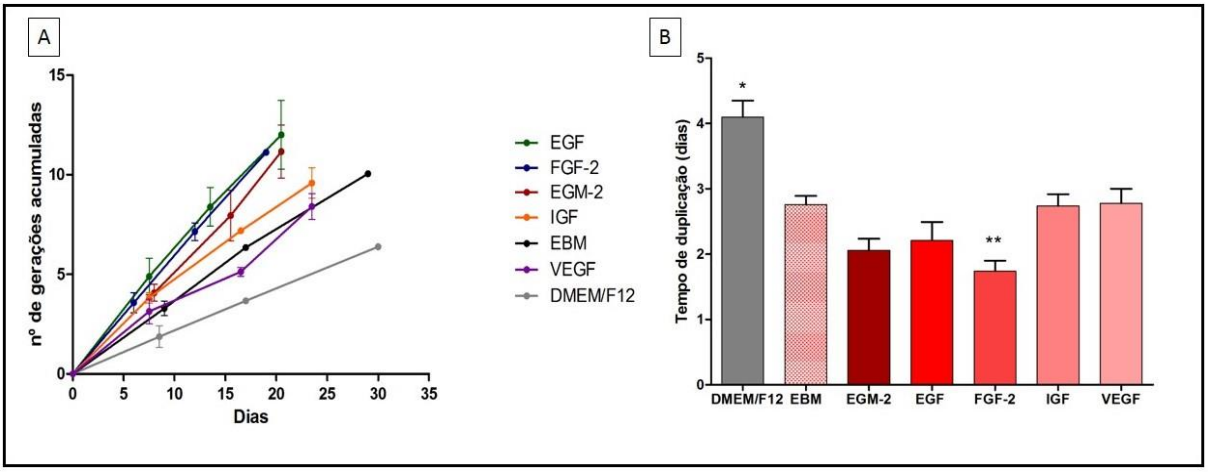


Figura 16. Avaliação da proliferação *in vitro* das MSCs-TA. A- Número acumulado de gerações por dias; **B-** Tempo de duplicação por dias. Teste estatístico ANOVA *one way* seguido do pós-teste Bonferroni. *DMEM/F12 em relação aos demais grupos, e **FGF-2 em relação à EBM. $p<0.0001$. n=3.

4.9. Meios pró-angiogênicos EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2 aumentam expressão de genes envolvidos na adipogênese e associados à pluripotência

Após a constatação de que MSCs-TA quando cultivadas nos meios EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2, apresentaram melhor desempenho nas

características analisadas anteriormente, selecionamos estes grupos de cultivo a fim de avaliar a influência de tais condições na expressão de alguns genes relacionados à adipogênese, osteogênese, senescência celular, pluripotência e genes expressos em pericitos e células musculares lisas.

4.9.1. Cultivo de MSCs-TA na presença de fatores pró-angiogênicos aumentam a transcrição de genes envolvidos no processo inicial de diferenciação adipogênica

Podemos verificar que as células cultivadas nos três meios pró-angiogênicos apresentaram alta expressão de dois fatores de transcrição chaves que atuam no início da diferenciação adipogênica, *FABP4* e *PPARɤ*, quando comparados às células cultivadas em DMEM/F12 (Figura 17-A). Ambos os grupos expressaram baixos níveis dos fatores de transcrição *CEBPα*, normalmente expressos somente após início da diferenciação adipogênica, e dos genes tardios relacionados ao final da adipogênese como *ADIPOQ* e *LEP*, expressos normalmente em adipócitos maduros.

Com relação aos genes envolvidos no processo de diferenciação osteogênica, não houve diferença na expressão do fator de transcrição Runx2, envolvido com o início da osteogênese.

Não houve expressão de BGLAP em quaisquer condições de cultivo, sendo este resultado esperado já que este gene está relacionado ao final do processo de diferenciação osteogênica. Com relação ao gene SPARC, houve uma elevada expressão em todos os grupos, sendo que o maior nível foi observado nas células cultivadas em DMEM/F12.

4.9.2. O cultivo de MSCs-TA em meio pró-angiogênico aumenta a expressão do fator de pluripotência Klf4

Já é bem relatado na literatura a expressão de fatores de transcrição-chaves responsáveis pela manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias. Assim avaliamos a expressão de quatro fatores de transcrição associados à pluripotência em MSCs-TA cultivadas nos respectivos meios, na primeira passagem.

De acordo com nossos dados, houve uma elevada expressão do fator de transcrição Klf-4 em células cultivadas nos meios pró-angiogênicos (EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2) em comparação às células cultivadas no meio DMEM/F12 (Figura 17-C).

Em seguida analisamos a expressão do gene da enzima telomerase que também está relacionada à manutenção das características progenitoras. Nenhum dos meios de cultivo alterou a expressão do referido gene (Figura 17-D).

4.9.3. MSCs-TA cultivadas sob as diferentes condições não adquirem uma assinatura transcricional típica de pericitos ou miofibroblastos

Para melhor elucidar o direcionamento do fenótipo das MSCs-TA cultivadas nos meios DMEM/F12 e nos meios pró-angiogênicos EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2, analisamos a expressão de genes relacionados à células maduras de origem mesenquimal como pericitos e miofibroblastos.

Podemos verificar que não houve expressão de nenhum dos genes característicos da linhagem pericítica, como nestina e desmina, e com relação aos genes característicos de miofibroblastos, apesar de uma elevada expressão do gene FSP-1, a baixa expressão de ACT-1 evidencia que não houve um perfil de expressão característico de miofibroblastos (Figura 17-E).

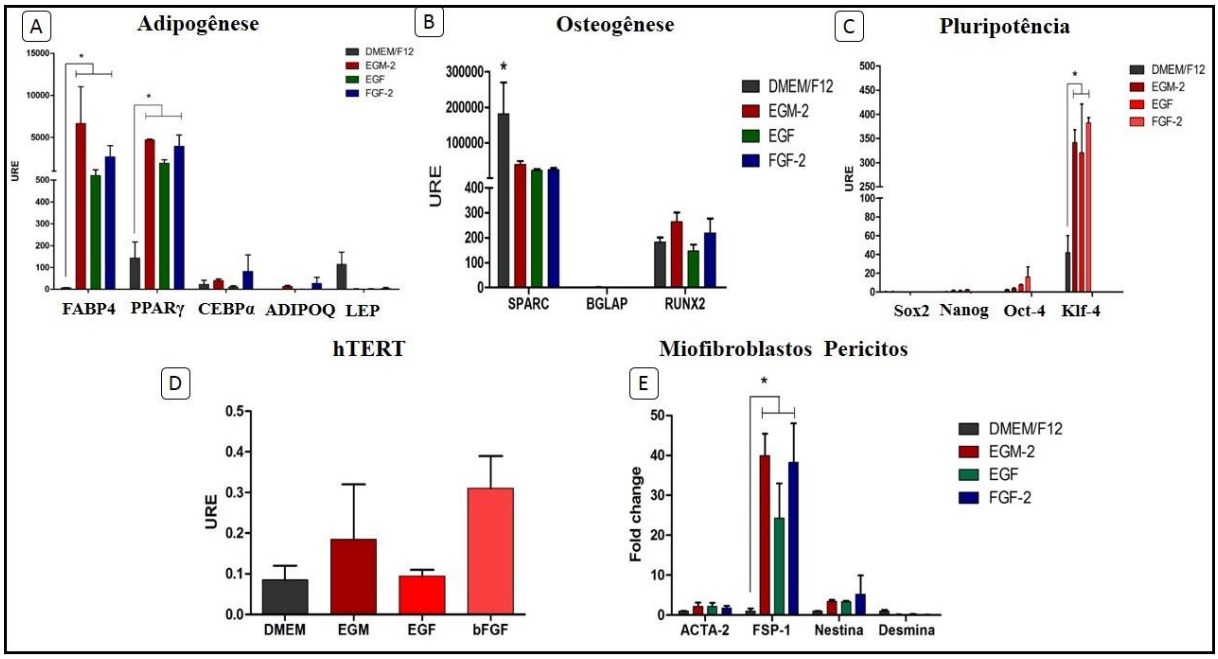


Figura 17. Análises de expressão gênica por PCR em tempo real das MSCs-TA cultivadas em DMEM/F12, EGM-2, EBM + EGF e EBM + FGF-2. A- Nível de expressão de genes envolvidos na diferenciação adipogênica; **B**- Nível de expressão de genes envolvidos na diferenciação osteogênica; **C**- Nível de expressão de genes da pluripotência; **D**- Nível de expressão do gene da telomerase humana; **E**- Nível de expressão de genes característicos de miofibroblastos (ACTA-1 e FSP-1) e pericitos (Nestina e Desmina). Teste estatístico ANOVA *one way* seguido do pós-teste Bonferroni. *p<0,05.

4.10. Caracterização de MSCs-TA cultivadas em EGM-2, EBM + EGF, EBM + FGF-2 e DMEM/F12 *in vivo*

A fim de verificar o comportamento *in vivo* de MSCs-TA cultivadas nas 4 condições, tais células foram modificadas a expressar luciferase, suspensas em matrigel e infundidas subcutaneamente em camundongos imunossuprimidos NSG. O monitoramento da sobrevida das células foi realizado por 35 dias, por PIBB, e após este período o tecido formado na região de infusão foi coletado, e

congelado para avaliação histológica e de expressão proteica por imunohistoquímica.

4.10.1. As diferentes condições de cultivo não alteram a sobrevida das MSCs-TA após transplante em camundongos imunodeficientes

Após a infusão subcutânea, quantificamos a intensidade de bioluminescência em todos os grupos para estimar a sobrevida das MSCs-TA transplantadas (Figura 18-A). O sinal bioluminescente diminuiu ao longo dos 35 dias, demonstrando que a maioria das células não foram capazes de sobreviver *in vivo* (Figura 18–B). Com estes dados verificamos a velocidade de decaimento da sobrevida a partir da área sobre a curva, e constatamos que não houve diferença na velocidade de decaimento entre os grupos (Figura 18-C).

Após o monitoramento da sobrevida *in vivo*, retiramos os tecidos gerados e confirmamos que eles eram originados das células transplantadas pois emitiam sinal bioluminescente (Figura 18-A, painel inferior).

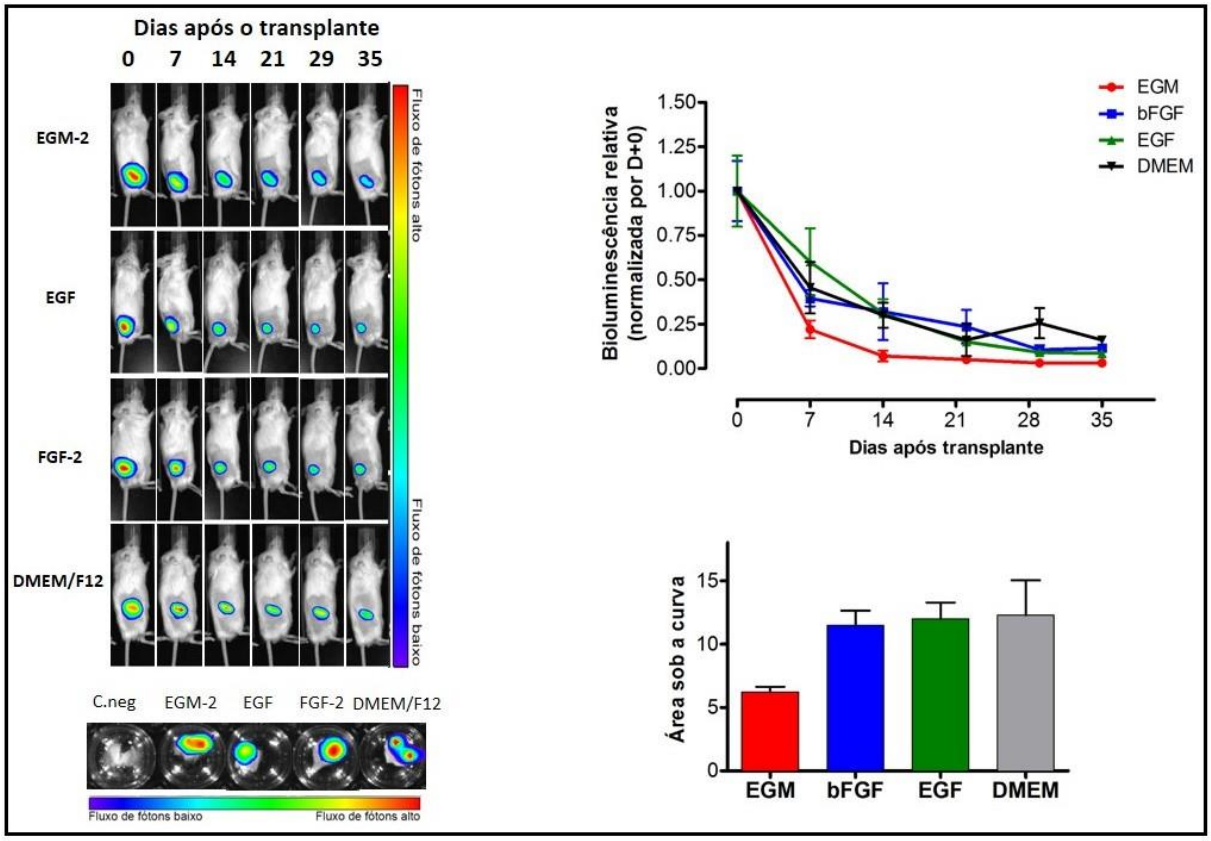


Figura 18. Processamento de imagem baseado em bioluminescência. A- Monitoramento *in vivo* por 35 dias, e *ex vivo;* **B-** análise da sobrevida e **C-** velocidade de decaimento de sinal bioluminescente. n=2-4 animais.

4.10.2. O cultivo na presença de citocinas pró-angiogênicas retém o potencial de diferenciação in vivo de MSCs-TA

Com o intuito de fazer uma caracterização histológica, bem como verificar a localização das células infundidas no tecido formado, congelamos os pedaços dos tecidos coletados e avaliamos a presença da proteína luciferase, proteína expressa pelas células infundidas, por imunohistoquímica. Ambos os grupos apresentaram marcação positiva para a luciferase, corroborando os dados de PIBB *in vivo* e *ex vivo* de que as MSCs-TA transplantadas de fato participavam da

composição do tecido. Células não cultivadas (fração fresca) serviram como controle negativo para a marcação, já que elas não foram modificadas a expressar o gene da luciferase (Figura 19).

Interessantemente, este grupo de células não cultivadas (fração fresca) formou uma estrutura semelhante ao tecido adiposo. O único tecido que apresentou um aspecto histológico idêntico ao gerado pela infusão das células não cultivadas foi aquele gerado por MSCs-TA mantidas em meio EGM-2. As células cultivadas em EBM + EGF e EBM + FGF-2 apresentaram uma leve semelhança ao tecido formado nos grupos anteriores, mas com adipócitos menores e pouco definidos. As células cultivadas em DMEM/F12 formaram uma massa de células sem padrão ou organização definida, indicando que elas não foram capazes de gerar tecido adiposo *in vivo* (Figura 19).

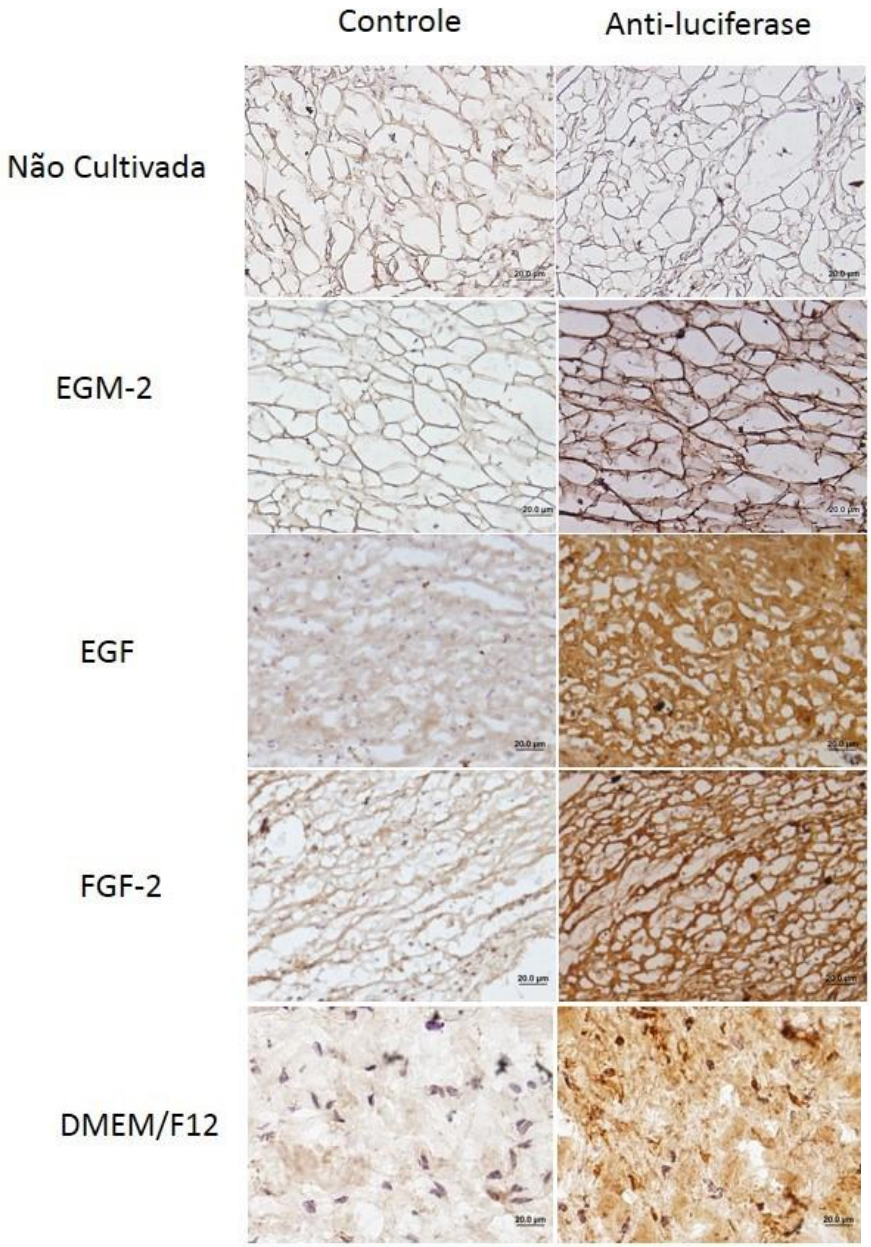


Figura 19. Avaliação histológica e detecção da proteína luciferase nos tecidos formados após 35 dias de infusão subcutânea. As figuras ilustram as estruturas formadas *in vivo*, onde podemos verificar forte semelhança entre a estrutura formada pelo grupo de células não cultivadas e o grupo de células cultivadas no meio EGM-2. Marcação por imunohistoquímica com anticorpo anti-luciferase evidenciando a presença das células humanas na estrutura formada. Aumento de 400x.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A manutenção das características de células progenitoras durante a expansão *ex vivo* é um dos principais desafios no cultivo destas células para fins terapêuticos e de pesquisa básica.

Este estudo apresenta evidências de que a presença de fatores de crescimento pró-angiogênicos é crítica para a manutenção das características progenitoras de MSCs-TA durante o processo de cultivo e expansão celular. Tais fatores foram responsáveis por manter a capacidade de autorrenovação, e os potenciais de diferenciação adipogênico e osteogênico *in vitro*. Além disto, as MSCs-TA cultivadas em meio pró-angiogênico EGM-2 foram capazes de formar uma estrutura semelhante ao tecido adiposo *in vivo*, sendo que tal capacidade foi completamente perdida em MSCs-TA cultivadas em condições convencionais (meio DMEM/F12).

A capacidade de autorrenovação e o potencial de diferenciação são as principais características que tornaram as células progenitoras mesenquimais atrativas para a medicina regenerativa. Portanto, a elaboração de estratégias de cultivo capazes de manter estas características resultará em uma maior eficiência terapêutica destas células.

O desafio em manter tais características em cultura motivou grupos de pesquisa a testarem diversas metodologias alternativas, como por exemplo, o uso de superfícies de contato de diferentes naturezas[65,66], variação na concentração de oxigênio[67,68], substituição de SFB por lisado plaquetário ou soro humano[69,70], cultura 3D[71], comparação entre diferentes formulações de meios de cultura, e avaliação de outros parâmetros, como a densidade de plaqueamento[72]. Entretanto, apesar dos esforços na tentativa de promover a manutenção de MSCs em cultura, ainda não há conclusões sobre uma metodologia proeminente.

Há diversos relatos na literatura sobre os efeitos de citocinas e/ou fatores de crescimento na regulação das funções de células-tronco[74,75]. Um exemplo clássico de método de cultivo que é capaz de manter as características de células progenitoras *in vitro* é o cultivo de células-tronco pluripotentes. Estas células são cultivadas sobre uma camada alimentadora de fibroblastos que secretam fatores solúveis no sobrenadante. Embora alguns métodos de cultivo consistam em substituir a camada de fibroblastos por matrizes, como o matrigel, a adição de citocinas é mantida[60]. Tais moléculas solúveis como FGF-2, TGFβ e fator inibidor de leucemia (LIF), por exemplo, atuam na manutenção da pluripotência e autorrenovação destas células, e sem estas moléculas as células entram em diferenciação espontaneamente[60,73].

Sabe-se, contudo, que a resposta celular aos fatores solúveis pode variar, como em alguns casos em que estas moléculas são utilizadas na indução de células progenitoras à diferenciação em uma linhagem celular específica[76,77]. Tais respostas podem depender das concentrações dos fatores, de sua interação com outros fatores e do tipo de célula que irão interagir. Portanto, na escolha de qual ou quais moléculas solúveis utilizar na cultura de MSCs-TA com o intuito de manter suas características progenitoras, é imprescindível considerar o contexto de um ambiente nativo que permita tal manutenção e quais fatores estão presentes neste ambiente.

A observação de que a formação de tecidos mesenquimais é precedida da angiogênese[78,79] foi utilizada como fundamentação para o nosso estudo. Nosso foco, portanto, foi tentar mimetizar um ambiente pró-angiogênico durante o cultivo das MSCs-TA e avaliar o efeito desta estratégia na manutenção de suas características progenitoras.

Nossos resultados foram consistentes com a ideia de que em um ambiente pró-angiogênico, que precede a formação do tecido adiposo, as MSCs-TA são mantidas em um estado indiferenciado enquanto proliferam acompanhando o crescimento do tecido vascular, e após este período elas apresentam um alto

potencial de diferenciação[57]. Tais resultados foram demonstrados pela observação de que as MSCs-TA cultivadas no meio EGM-2, que mimetiza um ambiente pró-angiogênico, apresentaram alta capacidade proliferativa e de autorrenovação, e quando induzidas à diferenciação apresentaram um elevado potencial adipogênico e osteogênico. Estes resultados foram comparados ao de células cultivadas no meio convencional DMEM/F12, no qual as MSCs-TA perderam estas habilidades.

A manutenção do estado progenitor de MSCs-TA durante o cultivo em meio pró-angiogêncio foi demonstrado após verificar que estas células previamente cultivadas em EGM-2 e transferidas para o meio convencional DMEM/F12 perdem seu potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico. Enquanto isso, na condição contrária as MSCs-TA recuperam parcialmente o potencial de diferenciação adipogênico. Tal recuperação da diferenciação adipogênica ocorreu de modo rápido (apenas 3 dias de incubação em EGM-2) e não-dependente de tempo, excluindo a possibilidade de que o alto potencial de diferenciação de MSCs-TA cultivadas em EGM-2 decorresse da expansão de uma subpopulação de células já dotadas de alto potencial de diferenciação adipogênica. Assim, tal aumento do potencial de diferenciação causado pelo cultivo em EGM-2, é em decorrente de mudanças na fisiologia celular das MSCs-TA.

Esta recuperação parcial do potencial adipogênico pode ser devido algumas células terem entrado em um nível de comprometimento celular irreversível durante o pré-cultivo em DMEM/F12, impossibilitando-as de ativarem o programa de diferenciação adipogênica. De fato, observamos que a linhagem de fibroblastos humanos Bj não aumentaram seu potencial de diferenciação adipogênico, provavelmente por serem células com um nível avançado de diferenciação celular. Além disso, o tratamento com EGM-2 não recuperou o potencial de diferenciação osteogênico após pré-cultivo em DMEM/F12. Isto pode estar associado à biologia do tecido adiposo, pois, é descrito que as MSCs perdem sua capacidade multipotencial de diferenciação em cultura de modo

hierárquico, de maneira que a cada determinado ciclo de divisões elas perdem a capacidade de se diferenciar em uma das linhagens de células mesenquimais de modo subsequente [80,81].

Assim, as MSCs-TA cultivadas em meio DMEM/F12 podem estar entrando em um nível de amadurecimento celular irreversível responsável pela diminuição de seu potencial de diferenciação, enquanto que as MSCs-TA cultivadas em meio pró-angiogênico podem manter um alto potencial de diferenciação *in vitro*.

Um único estudo tentou elucidar o uso do meio EGM-2 na manutenção das características progenitoras de MSCs-TA[64]. Entretanto, diferente dos nossos resultados, os autores não encontraram diferenças no potencial de diferenciação entre as células cultivadas nos meios EGM-2 e DMEM/F12.

O meio pró-angiogênico EGM-2 possui em sua composição os fatores de crescimento FGF-2, EGF, IGF e VEGF. O primeiro fator de crescimento, FGF-2, é um dos 24 membros da família de proteínas FGFs, e possui uma atividade biológica promotora de proliferação de fibroblastos[82]. Além disso, tem sido relatado que este fator de crescimento medeia ações relacionadas a diversas funções celulares como o processo de diferenciação[83,84], angiogênese, desenvolvimento embrionário, reparo tecidual e capacidade de autorrenovação, além de promover a manutenção de um estado celular progenitor pela inibição da senescência e envelhecimento celular[85,86].

O segundo fator de crescimento, EGF, também é uma proteína que está relacionada a diversas atividades e funções celulares como o aumento da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular[87,88,89]. Embora esteja bastante relacionado ao processo de diferenciação de tecidos mesenquimais, existem estudos demonstrando que o EGF pode retardar o desenvolvimento de tecidos mesenquimais como o tecido adiposo[90]. Entretanto estas controvérsias podem ser resultado de ações que variam de acordo com sua concentração[91].

O terceiro fator de crescimento, IGF, é um fator de crescimento bastante envolvido na diferenciação de tecidos mesequimais[92,93], crescimento,

remodelamento e metabolismo de lipídeos[94,95,96], aumento de replicação e diferenciação de préadipócitos[94], além de sua participação na angiogênese[97].

O quarto fator de crescimento, VEGF, também tem sido descrito possuir um importante atuação no desenvolvimento de tecidos mesenquimais através do seu papel no balanço entre a diferenciação osteogênica e adipogênica[98], e de seu papel como indutor da angiogênese, favorecendo o reparo tecidual[99]. Há relatos também de que células precursoras osteoblásticas expressam altos níveis de VEGF[100,101].

Sabendo que as citocinas presentes em EGM-2 possuem ações relacionadas ao processo de desenvolvimento e diferenciação de tecidos mesenquimais, nós avaliamos se alguma delas poderia recuperar o potencial de diferenciação perdido das MSCs-TA previamente cultivadas em DMEM/F12. Com isso, observamos que as células cultivadas na presença dos fatores de crescimento EGF e FGF-2 foram capazes de recuperar o potencial de diferenciação adipogênico de maneira semelhante ao meio EGM-2. Com relação ao potencial de diferenciação osteogênico, indo de encontro aos resultados apresentados anteriormente entre os cultivos em EGM-2 e DMEM/F12, nenhuma das citocinas foi capaz de recuperar o potencial osteogênico.

Seguinte a esses achados nos aprofundamos na caracterização das MSCs-TA cultivadas desde o isolamento do tecido em todos os meios de cultura descritos neste estudo, e adicionamos o grupo de MSCs-TA cultivadas no meio EBM, sem as citocinas, como controle.

A morfologia celular é uma característica que está associada a diversos processos e funções celulares, como senescência, motilidade, diferenciação e proliferação[102]. Assim, mudanças morfológicas podem acompanhar mudanças funcionais na célula. Recentemente, um estudo fez uma associação entre as características morfológicas das MSCs em cultura com sua multipotencialidade e capacidade de proliferação, e verificaram que as células com maior tamanho e morfologia poligonal apresentaram menor capacidade de diferenciação e de proliferação, comparado às células que apresentaram morfologia fibroblastóide e

fusiforme[103]. Estes resultados foram consistentes com os nossos, pois verificamos que células cultivadas em DMEM/F12 apresentaram uma morfologia poligonal, bastante larga e achatada na placa de cultura, e com presença marcante de fibras de estresse. Juntamente com estas características estas células apresentaram baixos potenciais de diferenciação, capacidade de autorrenovação e de proliferação. Tais características geralmente estão associadas ao processo de comprometimento celular em cultura[104,105]. Enquanto isso, MSCs-TA cultivadas em EGM-2, EGF e FGF-2 apresentaram morfologia alongada e fusiforme característica de células fibroblastóides, sendo que tal morfologia foi mantida em cultura, e estes grupos foram os que apresentaram maior potencial de diferenciação, autorrenovação e proliferação durante o cultivo.

Diferenças morfológicas foram observadas também em células cultivadas em EBM, IGF e VEGF, as quais apresentaram uma morfologia com protuberâncias na membrana celular, semelhante a uma morfologia estrelada. Tais semelhanças com o meio EBM nos leva a concluir que os fatores de crescimento IGF e VEGF não tem influência no aspecto morfológico de MSCs-TA nas condições analisadas.

Filamentos de actina participam da composição do citoesqueleto e estão associados à morfologia, mobilidade e ao processo de diferenciação celular. No processo de comprometimento celular, as células sofrem alterações morfológicas relacionadas à distribuição de proteínas do citoesqueleto[105]. Em concordância a estas observações, o grupo de Treiser (2010) demonstrou que modificações iniciais no citoesqueleto poderiam predizer o potencial de diferenciação das MSCs[106]. No nosso trabalho, observamos que o grupo de células cultivadas em DMEM/F12 apresentou filamentos de actina mais espessos, enquanto que nos demais grupos, os filamentos encontraram-se mais delgados e espalhados no citoplasma. Além disso, células cultivadas em DMEMF12 apresentaram fibras de estresse, que são feixes longos e espessos de actina alinhados continuamente em associação com outras proteínas. Estas fibras são associadas à células que estão

com a superfície celular muito espalhada na placa de cultura e à ausência de mobilidade celular, geradas devido à forte adesão celular na placa[107,108]. De acordo com nossas análises as citocinas EGF e FGF-2 possuem um papel na manutenção da morfologia fibroblastóide de MSCs-TA, perdida no cultivo em DMEM/F12. Tais diferenças morfológicas podem estar associadas às diferentes características apresentadas entre as células cultivadas nos respectivos meios.

É comum as MSCs apresentarem um perfil imunofenotípico homogêneo em cultura. Entretanto, isto não reflete em suas características funcionais, já que a cultura de MSCs é composta por células heterogêneas[81]. Por este motivo, a expressão de marcadores de superfície de MSCs cultivadas não é um método confiável para identificar populações celulares[109]. Estas informações estão de acordo com nossos resultados, visto que não houve diferença na expressão dos marcadores de superfícies testados nas MSCs-TA cultivadas nos diferentes meios. Entretanto, tal homogeneidade não refletiu nas distintas habilidades apresentadas entre as células cultivadas nestes meios, como demonstrado pelos ensaios de diferenciação, autorrenovação e proliferação.

Em 2007, Suga *et al* verificaram que as MSCs-TA cultivadas em EGM-2 apresentaram maior proliferação do que células cultivadas em DMEM/F12[64], o que também podemos verificar em nossos resultados. Além disto, estes autores demonstraram que, dentre as citocinas presentes no EGM-2, apenas o FGF-2 induziu um maior potencial de proliferação em comparação ao meio DMEM/F12. Entretanto o meio suplementado somente com FGF-2 induziu uma proliferação celular inferior em comparação ao meio EGM-2, de modo que os autores sugeriram que haveria um efeito sinérgico entre as citocinas presentes no meio EGM-2. Em nosso estudo verificamos que as MSCs-TA cultivadas em EGM-2, EGF e FGF-2 apresentaram maiores capacidades proliferativas. Contudo, apenas FGF-2 obteve diferença em comparação ao meio EBM. Comparando ao DMEM/F12 as demais condições apresentaram maior potencial proliferativo.

Estes dados indicam que é possível, através do cultivo em meio pró-angiogênico, alcançar uma maior quantidade de células em menos tempo de cultura.

Relatos sobre o papel de FGF-2 e EGF na capacidade proliferativa de MSC já são descritos[110,111,88], entretanto apenas o nosso grupo e o grupo de Suga elucidaram o aumento da proliferação em células cultivadas no meio pró-angiogênico avaliando também a manutenção de suas características progenitoras.

Com relação ao potencial de diferenciação entre as células cultivadas nas diferentes condições, nossos dados demonstram que o cultivo na presença das citocinas possibilitou uma maior capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica em comparação aos meios DMEM/F12 e EBM. Entre os fatores de crescimento, as células cultivadas na presença de FGF-2 e EGF, se sobressaíram em comparação às outras citocinas. Consistente com nossos achados, Kawaguchi *et al*, também demonstraram que o IGF mostrou ser um indutor do potencial de diferenciação adipogênico inferior comparado ao FGF-2[83]. Já com relação à indução osteogênica, não encontramos diferenças entre os grupos cultivados na presença de citocinas. Este resultado pode ser explicado devido à variação dos potenciais de diferenciação entre as amostras de cada paciente. Tal observação pode ser visualizada no apêndice II. Apesar da variação entre amostras, é possível notar que o cultivo na presença das citocinas contribuiu para o potencial osteogênico.

Além disso, verificamos que o potencial de diferenciação adipogênico demonstrou-se mais robusto do que o potencial de diferenciação osteogênico em todos os tecidos. Este resultado é consistente com observações de que o potencial de diferenciação depende do tecido de onde as MSCs são isoladas,[109] sendo que as MSCs-TA são menos propensas à diferenciação osteogênica e tendem a se diferenciar mais facilmente em adipócitos[112,113].

É importante observar que as células que foram cultivadas no meio endotelial básico EBM, sem as citocinas, não apresentaram potencial de

diferenciação tão evidente como no cultivo com a presença dos fatores de crescimento, o que indica que as citocinas são responsáveis por tal ação. Apesar de focar em objetivos diferentes dos nossos, Kolbe e colaboradores verificaram que MSCs cultivadas em EGM-2 deram mais suporte a formação de pequenos vasos em cultura, o que não foi observado nas células cultivadas no meio básico EBM, ausente de citocinas[114]. Este resultado é consistente com os nossos, onde podemos concluir que os fatores solúveis presentes no meio EGM-2 são responsáveis pela manutenção das características das MSCs-TA cultivadas neste meio pró-angiogênico.

Corroborando com estes achados, Hebert *et al* cultivaram MSCs-TA em meio DMEM/F12 suplementado com os fatores de crescimento EGF e FGF-2 e verificaram que houve aumento do potencial de diferenciação adipogênico[115]. Entretanto, aparentemente, nosso resultado demonstrou um potencial de diferenciação adipogênico maior. Isto pode ser explicado porque no experimento conduzido por Hebert e colaboradores, as MSCs foram cultivadas inicialmente em meio DMEM/F12 e posteriormente os fatores de crescimento foram adicionados. Em um dos nossos experimentos, verificamos que MSCs-TA cultivadas em meio DMEM/F12 diminuem ou perdem seu potencial de diferenciação em adipócitos e osteoblastos. Portanto, apesar de as citocinas possuírem grande influência na capacidade de diferenciação das MSCs, o cultivo prévio em meio DMEM/F12 pode afetar esta capacidade. Dessa maneira, o meio básico de crescimento de células endoteliais (EBM) em si também parece ser um fator que influencia na atividade biológica das citocinas. Um dos componentes presentes no meio EBM é a heparina, um glicosaminoglicano que atua na estabilização de FGF-2 no meio de cultura, bem como ajuda a promover a ligação dos fatores EGF e FGF-2 com seus respectivos receptores nas células, promovendo o desencadeamento da sinalização intracelular destes fatores[82,116].

Outra importante habilidade de células progenitoras é a sua capacidade de autorrenovação. A autorrenovação é um processo de replicação celular, em que

uma célula é capaz de gerar ao menos uma célula-filha idêntica à célula-mãe. Este processo pode ocorrer tanto de forma simétrica, processo em que são geradas duas células-filhas idênticas à célula-mãe; ou de maneira assimétrica, em que a célula-mãe origina uma célula semelhante a si mesma, e origina ao mesmo tempo outra célula em um determinado estado de diferenciação mais comprometido. Ambas as divisões são importantes quando há necessidade de expansão celular tal como durante o desenvolvimento ou após uma lesão[117].

Embora seja um procedimento extremamente complexo, o qual precisa ser melhor elucidado, é evidente a presença de um esquema hierárquico de comprometimento celular no qual uma vez estimulada a se dividir a célula-tronco *bona fide* produz uma progênie de células em um estado indiferenciado, porém, em um nível de comprometimento celular mais avançado do que o de sua progenitora, que por sua vez produz células em um estado de comprometimento ainda mais avançado e assim segue a partir de sucessivos ciclos de proliferação celular[118].

Em concordância com esta questão, Sarugasser *et al* avaliaram a capacidade de diferenciação entre clones de células parentais e células-filhas, evidenciando o esquema hierárquico de MSCs, em que estas dão origem à uma progênie com capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação mais restritos[81].

No nosso estudo, verificamos que células cultivadas na presença dos fatores pró-angiogênicos mantiveram a frequência de colônias superior em comparação às células cultivadas em DMEM/F12 e EBM. Interessantemente, após a primeira passagem (p1), houve um intenso aumento do número de colônias fibroblastóides em todos os grupos, mantendo-se as células cultivadas em EGM-2, EGF e FGF-2 as que apresentaram maior capacidade de formação de colônias. Tais observações são consistentes com dados já descritos sobre o papel das citocinas EGF e FGF-2 no processo de autorrenovação[119,120].

Assim, o cultivo de MSCs-TA em meio contendo fatores pró-angiogênicos pode proporcionar às células um ambiente capaz de manter sua capacidade de

autorrenovação por mais tempo em cultura, comparado ao cultivo em meio DMEM/F12 e meio EBM, ausente dos fatores de crescimento.

Interessantemente, a frequência de colônias em todos os grupos foi diminuída da primeira (p1) para a segunda passagem (p2), e da segunda para a terceira passagem (p3) a frequência foi mantida. Isto mostra que durante o processo de cultivo, o momento no qual as MSCs-TA apresentaram maior frequência de colônias fibroblastóides foi na p1. Esta observação indica que a cultura de MSCs-TA tem a maior quantidade de células progenitoras ao término da segunda expansão pós-isolamento. Portanto, este deve ser o período mais promissor para o uso destas células em estudos que visem investigar o comportamento ou o efeito terapêutico de células progenitoras (e não apenas progênie).

Diante de tais resultados, selecionamos as MSCs-TA cultivadas em FGF-2, EGF, EGM-2 e DMEM/F12 e constatamos que as células cultivadas nestes meios não apresentaram um perfil de transcritos característicos de miofibroblastos e pericitos. Além disso, células cultivadas na presença das citocinas, representados por EGM-2, EGF e FGF-2, apresentaram alta expressão de genes envolvidos no início da diferenciação adipogênica. Assim, o cultivo na presença de citocinas pró-angiogênicas pode estar levando às MSCs-TA a um fenótipo semelhante ao de pré-adipócitos, caracterizado pela elevada expressão do fator de transcrição PPARγ[51]. Estes dados estão de acordo com o maior potencial adipogênico das MSCs-TA cultivadas com fatores de crescimento pró-angiogênicos.

Entretanto, não foi detectada expressão dos fatores de transcrição analisados envolvidos na osteogênese. Portanto, o aumento da diferenciação osteogênica observada pode estar associado a mecanismos desencadeados por outras vias moleculares cujos componentes não foram avaliados neste estudo.

Continuando a caracterização molecular das células cultivadas nas quatro condições selecionadas, verificamos também uma alta expressão do fator de transcrição Klf-4 nas células cultivadas com fatores pró-angiogênicos. Sendo este

um dos fatores de transcrição responsáveis pela manutenção da pluripotência em iPS, tal aumento de expressão destaca a possibilidade de este fator de transcrição estar associado à manutenção das características progenitoras das células cultivadas na presença das citocinas. Interessantemente, Worthley *et al* verificaram uma alta expressão deste fator de transcrição associado à MSCs genuínas da medula óssea[121]. Contudo, para nossos experimentos, tal suposição necessita de um maior aprofundamento.

Mesmo reconhecendo o importante papel do cultivo celular no estudo do comportamento das células, sabemos que muitas vezes este comportamento não é correspondente no ambiente *in vivo*. Por este motivo, ensaios *in vivo* são ensaios mais adequados e confiáveis para demonstrarmos o real comportamento das células dentro da complexidade que é um organismo vivo.

Outros grupos já demonstraram a influência dos fatores de crescimento EGF e FGF-2 no processo de diferenciação após serem infundidos *in vivo*[122]. Entretanto, a presença destes fatores de crescimento é bastante associada à angiogênese tumoral, não sendo, portanto, seguro seu uso no ambiente *in vivo*[123].

Nenhum outro estudo demonstrou a formação de uma estrutura semelhante ao do tecido adiposo *in vivo* a partir da infusão de MSCs-TA cultivadas previamente em meio pró-angiogênico. Esta estratégia possibilitou a formação *in vivo* de um tecido semelhante ao tecido de origem das MSCs-TA infundidas, mesmo após estas terem passado por um processo de expansão em cultura.

É importante ressaltar que as células da fração não cultivada foram capazes de formar um tecido histologicamente semelhante ao tecido adiposo, e que esta habilidade foi alcançada *in vivo* somente pelas MSCs-TA que foram cultivadas em meio EGM-2. Dessa forma, mesmo as células cultivadas em FGF-2 terem apresentado um maior potencial de diferenciação adipogênico *in vitro*, apenas as células cultivadas em EGM-2 formaram um tecido com estrutura semelhante às estruturas formadas pelas células da fração não cultivada.

Nesta estratégia experimental, pressupõe-se que MSCs-TA não cultivadas possuem uma população de células progenitoras com potencial de diferenciação adipogênico *in vivo*, que é geralmente perdido no processo de cultura *in vitro*. Entretanto, o cultivo em EGM-2 foi capaz de manter este potencial de diferenciação durante a cultura, evidenciado pela formação de uma estrutura semelhante à apresentada pelos cortes histológicos do tecido formado pelas células da fração não cultivada. Podemos confirmar ainda que as estruturas formadas foram geradas pelas MSCs-TA humanas infundidas nos camundongos imunossuprimidos, por meio da marcação positiva para o gene da luciferase.

Estes achados demonstram que o cultivo em meio pró-angiogênico pode ser utilizado como uma estratégia promissora para a manutenção do estado progenitor de MSCs-TA durante o processo de expansão *ex vivo*.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Estes resultados demonstram que citocinas pró-angiogênicas mantém as características progenitoras de MSCs-TA ao longo do seu cultivo e mantém sua capacidade de diferenciação *in vivo* após transplante. Estes achados estabelecem uma estratégia para manter as propriedades de MSCs-TA que são perdidas durante o cultivo convencional e destacam a importância de EGF e FGF-2 como possíveis fatores-chave na regulação das propriedades progenitoras destas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: New directions. **Cell Stem Cell**, v.10, n.6, p. 709-716, 2012.

2- TAVASSOLI, M. e CROSBY, W.H. Transplantation of marrow to extramedullary sites. **Science**, v. 161, n. , p. 54-56, 1968.

3- BIANCO, P. *et al*. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. **Nature Medicine**. v.19, n.1, p.35-42, 2013.

4- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKJAN, R. K. e LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and tissue Kinetics**, v.3, n.4, p.393-403, 1970.

5- MÉNDEZ-FERRER, S. *et al*. Mesenchymal and haematopoietic stem cell form a unique bone marrow niche. **Nature**. V.466, n.12, p.829-836, 2010.

6- SACHETTI, B. *et al*. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematipoietic microenvironment. **Cell**, v. 131, n.2, p. 324-336, 2007.

7- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.9, n.5, p.641-650, 1991.

8- SHIPONOUVA, I. *et al*. Mesenchymal stem cells: precursor hierarchy. **Cellular Therapy and Transplantation**, v. 1, n. 2, p. 44-48, 2008.

9- HORWITZ, E. M. *et al*. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p. 393-395, 2005.

10- PITTENGER, M. F. *et al*. Multilinage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

11- FRENETTE, P. S. *et al*. Mesenchymal Stem Cell: Keystone of the Stem Cell Niche and a Stepping-Stone for Regenerative Medicine. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 285-316, 2013.

12- MEIRELLES, L. D. S., CHAGASTELLES, P. C. e 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.

13- COVAS, D. T. *et al*. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146 þ perivascular cells and fibroblastos. **Experimental Hematology**, v.36, n.5, p. 642-654, 2008.

14- CAPLAN, A. I. e CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, v.9, n.1, p. 11-15, 2011.

15- MEIRELLES, L. D. S. *et al*. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokines Growth Factor**, v. 20, p. 419-427, 2009.

16- UCCELLI, A., PISTOIA, V. e MORETTA, L. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? **Trends in Immunology**, v.8, n.5, p. 219- 226, 2007.

17- LE BLANC, K. e MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 383-396, 2012.

18- BLAZAR, B. R., MURPHY, W. J.e ABEDI, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. **Nature Reviews Immunology**, v.12, n.6, p.443-458, 2012.

19- TROYER, D. L. e WEISS, M. L. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. **Stem Cells**, v. 26, n.3, p. 591-599, 2008.

20- CHEN, L. *et al*. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS ONE** v.3, n.4, e1886, 2008.

21- NEMETH, K. *et al*. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**. v.15, n.1, p.42–49, 2009.

22- MOSSER, D. M. e EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**. v.8, n.12 , p.958–969, 2008.

23- MAGGINI, J. *et al*. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. **PLoS ONE**, v.5, n.2, e9252, 2010.

24- SHI, Y. *et al*. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses**. Trends in Immunology**, v.33, n.3, p.136-143, 2012.

25- REN, G. *et al*. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. **Stem Cells**, v.27, p. 1954–1962, 2009.

26- RYAN, J. M. *et al*. Interferon-γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. **Clinincal and Experimental Immunology.** v.149, p.353–63, 2007.

27- AGGARWAL, S. e PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood,** v.105, n.4, p.1815–1822, 2005.

28- JARVINEN, L. *et al*. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. **Journal of Immunnology**, v.181, n.6, p. 4389–96, 2008.

29- SZÖKE, K. e BRINCHMANN, J. E. Concise Review: Therapeutic Potential of Adipose Tissue-Derived Angiogenic Cells**. Stem Cells Translational Medicine**, v.1, n.9, p. 858-667, 2012.

30- SORRELL, J. M., BABER, M. A. e CAPLAN, A. I. Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation**. Tissue Engineering Part A**, v.15, n.7, p.1751-1761, 2004.

31- KINNAIRD, T. *et al*. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments colateral perfusion through paracrine mechanisms. **Circulation,** v.109, n.12, p.1543-1549, 2004.

32- BIANCO, P., ROBEY, P. G. e SIMMONS, P. J., *et al*. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts and assays. **Cell Stem Cell**. v.2, n.4, p.313-319, 2008.

33- GUIMARÃES, A. C. R e ALVES, E. A. Cultivo Celular**. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde.** v.2, n.5, p.1215-1253.

34- CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **Journal of Experimental Medicine**. v.15, p. 516–528, 1912.

35- ROUS, P. e JONES, F. A. A method for obtaining suspension of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. **Journal of Experimental Medicine.** v.23, n.4, p. 549-555 , 1916.

36- PARKER, R. C. Methods of tissue culture. **Hoeber Inc.,** New York. 3º edição.

37- FRESHNEY, R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. **Nova York: Wiley-Liss**, 4. ed. p.397, 1994.

38- BANFI, A. *et al*. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology,** v.28, p.707-715, 2000.

39- EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science**, v.122, n.3168, p.501-504, 1955.

40- AASEN, T. e BELMONTE, J. C. I. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. **Nature Protocols,** v.5, n.2, p.371-382, 2010**.**

41- CARVALHO, A. C. S. R. D. Estudo da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas provenientes do sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos **[Tese]**. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

42- IKEBE, C. e SUZUKI, K. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Therapy: Optimization of Cell Preparation Protocols. **BioMedical Research International**, v. 2014, p.1-11, 2014.

43- WAGNER, W. *et al.* The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations – Evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. **Experimental Hematology**. v. 36, n. 4, p. 536-548, 2006.

44- SEKYIA, I. *et al*. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. **Stem Cells**. v. 20, n. 6 ,p. 530-541, 2002.

45- CARRANCIO, S. *et al*. Optimization of mesenchymal stem cells expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. **Experimental Hematology**, v. 36, n. 8, p. 1014-1021, 2008.

46- BLANDE, I. S. *et al*. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. **Transfusion**, v. 49, p. 2680-2685, 2009.

47- PÉREZ-ILZARBE, M. *et al.* Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. **Transfusion**, v. 49, p. 1901-1910, 2009.

48- SUN, L. Y., *et al*. Antioxidants cause rapid expansion of human adipose-derived mesenchymal stem cells via CDK and CDK inhibitor regulation. **Journal of Biomedical Science**. v. 20, p. 53-64, 2013.

49- NG, P. C., *et al*. Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM. **Biomaterials**, v. 35, p. 4046-4057, 2014.

50- LI, C. Y., *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal setm cells from bone marrow and adipos tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem Cell Research Therapy**, v. 6, p. 55-68, 2015.

51- TANG, W. *et al*. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. **Science**. v.322, p. 583-586, 2008.

52- CRISAN, M. *et al*. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell,** v.3, n.3, p301-313, 2008.

53- TRAKTUEV, D. O. *et al*. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. **Circulation Research**, v.102, n. 1, p. 77-85, 2008.

54- WAGERS, A. J. The stem cell niche in regenerative medicine. **Cell Stem Cell**, v.10, n., p.362-369, 2012.

55- LINDROOS, B., SUURONEN, R. e MIETTINEN, S. *et al.* The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 7, p. 269–291, 2011.

56- CAO, Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. **Journal of Clinic Investigation,** v.117, p.2362–2368, 2007.

57- HAN, J. *et al*. The spatiotemporal development of adipose tissue**.** **Development**, v.138, p.5027-5037, 2011.

58- BUTLER, J. M. *et al*. Development of a vascular niche platform for expansion of repopulating human cord blood stem and progenitor cells. **Blood**, v.120, p.1344-1347, 2012.

59- RAJASHEKHAR, G., *et al*. IFATS collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical Wnt signaling. **Stem Cells,** v.26, n.10, p.2674-2681,2008.

60- NISHIKAWA, S. I., JAKT, L. M. e ERA, T. *et al*. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology,** v. 8, p.502-507, 2007.

61- MYIAKE, M., *et al*. Expression of CKCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. **Laboratory Investigative**, v. 93, p. 768-778, 2013.

62- RABINOVSK, E. D. e DRAGUI-AKLI, R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 1, p. 46-55, 2004.

63- SENER, E. *et al.* The impact of subconjuctivally injected EGF and VEGF inhibitors on experimental corneal neovascularization in rat model. **Current Eye Research**. v. 36 ,n. 11, p.1005-13, 2011.

64- SUGA, H. *et al*. Rapid expansion of human adipose-derived stromal cells preserving multipotency. **Cytotheray,** v.9, n.8, p.738-745, 2007.

65- MC MURRAY, R. J., *et al*. Nanoscale surfaces for the long term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency. **Nature Materials,** v.10, p.637-644, 2011.

66- HARTRIANTI, P., *et al*. Modulating mesenchymal stem cell behavior using human hair keratin-coated surfaces. **Stem Cell International**, v.2015, p. 1-9, 2015.

67- MA, T., *et al*. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. **Biotechnology Progress**, v.25, n. 1, p.32-42, 2009.

68- HAQUE, N., *et al*. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for Mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. **The Scientific World Journal**. v.2013, p. 1-12, 2013.

69- KOCAOEMER, A., *et al*. Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. **Stem Cell**, v.25, n. 5, p. 1270-1278, 2007.

70- JONSDOTTIR-BUCH, S. M., LIEDER, R., e SIGURJONSSON, O. E. Platelet Lysates Produced from Expired Platelet Concentrates Support Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Plos One**, v. 11, n. 7, e68984, 2013.

71- HOCH, A. L. e LEICH, J. K. Concise Review: Optimizing Expansion of Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells for Clinical Applications **Stem Cells Translational Medicine**, v.3, n. 5, p.643–652, 2014.

72- SOTIROPOULOU, P. A. *et al*. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, n.2, p. 462-471, 2006.

73- NIWA, H. How is pluripotency determined and maintained? **Development**, v.134, n. 4, p. 635-646, 2007.

74- ZHANG, C. C. e LODISH, H. F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. **Current Opnion Hematology**, v. 15, n. 4, p. 307-3011, 2008.

75- ZHANG, L. *et al*. Human bone marrow mesenchymal stem cells support the derivation and propagation of human induced pluripotent stem cells in culture. **Cellular Reprogramming**, v. 15, n. 3, p. 216-223, 2013.

76- SIX, E.M. *et al*. Cytokines and culture medium have a major impact on human in vitro T-cell differentiation**. Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 47, p. 72–78, 2011.

77- SONG, *et al*. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Into Hepatocytes Induced by a Combination of Cytokines and Sodium Butyrate. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n.3, p. 606–614, 2010.

78- FUKURAMA, D. *et al.* Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. **Circulation Research**, v. 93, n. 9, p. e88-e97, 2003.

79- RUPNICK, M. A. *e al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. **PNAS**, v. 99, n. 16, p. 10730-10735, 2002.

80- MURAGLIA, A., CANCEDDA, R. e QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science,** v.113, p. 1161-1166, 2000.

81- SARUGASSER, R. *et al*. Human mesenchymal stem cells self-renewand differentiate according to a deterministic hierarchy. **Plos One**, v.4, n.8, p.e6498, 2009.

82- DEMARGOS, A. FGF-2 estudo de estrutura e função **[Tese]** São Paulo: Instituto de Química da Universidade de São Paulo; 2007.

83- KAWAGUCHI, N. *et al. De novo* adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth fator. **PNAS**, v.95, n.3, p. 1062-1066, 1998.

84- NG, F. *et al.* PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. **Blood**, v. 112, p. 295-307, 2008.

85- COUTU, D. L. e GALIPEAU, J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. **Aging**, v. 3, n. 10, p. 920-933, 2011.

86- EOM, Y. W. *et al*. Role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow–derived mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 445,n. 1, p. 16-22, 2014.

87- KOELLENSPERGER, E. *et al.* Human serum from platelet-poor plasma for the culture of primary human preadipocytes. **Stem Cells**, v. 24, p. 1218–1225, 2006.

88- TAMAMA, K. *et al*. Epidermal growth factor as a candidate for ex vivo expansion of bone marrow–derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, n. 3, p. 686–695, 2006.

89- KRAMPERA, M. *et al.* HB-EGF/HER-1 signaling in bone marrow mesenchymal stem cells: inducing cell expansion and reversibly preventing multilineage differentiation. **Blood**, v. 106, p. 59-66, 2005.

90- SERRERO, G. e MILLS, D. Physiological role of epidermal growth factor on adipose tissue development *in vivo*. **PNAS**, v. 88, p. 3912-3916, 1991.

91- HARRINGTON, M., POND-TOR, S., e BONEY, C. M. Role of epidermal growth factor and ErbB2 receptors in 3T3-L1 adipogenesis. **Obesity**, v.15, n. 3, p. 563-571, 2007.

92- GUNTUR, A. R. e ROSEN, C. J. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. **BoneKEy Reports**, v. 2, n. 437, 2013.

93- SMITH, P. J. *et al*. Insulin-like growth factor –I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 19, p. 9402-9408, 1998.

94- FRITTON, J. C. *et al.* The insulin-like growth factor-1 binding protein acid-labile subunit alters mesenchymal stromal cell fate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4709–4714, 2010.

95- HAUSMAN, D. B. *et al.* The biology of white adipocyte proliferation. **Obesity Reviews**, v. 2, n. 4, p. 239-254, 2001.

96- MISRA, M. *et al*. Lower growth hormone and higher cortisol are associated with greater visceral adiposity, intramyocellular lipids, and insulin resistance in overweight girls. **Americal Journal of Physiology Endocrinolology and Metabolism.** v. 295, n.2, p. 385-392, 2008.

97- RABINOVISK, E. D. e DRAGUIA-AKLI, R. Insulin-like growth factor-I Plasmid therapy promotes in vivo angiogenesis. **Molecular Therapy**, v. 9, n. 1, 2004.

98- LIU, Y. *et al*. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. **Journal of Clinical Investigation**.v.122, n. 9, p. 3101–3113, 2012.

99- SHEVCHENKO, E. K. *et al*. Transplantation of modified human adipose derived stromal cells expressing VEGF165 results in more efficient

angiogenic response in ischemic skeletal muscle. **Journal of Translational Medicine**, v.11, n.138, 2013.

100- MAYR-WOHLFART, U. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. **Bone**, v. 30, n. 3, p. 472–477, 2002.

101- MAES, C. *et al*. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. **Developmental Cell**, v. 19, n. 2, p. 329–344, 2010.

102- WAGNER, W. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. **Plos One**, v.3, n.5, e 2213, 2008.

103- SAZAKI, H. *et al.* Label-free morphology-based prediction of multiple differentiation potentials of human mesenchymal stem cells for early evaluation of intact cells. **Plos One**, v. 9, n.4, e93952, 2014.

104- MUÑOZ-ESPÍN, D. e SERRANO, M. Cellular senescence: from physiology to pathology. **Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 482-496, 2014.

105- SIKAVISTAS, V. I., TEMENO, J. S. e MIKOS, A. G. Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, v.22, p. 2581 -2593, 2001.

106- TREISER, M. D. *et al*. Cytoskeleton-based forecasting of stem cell lineage fates. **PNAS**, v.107, n. 2, p. 610-615, 2010.

107- KARP, G. Biologia celular e molecular – conceitos e experimentos. **Editora Manole**, Capítulo 9, p. 385, 2005.

108- MOLINARO, E. M. *et al*. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. **Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz**, v. 2, p. 35, 2010.

109- HO, A. D. *et al*. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. **Cytotherapy**, v.10, p.320–330, 2008.

110- WILLIAMS, A. R. e HARE, J. M. Mesenchymal stem cells biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circulation Research**, v. **109, p. 923-940, 2011.**

111- AHN, H. J. *et al*. FGF2 stimulates the proliferation of human mesenchymal stem cells through the transient activation of JNK signaling. **FEBS Letters** v. 583, n.17, p. 2922–2926, 2009.

112- MOSNA, F., SENSEBÉ, L. e KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: A user's guide. **Stem cells and development**, v. 19, n. 10, 2010.

113- BROCHER, J. *et al*. Inferior ectopic bone formation of mesenchymal stromal cells from adipose tissue compared to bone marrow: Rescue by chondrogenic pre-induction. **Stem Cell Research**, v. 11, p. 1393-1406, 2013.

114- KOLBE, M. *et al*. Paracrine effects influenced by cell culture medium and consequences on microvessel-like structures in cocultures of mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. **Tissue Engineering Part A.** v.17, p. 2199-212, 2011.

115- HEBERT, T. L. *et al*. Culture effects of epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on cryopreserved human adiposederived stromal/stem cell proliferation and adipogenesis. **Journal of Tissue Engineering Regenerative Medecine.** v. 3, n.7, p. 553–561, 2009.

116- CALDWELL, M. A. *et al*. Heparin stabilizes FGF-2 and modulates striatal precursor cell behavior in response to EGF. **Experimental Neurology**, v. 188, p. 408–420, 2004.

117- INABA, M., YAMASHITA, M. Y. Asymmetric stem cell division: Precision for robustness. **Cell stem Cell**, v.11, p.461-469, 2012.

118- SHARPLESS, N. E. e DEPINHO, R. A. How stem cells age and why this makes us grow old. Nature **Reviews Molecular Cell Biology,** v.8, p.703-713, 2007.

119- CONTI, L. *et al.* Niche-independent symmetrical self-renewal of mammalian tissue stem cell. **Plos Biology**, v. 3, n.9, p. 1594-1606, 2005.

120- ZARAGOSI, L. AILHAUD, G. e DANI, C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 2412-2419, 2006.

121- WORTHLEY, D. L. *et al*. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. **Cell**, v.160, p. 269–284, 2015.

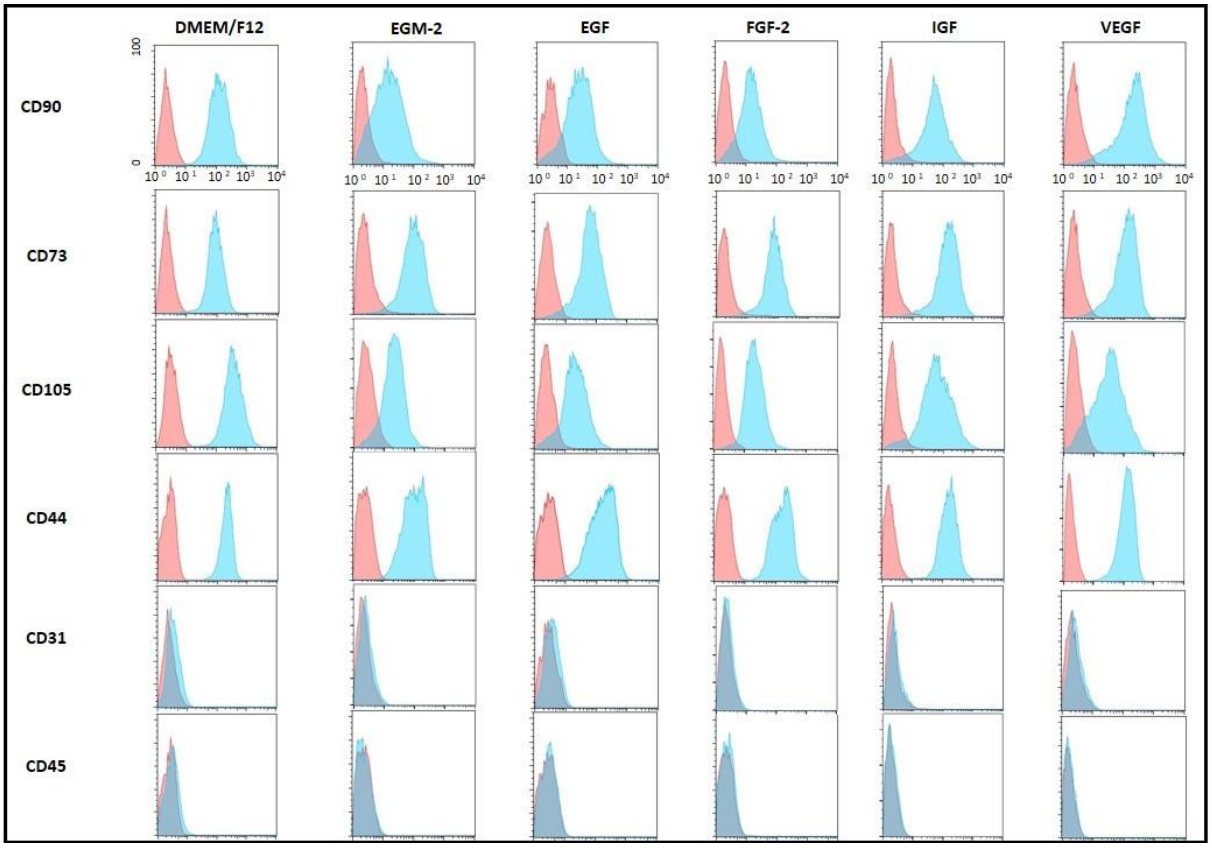
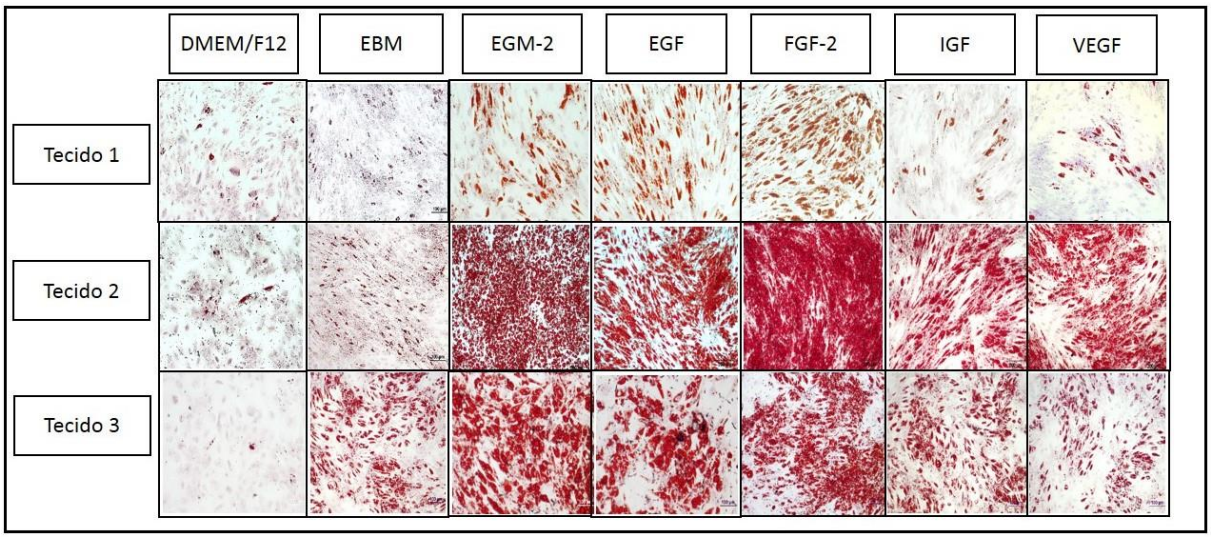
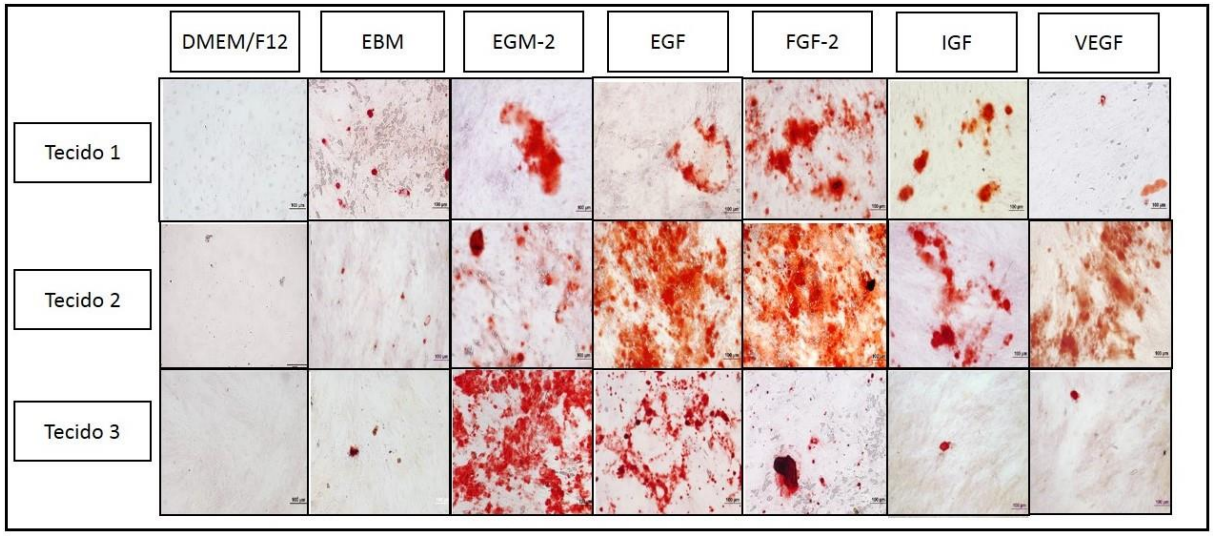
122- DELCROIX, J. R. G. *et al*. EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specific action and the response to neuronal commitment of MIAMI cells. **Differentiation**, v.80, p. 213-227, 2010.

123- ABATE-SHEN, C. e SHEN, M. M. FGF signaling in prostate tumorigenesis: new insights into epithelial-stromal interactions. **Cancer Research,** v.12, n.6, p. 495-497, 2007.

APÊNDICES

8. APÊNDICES

APÊNDICE A: Perfil imunofenotípico. Painel com perfil imunofenotípico de células mesenquimais do tecido adiposo na terceira passagem. Através das análises de histograma podemos verificar que as células cultivadas nas diferentes condições expressaram os marcadores CD44, CD90, CD73 e CD105, característicos de células mesenquimais, e ausência de expressão de marcadores específicos de células hematopoiéticas e endoteliais como CD45 e CD31, respectivamente.



APÊNDICE B: Potencial de diferenciação entre amostras de tecido. Podemos verificar a existência de distintos potenciais de diferenciação adipogênico e osteogênico entre os tecidos coletados. Assim, a capacidade de diferenciação pode variar entre as amostras coletadas, sendo necessário identificar quais fatores poderiam estar influenciando neste resultado. Entretanto, mesmo observando estas diferenças podemos notar que as células apresentaram maior potencial de diferenciação na presença das citocinas, sendo mantido um padrão entre os grupos. Este padrão é verificado por um potencial de diferenciação mais robusto nos grupos EGM-2, EGF e FGF-2 em comparação aos demais grupos.