**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LIZIANE RAQUEL BECKENKAMP

**Caracterização de células estromais mesenquimais do tecido
adiposo selecionadas a partir da expressão diferencial do
marcador de superfície celular CD271**

Ribeirão Preto

2015

LIZIANE RAQUEL BECKENKAMP

**Caracterização de células estromais mesenquimais do tecido adiposo selecionadas
a partir da expressão diferencial do marcador de superfície celular CD271**

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

Programa: Oncologia clínica, células-tronco e
terapia celular

Opção: Células-tronco e terapia celular

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

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 à fonte.

Beckenkamp, Liziane Raquel

Caracterização de células estromais mesenquimais do tecido adiposo selecionadas a partir da expressão diferencial do marcador de superfície celular CD271

98 p.: il. ; 30cm

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto /USP. Área de concentração: Oncologia clínica, células-tronco e terapia celular. Opção: Células-tronco e terapia celular.

Orientador: Tadeu Covas, Dimas

1. Células estromais mesenquimais multipotentes. 2. CD271.
3. Tecido adiposo. 4. *Sorting* celular. 5. Células-tronco.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Beckenkamp, Liziane Raquel

Título: Caracterização de células estromais mesenquimais do tecido adiposo selecionadas a partir da expressão diferencial do marcador de superfície celular CD271

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: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Rui e Lisane*, por todo amor,
carinho e dedicação, sem os quais eu jamais
teria chegado tão longe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Rui e Lisane*, e ao meu irmão, *Gustavo*, que são a base de tudo que sou hoje. Obrigado por todo amor, carinho e principalmente por sempre estarem por perto me apoiando e incentivando. Difícil é transpor em palavras o amor que sinto por vocês!

Ao Prof. Dr. *Dimas Tadeu Covas*, pela orientação, oportunidade e confiança em mim depositada, permitindo que eu aprendesse tantas coisas novas.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Transferência Gênica, *Angelo, Daianne, Fernanda, Lucas, Ricardo e Thaís*. Obrigada pela amizade verdadeira, pela paciência, colaboração e os momentos de descontração. Sem vocês eu não teria conseguido!!

Ao *Lucas*, pela amizade, companheirismo, mas principalmente por sempre se mostrar disposto a escutar, ajudar e ensinar. Você foi fundamental para o andamento deste projeto.

Ao *Ricardo e Lucas*, pelo auxílio e valiosas dicas na correção da dissertação. Muito obrigada meninos!

Às professoras *Dr^a. Maristela, Dr^a. Simone e Dr^a. Virgínia*, por todos os ensinamentos e por auxiliarem nas dificuldades que surgiram ao longo do projeto.

Às funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo, pelo suporte nos experimentos de imunofenotipagem, e em especial a *Patrícia Vianna*, pelas noites à dentro para a realização do *sorting* celular. Obrigada por todo o apoio, confiança e aprendizagem.

Às amigas *Dr^a. Danielle e Josiane*, pela amizade, risadas e por me ensinarem todos os procedimentos de imunofluorescência e microscopia confocal.

Às funcionárias e amigos do *Laboratório de Terapia Celular*, pela atenção e auxílio nos experimentos de cultura celular.

Aos amigos do *Laboratório de Biologia Molecular*, por sempre se mostrarem prestativos para suprir as dúvidas que surgiam, e principalmente à *Fernanda* por me ajudar e ensinar as técnicas de biologia molecular.

Aos amigos do *Laboratório de Biologia Celular e Laboratório de Biotecnologia*, pela amizade, companheirismo e os momentos de diversão que foram essenciais durante esta trajetória.

À *Dr^a. Carolina Thomé*, pela atenção e disponibilidade para a realização dos experimentos de western blotting.

Aos médicos *Dr. Jayme* e *Dr^a Marina*, por sempre serem prestativos e auxiliarem com os procedimentos de coleta do tecido adiposo.

Aos pacientes, que permitiram a coleta de amostras, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, por contribuírem de uma forma ou de outra e por tornarem a realização deste projeto mais agradável.

Às secretárias do Hemocentro de Ribeirão Preto, que sempre se mostraram dispostas a solucionar as questões burocráticas do departamento.

Aos meus queridos amigos, Ana Júlia, Juliana, Rodrigo, Felipe, Luciana, Patrícia e Rafaella, pela convivência diária, descontração e acima de tudo pelo carinho que sempre tiveram comigo. Conhecer vocês e poder compartilhar tantos momentos felizes foi um dos melhores presentes durante esta caminhada.

Às minhas inseparáveis amigas, *Larissa, Bianca, Pâmela, Janise, Tamyres, Aline e Scheine*, que mesmo de longe sempre me apoiaram, incentivaram e torceram por mim.

Minha eterna gratidão!

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho para o êxito”

(Charlie Chaplin)

RESUMO

Beckenkamp, L. R. **Caracterização de células estromais mesenquimais do tecido adiposo selecionadas a partir da expressão diferencial do marcador de superfície celular CD271.** 2015. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Células estromais mesenquimais multipotentes (CTMs) são um tipo de células-tronco/progenitoras pós-natal de grande interesse na comunidade científica, principalmente por sua habilidade de secretar inúmeras moléculas com propriedades antiapoptóticas, imunorregulatórias e angiogênicas que podem trazer benefícios para a aplicação das mesmas na medicina regenerativa. No entanto, a grande heterogeneidade desta população de células aliada à falta de um marcador específico para identificá-las, têm dificultado a compreensão da sua biologia e uma melhor utilização destas células na clínica. Diferentes epítomos de superfície celular têm sido propostos como potenciais marcadores para CTMs, mas se estes podem ser utilizados para identificar todos os tipos de CTMs, independente de sua fonte primária, ainda não está totalmente elucidado. Por este motivo, este trabalho investigou a capacidade do marcador de superfície celular CD271, comumente associado à CTMs da medula óssea (CTMs-MO), em enriquecer CTMs obtidas do tecido adiposo (CTMs-TA). Para tanto, células da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo humano foram selecionadas por *sorting* celular com base na expressão do CD271 (CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD271⁺ e CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD271⁻) e avaliadas *in vitro* para verificar se apresentavam características de CTMs. Ambas as frações celulares obtidas por *sorting* e a FEV apresentaram capacidade clonogênica, morfologia fibroblastóide, potencial de diferenciação nas linhagens mesodérmicas e perfil imunofenotípico compatível com CTMs (CD90⁺, CD73⁺, CD31⁻ e CD45⁻). Ao avaliar a capacidade de duplicação populacional entre as frações celulares de interesse não se observaram diferenças no potencial proliferativo entre elas, no entanto, ambas as células CD271⁺ e CD271⁻ foram mais proliferativas que a FEV. Além disso, os ensaios de formação de colônias fibroblastóides (CFU-Fs) revelaram que células CD271⁻ geravam em média o dobro de colônias em relação à FEV e células CD271⁺. Quando comparado o potencial de diferenciação nas linhagens mesodérmicas, os resultados de diferenciação osteogênica demonstraram que o antígeno CD271 pode estar relacionado com vias de sinalização que aumentam a capacidade de mineralização das CTMs, visto que as células CD271⁺ produziram significativamente mais matriz mineralizada que as células CD271⁻ e FEV. Em adição, ao comparar o fenótipo das frações celulares (CD271⁺ e CD271⁻) sem cultivo celular com marcadores associados à pericitos por expressão gênica e/ou western blotting observou-se que existem algumas diferenças entre estas células, sendo que células CD271⁺ apresentam algumas similaridades com pericitos. Apesar de ambas as frações celulares apresentarem transcritos do gene *CD140b*, apenas a fração CD271⁺ apresentou a proteína pelas análises de *western blotting*. De maneira semelhante, o gene *NESTIN* também se mostrou mais expresso em células CD271⁺ quando comparado as células CD271⁻. Investigando-se a localização *in situ* destes marcadores por imunofluorescência no tecido adiposo, as fotomicrografias obtidas por microscopia confocal sugerem que células CD34⁺ estejam localizadas na túnica adventícia de grandes vasos enquanto que células CD271⁺ parecem estar situadas justapostas ao endotélio. Em conclusão, embora a fração celular CD271⁺ seja enriquecida com CTMs na medula óssea, nossos resultados demonstram que, no tecido adiposo, células com características de CTMs *in vitro* estão distribuídas entre ambas as populações celulares CD271⁺ e CD271⁻, o que demonstra que a origem do tecido pode alterar o fenótipo das CTMs. Além disso, demonstramos que existem algumas diferenças fenotípicas entre as células CD34⁺CD271⁺ e CD34⁺CD271⁻ que poderão auxiliar na elucidação da identidade e localização *in vivo* das CTMs no tecido adiposo.

Palavras-chaves: células estromais mesenquimais multipotentes, CD271, tecido adiposo, *sorting* celular, células-tronco.

ABSTRACT

Beckenkamp, L. R. **Characterization of mesenchymal stromal cells from adipose tissue selected by differential expression of molecular marker CD271**. 2015. Dissertação (mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are subject of great interest in the scientific community, mainly for their potential to secrete several molecules with anti-apoptotic, immunoregulatory and angiogenic properties that might be benefic for regenerative medicine. However, the great heterogeneity of these cells together with the lack of a specific marker to define the MSCs has impaired the compress your biology and better clinical application. The large number of different markers has been associated with MSCs, but if they can be employed to all types of the MSCs, regardless of their primary source, remains unknown. To test this hypothesis, this study evaluated if the bone marrow MSCs' marker CD271 is also effective on enriching adipose-derived MSCs (ATSCs). Freshly isolated cells from the stromal-vascular fraction (SVF) from human adipose tissue were sorted based on CD271 (CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD271⁺ and CD45⁻CD31⁻CD34⁺CD271⁻) and assays in vitro were conducted to verify whether these cells are endowed with MSCs' characteristics. Both cell populations and SVF displayed clonogenic capacity, fibroblastic morphology, multipotential differentiation and immunophenotype from MSCs (CD90⁺, CD73⁺, CD31⁻ e CD45⁻). When evaluated the proliferation potential among cells fractions there isn't differences in population doubling, however, both CD271⁺ and CD271⁻ cells were more proliferative than SVF. Furthermore, CD271⁻ ATSCs are 2-fold enrichment of fibroblastic colonies (CFU-Fs) compared to SVF and cells CD271⁺. When compared the differentiation capacity into mesodermal lineages, the data of osteogenic differentiation suggest that the antigen CD271 might be involved with signaling pathways that increase mineralization capacity from MSCs, whereas CD271⁺ cells produced more mineralized matrix than CD271⁻ cells and SVF. In addition, when compared the imunophenotypic of freshly isolated cells fractions (CD271⁺ and CD271⁻) with markers associates to pericytes by gene expression and western blotting, the analyses reveals that there are some differences among CD271⁺ and CD271⁻ cells, which the first showed some similarities with pericytes. Even though both cell fractions revealed transcripts of the gene *CD140b*, only CD271⁺ fraction exhibited the protein in western blotting. Likewise, the gene *NESTINA* was more expressed in CD271⁺ cells than CD271⁻ cells. Indeed, the immunoflourescence staining in situ suggest that CD34⁺ cells are localized in tunica adventitia from large blood vessels and CD271⁺ cells are situated near the endothelium. Taken together, the results reveals that although the CD271⁺ cell fraction is enriched with MSCs in bone marrow, in adipose tissue cells with MSCs' traits are distributed between CD271⁺ and CD271⁻ cells. Furthermore, we suggest that there is a difference among these fractions (CD271⁺ and CD271⁻) that may help on the elucidation of MSCs' native identity and your localization in vivo on adipose tissue.

Keywords: multipotential mesenchymal stromal cells, CD271, adipose tissue, cell sorting, stem cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblastóides
CTEh	Célula-tronco embrionária humana
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula estromal mesenquimal multipotente
CTM-MO	Célula estromal mesenquimal multipotente da medula óssea
CTM-TA	Célula estromal mesenquimal multipotente do tecido adiposo
DAPI	40,6-diamino-2-fenilondole
DMEM-LG	Meio essencial modificado de Dulbecco baixa concentração de glicose
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FACS	Separação celular ativado por fluorescência
FEV	Fração estromal vascular
HCFMRP/USP	Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno histocompatibilidade de classe II
IFATS	Federação Internacional para terapêuticas adiposas
IFN-γ	Interferon- γ
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1 β
IL-8	Interleucina-8
ISAPS	Sociedade Internacional de cirurgia plástica
ISCT	Sociedade Internacional de células-tronco
ITS	Insulina-transferrina-selênio
K₂CO₃	Carbonato de potássio
KCl	Cloreto de potássio
KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
LINGO-1	do inglês, leucine rich repeat and Ig domain containing 1
LPL	Lipoproteína lipase
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos-1

MgCl₂	Cloreto de magnésio
Na₂HPO₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NG2	Antígeno glia/neural 2
NGF	Fator de crescimento neural
NGFR	Receptor do fator de crescimento neural
NH₄Cl	Cloreto de amônio
NOGO-R	Receptor NOGO
NT-3	Neurotrofina-3
NT-4/5	Neurotrofina-4/5
P75NTR	Receptor da neurotrofina p75
PBS	Solução salina tamponada de fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFR	Receptor fator de crescimento derivado de plaquetas
RPMI	Meio instituto memorial Roswell Park
SA-β-Gal	Beta-galactosidase associada a senescência
SFB	Soro fetal bovino
SiRNA	Ácido ribonucléico de interferência
SORT-1	Sortilina-1
TA	Tecido adiposo
TDP	Tempo de duplicação populacional
TGF-β3	Fator de crescimento transformante- β3
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
Trks	Receptor da tropomiosina quinase
αMEM	Meio essencial mínimo-alfa
αSMA	Alfa-actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O processo mesengênico.	20
Figura 2: Composição celular do tecido adiposo	24
Figura 3: Composição celular da adventícia vascular	26
Figura 4: Expressão de CD271 em células-tronco presentes em diferentes estágios do desenvolvimento.....	28
Figura 5: Imagem das amostras de tecido adiposo abdominal intacto e processado.....	48
Figura 6: Perfil imunofenotípico da FEV não cultivada.	50
Figura 7: Análise representativa da co-expressão dos marcadores de superfície celular CD34, CD146 e CD31 na FEV	51
Figura 8: Viabilidade celular da FEV	52
Figura 9: Esquema representativo da estratégia de <i>sorting</i> celular utilizada para separação das frações celulares CD45 ^{neg} CD31 ^{neg} CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e CD45 ^{neg} CD31 ^{neg} CD34 ^{pos} CD271 ^{pos}	53
Figura 10: Pureza das amostras submetidas ao processo de <i>sorting</i> celular	54
Figura 11: Expressão gênica dos marcadores alvos do <i>sorting</i> e expressão da proteína CD146..	55
Figura 12: Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) geradas pelas frações celulares e FEV.	56
Figura 13: Frequência de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs).	56
Figura 14: Características morfológicas das frações celulares e FEV após cultura celular.....	57
Figura 15: Análise imunofenotípica das frações celulares e FEV cultivadas.	59
Figura 16: Potencial proliferativo das frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e FEV.	60
Figura 17: Análise qualitativa da senescência celular das populações celulares.	61
Figura 18: Diferenciação adipogênica das frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e FEV	62
Figura 19: Diferenciação osteogênica das frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e FEV.	63
Figura 20: Diferenciação em condrócitos das frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e FEV.	64
Figura 21: Localização <i>in situ</i> dos marcadores CD34, CD31 e CD271.....	65
Figura 22: Expressão gênica dos marcadores associados à pericitos e análise proteica do marcador CD140B.....	66

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido	93
---	----

LISTA DE ANEXO

Anexo A - Termo de aprovação do comitê de ética em pesquisa.....	98
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados estatísticos dos procedimentos de cirurgia plástica	23
Tabela 2: Relação das sondas TaqMan utilizadas nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvos.	39
Tabela 3. Lista de anticorpos primários utilizados para as análises de <i>western blotting</i>	45
Tabela 4. Características das amostras coletadas.	48
Tabela 5. Porcentagem de cada população celular avaliada durante o <i>sorting</i> celular.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Células-tronco: revisando a história e conceitos	19
1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes	19
1.3 Tecido adiposo: uma fonte promissora de CTMs	23
1.4 Caracterização das CTMs-TA: a identidade <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	25
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 Principais reagentes.....	34
3.2 Considerações éticas	36
3.3 Obtenção das amostras de tecido adiposo e casuística.....	36
3.4 Isolamento da fração estromal vascular (FEV)	36
3.5 Separação das populações celulares por separação celular ativado por fluorescência (FACS)	37
3.6 Análise da pureza do <i>sorting</i> celular	38
3.7 Quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs)	39
3.8 Cultivo e expansão celular	39
3.9 Imunofenotipagem da FEV e das frações celulares obtidas do <i>sorting</i>	40
3.10 Avaliação da cinética de crescimento celular <i>in vitro</i>	40
3.11 Avaliação qualitativa do estado de senescência celular	41
3.12 Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos <i>in vitro</i>	41
3.13 Quantificação dos corantes Oil red e Alizarin red	43
3.14 Análise proteica – extração, eletroforese e <i>western blotting</i>	43
3.15 Microscopia confocal	45
3.16 Metodologia de análise dos resultados	46

4. RESULTADOS	48
4.1 Características das amostras estudadas	48
4.2 Caracterização imunofenotípica da FEV do tecido adiposo	49
4.3 Identificação e separação das populações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e CD34 ^{pos} CD271 ^{neg}	51
4.4 Confirmação da pureza celular ao término do <i>sorting</i> celular	53
4.5 Células CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} são mais clonogênicas que células da FEV e CD34 ^{pos} CD271 ^{pos}	55
4.6 Células da FEV e frações celulares CD34 ^{pos} CD27 ^{pos} / CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} apresentam características de CTMs em cultura e passam a expressar marcadores associados a pericitos <i>in vitro</i>	57
4.7 As frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} e CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} exibem potencial proliferativo superior a FEV	59
4.8 A FEV e células CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} / CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} apresentam potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico e condrogênico	61
4.9 Frações celulares CD34 ^{pos} CD271 ^{pos} e CD34 ^{pos} CD271 ^{neg} não cultivadas apresentam diferenças à nível de expressão gênica e proteica e podem apresentar distintas localizações <i>in vivo</i>	64
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO.....	81
7. BIBLIOGRAFIA.....	83

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco: revisando a história e conceitos

O termo células-tronco (CT) originou-se no final do século 19 e atualmente é empregado para descrever a habilidade que algumas células possuem de autorrenovação por tempo ilimitado ou prolongado e de dar origem a pelo menos um tipo celular em estágio de diferenciação mais avançado (revisado por WEISSMAN, 2000).

Acredita-se que diferentes tecidos embrionários e adultos contêm células-tronco, as quais seriam responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração de tecidos e órgãos (revisado por UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). A classificação das CT é feita a partir de seu potencial de diferenciação e/ou origem, sendo as células totipotentes aquelas que são capazes de originar todas as células de um organismo e as células pluripotentes aquelas que originam as células dos três folhetos embrionários, encontradas apenas em tecidos de origem embrionária. As CT multipotentes são características de tecidos fetais e adultos, e são restritas em seu potencial de diferenciação, gerando três ou mais linhagens celulares (revisado por WEISSMAN, 2000).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) foram as primeiras a serem descritas e são as mais bem caracterizadas em humanos. Outras populações de células-tronco/progenitoras somáticas também já foram descritas em diferentes tecidos, como as neurais (MCKAY, 1997), endoteliais (ASAHARA, 1997), epiteliais (SLACK, 2000) e mesenquimais (CAPLAN, 1991; FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966; PITTENGER, 1999).

Baseado no modelo da hematopoese, no qual as CTH atuam como células multipotentes que dão origem às diferentes células do sangue, alguns pesquisadores passaram então a investigar as células mesenquimais como responsáveis pelo processo mesengênico, com o papel de originar todos os tecidos mesenquimais do organismo (CAPLAN, 1991; PITTENGER, 1999; PROCKOP, 1997).

1.2 Células estromais mesenquimais multipotentes

As primeiras evidências diretas que a medula óssea possuía células precursoras mesenquimais não hematopoiéticas foram apresentadas por Friedenstein e colaboradores

(1966), que na ocasião demonstraram o potencial de células da medula óssea em se diferenciar em osso após transplante *in vivo*. Em uma série de estudos subsequentes, este grupo demonstrou que essas células possuíam capacidade de adesão ao vidro e, quando plaqueadas em baixas densidades, eram capazes de originar colônias de células fibroblastóides. Por esta razão, foram primeiramente denominadas unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Inúmeras pesquisas subsequentes revelaram que estas células seriam capazes de originar além de osso, outros tecidos mesenquimais como cartilagem e tecido adiposo *in vivo* e *in vitro* (revisado por BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

Ainda que estes trabalhos indicassem que a medula óssea possuía um segundo tipo de célula-tronco diferente das CTH, foi somente em 1991 que Arnold Caplan propôs que esta população de células cultivadas *ex vivo* seriam “células-tronco mesenquimais” (CTM), com a premissa que tais células seriam as progenitoras para todos os tecidos conectivos de origem mesodérmica *in vivo* (Figura 1) (CAPLAN, 1991).

Figura 1: O processo mesengênico. Esta figura representa a hipótese do processo mesengênico em que as CTM originariam todos os tecidos mesodérmicos *in vitro* ou *in vivo* (adaptado de SINGER; CAPLAN, 2011).

A multipotência das CTMs, aliada a sua habilidade de secretar inúmeras moléculas com propriedades antiapoptóticas, imunorregulatórias e angiogênicas implicaram em grande interesse na sua utilização para a medicina regenerativa. Dentre as inúmeras potenciais

aplicações, pesquisadores buscavam utilizar CTMs para a regeneração de tecidos como os do sistema esquelético e para o tratamento de doenças autoimunes (revisado por UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). Contudo, apesar da rápida notoriedade conquistada pelas CTMs, elas constituíam *in vitro* uma população heterogênea, com células em diferentes estágios de diferenciação e com apenas um pequeno número possuindo realmente a capacidade de autorrenovação e diferenciação comprovada *in vivo*, mostrando que a denominação “célula-tronco” seria inapropriada para designar esta população de células estromais cultivadas (HORWITZ *et al.*, 2005).

Diante das inúmeras críticas e com o intuito de padronizar a identidade das células mesenquimais, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, *International Society for Cellular Therapy*) propôs novos critérios e definições para estas células, sendo então chamadas de “células estromais mesenquimais multipotentes”, enquanto o termo “célula-tronco mesenquimal” deveria ser utilizado apenas para descrever as células com características de autorrenovação e diferenciação *in vivo* comprovada. Em adição, a sigla CTM continuaria a ser utilizada para as populações cultivadas *ex vivo*. Na ocasião, a ISCT definiu ainda um conjunto de propriedades para auxiliar a identificação das CTMs *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006):

- 1) Células com capacidade de aderência ao plástico quando cultivadas em condições padrões;
- 2) Possuir potencial de diferenciação *in vitro* nas três linhagens mesodermis (adipogênica, condrogênica e osteogênica);
- 3) Apresentar alta porcentagem de células positivas para os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e baixa porcentagem ou ausência para os marcadores hematopoiéticos CD45, CD19 ou CD79, CD14 ou CD11b, e HLA-DR.

Apesar da contribuição deste conjunto de propriedades na caracterização das CTMs cultivadas, a existência de um marcador exclusivo para elas continua desconhecida. Visto a grande heterogeneidade ainda observada nestas células *in vitro*, a necessidade de critérios mais restritivos para a sua caracterização torna-se necessária para um melhor entendimento da sua biologia e para que estudos clínicos possam ser mais bem estruturados, evitando vieses devido ao uso de diferentes populações celulares. Para tanto, a investigação de novos marcadores tanto *in vitro* quanto *in vivo* torna-se imprescindível, principalmente a fim de

delinear as diferenças funcionais dentro desta população heterogênea. Estas medidas permitirão aperfeiçoar e ampliar as aplicações terapêuticas, permitindo a seleção de células que possuam maior potencial de diferenciação ou ainda maior secreção de moléculas próprias para o tratamento de determinadas doenças, melhorando a eficácia clínica das terapias celulares.

A partir da população heterogênea de CTMs cultivadas, alguns trabalhos já relataram o isolamento de subpopulações celulares com propriedades específicas que podem ser úteis na aplicação clínica. Kuçi e colaboradores (2010), por exemplo, reportaram que CTMs da medula óssea (CTMs-MO) imunoselecionadas para o marcador CD271, um receptor de neurotrofinas que será mais bem descrito nos próximos capítulos, secretam uma quantidade superior de moléculas com capacidade imunossupressora (IL-10), quimioatrativa (MCP-1, IL-8, IL-1 β) e promotora do enxerto linfohematopoiético (IL-2) em relação às CTMs obtidas por adesão ao plástico. Estas características podem ser favoráveis para o sucesso do tratamento de doenças autoimunes, degenerativas e para complicações relacionadas ao transplante de CTHs, como a doença do enxerto-contra-o-hospedeiro (GVHD).

Embora as CTMs tenham sido obtidas apenas da medula óssea durante anos, hoje se postula que estas células ocupam o espaço perivascular e que, portanto, residem em praticamente todos os órgãos e tecidos vascularizados do organismo. De fato, as CTMs já foram isoladas de uma ampla variedade de tecidos como tecido adiposo, tendão, pele, osso, músculo, cérebro, fígado, rins, pulmões, baço, pâncreas, timo, membrana sinovial, placenta, fluido amniótico e sangue de cordão umbilical (COVAS *et al.*, 2008; CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Ainda que existam diversas fontes para obtenção das CTMs, a maioria delas requer procedimentos invasivos de coleta e a quantidade de células obtidas é pequena, o que restringe sua utilização clínica. Entretanto, o tecido adiposo mostra-se promissor devido à facilidade de obtenção de grandes quantidades de material por meio de métodos minimamente invasivos e bem estabelecidos na prática clínica, como as cirurgias de lipoaspiração (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007; ZUK *et al.*, 2001).

As cirurgias estéticas e de reparação vem aumentando consideravelmente no Brasil nos últimos anos, fazendo este ocupar a primeira posição no ranking entre os países que mais realizaram tais procedimentos em 2013 no mundo (tabela 1A). Além disso, dentre as cirurgias plásticas feitas no Brasil as lipoaspirações lideram a lista de procedimentos cirúrgicos, totalizando mais de 227 mil cirurgias realizadas (Sociedade Internacional de cirurgia estética -

<http://www.isaps.org> – acesso em 14 de setembro de 2014) (Tabela 1B). Portanto, considerando este cenário de grande disponibilidade de amostra por meios pouco invasivos e que os tecidos remanescentes destas cirurgias são descartados, o tecido adiposo torna-se uma importante fonte para a terapia celular e estudos da biologia das CTMs.

Tabela 1. Dados estatísticos dos procedimentos de cirurgia plástica no mundo (A) e das especialidades realizadas no Brasil em 2013 (B)*.

*Adaptado de Sociedade Internacional de cirurgia estética (ISAPS) - <http://www.isaps.org>.

A) Procedimentos de cirurgia plástica total			
Ranking*	País		% total no mundo
1	Brasil	1.491.721	12,9%
2	EUA	1.452.356	12,5%
3	México	486.499	4,2%
4	Alemanha	343.479	3,0%
5	Colômbia	291.954	2,5%
6	Venezuela	231.742	2,0%
7	Espanha	213.297	1,8%
8	Itália	182.680	1,6%
9	Argentina	120.652	1,0%
10	Irã	118.079	1,0%
* Os rankings são baseados apenas em relação aqueles países no qual dados suficientes de respostas da pesquisa foram recebidos e considerados como representativos.			

B) Brasil	
Procedimentos cirúrgicos	
Lipoaspiração	227.896
Aumento de mama	226.090
Elevação de mama	139.835
Abdominoplastia	129.601
Elevação de pálpebras	116.849

1.3 Tecido Adiposo: uma fonte promissora de CTMs

O tecido adiposo (TA) é composto de adipócitos maduros, que constituem mais de 90% do volume do tecido, e de um estroma de suporte, a fração estromal vascular (FEV), constituída de fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais, macrófagos e monócitos residentes, linfócitos e pré-adipócitos ou células-tronco adiposas (revisado por OUCHI *et al.*, 2011) (Figura 2).

Figura 2: Composio celular do tecido adiposo (adaptado de OUCHI *et al.*, 2011).

Zuk e colaboradores (2001 e 2002) foram os primeiros a reportar uma populao de células do lipoaspirado humano que eram aderentes ao plástico e possuíam capacidade de diferenciao em múltiplas linhagens quando estimuladas apropriadamente. Estas células foram definidas como células estromais mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo (CTMs-TAs) e eram muito semelhantes às CTMs-MO, uma vez que estudos de expressão gênica demonstraram que ambas as populaoes celulares apresentaram apenas 1% de genes diferencialmente expressos (LEE *et al.*, 2004).

Em estudos posteriores *in vitro*, mostrou-se que além de se diferenciar nas linhagens mesodérmicas como adipócitos (ZUK *et al.*, 2002), condrócitos (ERICKSON *et al.*, 2002), osteócitos (DRAGOO *et al.*, 2003) e miócitos (MIZUNO *et al.*, 2002), elas também poderiam diferenciar em linhagens de outros folhetos germinativos como neurnios (SAFFORD *et al.*, 2002) e hepatócitos (SEO *et al.*, 2005) quando devidamente estimuladas. No entanto, evidências da diferenciao não mesodérmica de CTMs-TA *in vivo* são praticamente inexistentes.

Dentre as fontes de tecido adiposo no organismo, a região subcutânea  a que contm a maior porcentagem de CTMs-TA comparado a outros sítios anatmicos (JOE *et al.*, 2009). A técnica para extrao destas células  baseada na digestão enzimática do tecido, seguido da centrifugao para separao dos adipócitos maduros e cultivo da FEV por aderência ao plástico (RODBELL, 1964; ZUK *et al.*, 2001). A quantidade de células obtidas, assim como

em outros tecidos, pode variar de acordo com a idade, sexo, localização anatômica, tipo de tecido (tecido adiposo branco ou marrom) e espécie (revisado por SCHÄFFLER; SCHÖLMERICH; BÜCHLER, 2005). Contudo, mesmo com estas variáveis, as CTMs-TA ainda são mais abundantes que as raras CTMs-MO, sendo possível obter 500 vezes mais células nucleadas que a MO, das quais aproximadamente 5% são capazes de gerar CFU-Fs, enquanto na medula óssea estas células correspondem apenas a 0,001%-0,01% (revisado por BOURIN *et al.*, 2013).

Devido à grande atenção que estas células ganharam nas últimas décadas como importante fonte celular para aplicações clínicas, as CTMs-TA também vêm sendo alvo de inúmeras pesquisas na tentativa de elucidar sua exata localização *in vivo*, e conseqüentemente o perfil imunofenotípico correspondente a estas células. Embora as CTMs-TA sejam mais homogêneas que a FEV, elas ainda apresentam certo grau de heterogeneidade e, portanto, apenas uma fração destas células realmente satisfaz todos os critérios de CTMs “genuínas”. Além disso, até hoje ainda não foi totalmente esclarecido se, apesar das similaridades entre as CTMs-MO e CTMs-TA, os mesmos marcadores de superfície celular utilizados primeiramente para caracterizar as CTMs-MO podem ser aplicados a outras fontes de CTMs (revisado por LV *et al.*, 2014).

1.4 Caracterização das CTMs-TA: a identidade *in vivo* e *in vitro*

As definições assumidas pela ISCT e compartilhadas por muitos trabalhos levaram a premissa de que as CTMs isoladas de diferentes tecidos compartilhariam as mesmas propriedades, independente de seu precursor original *in vivo*. No entanto, esta questão levou pesquisadores a investigar em CTMs-TA a expressão de marcadores de superfície celular que foram primeiramente identificados nas CTMs-MO. Estes estudos demonstraram que, embora mais de 90% das moléculas de superfície analisadas fossem expressas em ambas as populações, elas não podem ser consideradas idênticas quanto ao perfil imunofenotípico (revisado por GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007).

A glicoproteína CD34, por exemplo, um marcador conhecido de células hematopoiéticas (CIVIN; STRAUSS; BROVALL, 1984) e endoteliais (ASAHARA, 1997; FINA; MOLGAARD, 1990), é também expressa em CTMs-TA em passagens recentes, e, portanto, trata-se de um importante marcador de células-tronco/progenitoras no tecido adiposo (MIRANVILLE *et al.*, 2004; YOSHIMURA *et al.*, 2006). No entanto, este marcador não é

expresso por CTMs-MO (revisado por BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008). Similarmente a expressão do CD54 é observada apenas nas CTMs-TA, enquanto o CD106 é observado nas CTMs-MO e não nas CTMs-TA (revisado por STRIOGA *et al.*, 2012).

Além das diferenças imunofenotípicas observadas em CTMs de diferentes tecidos, a sua exata localização e identidade *in vivo* também vêm sendo alvo de intenso debate nos últimos anos. Embora a existência de um nicho perivascular para as CTMs seja um consenso entre os pesquisadores, a hipótese que elas correspondam a pericitos *in vivo* vem sendo questionada. Diferentes trabalhos têm sugerido que CTMs podem não originar de pericitos ($CD146^+CD34^-$), mas de um conjunto de células adventícias distintas histologicamente e fenotipicamente ($CD146^-CD34^+$), as quais residem na camada externa da parede de vasos sanguíneos e assumem características de CTMs ao longo da cultura *in vitro* (revisado por HU; XU, 2011) (Figura 3).

Figura 3: Composição celular da adventícia vascular. Diferente da camada íntima e média, as quais são compostas de células endoteliais e células musculares lisas, respectivamente, a adventícia é composta por uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo fibroblastos, células progenitoras residentes, células imunomodulatórias (células dendríticas, macrófagos, linfócitos T), *vasa vasorum* e nervos adrenérgicos. Abreviações: EEL – lâmina elástica externa; IEL – lâmina elástica interna (retirado e adaptado de STENMARK *et al.*, 2013).

Esta camada adventícia foi considerada durante anos como um componente inativo dos vasos sanguíneos, servindo apenas como um suporte estrutural da túnica média. No

entanto, hoje se sabe que ela possui células que podem participar no remodelamento vascular e desenvolvimento de doenças vasculares (revisado por CORSELLI *et al.*, 2010).

Estudos com as CTMs-TA vêm fortalecendo a teoria de uma origem adventícia para as CTMs. Yoshimura e colaboradores (2006) em estudos pioneiros para identificação do fenótipo das CTMs-TA observaram a existência de diferentes populações celulares na FEV as quais podem ser distinguidas pelo perfil de expressão de CD34 e CD146, sendo o marcador CD146 uma glicoproteína de superfície celular presente em pericitos (CRISAN *et al.*, 2008). Após o fracionamento e análise das subpopulações os autores propuseram que as verdadeiras CTMs-TA apresentam o perfil imunofenotípico CD34^{pos}CD146^{neg}CD31^{neg}CD45^{neg}, e que ele é distinto daqueles dos pericitos (CD34^{neg}CD146^{pos}CD31^{neg}CD45^{neg}) e das células progenitoras de pericitos (CD34^{pos}CD146^{pos}CD31^{neg}CD45^{neg}) (YOSHIMURA *et al.*, 2006).

De fato, a discussão entre a verdadeira identidade das CTMs-TA e sua origem é vasta na literatura, com alguns autores defendendo a hipótese de um fenótipo de pericito para elas (Traktuev *et al.*, 2008; Zannettino *et al.*, 2008), enquanto outros relatam a existência de dois tipos celulares distintos no tecido adiposo, sendo as verdadeiras CTMs localizadas na túnica adventícia (CORSELLI *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2008; MAUMUS *et al.*, 2011; ZIMMERLIN *et al.*, 2010).

Na tentativa de obter mais respostas que pudessem solucionar estas controvérsias referentes à identidade *in vivo* das CTMs-TA, a origem embrionária do tecido adiposo também passou a ser investigada com a finalidade de identificar marcadores e vias que pudessem auxiliar na caracterização destas células (BILLON; MONTEIRO; DANI, 2008; PHINNEY; SENSEBÉ, 2013).

Estudos recentes da ontogenia das CTMs-TA postulam uma origem neuroectodermal para estas células, sugerindo que a mesoderme não seria a única fonte de células mesenquimais no tecido adiposo (BILLON; MONTEIRO; DANI, 2008). Takashima e colaboradores (2007) demonstraram que células neuroepiteliais SOX1^{pos} de camundongos originam CTMs com capacidade de gerar adipócitos. Mais recentemente, um estudo propôs que CTMs da medula óssea de camundongo expressam o marcador de células neuroepiteliais nestina e são capazes de gerar tecido ósseo heterotópico *in vivo* (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2010).

Embora a maioria dos estudos demonstre a contribuição da crista neural para a formação do tecido adiposo crânio-facial (BILLON *et al.*, 2007; TAKASHIMA *et al.*, 2007), células oriundas da crista neural localizadas no tronco dos embriões também foram capazes de

originar CTMs *in vitro*, com capacidade de diferenciação adipogênica (BILLON *et al.*, 2007).

Estas evidências demonstram que a crista neural possui células-tronco migratórias multipotentes, sendo capazes de se diferenciar também nos tecidos mesodérmicos durante o desenvolvimento. Contudo, ainda não está claro se estas células realmente persistem em tecidos adultos. De qualquer modo, a hipótese que as CTMs possam originar-se também da crista neural através da transição epitélio-mesenquimal, abre caminho para a análise de outros marcadores para as CTMs-TA.

Um dos marcadores associados às linhagens neuroectodermas e da crista neural é o CD271, o qual também identifica células-tronco/progenitoras em diferentes tecidos e órgãos. Diversos estudos reportam a utilização do CD271 isoladamente ou em combinação com outros epítomos de superfície celular para a identificação de células com diferentes graus de comprometimento em tecidos embrionários e adultos (Figura 4).

Figura 4: Expressão de CD271 ($p75^{NTR}$) em células-tronco presentes em diferentes estágios do desenvolvimento. Células-tronco positivas para $p75^{NTR}$ estão presentes em muitos modelos celulares com diferentes graus de comprometimento. A fusão de gametas e formação de um zigoto diplóide determina o estabelecimento de um embrião multicelular. Células da massa interna do blastocisto apresentam transcritos de $p75^{NTR}$. Células positivas para $p75^{NTR}$ estão presentes em células-tronco da crista neural (representados durante o estágio de neurulação) bem como em muitos tecidos pós-natais e fetais. É importante ressaltar que outros tipos celulares além dos tecidos derivados da crista neural apresentam subpopulações de células-tronco positivas para $p75^{NTR}$, demonstrando uma origem mais primitiva destas células (retirado e adaptado de TOMELLINI *et al.*, 2014).

O CD271, também conhecido como receptor de neurotrofinas $p75$ ($p75^{NTR}$) ou receptor do fator de crescimento neural (NGFR), é um receptor de neurotrofinas e pró-

neurotrofinas as quais são uma família de fatores de crescimento que estimulam células neurais e desempenham inúmeras atividades através dos receptores de tropomiosina quinase (Trks) (MORRISON *et al.*, 1999; TOMELLINI *et al.*, 2014). Esta capacidade de interação com inúmeras neurotrofinas, como fator de crescimento neural (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT3) e neurotrofina 4/5 (NT4/5), permite que este receptor responda a diversas funções celulares como sobrevivência celular, apoptose, mielinização, regulação do ciclo celular, invasão e migração celular e diferenciação de células progenitoras (revisado por TOMELLINI *et al.*, 2014).

As primeiras evidências de CTMs positivas para CD271 foram reportadas na década de 80 por um grupo de pesquisadores que demonstraram a presença deste marcador nas três camadas germinativas (mesodermal, endodermal e ectodermal), e que este poderia atuar como um fator chave na regulação do estado indiferenciado das células (THOMSON *et al.*, 1988). Mais recentemente, CTMs-MO CD271^{pos} foram caracterizadas como um grupo de células com alto potencial de formação de CFU-F, alta capacidade proliferativa e de diferenciação em adipócitos e osteócitos (QUIRICI *et al.*, 2002). Estes resultados junto a estudos posteriores fizeram do CD271 um marcador amplamente aceito para células progenitoras mesenquimais na medula óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BATTULA *et al.*, 2009; MABUCHI *et al.*, 2013; TORMIN *et al.*, 2011).

A partir disto diferentes grupos de pesquisa passaram a investigar o potencial do CD271 em identificar CTMs em outras fontes celulares, como tecido adiposo (QUIRICI *et al.*, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2007), sangue periférico (AHRARI *et al.*, 2013), pele (WONG *et al.*, 2006), polpa dental (LUUKKO *et al.*, 1996) e sangue de cordão umbilical (BRACCI-LAUDIERO *et al.*, 2003).

A identificação do CD271 como marcador de CTMs no tecido adiposo iniciou-se com pesquisadores isolando células de camundongo CD271^{pos} que possuíam maior capacidade de diferenciação nas linhagens mesodérmicas quando comparada às populações negativas para tal marcador (YAMAMOTO *et al.*, 2007). Pouco tempo depois, Quirici e colaboradores (2010) isolaram CTMs CD34^{pos} e CD271^{pos} no tecido adiposo humano e investigaram a capacidade destas duas populações quanto as características de CTMs *in vitro*, observando que a população celular CD271^{pos} tinha capacidade clonogênica e de diferenciação nas três linhagens mesodérmicas superior a população CD34^{pos}. No entanto, o marcador CD34 é amplamente expresso no tecido adiposo e praticamente todas as células CD271^{pos} são também CD34^{pos}, sendo difícil distinguir neste caso se os resultados obtidos são decorrência da

seleção do marcador CD271 ou CD34.

Devido a estes resultados inconclusivos e a falta de mais estudos investigando em maiores detalhes o papel do CD271 no tecido adiposo este trabalho propôs avaliar a função deste marcador de superfície celular em conjunto com o CD34 nas células obtidas da FEV, partindo da hipótese que o CD271 é um forte candidato para identificação de células progenitoras mesenquimais. Para tanto, células estromais do tecido adiposo foram primeiramente selecionadas com base na expressão de CD271 (CD271^{pos} e CD271^{neg}) por *sorting* celular. Em seguida, ambas as populações e a FEV foram extensivamente avaliadas quanto às características típicas de CTMs *in vitro*, além de sua localização *in situ*, com o objetivo de elucidar a identidade das CTMs-TA *in vivo*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar diferentes populações celulares da fração estromal vascular do tecido adiposo selecionadas a partir da expressão diferencial do marcador de superfície celular CD271, avaliando seu potencial como marcador de células progenitoras mesenquimais no tecido adiposo.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar populações celulares da fração estromal vascular do tecido adiposo por meio de aderência ao plástico e *sorting* celular utilizando os seguintes marcadores de superfície: CD31^{neg}CD45^{neg}CD271^{pos}CD34^{pos} e CD31^{neg}CD45^{neg}CD34^{pos}CD271^{neg};
- Estabelecer um perfil imunofenotípico para as populações obtidas em ambos os métodos de seleção, avaliando ainda a capacidade dessas células quanto à proliferação, formação de colônias fibroblastóides (CFU-F) e o potencial de diferenciação nas linhagens mesodérmicas (osteócitos, adipócitos e condrócitos);
- Avaliar e comparar a influência do cultivo celular sobre o fenótipo das populações celulares;
- Analisar o perfil de expressão gênica das populações celulares obtidas sem cultivo *in vitro* para genes referentes à CTMs e pericitos;
- Identificar *in situ* a localização dos marcadores CD34, CD31 e CD271 nos vasos sanguíneos do tecido adiposo.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Principais reagentes

Solução salina tamponada de fosfato (PBS 1x): para volume de 1L água MilliQ suplementar com 137mM NaCl, 10mM tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) e 2,7mM KCl, pH 7,2.

Solução tampão lise de eritrócitos: 500mL de PBS 1X suplementado com 154,9mM NH_4Cl , 7,24 mM K_2CO_3 e 0,12mM EDTA, pH7,2.

Solução tampão para *sorting*: 500mL de PBS 1X suplementado com 1mM EDTA, 25mM HEPES e 1% albumina, pH 7,2.

Meio de cultivo das CTMs: Meio DMEM-LG (Gibco) suplementado com 10% em volume de Soro Fetal Bovino (Hyclone), 26mM Bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10mM HEPES (Sigma), 100U/mL Penicilina (Gibco), 100µM Estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

Meio de digestão enzimática do tecido adiposo: Meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 26mM Bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 25mM HEPES (Sigma), 100U/mL Penicilina (Gibco), 100µM Estreptomicina (Gibco), 0,1% Colagenase Tipo 1 (Worthington), pH 7,2.

Meio de inativação enzimática: Meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% em volume de Soro Bovino Fetal (Hyclone), 26mM Bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 25mM HEPES (Sigma), 100U/mL Penicilina (Gibco), 100µM Estreptomicina (Gibco), pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação adipogênica: Meio DMEM-LG (Gibco) suplementado com 10% em volume de Soro Fetal Bovino (Hyclone), 26mM Bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10mM HEPES (Sigma), 100U/mL Penicilina (Gibco), 100µM Estreptomicina (Gibco), 10µM Dexametasona (Sigma), 10µg/mL Insulina (Sigma), 200mM Indometacina (Sigma), pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação osteogênica: Meio α -MEM (Gibco) suplementado com 10% em volume de Soro Fetal Bovino (Hyclone), 26mM Bicarbonato de sódio (Fisher Scientific), 10mM HEPES (Sigma), 100U/mL Penicilina (Gibco), 100µM Estreptomicina (Gibco), 0,1µM Dexametasona (Decadron injetável), 200µM de ácido ascórbico (Sigma), 10mM β -glicerolfosfato (Sigma), pH 7,2.

Meio indutor de diferenciação condrogênica: Meio DMEM-LG (Gibco) sem acréscimo de

soro fetal bovino suplementado com 1mM piruvato de sódio (Sigma), 1μM Dexametasona (Sigma), 0,3mM de ácido ascórbico (Sigma), ITS 1X (Insulina-transferrina-selênio) (Sigma), 40μg/ml L-prolina (Sigma) e 10ng/ml de TGF-β3 (PrepoTech).

Solução β-Gal (atividade da enzima β-galactosidases): 40mM fosfato sódio (dibásico), 40mM ácido cítrico, 150mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM ferrocianeto de potássio, 5mM ferricianeto de potássio (todos os reagentes SIGMA) e 1mg/ml do substrato X-gal.

3.2 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - HCFMRP/USP, **CAAE:** 13724813.3.0000.5440.

O material biológico e amostras remanescentes deste projeto foram conservados e estocados no “Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular” do Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP (processo HCRP 920/2009).

3.3 Obtenção das amostras de tecido adiposo e casuística

O tecido adiposo foi obtido de amostras remanescentes ao final de cirurgias de abdominoplastias realizadas pela Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP). Aproximadamente 200-500g de amostra de cada paciente foram coletadas em frasco estéril e imediatamente processadas.

Foram selecionados pacientes de ambos os sexos que concordassem em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido e atendessem os seguintes critérios de inclusão: possuir entre 18 e 40 anos, não estar fazendo uso de imunossupressores, não apresentar infecção sistêmica e local, incluindo HIV e doenças malignas, não possuir sinais clínicos de desnutrição e não apresentar insuficiência renal, hepática, cardíaca, respiratória ou neurológica clinicamente significativa.

3.4 Isolamento da fração estromal vascular (FEV)

O tecido obtido da abdominoplastia foi lavado 3 vezes com PBS 1X suplementado com antibiótico e antimicótico 1X (Gibco) para a remoção de leucócitos e eritrócitos. Em seguida o tecido era fragmentado em pequenas partes (~1cm) com uma tesoura estéril para facilitar o processo de digestão enzimática.

Após o processo de lavagem, o tecido foi submetido à digestão utilizando meio de digestão enzimática suplementado com 0,1% de collagenase tipo 1A (Worthington). Para cada volume de tecido obtido foi adicionado à mesma proporção do volume de solução de digestão, e incubado a 37°C em banho-maria com constante agitação durante 1 hora. Em seguida, adicionou-se meio RPMI-10%SFB a fim de inativar a atividade da collagenase, em volume

equivalente a 2 vezes ao volume de solução de digestão utilizada.

O tecido digerido foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugado a 500xg por 5 minutos para separação da FEV e dos adipócitos; o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular obtido lavado com PBS 1X e centrifugado a 300xg por 6 minutos. Em seguida adicionou-se 20ml de solução de tampão de lise de eritrócitos no *pellet* formado e incubado por 10 minutos no gelo seguida de nova centrifugação a 300xg por 6 minutos.

Para a remoção de tecidos não digeridos e agregados celulares as células foram ressuspensas em 5ml de PBS 1X e filtradas em filtros de 100µm e 40µm (Falcon®), respectivamente. Para determinação do número de células viáveis ao fim do processo as células foram contadas em câmara de Neubauer com auxílio de Azul de Trypan (Gibco) e separadas em duas alíquotas: uma alíquota submetida ao processo de *sorting* celular e outra plaqueada diretamente em placas de cultura, a fim de selecionar as CTMs-TA por aderência ao plástico, as quais foram denominadas de FEV para facilitar a distinção das frações celulares obtidas por *sorting*.

3.5 Separação das populações celulares por Separação celular ativado por fluorescência (FACS)

Aproximadamente $2-3 \times 10^7$ células da FEV eram ressuspensas em 100µl de PBS1X para serem incubadas com os anticorpos de interesse por 15 minutos no escuro. Os seguintes anticorpos conjugados foram utilizados para marcação das células: CD34-FITC (12,5µg/ml, clone 8G12), CD271-PE (50µl/teste, clone C40-1457), CD45-APC (40µg/ml, clone 30-F11) e CD31-APC (40µg/ml, clone MEC-13.3) (Becton Dickinson). Em seguida, as células foram lavadas com 10ml de solução tampão de *sorting*, filtradas em filtros de 40µm (Falcon®) para remoção de agregados celulares e centrifugadas a 300xg por 6 minutos. Para exclusão de células não-viáveis as células foram marcadas com o anticorpo 7-AAD (7-aminoactinomycin D) (1,5µg/ml) por 15 minutos.

Para a separação das populações celulares de interesse ($CD31^{neg}CD45^{neg}CD271^{neg}CD34^{pos}$ e $CD31^{neg}CD45^{neg}CD271^{pos}CD34^{pos}$) foi utilizada a técnica FACS (do inglês, fluorescent activated cell sorting) com o auxílio do aparelho FACSaria™ (Becton Dickinson, EUA) e a seguinte estratégia de *sorting* foi realizada: primeiramente foi realizada uma *gate* baseada no tamanho celular e excluindo células positivas para o marcador 7-AAD, o qual intercala o DNA de células não-viáveis. Nas células

viáveis foram então selecionadas em conjunto células negativas para os marcadores CD31 e CD45, para exclusão de células hematopoiéticas e endoteliais. Dentro desta população duplo negativa ($CD45^{neg}CD31^{neg}$) foi avaliada a porcentagem de células $CD34^{pos}$ e $CD271^{pos}$ e então selecionadas as células de interesse ($CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$). O *sorting* celular foi realizado através de um processo “*single cell*”, permitindo que as células fossem analisadas isoladamente pelo laser detector evitando possíveis aglomerados celulares e contaminação de células com fenótipos diferentes.

As células obtidas do processo de *sorting* eram recolhidas em meio DMEM-LG-50%SFB e contadas com Azul de Trypan 0,4% (Gibco) para determinar o número de células viáveis obtidas.

3.6 Análise da pureza do *sorting* celular

A análise da pureza das células obtidas ao término do *sorting* foi realizada por dois métodos: através da análise de expressão gênica por PCR em tempo real e análise do imunofenótipo por citometria de fluxo.

Para análise de citometria de fluxo, 100µl da solução de células obtidas ao término do *sorting* eram analisadas no aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson) e os marcadores utilizados para o *sorting* CD271 e CD34 avaliados.

Para análise da expressão gênica, aproximadamente $1-3 \times 10^6$ células foram separadas de cada população, incluindo a FEV, e o RNA total extraído com TRIzol (Ambion®), de acordo com as instruções do fabricante, sendo sua integridade avaliada por gel de agarose. Para a síntese do cDNA foi utilizado 1µg do RNA total de cada amostra e este sintetizado com o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi realizada com sondas TaqMan (Applied Biosystems). A expressão dos genes-alvo (CD271, CD34, CD45 e CD31) foi normalizada pela expressão do gene endógeno β -2-microglobulina e as sondas utilizadas para a reação estão listadas na tabela 2.

As células obtidas do *sorting* e a FEV sem cultivo celular foram ainda avaliadas quanto a expressão de importante genes relacionados à pericitos e CTMs (tabela 2) para caracterizar o perfil molecular destas populações.

Tabela 2: Relação das sondas TaqMan utilizadas nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvos.

Nome do gene	Sonda
CD271	Hs00182120_m1
CD34	Hs00990732_m1
CD45	Hs00174541_m1
CD31	Hs00169777_m1
CD146	Hs00174838_m1
CD140A	Hs00998018_m1
CD140B	Hs01019589_m1
NG2	Hs00426981_m1
Nestina	Hs00707120_s1
Desmina	Hs00157258_m1

3.7 Quantificação das Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs)

As células obtidas da FEV total e populações isoladas por *sorting* foram plaqueadas imediatamente após o fim do *sorting* na concentração de 18 células/cm² em meio DMEM-LG-10%SFB. As células foram incubadas em câmara úmida a 37°C com 5%CO₂ e o meio renovado a cada 48-72 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Ao final do 14º dia de cultivo as células eram coradas com corante Leishman (Dols) por 15 minutos e as colônias com mais de 40 células contadas com o auxílio do microscópio de contraste de fase, a fim de avaliar o potencial de formação de colônias fibroblastóides de cada população celular.

3.8 Cultivo e expansão celular

A FEV total e as populações celulares selecionadas por *sorting* foram plaqueadas em placas de cultura em uma densidade aproximada de 2x10³ células/cm² e cultivadas em meio DMEM-LG-10%SFB. As células foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5%CO₂, sendo o meio trocado totalmente após 72 horas para retirada de células não aderente e debris celulares e renovado a cada 48-72 horas.

Ao atingir cerca de 80-90% de confluência, as células foram coletadas por dissociação enzimática com solução de tripsina/EDTA (0,05% Tripsina, 0,53mM EDTA, Gibco) e contadas em câmara de Neubauer com Azul de Trypan (Gibco). Após determinação do número de células, alíquotas dessas células foram separadas para expansão celular, caracterização do perfil imunofenotípico, avaliação da cinética celular e diferenciação nas três linhagens mesodermiais.

3.9 Imunofenotipagem da FEV e das frações celulares obtidas do *sorting*

A caracterização imunofenotípica ao longo da cultura celular da FEV e das populações isoladas por *sorting* foi realizada por citometria de fluxo com o auxílio do aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson). Para as análises foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais conjugados: CD271-PE, CD34-PERCP, CD146-FITC, CD45-APC, CD31-FITC, CD90-FITC, CD105-PERCP, CD73-PERCP, NG2-PE, CD140a-PE e CD140b-PERCP (Becton Dickinson).

Suspensões contendo 1×10^5 células foram marcadas com 0,1µg de cada anticorpo e as amostras incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X e analisadas no citômetro de fluxo, no qual pelo menos 100.000 eventos eram capturados para as análises.

3.10 Avaliação da cinética de crescimento celular *in vitro*

Para avaliar a capacidade proliferativa de cada população obtida as células foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 1×10^4 células/poço, sendo o experimento de cada população realizado em triplicata. As células foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂, com o meio trocado a cada 48-72 horas até atingirem uma confluência aproximada de 80%. Ao atingirem esta confluência as células eram tripsinizadas separadamente e contadas em câmara de Neubauer com Azul de Trypan (Gibco) para determinação da taxa de duplicação de cada população. Cada população celular foi cultivada por um período de 100 dias e para o cálculo de duplicação foi utilizado a seguinte fórmula:

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

Sendo que: N_i = número inicial de células e N_f = número final de células.

Os valores obtidos do DP foram plotados em um gráfico exponencial, a partir do qual foi obtida a curva de crescimento e o número de gerações de cada população e pode-se avaliar a dinâmica das células até o início de sua senescência.

3.11 Avaliação qualitativa do estado de senescência celular

Para avaliar se as células cultivadas após o período de 100 dias estavam entrando em processo de senescência celular o método de coloração de SA- β -Gal foi utilizado. Este ensaio baseia-se no método enzimático utilizando a solução SA- β -Gal, pH 6,0, que contém o substrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactoside) para a enzima lisossômica β -galactosidase. O X-gal é clivado pela enzima β -galactosidase (presente em células senescentes) e a reação da clivagem libera uma molécula de galactose e o complexo resultante denominado de 5-bromo-4-cloro-3-hidroxyindole que é oxidado para 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, gerando um produto insolúvel de coloração azul.

Após a última contagem das células no 100º dia as células foram novamente plaqueadas em placas de 6 poços (triplicata) e cultivadas por 7 dias para estabelecimento da cultura. Após este período as células foram lavadas com PBS 1X, fixadas com solução fixadora de formalina 3,7% e incubadas com a solução de SA- β -Gal preparada antes da incubação por 16 horas em estufa a 37°C. Após este período as células foram lavadas com PBS 1X e avaliada a presença de células positivas para coloração azulada (células senescentes).

Para validação da coloração, CTMs-TA na passagem 2 ou 3 foram utilizadas como controle negativo e mantidas pelo mesmo período e protocolo de coloração.

3.12 Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos *in vitro*

Para as diferenciações osteogênicas e adipogênicas suspensões celulares contendo 2×10^4 células/poço (osteogênese) e 4×10^4 células/poço (adipogênese) para a diferenciação e $1,5 \times 10^3$ células/poço para os controles foram cultivadas em meio DMEM-HG-10%SFB (adipogênese) e α -MEM-10%SFB (osteogênese) em placas de 24 poços por 24 horas para estabelecimento da cultura. As células foram então incubadas com meio de indução adipogênica ou indução osteogênica para as células em diferenciação e em nos respectivos meios não suplementados para as células controles. As células foram mantidas em estufa

úmida a 37°C com 5%CO₂ e os meios indutores e controle renovados a cada 72 horas por um período de 21 dias para a adipogênese e 45 dias para osteogênese.

Para as análises morfológicas, as células diferenciadas e os controles eram fixados com formalina 3,7% (Sigma-Aldrich) por 60 minutos em temperatura ambiente, lavadas com água destilada e realizadas as colorações para adipócitos e osteócitos.

Para a diferenciação em condrócitos suspensões celulares contendo 1x10⁶ células para a diferenciação e controle eram ressuspensas em PBS 1x e centrifugadas a 300g por 6 minutos em tubos de polipropilenos de 15ml para formação de um *pellet* celular de alta densidade. O sobrenadante era removido cuidadosamente para não soltar o *pellet* formado e o meio indutor de condrogênese acrescido de TGF-β3 (PrepoTech) adicionado ao tubo de diferenciação e o meio sem TGF-β3 adicionado ao tubo controle, evitando a ressuspensão das células. Os tubos foram incubados em estufa úmida a 37°C com 5%CO₂ e os meios indutores e controle renovados a cada 72 horas por um período de 21 dias. Para as análises histoquímicas e de coloração o *pellet* celular era fixado com formalina 3,7% por 15 minutos em temperatura ambiente e o *pellet* incluído em solução crioprotetora (Tissue Tek® O.C.T.) para congelamento em acetona gelada. Secções de 5µm eram realizadas e os cortes submetidos a coloração com Azul de Alciano (Sigma).

Coloração dos adipócitos: As células foram incubadas com isopropanol 60% (Sigma) por 5 minutos e em seguida incubadas com o corante Oil Red 0,5% por 60 minutos, para coloração das vesículas lipídicas. As células foram lavadas repetidamente com água destilada para remoção do excesso de corante. O corante Oil Red cora os depósitos lipídicos em vermelho.

Coloração dos osteócitos: As células foram incubadas com o corante Alizarin Red (pH = 4,1 - 4,3) por 45 minutos no escuro, para a coloração dos depósitos de cálcio. As células foram lavadas repetidamente com água destilada para remoção do excesso de corante. O corante Alizarin Red cora os depósitos de cálcio em vermelho.

Coloração dos condrócitos: Para examinar os proteoglicanos específicos de cartilagem as secções foram submetidas a uma lavagem com ácido acético 0,3% por 3 minutos e em seguida coradas com Azul de Alciano 8GX (Sigma) por 30 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e montadas com auxílio de Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences).

Após a coloração, as células foram analisadas e fotografadas em microscópio óptico (Axioskop 2 plus®, Carl Zeiss) equipado com uma câmera digital (AxioCam®, Carl Zeiss).

3.13 Quantificação dos corantes Oil Red e Alizarin Red

Recuperação do corante Oil Red: para a quantificação em espectrofotômetro do corante Oil Red, as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas para completa evaporação da água. Em seguida foram adicionados 500µl de isopropanol p.a. em cada poço com agitação constante por 15 minutos para a remoção do corante. O corante recuperado foi pipetado em placas de 96 poços e a concentração determinada através da análise da absorbância em 500nm no aparelho SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices).

Recuperação do corante Alizarin Red: para a quantificação do corante Alizarin Red as placas eram completamente secas e armazenadas em freezer -20°C até a remoção do corante. Para a recuperação do corante eram adicionados 160µl de ácido acético 10% e incubado a temperatura ambiente por 30 minutos com agitação constante. A monocamada de células foi removida e transferida para tubos de polipropileno de 0,5ml. Em seguida, foi adicionado sobre a suspensão de células 100µl de óleo mineral, a fim de evitar a evaporação do ácido acético, e aquecido em banho seco a 85°C por 10 minutos. Os tubos foram incubados no gelo por 5 minutos e em seguida centrifugados a 13.200rpm por 15 minutos. Aproximadamente 100µl do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de polipropileno de 0,5ml e a solução neutralizada com 40µl de hidróxido de amônio 10% (pH = 4,1 – 4,5).

O corante recuperado foi pipetado em placas de 96 poços e a concentração determinada através da análise da absorbância em 405nm no aparelho SpectraMax M5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Devices).

3.14 Análise proteica – extração, eletroforese e western blotting

Para analisar a presença das proteínas CD146 e CD140b nas frações celulares obtidas do *sorting*, a proteína total de cada grupo foi extraída utilizando tampão RIPA contendo 50 mM do TrisHCl pH7.4, 150 mMNaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS, suplementado com inibidores de protease e fosfatase (Roche Applied Science). Aproximadamente 100 µL de tampão RIPA foram adicionados em cada fração celular logo após o término do *sorting* celular. As proteínas extraídas foram armazenadas a -80°C até a realização dos experimentos.

Quantificação das proteínas: A quantificação das proteínas totais foi feita utilizando-

se o *kit* da Bio-Rad DC (Bio-Rad, Hercules, CA), baseado no método descrito por BRADFORD (1976). O ensaio foi realizado em microplacas com volume total de 220µL por poço, com faixa de linearidade 0,5 a 2,0µg de proteínas. Foram utilizados 20 µL de amostra diluída em água MilliQ e 200µL do reagente de Bradford. Após 15 minutos de incubação, as absorbâncias foram lidas a 595nm em leitor de Elisa (VersamarxTunableMicroplate Reader). Uma curva padrão com 5 pontos em triplicata correspondentes à quantidades conhecidas de BSA (0,0 a 2,0 µg) foi feita a cada ensaio realizado. A concentração das amostras foi determinada usando diferentes diluições em triplicata (1:50, 1:100, 1:200, v/v) para cada amostra. Os desvios padrões dos resultados obtidos nas triplicatas foram menores que 10%.

Separação das proteínas: Para a realização da eletroforese, géis SDS-PAGE de bis-acrilamida 7,5% foram feitos a partir do protocolo LAEMMLI (1970). As amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, SDS 2%, DTT 1%, glicerol 10%, pH 6,8) e fervidas por 5 minutos em microtubos. As separações foram realizadas nas seguintes condições: 300V, sob uma amperagem constante de 12 mA por gel, 10W e um total de 2 h de corrida. A eletroforese foi feita em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, SDS 0,1% à temperatura ambiente.

Western Blotting: Os extratos protéicos separados no gel SDS-PAGE foram eletrotransferidos para a membrana de PVDF (Hybond-P, GE). A transferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% por 2 horas a 100 V, 300 mA a 4°C. Para bloquear sítios não específicos, as membranas foram incubadas em tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,6 (TBS-T) com 5% (m/v) de leite desnatado em pó por 1 hora. As membranas foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com TBS-T e incubadas com os anticorpos primários nas diluições adequadas por 2 horas a temperatura ambiente (β -actina (sc-81178, Sta Cruz Biotechnology)) ou *overnight* a 4°C sob agitação (PDGF Receptor beta (ab32570, Abcam) e CD146 (ab75769, Abcam)) (Tabela 3). O anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (CellSignaling) foi incubado na diluição 1:2000 e o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (RPN4221)(GEHealthcare) foi incubado na diluição 1:10000 por 1 hora.

A detecção foi feita usando o *kit* ECL Plus *Western Blotting Detection Reagents* (GE HealthCare), utilizado para a detecção baseada em sinal de quimiluminescência realizado com uma câmera CCD *Chemilux* (ImageQuant TM, LAS 4000 mini, GE Healthcare).

Tabela 3. Lista de anticorpos primários utilizados para as análises de western blotting.

Anticorpo	Fonte	P/M*	Peso (kDa)	Diluição
CD146	Coelho	M	72	1:10000
CD140b	Coelho	M	175	1:10000
β Actina	Camundongo	M	43	1:500

(*)P.: Policlonal; M.: Monoclonal

3.15 Microscopia confocal

Para a localização *in situ* dos marcadores alvos, fragmentos de tecido adiposos recém coletados (~1cm³) foram fixados em solução de formalina 3,7% por 5 horas. Os tecidos fixados foram congelados em meio crioprotetor (Tissue Tek® O.C.T.) imersos em acetona gelada e estocados em freezer -20°C até o processamento das amostras. Cortes de 25µm foram realizados nos tecidos congelados com auxílio do criostato CM1850 (Leica Biosystems).

Para a marcação imunofluorescente dos tecidos, as lâminas com os cortes histológicos foram descongeladas em temperatura ambiente, fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 10min e incubadas em solução de glicina 0,1M (Amersham Pharmacia Biotech AB) por 30 minutos. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS 1X, permeabilizados com solução de TritonX-100 (Sigma) 0,3% por 15 minutos, lavados com PBS 1x, seguido da incubação com ImageIt por 30 minutos e posterior bloqueio de epítomos inespecíficos com solução de albumina bovina 2% (Sigma) por 1 hora e 30 minutos.

Para a marcação dos cortes foram utilizados os seguintes anticorpos primários: CD271 (rabbit, ab8875), CD146 (rabbit, ab75769), CD31 (rabbit, ab32457) (ABCAM) e CD34 (mouse, clone 8G12) (Becton Dickinson), diluídos em solução de albumina bovina 2% (Sigma) visando à concentração final de 10µg/ml. Os anticorpos foram incubados *overnight* a 4°C em câmara úmida seguido de lavagens com PBS 1X para remoção do excesso de anticorpo.

Para a marcação indireta foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 546 (Invitrogen), diluídos para uma concentração de 10µg/ml. Os anticorpos foram incubados por 1 hora no escuro em câmara úmida e lavados 5 vezes com PBS 1X para remoção do excesso de anticorpo.

Para marcação nuclear os cortes foram incubados com solução de DAPI (*dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol*; Abbott Molecular Inc.) na concentração de 0,75mg/mL por 10 minutos a TA em câmara úmida ao abrigo da luz. Ao final deste período,

as lâminas foram novamente lavadas com PBS 1X e imersas rapidamente em água destilada para retirada dos resíduos de sal presentes na solução de PBS. As lâminas foram montadas em Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences).

Para visualização dos cortes marcados foi utilizado um Microscópio Confocal LSM 710 (Carl Zeiss) com lente objetiva 63x em óleo de imersão e abertura numérica de 1.4. Os lasers de Argônio de 488nm e 540nm foram usados para excitar a superfície marcada com o anticorpo primário, e a emissão foi medida em 525nm e 617nm, respectivamente. A visualização da luz refletida para cada um dos comprimentos de onda de excitação foi capturada usando canais de detecção separados.

Análise das imagens e o estudo de co-localização foram realizados utilizando o software Zen 2008 do sistema confocal (ZEN, version 2.5). As imagens teste e controle foram capturadas usando parâmetros idênticos.

3.16 Metodologia de análise dos resultados

Os experimentos foram avaliados tanto qualitativamente quanto quantitativamente. A análise por microscopia de luz da morfologia das células em cultura, da atividade SA- β -Gal nas células senescentes, da capacidade de diferenciação nas linhagens mesodermas e das imunofluorescências *in situ* foram à base da discussão qualitativa dos resultados e foram embasadas a partir da fotodocumentação obtida.

Para avaliação quantitativa da imunofenotipagem por citometria de fluxo, o nível de expressão gênica por *Real Time* PCR, a formação de colônias fibroblastóides (CFU-F) e demais comparações entre múltiplas médias foi utilizado o teste ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os testes estatísticos e a montagem dos gráficos foram elaborados com o auxílio do programa GrahPad 5.0®. As médias foram apresentadas com o desvio padrão (PD) e serão consideradas significativamente diferentes entre si quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Características das amostras estudadas

Para o estudo das populações celulares $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$ obtidas da FEV do tecido adiposo foram escolhidas amostras procedentes da região abdominal devido ao elevado número de células progenitoras associadas ao tecido adiposo subcutâneo em comparação a outras regiões anatômicas (JOE *et al.*, 2009) (Figura 5A-B). As amostras coletadas após o consentimento de cada paciente eram processadas no mesmo dia para então serem submetidas ao *sorting* celular. As características de cada tecido estão resumidas na tabela 4.

Figura 5. Imagem das amostras de tecido adiposo abdominal intacto e processado. (A) Tecido adiposo não processado obtido de cirurgias de abdominoplastia. (B) Tecido adiposo após fragmentação para a digestão enzimática.

Tabela 4. Características das amostras coletadas.

Local da coleta	Idade do paciente*	Volume obtido de material (ml)	Quantidade de células obtidas
Abdômen	34	350	$6,6 \times 10^7$
Abdômen	31	300	$5,5 \times 10^7$
Abdômen	34	200	$3,0 \times 10^7$
Abdômen	38	400	$5,3 \times 10^7$
Abdômen	27	400	$8,0 \times 10^7$
Abdômen	40	300	$3,0 \times 10^7$
Média ($\pm$ DP)	$34,0 \pm 4,7$	$325,0 \pm 75,8$	$5,2 \pm 2,0$

*Todos os tecidos foram obtidos de pacientes femininos.

4.2 Caracterização imunofenotípica da FEV do tecido adiposo

As células obtidas ao término da digestão enzimática do tecido adiposo foram submetidas à análise de marcadores de superfície celular relacionados à CTMs, pericitos, células endoteliais e hematopoiéticas por citometria de fluxo, a fim de avaliar as características imunofenotípicas das células presentes na FEV previamente ao cultivo celular. Conforme os dados obtidos da imunofenotipagem, a FEV é composta de células hematopoiéticas e endoteliais, caracterizadas pelos marcadores CD45 ($30,1\% \pm 6,7\%$) e CD31 ($9,3\% \pm 6,4\%$), respectivamente, e por células positivas para o marcador CD90 ($55,6\% \pm 8,3\%$), também expresso por CTMs. A expressão de outros dois marcadores de CTMs, CD73 e CD105, foi identificada em $10,7\% \pm 11,2\%$ e $3,1\% \pm 4,0\%$ das células, respectivamente (Figura 6A), corroborando outros trabalhos que demonstram uma menor proporção destas células na FEV antes de submetida ao cultivo celular (BRAUN *et al.*, 2013; MITCHELL *et al.*, 2006; ZUK *et al.*, 2002). Em adição, menos de 10% das células presentes na FEV expressavam marcadores comumente associados à pericitos, como CD146 ($6,2\% \pm 4,5\%$), CD140b ($3,5\% \pm 5,1\%$), CD140a ($1,7\% \pm 3,8\%$) e NG2 ($6,4\% \pm 6,8\%$), e de células-tronco/progenitoras CD117 ($3,0\% \pm 2,1\%$) (Figura 6A).

Ao avaliar os marcadores de interesse deste estudo (CD34 e CD271) na FEV, observou-se que $51,4\% \pm 14,3\%$ das células eram positivas para o antígeno CD34 enquanto $17,0\% \pm 9,4\%$ expressavam o marcador CD271 (Figura 6A). Analisando a co-expressão destes marcadores verificou-se que praticamente todas as células CD271^{pos} presentes na FEV são também positivas para o marcador CD34 (Figura 6B).

Figura 6: Perfil imunofenotípico da FEV não cultivada. (A) As células obtidas de 6 tecidos de doadores diferentes e analisadas independentemente apresentaram marcação dos principais marcadores hematopoiético (CD45), endotelial (CD31) e CTMs (CD90), ao passo que se observou um menor número de células positivas para os marcadores relacionados a pericitos (CD146, CD140b, CD140a e NG2). Ao avaliar os marcadores de interesse deste estudo (CD34 e CD271) verificou-se que mais de 50% das células expressavam o marcador CD34 enquanto que um número menor de células expressou o marcador CD271. (B) A análise representativa da co-expressão dos marcadores CD34 e CD271 nas células presentes na FEV revelou que praticamente todas as células CD271^{pos} eram também positivas para o marcador CD34. Todas as análises foram realizadas em conjunto com os isotipos controles (n=6).

O CD146 é frequentemente relacionado às CTMs *in vitro* e *in vivo*, principalmente na medula óssea (CRISAN *et al.*, 2008; SACCHETTI *et al.*, 2007). A fim de identificar os tipos celulares que compunham a fração de células CD146^{pos}, foi avaliada a co-expressão deste marcador com os antígenos CD34, relacionado à CTMs-TA, e CD31, um marcador de células endoteliais. Os resultados desta análise demonstraram que uma pequena porcentagem de células co-expressa os marcadores CD34 e CD146 (2,3% $\pm$ 0,5%) (Figura 7A). Entretanto, todas as células CD146^{pos}CD34^{pos} expressavam o marcador CD31, correspondendo, portanto, a uma população de células progenitoras endoteliais (Figura 7B). Este fenótipo de células progenitoras endoteliais no tecido adiposo já foi descrito por outros trabalhos (CORSELLI *et al.*, 2012; YOSHIMURA *et al.*, 2006; ZIMMERLIN *et al.*, 2010) e esta população foi excluída em nossa estratégia de sorting através da depleção de células CD31^{pos} como demonstrado a seguir.

Figura 7: Análise representativa da co-expressão dos marcadores de superfície celular CD34, CD146, CD31 na FEV. (A) Co-expressão dos marcadores CD34 e CD146 na FEV. O gráfico representativo obtido da imunofenotipagem da FEV demonstra que uma pequena porcentagem das células analisadas co-expressam os marcadores CD34 e CD146. (B) Co-expressão dos marcadores CD31 e CD146 na FEV. A análise do marcador de células endoteliais CD31 dentro da população duplo positiva para CD34 e CD146 demonstra que todas as células positivas para o CD146 são também positivas para o CD31, correspondendo a uma população de células progenitoras endoteliais (n=3).

4.3 Identificação e separação das populações celulares $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$

Para avaliar o potencial do marcador de superfície celular CD271 em isolar células progenitoras mesenquimais no tecido adiposo, a técnica de separação celular ativada por fluorescência (FACS), comumente chamada de *sorting* celular, foi utilizada e a seguinte combinação de marcadores foi empregada para separação das populações celulares de interesse: $CD31^{neg}CD45^{neg}CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD31^{neg}CD45^{neg}CD34^{pos}CD271^{neg}$.

Antes do início do processo de FACS as células obtidas após a digestão enzimática do tecido adiposo foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do marcador intercalante de DNA 7-AAD, o qual não é incorporado por células viáveis. Esta análise demonstrou que mais de 70% das células obtidas após o processamento das amostras estavam viáveis (Figura 8).

Figura 8: Viabilidade celular da FEV. (A-F) Todos os tecidos submetidos à digestão enzimática foram avaliados quanto à viabilidade celular antes do início do *sorting* celular através do marcador de viabilidade 7-AAD. Os resultados demonstram que as células obtidas dos diferentes tecidos apresentavam uma viabilidade celular superior a 70% de acordo com o recomendado pelo ISCT (n = 6).

A estratégia de *sorting* celular utilizada a partir da seleção das células viáveis está representada na figura 9. Células hematopoiéticas ($CD45^{pos}$) e endoteliais ($CD31^{pos}$) foram excluídas por meio da seleção de células $CD45^{neg}CD31^{neg}$ (Figura 9B). A partir desta fração celular $CD45^{neg}CD31^{neg}$ foram então selecionadas as células de interesse $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$ (Figura 9C). A porcentagem de células $CD45^{neg}CD31^{neg}$ em cada amostra após exclusão de células mortas, bem como a porcentagem das frações celulares de interesse presente nesse estroma podem ser observadas na tabela 5.

Figura 9: Esquema representativo da estratégia de *sorting* celular utilizada para separação das frações celulares $CD45^{neg}CD31^{neg}CD34^{pos}CD271^{neg}$ e $CD45^{neg}CD31^{neg}CD34^{pos}CD271^{pos}$. (A) Seleção das células viáveis. As células foram selecionadas através da exclusão do marcador de viabilidade 7-AAD, permitindo a separação de células viáveis para o processo de *sorting*. (B) Seleção da população $CD45^{neg}CD31^{neg}$. As células viáveis foram submetidas a depleção de células hematopoiéticas ($CD45^{pos}$) e endoteliais ($CD31^{pos}$). (C) Separação das populações celulares $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$. As células $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$ foram selecionadas dentro da população $CD45^{neg}CD31^{neg}$ respeitando-se uma margem de separação entre as populações celulares a fim de evitar a contaminação celular entre as duas populações.

Tabela 5. Porcentagem de cada população celular avaliada durante o *sorting* celular.

Amostras	Porcentagem de células $CD45^{neg}CD31^{neg}$ (%)	Porcentagem de células $CD34^{pos}CD271^{neg}$ (%)	Porcentagem de células $CD34^{pos}CD271^{pos}$ (%)
Amostra 1	60,8	64,2	30,8
Amostra 2	46,6	32,3	20,9
Amostra 3	53,5	45,3	12,3
Amostra 4	55,8	56,1	24,0
Amostra 5	67,0	38,2	24,9
Amostra 6	65,2	61,7	17,9
Média ($\pm$DP)	58,2 $\pm$ 7,7	49,6 $\pm$ 13,0	21,8 $\pm$ 6,4

4.4 Confirmação da pureza celular ao término do *sorting* celular

A fim de verificar a pureza das células obtidas ao término do *sorting* celular, todas as frações celulares foram re-analisadas por citometria de fluxo para os marcadores de interesse CD34 e CD271 e a imunofenotipagem revelou uma pureza entre 95,5% e 99,9% (Figura 10).

Figura 10: Pureza das amostras submetidas ao processo de *sorting* celular. As populações celulares obtidas ao término do *sorting* celular foram re-analisadas através de citometria de fluxo para os marcadores de interesse CD34 e CD271. As figuras de A-F correspondem a fração celular CD34^{pos}CD271^{neg} e as figuras G-L a fração celular CD34^{pos}CD271^{pos}, demonstrando que todas as amostras apresentaram uma pureza entre 95,5 e 99,9%.

Com o intuito de confirmar a eficácia do *sorting* celular realizado, as células CD34^{pos}CD271^{neg} e CD34^{pos}CD271^{pos} sem cultivo celular foram também avaliadas quanto a expressão dos genes CD34, CD271, CD45, CD31 e CD146 por PCR em tempo real quantitativo. O perfil transcricional observado nas frações celulares em comparação a FEV sem cultivo corrobora os resultados obtidos pela citometria de fluxo, evidenciando um aumento de transcritos do gene *CD271* nas células CD34^{pos}CD271^{pos} ($803,0 \pm 328,6$ URE) e menor expressão gênica nas células CD34^{pos}CD271^{neg} ($31,0 \pm 12,8$ URE). Ambas as frações celulares apresentaram um aumento entre 2 a 5 vezes na expressão do gene *CD34* e diminuição dos transcritos que codificam os marcadores CD45 e CD31 (Figura 11A).

Em adição à baixa expressão do gene *CD146* (CD34^{pos}CD271^{pos}: $8,9 \pm 3,6$, CD34^{pos}CD271^{neg}: $6,5 \pm 3,1$ e FEV: $51,2 \pm 46,5$ URE), os resultados de *western blotting* demonstraram ausência da proteína CD146 em ambas as populações selecionadas (Figura 11B). A expressão irrisória do referido marcador na FEV confirmou os resultados obtidos da imunofenotipagem realizada previamente ao *sorting* celular. A expressão de CD146 foi identificada apenas nas células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC), que foram utilizadas como controle positivo da marcação (Figura 11B).

Este perfil de expressão gênica demonstra que as células obtidas do *sorting* celular estão de acordo com o fenótipo estabelecido até o momento para as CTMs-TA (CD34^{pos}CD146^{neg}CD31^{neg}CD45^{neg}) (CORSELLI *et al.*, 2012; YOSHIMURA *et al.*, 2006).

Figura 11: Expressão gênica dos marcadores alvos do *sorting* e expressão da proteína CD146. (A) A expressão gênica em relação ao endógeno β -2-microglobulina de cada gene confirma a eficiência do processo de *sorting* celular realizado quando comparadas a FEV, demonstrando uma diminuição das células endoteliais (CD31) e hematopoiéticas (CD45), um aumento dos transcritos dos genes *CD34* e *CD271* na população CD271^{pos}CD34^{pos} e diminuição do gene *CD271* na população CD271^{neg}CD34^{pos}. Além disso, foram observados baixos níveis do gene *CD146*. FEV - barras pretas, CD34^{pos}CD271^{pos} – barras cinzas, CD34^{pos}CD271^{neg} – barras brancas. Os resultados estão representados em média $\pm$ desvio padrão ($n = 3$). (B) A expressão da proteína CD146 foi avaliada por *western blotting* nas frações celulares não cultivadas, FEV cultivada e controle positivo HUVEC, indicando que apenas as células endoteliais (HUVEC) apresentam a expressão da proteína ($n = 1$).

4.5 Células CD34^{pos}CD271^{neg} são mais clonogênicas que células da FEV e CD34^{pos}CD271^{pos}

Ao avaliar a frequência de CFU-Fs produzidas por cada população celular ao término do 14º dia verificou-se que todas as frações celulares foram capazes de gerar colônias fibroblastóides, como demonstrado pela coloração com o corante Leischman (Figura 12). Contudo, a fração celular CD34^{pos}CD271^{neg} apresentou maior capacidade de formação de colônias em relação as células CD34^{pos}CD271^{pos} e a FEV. Este resultado foi obtido em todas as amostras analisadas (Figura 13A-E). Em média, a população celular CD34^{pos}CD271^{neg} foi capaz de gerar o dobro de colônias em relação as demais frações celulares (Figura 13F).

Figura 12: Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) geradas pelas frações celulares e FEV. As imagens representativas demonstram que ao término do 14º dia todas as populações celulares obtidas foram capazes de gerar CFU-F como demonstrado pela coloração Leischman. Contudo, a população CD34^{pos}CD271^{neg} visivelmente demonstra possuir um número superior de colônias fibroblastóides em relação as demais populações celulares.

Figura 13: Frequência de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-Fs). (A-E) As populações celulares submetidas ao ensaio formação de colônias demonstraram ao término do 14º dia que em todas as amostras analisadas a fração celular CD34^{pos}CD271^{neg} possuiu um número significativamente maior de colônias em relação a FEV e/ou as células CD34^{pos}CD271^{pos}. (F) A análise da frequência relativa de CFU-Fs normalizada pela FEV demonstra que em média a população CD34^{pos}CD271^{neg} gerou o dobro de CFU-Fs em relação as demais frações estudadas. Os resultados estão demonstrados em média ± desvio padrão e os asteriscos indicam os resultados com diferenças significativas (*) p<0,05, (**) p<0,01 e (***) p<0,001, (n = 5).

4.6 Células da FEV e frações celulares $CD34^{pos}CD27^{pos}$ / $CD34^{pos}CD271^{neg}$ apresentam características de CTMs em cultura e passam a expressar marcadores associados a pericitos *in vitro*

A adesão ao plástico é ainda a maneira mais frequente de selecionar CTMs para fins terapêuticos. Por esta razão todas as populações obtidas foram analisadas quanto às mudanças fenotípicas ao longo da cultura celular. Como observado pelas fotomicrografias de contraste de fase, todas as células apresentavam-se pequenas e arredondadas logo após a adesão celular em placas de cultura (Figura 14A-C) e ao término da cultura primária estas células exibiam características fibroblastóides típicas de CTMs (Figura 14D-F).

Figura 14: Características morfológicas das frações celulares e FEV após cultura celular. (A-C) Fotomicrografias em contraste de fase demonstrando que após a aderência ao plástico todas as populações celulares apresentaram características arredondadas e pequenas. (D-F) Ao término da cultura primária (aproximadamente 9 dias) todas as frações celulares possuíam morfologia fibroblastóide, exibindo características típicas de CTMs. Escala: 50μm e 200μm.

Análises por citometria de fluxo após a cultura primária (aproximadamente 9 dias) e ao fim da terceira passagem celular demonstraram que a cultura celular levou a uma clara homogeneização do perfil imunofenotípico das frações celulares estudadas (Figura 15A-B).

A fase inicial da cultura celular das populações $CD34^{pos}CD27^{neg}$ / $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e FEV foi associada com um aumento significativo na proporção de células expressando os clássicos marcadores de CTMs CD73 ($93,0\% \pm 7,3\%$, $94,7\% \pm 4,7\%$ e $98,0\% \pm 1,8\%$, respectivamente) e CD90 ($97,3\% \pm 1,8\%$, $97,8\% \pm 0,9\%$ e $92,6\% \pm 12,7\%$) e uma diminuição significativa da expressão de CD34 ($12,1\% \pm 11,6\%$, $20,6\% \pm 10,6\%$ e $14,3\% \pm 11,3\%$)

quando comparado à FEV não cultivada. O marcador CD271 também se mostrou fortemente regulado pela cultura celular, sendo que a fração celular CD34^{pos}CD271^{pos} sofreu forte redução na porcentagem de células CD271 positivas ($18,8\% \pm 8,4\%$) em comparação aos resultados obtidos da pureza celular após o *sorting* ($96,2\% \pm 1,0\%$). De maneira semelhante, a FEV ($8,8\% \pm 6,3\%$) e células CD34^{pos}CD271^{neg} ($7,9\% \pm 2,9\%$) também expressaram baixas porcentagens deste marcador após o término da cultura primária (Figura 15A).

Apesar da grande variação observada entre as amostras coletadas, os marcadores associados à pericitos apresentaram mudanças significantes nos primeiros dias de cultura, com um aumento na porcentagem de células positivas para o CD140a ($34,9\% \pm 25,8\%$, $51,2\% \pm 24,4\%$ e $52,7\% \pm 26,4\%$), CD140b ($84,7\% \pm 14,3\%$, $90,5\% \pm 7,2\%$ e $90,3\% \pm 6,4\%$) e NG2 ($45,5\% \pm 15,1\%$, $38,9\% \pm 37,2\%$ e $36,9\% \pm 29,4\%$) e em menor proporção para o marcador CD146 ($11,8\% \pm 6,5\%$, $7,0\% \pm 5,0\%$ e $9,3\% \pm 8,5\%$) (Figura 15A). Estas expressões mantiveram-se semelhantes ao longo da cultura celular como observado ao fim da 3ª passagem, enquanto o número de células CD34 positivas ($0,7\% \pm 0,9\%$, $4,8\% \pm 3,1\%$ e $3,1\% \pm 2,0\%$) e CD271 positivas ($3,2\% \pm 2,7\%$, $7,6\% \pm 5,5\%$ e $5,7\% \pm 5,4\%$) continuaram a diminuir (Figura 15B).

Figura 15: Análise imunofenotípica das frações celulares e FEV cultivadas. (A) Imunofenotipagem ao término da cultura primária. As populações celulares avaliadas por citometria de fluxo demonstraram uma homogeneização do perfil imunofenotípico após o cultivo celular. Em adição, pode-se observar um aumento significativo de células positivas para os marcadores CD90 e CD73 em relação a FEV não cultivada e uma diminuição das células CD34^{pos} e CD271^{pos}. Todas as populações celulares demonstraram um aumento significativo no número de células positivas para os marcadores relacionados a pericitos (PDGFRs e NG2). (B) Imunofenotipagem ao término da 3ª passagem. Ao término da 3ª passagem celular todas as populações celulares mantiveram um imunofenótipo semelhante ao observado no fim da cultura primária. Os resultados estão demonstrados em média $\pm$ DP e os asteriscos indicam os resultados com diferenças significativas (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$ ($n = 5$).

4.7 As frações celulares CD34^{pos}CD271^{neg} e CD34^{pos}CD271^{pos} exibem potencial proliferativo superior a FEV

Para caracterizar e comparar a habilidade de expansão das diferentes frações celulares obtidas, as células foram cultivadas durante 100 dias, quando foi possível observar células cuja morfologia era indicativa do início da senescência celular (células achatadas, grandes e

poligonais). A média de duplicações celulares de três amostras diferentes para a FEV e as frações celulares CD34^{pos}CD271^{neg} e CD34^{pos}CD271^{pos} foi de $17,8 \pm 3,7$, $22,6 \pm 2,6$ e $22,7 \pm 2,2$, respectivamente (Figura 16A). As análises estatísticas demonstraram uma diferença significativa na taxa de proliferação entre as células selecionadas por *sorting* celular em relação a FEV, como observado após quantificação das áreas sob as curvas de crescimento celular (Figura 16B).

Figura 16: Potencial proliferativo das frações celulares CD34^{pos}CD271^{neg} e CD34^{pos}CD271^{pos} e FEV. (A, C, E) Para avaliar a capacidade proliferativa de cada população celular obtida, o número de vezes que cada população duplicou foi determinado de forma cumulativa e plotado em um gráfico no qual o eixo x representa o número de dias em cultura e o eixo y representa a duplicação populacional cumulativa (DPc). A média da

triplicata da DPc para cada fração celular em três amostras distintas foi: 20,3, 21,7 e 25,8 ($CD34^{pos}CD271^{neg}$), 20,8, 22,0 e 25,4 ($CD34^{pos}CD271^{pos}$) e 14,8, 16,2 e 22,5 (FEV). (**B, D, F**) As análises da quantificação das áreas sob as curvas de crescimento celular, demonstraram uma diferença significativa entre as populações selecionadas por *sorting* em relação a FEV. Os resultados estão demonstrados em média $\pm$ DP e os asteriscos indicam os resultados com diferenças significativas (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$. (n = 3).

Ao verificar que as células em cultura começaram a apresentar uma morfologia achatada e irregular, tamanho celular maior e o citoplasma granular com muitas inclusões, as culturas celulares foram interrompidas e analisadas quanto à senescência celular pela presença da enzima β -galactosidade. As fotomicrografias realizadas após a coloração com a solução β -gal demonstram que todas as frações celulares já apresentavam células em processo de senescência celular, como observado pelas regiões do citoplasma coradas em azul, caracterizando a atividade da enzima β -galactosidase (Figura 17).

Figura 17: Análise qualitativa da senescência celular das populações celulares. As fotomicrografias representativas realizadas após coloração com a solução β -gal evidenciam o início da senescência celular das frações estudadas pela presença da coloração azulada observada no citoplasma das células, demonstrando a ação da enzima β -galactosidase. Além disso, é possível observar as modificações morfológicas exibidas pelas células, como forma irregular e citoplasma grande e fino. (**A-C**) Fotomicrografias em menor aumento (40x), (**E-G**) Fotomicrografias em maior aumento (100x). (**D,H**) Estas características não foram observadas em células na 3ª passagem, como observado na cultura controle.

4.8 A FEV e frações $CD34^{pos}CD271^{neg}$ / $CD34^{pos}CD271^{pos}$ apresentam potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico e condrogênico

Considerando um dos critérios estabelecidos pela ISCT para caracterização das CTMs *in vitro*, todas as frações celulares foram avaliadas quanto à capacidade de diferenciação nas linhagens mesodérmicas (osteócitos, condrócitos e adipócitos) após expansão celular até a 3ª passagem.

Após o cultivo com os meios indutores de diferenciação específicos, todas as células obtidas de 4 amostras diferentes acumularam vesículas lipídicas, como evidenciado pela coloração com o corante *Oil red* (Figura 18A-D). A quantificação por densitometria óptica do corante *Oil red* recuperado revelou não existir diferenças no potencial adipogênico entre as populações celulares avaliadas (FEV: $0,365 \pm 0,156$, $CD34^{pos}CD271^{neg}$: $0,404 \pm 0,154$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$: $0,423 \pm 0,159$ OD) ($p = 0,6081$) (Figura 18E).

Figura 18: Diferenciação adipogênica das frações celulares $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e FEV. (A-D) Fotomicrografias representativas após diferenciação em adipócitos das células controle (A), no qual não se detectou presença de vacúolos lipídicos, e das células diferenciadas FEV (B), $CD34^{pos}CD271^{pos}$ (C) e $CD34^{pos}CD271^{neg}$ (D) evidenciado pelas gotículas lipídicas coradas em vermelho pelo corante *Oil red*. (E) Análise da absorbância do corante *Oil red* recuperado. O gráfico obtido a partir da quantificação por densitometria óptica do corante *Oil red* demonstra não existir diferenças significativas na capacidade de diferenciação entre as populações celulares estudadas. Os resultados estão demonstrados em média $\pm$ DP, $p > 0,05$, Escala: 500 μ m. (n = 4).

Ao avaliar a capacidade de diferenciação das populações celulares em osteócitos verificou-se que das 4 amostras testadas apenas 2 tecidos foram capazes de depositar matriz calcificada, enquanto as outras 2 amostras foram incapazes de tal habilidade (dados não mostrados).

As fotomicrografias representativas das células diferenciadas em osteócitos demonstram que apesar de todas as frações celulares possuírem capacidade de mineralização *in vitro*, as células $CD34^{pos}CD271^{pos}$ apresentaram maior depósito de matriz mineralizada em comparação a FEV e células $CD34^{pos}CD271^{neg}$, como observado pela coloração com o corante *Alizarin red* (Figura 19A-D). Estes resultados foram confirmados através das análises de absorbância do corante *Alizarin red* recuperado, revelando uma diferença significativa na

quantificação do corante entre esta população celular e as demais avaliadas (FEV: $0,093 \pm 0,136$, $CD34^{pos}CD271^{neg}$: $0,02 \pm 0,01$ e $CD34^{pos}CD271^{pos}$: $0,454 \pm 0,265$ OD) ($p = 0,0012$) (Figura 19E).

Figura 19: Diferenciação osteogênica das frações celulares $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$ e FEV. (A-D) Fotomicrografias representativas após diferenciação em osteócitos das células controle (A) e das populações celulares FEV (B), $CD34^{pos}CD271^{pos}$ (C) e $CD34^{pos}CD271^{neg}$ (D) demonstrando a capacidade de todas as células em depositar matriz mineralizada corada em vermelho pelo corante *Alizarin red*. Estas imagens revelam que células $CD34^{pos}CD271^{pos}$ formaram mais matriz mineralizada em relação as demais células avaliadas. (E) O gráfico obtido a partir da quantificação por densitometria óptica do corante *Alizarin Red* recuperado confirmam a diferença significativa entre a fração celular $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e as demais populações. Os resultados estão demonstrados em média $\pm$ DP e os asteriscos indicam os resultados com diferenças significativas. (**) $p < 0,01$, $n = 2$. Escala: $500\mu m$.

Quanto ao potencial condrogênico das frações celulares, os cortes histológicos dos *pellets* submetidos a diferenciação em condrócitos foram corados com Azul de Alciano. Através das fotomicrografias representativas é possível observar uma formação de matriz cartilaginosa mais densa corada em azul, demonstrando a presença de glicosaminoglicanos da matriz cartilaginosa (Figura 20B-C), quando comparado ao *pellet* controle (Figura 20A). Contudo, apesar de nas fotomicrografias aparentar existir diferenças entre a FEV e as populações obtidas do sorting, estas análises demonstram apenas qualitativamente a capacidade de diferenciação em condrócitos, não sendo possível comparar o potencial de diferenciação entre as populações celulares.

Figura 20: Diferenciação em condrócitos das frações celulares CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} e FEV. As fotomicrografias representativas dos cortes histológicos submetidos a coloração de azul de alciano evidenciam a formação de uma matriz cartilaginosa mais densa, demonstrada pela coloração em azul dos glicosaminoglicanos em relação ao pellet controle. A) Controle, B) FEV, C) CD34^{pos}CD271^{pos} e D) CD34^{pos}CD271^{neg}. Escala: 100µm.

4.9 As frações celulares CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} não cultivadas apresentam diferenças à nível de expressão gênica e proteica e podem apresentar distintas localizações *in vivo*

A fim de melhor caracterizar as CTMs do tecido adiposo análises de imunofluorescência *in situ* foram realizadas para identificar a possível localização destas células *in vivo*. As imagens dos cortes histológicos a partir da coloração de hematoxilina e eosina exibem a típica morfologia do tecido adiposo, composto de um grande número de adipócitos, capilares e vasos sanguíneos de diferentes tamanhos (Figura 21A-D).

Ao verificar a localização das células CD34^{pos}, as análises de imunofluorescência revelaram que estas parecem estar presentes na camada mais externa dos grandes vasos, conhecida como túnica adventícia. Para confirmar esta provável localização adventícia das CTMs-TA foi utilizado em conjunto a marcação do anticorpo CD31, para identificação de células endoteliais. Como observado nas imagens obtidas pela microscopia confocal pode-se identificar a existência de dois anéis distintos nos vasos sanguíneos, o mais interno correspondendo ao endotélio com marcação apenas do CD31 e o mais externo com marcação do anticorpo CD34, correspondendo provavelmente à túnica adventícia (Figura 21 I-M).

Ao investigar a localização do marcador de superfície celular CD271, as imagens da microscopia confocal revelaram que células positivas para este antígeno parecem localizar-se em uma camada próxima ao endotélio, semelhante à localização subendotelial dos pericitos (Figura 21N-Q). No entanto, assim como para a marcação do CD34, uma definição mais exata das túnicas adventícia, média e íntima seria necessária para confirmar a exata localização destes antígenos.

Figura 21: Localização *in situ* dos marcadores CD34, CD31 e CD271. (A-D) Histologia do tecido adiposo. As colorações de hematoxilina e eosina exibem a clássica estrutura do tecido adiposo rico em adipócitos (A e C) e vasos de diferentes tamanhos (B e D). (E-Q) Imunofluorescência para os marcadores CD34, CD31 e CD271. As análises de imunofluorescência realizadas nos cortes histológicos do tecido adiposo revelaram a existência de dois anéis distintos a partir da marcação do CD34 e CD31, no qual células CD34^{pos}CD31^{neg} parecem estar localizadas na túnica adventícia de grandes vasos (J, O, M e Q) e células CD31^{pos} foram encontradas em uma região característica ao endotélio (L e M). A dupla marcação para os antígenos CD34 e CD271 sugere que células CD271^{pos} estejam localizadas em uma região próxima ao endotélio (P e Q). As imagens E-H demonstram os controles negativos dos Alexas 488 e 546 nas amostras analisadas.

Apesar de em nossas análises de imunofluorescência não conseguirmos identificar a localização do marcador CD146 ou de outros antígenos relacionados à pericitos *in situ*, os resultados de expressão gênica das células obtidas por FACS sem cultivo celular demonstram que alguns destes marcadores apresentam baixas unidades relativas de expressão (URE) quando comparados a típicos genes de CTMs-TA, como por exemplo, o *CD34*. Além da baixa expressão do marcador CD146, como demonstrado por citometria de fluxo, PCR em tempo real e *western blotting*, o gene *DESMINA* apresentou níveis quase que indetectáveis nas populações avaliadas (FEV: $17,5 \pm 0,1$, $CD34^{pos}CD271^{pos}$: $1,6 \pm 0,7$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$: $1,1 \pm 0,7$ URE), assim como o gene *NG2* (FEV: $10,1 \pm 6,4$, $CD34^{pos}CD271^{pos}$: $19,3 \pm 5,2$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$: $7,5 \pm 3,1$ URE) (Figura 22A).

Contudo, ao analisarmos o gene *NESTINA*, observou-se que este apresentava uma expressão gênica superior na fração celular $CD34^{pos}CD271^{pos}$ ($162,1 \pm 92,2$ URE) em relação às células $CD34^{pos}CD271^{neg}$ ($35,7 \pm 13,4$ URE) e FEV ($17,5 \pm 0,9$ URE) (Figura 22A). De maneira semelhante, um aumento superior a 10 vezes foi observado para o gene *CD140A* e superior a 4 vezes para o gene *CD140B* em ambas as frações celulares em relação a FEV (Figura 22A). Para confirmar a expressão do gene *CD140B*, análises da expressão desta proteína foram realizadas pela técnica de *western blotting*. Os resultados revelam que, apesar de as duas frações celulares apresentarem a expressão deste gene, esta proteína é expressa mais intensamente apenas na população $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e em proporções menores nas células $CD34^{pos}CD271^{neg}$, não sendo observada nas células endoteliais (HUVEC) que serviram como controle negativo (Figura 22B).

Figura 22: Expressão gênica dos marcadores associados à pericitos e análise proteica do marcador CD140B. (A) O nível de expressão gênica em relação ao endógeno β -2-microglobulina de cada gene revelam baixa expressão dos genes *DESMINA*, *NESTINA* e *NG2* se comparados aos genes *CD140A* e *CD140B* que apresentaram altos níveis de expressão nas populações obtidas do *sorting* celular e na FEV. FEV - barras pretas,

CD34^{pos}CD271^{pos} – barras cinzas, CD34^{pos}CD271^{neg} – barras brancas. Os resultados estão representados em média $\pm$ desvio padrão (n = 3). **(B)** As marcações de *western blotting* demonstram que a proteína CD140B é expressa intensamente na fração celular CD34^{pos}CD271^{pos} se comparada a fração celular CD34^{pos}CD271^{neg} ou ao controle negativo HUVEC (n = 1).

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que ambas as populações celulares CD34^{pos}CD271^{neg} e CD34^{pos}CD271^{pos} são capazes de originar células com características de CTMs *in vitro*, possuindo perfil imunofenotípico compatível com CTMs, potencial de gerar CFU-Fs, alta capacidade proliferativa e potencial de diferenciação nas três linhagens mesodermas (osteócitos, condrócitos e adipócitos). As análises de imunofluorescência *in situ*, expressão gênica e de *western blotting* sugerem ainda que as frações celulares estudadas apresentam algumas diferenças fenotípicas, com as células CD34^{pos}CD271^{pos} expressando alguns marcadores associados a pericitos que não foram observados nas células CD34^{pos}CD271^{neg}. Além disso, a presença do receptor CD271 nas CTMs pode estar relacionada com vias de sinalização que potencializam a diferenciação osteogênica das mesmas.

O grande potencial das CTMs em diferenciar-se em diversos tipos celulares e de promover a secreção de uma ampla gama de moléculas bioativas tornaram estas células um importante alvo para utilização na terapia celular. Com a descoberta das CTMs no tecido adiposo, a possibilidade de se obter uma grande quantidade de células e a facilidade de obtenção destas amostras impulsionou os estudos para utilização das CTMs-TA no tratamento de uma ampla gama de doenças (revisado por GIMBLE; BUNNELL; GUILAK, 2012). No entanto, assim como para CTMs de outras fontes celulares, os insucessos observados em alguns ensaios clínicos demonstraram a necessidade de uma melhor compreensão da biologia destas células, principalmente com o intuito de selecionar as populações celulares utilizadas na aplicação clínica e a fim de melhor direcionar as pesquisas realizadas.

As descobertas ao longo dos anos que as CTMs possuem uma localização perivascular e são capazes de formar derivados mesodérmicos levou a premissa que todas as CTMs apresentariam as mesmas características fenotípicas *in vitro* e *in vivo*, independente de seu tecido de origem. No entanto, esta visão de CTMs como uma população uniforme, equipotente e igualmente distribuída pelo organismo vem sendo desmistificada e as diferenças entre populações de mesenquimais derivadas de diferentes fontes celulares tem se tornado mais aparente (revisado por LV *et al.*, 2014; STRIOGA *et al.*, 2012).

O marcador de superfície celular CD271, por exemplo, amplamente aceito e considerado um dos mais específicos para identificar células progenitoras mesenquimais na medula óssea (CATTORETTI *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 2002; QUIRICI *et al.*, 2002;

TORMIN *et al.*, 2011) tem se mostrado bastante variável entre as fontes de CTMs, não sendo encontrado, por exemplo, em células da membrana sinovial, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical (AHRARI *et al.*, 2013; KARYSTINOUS *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2011).

Poucos estudos investigaram em maiores detalhes a presença e função deste marcador nas CTMs do tecido adiposo (QUIRICI *et al.*, 2010; YAMAMOTO *et al.*, 2007). Por este motivo, este trabalho analisou o potencial do CD271 em identificar células progenitoras mesenquimais no tecido adiposo humano. As análises imunofenotípicas demonstraram a presença de células CD271 positivas ($17,0\% \pm 9,4$) neste tecido, sendo esta porcentagem superior ao comparar-se à CTMs obtidas da medula óssea, na qual 0,03 a 2,3% são positivas para o CD271 (KUÇI *et al.*, 2010; POLONI *et al.*, 2009; QUIRICI *et al.*, 2002; TORMIN *et al.*, 2011). De fato, a frequência de CTMs no tecido adiposo é superior a observada na medula óssea, com uma atividade de CFU-Fs 5 vezes maior (BOURIN *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos que já relataram a presença do marcador CD271 no tecido adiposo humano encontraram porcentagens menores de células positivas (0,6% a 5,6%) (GRIESCHE *et al.*, 2010; MEYERROSE *et al.*, 2007; QUIRICI *et al.*, 2010). No entanto, alguns fatores como a idade dos pacientes pode influenciar o percentual de células CD271^{pos} nas amostras. Um estudo recente revelou que a porcentagem de células CD271 em tecido adiposo humano é significativamente afetada pela faixa etária, demonstrando que a quantidade de células CD271^{pos} é inversamente proporcional a idade, com a mais alta porcentagem observada entre a faixa etária de 30-40 anos (CUEVAS-DIAZ DURAN *et al.*, 2013). Estes resultados haviam sido previamente demonstrados em tecido adiposo de camundongos, no qual Yamada e colaboradores (2010) comprovaram que camundongos com 3 semanas de vida possuíam uma porcentagem superior de CTMs CD271^{pos} ($35,9\% \pm 3,9$) quando comparados a camundongos com 24 semanas ($26,3\% \pm 2,6$) (YAMADA *et al.*, 2010).

Esta redução de células CD271^{pos} pode ser consequência de uma diminuição no número de células progenitoras presentes nos tecidos, corroborando o papel de marcador de células progenitoras mesenquimais para esta proteína (revisados por STOLZING *et al.*, 2008; TOMELLINI *et al.*, 2014). De fato, nos estudos onde a porcentagem de células CD271^{pos} foi inferior, a média de idade dos pacientes era superior a 40 anos, enquanto que a média de idade dos doadores em nosso trabalho foi de $34,0 \pm 4,7$ anos.

Em adição a caracterização imunofenotípica, as análises de citometria de fluxo demonstraram que apesar da presença deste marcador nas CTMs-TA não cultivadas, sua expressão diminuiu significativamente após aderência ao plástico. Esses resultados

corroboram outros trabalhos que já haviam relatado a forte influência da cultura celular sobre este marcador ao longo das passagens (BATTULA *et al.*, 2009; CHURCHMAN *et al.*, 2013; CUEVAS-DIAZ DURAN *et al.*, 2013; MIKAMI *et al.*, 2011; QUIRICI *et al.*, 2010). Além disso, a redução observada na porcentagem de células CD271^{pos} ao longo da cultura celular coincidiu com a diminuição da expressão de outro importante marcador de CTMs-TA, o CD34 (CORSELLI *et al.*, 2012; MIRANVILLE *et al.*, 2004; YOSHIMURA *et al.*, 2006). Nossas análises imunofenotípicas revelaram uma grande porcentagem de células CD34 positivas previamente ao cultivo celular, o que diminuiu significativamente logo nos primeiros dias de cultura, como já observado por outros trabalhos (MITCHELL *et al.*, 2006; TRAKTUEV *et al.*, 2008; YOSHIMURA *et al.*, 2006).

Embora o marcador de superfície celular CD34 tenha sido considerado durante décadas apenas como um marcador de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas, nos últimos anos evidências vem demonstrando que ele pode identificar outros tipos celulares não-hematopoiéticos, incluindo progenitoras endoteliais (ASAHARA, 1997; FINA; MOLGAARD, 1990), mesenquimais (MIRANVILLE *et al.*, 2004; SIMMONS; TOROK-STORB, 1991) e epiteliais (BLANPAIN *et al.*, 2004). O exato papel desta proteína nestas células ainda é desconhecido, contudo, estudos em CTH sugerem que ele possa estar relacionado com a regulação da adesão celular, diferenciação e proliferação, e que a diminuição ou perda de sua expressão seja decorrência da ativação destas células de um estado quiescente até sua diferenciação (HEALY *et al.*, 1995; NIELSEN; MCNAGNY, 2009).

De fato, a baixa expressão do CD34 observada em células cultivadas, o que acabou caracterizando este como um marcador negativo para as CTMs, parece ser decorrência de um processo de diferenciação provocado pelo cultivo celular sob aderência ao plástico. Maumus e colaboradores (2011) comprovaram que a porcentagem de células CD34^{pos} diminui consideravelmente quando cultivada em meios de cultura contendo 10%SBF, enquanto a proporção de células CD34^{pos} permaneceu estável por um período maior de tempo no meio contendo apenas 2% SFB.

Apesar da influência da cultura celular nestes dois marcadores, o CD271 e CD34 têm sido amplamente associados à CTMs com alta atividade de CFU-F em amostras como medula óssea e tecido adiposo. Simmons & Torok-Storb (1991), em uma análise detalhada das CTMs-MO observaram que mais de 95% das CFU-Fs identificadas eram positivas para CD34, resultados que foram mais tarde confirmados por outro grupo de pesquisa

demonstrando que na medula óssea a atividade de CFU-F também estaria presente na população CD34^{pos} (KAISER *et al.*, 2007). Embora esta hipótese ainda seja muito debatida na medula óssea, visto que alguns pesquisadores sugerem que esta função é exclusiva de células CD34^{neg} (SACCHETTI *et al.*, 2007), as análises no tecido adiposo têm comprovado que células CD34^{pos} apresentam o mais alto potencial de formação de colônias quando comparadas as células CD34^{neg} (MAUMUS *et al.*, 2011; SUGA *et al.*, 2009).

Por outro lado, o marcador CD271 está mais bem estabelecido como marcador para CFU-Fs na medula óssea, na qual diversos trabalhos demonstram que a geração de colônias fibroblastóides é restrita a população CD271^{pos} (KUÇI *et al.*, 2010; MABUCHI *et al.*, 2013; QUIRICI *et al.*, 2002; TORMIN *et al.*, 2011). No tecido adiposo um trabalho de caracterização de células CD271^{pos} sugeriu existir uma frequência superior de CFU-Fs nesta população (QUIRICI *et al.*, 2010). No entanto, as análises realizadas por eles foram baseadas em células cultivadas por um curto período de tempo antes do início dos experimentos, o que pode ter levado a uma alteração na atividade de CFU-Fs destas células. Além disso, células CD271^{neg} não foram analisadas em conjunto para comparação.

Nossos ensaios de formação de colônias pelas frações celulares CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} revelaram que ambas as populações foram capazes de gerar CFU-Fs. No entanto, de maneira contraditória ao sustentado pela literatura na medula óssea, a população CD34^{pos}CD271^{neg} apresentou uma eficiência de formação de colônias superior em todos os tecidos analisados. Mabuchi e colaboradores (2013) também identificaram que células selecionadas negativamente para o CD271 no tecido adiposo poderiam gerar colônias fibroblastóides. Achados semelhantes já foram demonstrados em CTMs da polpa dentária, na qual a fração celular CD271^{neg} também apresentava capacidade de formação de CFU-Fs, embora em uma capacidade inferior ao das células CD271^{pos} (MIKAMI *et al.*, 2011).

Até hoje pouco se sabe sobre a verdadeira função do receptor CD271 nas CTMs e as tentativas de elucidar o papel fisiológico desta proteína têm sido baseadas em funções desempenhadas em outros tipos celulares, como células derivadas da crista neural, células-tronco embrionárias e alguns tipos de células-tronco/progenitoras somáticas. Os estudos demonstram que a ligação de baixa afinidade deste receptor com diferentes neurotrofinas (NGF, BDNF, NT-3 e NT-4/5), assim como a interação com diferentes co-receptores (Trk, Sortilina-1, NogoR e LINGO-1), podem ser responsáveis pelas diversas funções atribuídas a ele, como por exemplo sobrevivência celular, apoptose, regulação do ciclo celular, migração e invasão celular e diferenciação de células progenitoras (revisado por TOMELLINI *et al.*,

2014).

Nos últimos anos pesquisas têm apontado que a interação como co-receptor dos receptores tropomiosina quinase (Trks) é a principal via de ação deste receptor, demonstrando que a presença do CD271 pode facilitar a afinidade e seletividade de cada neurotrofina por seu receptor, como por exemplo, NGF ao receptor TrkA e BDNF ao TrkB, e assim desempenhar as diferentes funções associadas a ele (revisado por UNDERWOOD; COULSON, 2008). De fato, em um estudo com células-tronco embrionárias humanas (CTEh), Pyle e colaboradores (2006) identificaram que as neurotrofinas BDNF, NT-4/5 e NT-3 sustentavam a sobrevivência das CTEh através da ligação aos seus receptores TrkB e TrkC, e sugeriram que a expressão do CD271 observada nestas células poderia auxiliar na ativação desta via de sinalização (PYLE; LOCK; DONOVAN, 2006). De maneira semelhante, o CD271 parece desempenhar algumas funções em conjunto com as neurotrofinas NGF e proNGF no desenvolvimento dos dentes, mediando assim a diferenciação dos odontoblastos (LUUKKO *et al.*, 1996; MITSIADIS *et al.*, 1993).

Na pele, as neurotrofinas parecem atuar tanto na inervação do tecido como na liberação de fatores de crescimento e sobrevivência para células epidermais. Os resultados de silenciamento do receptor CD271, através de siRNA, demonstraram que ele é diretamente relacionado a capacidade de proliferação e viabilidade de fibroblastos dermais (PALAZZO *et al.*, 2012). Apesar desta evidência, no tecido adiposo o CD271 parece não interferir no potencial proliferativo das CTMs-TA, visto que os experimentos de proliferação celular das populações CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} não apresentaram diferenças significativas entre estas células.

Nas CTMs, Braum e colaboradores (2013) recentemente sugeriram que a presença deste marcador na fase inicial da cultura celular poderia estar relacionada com a adesão celular e migração, visto que populações selecionadas negativamente para este antígeno passavam a expressá-lo nos primeiros 14 dias de cultura, diminuindo consideravelmente após este período. De fato, nossas análises imunofenotípicas também demonstraram que houve um pequeno aumento da expressão do CD271 na população CD34^{pos}CD271^{neg} após a aderência celular, contudo, ainda não existe nenhuma evidência comprovando o envolvimento desta proteína e a capacidade de adesão das CTMs.

O que diferentes estudos têm apontado nos últimos anos é que o CD271 provavelmente esteja envolvido na capacidade das CTMs em diferenciar-se nas diferentes linhagens mesodérmicas (KUÇI *et al.*, 2010; QUIRICI *et al.*, 2002, 2010; RADA; REIS;

GOMES, 2011). Alguns pesquisadores sugerem ainda que este controle de diferenciação esteja mais relacionado ao potencial osteogênico, no qual o receptor CD271 poderia atuar como co-receptor de vias de sinalização Trk e neurotrofinas ou vias alternativas como NogoR e sortilina para aumentar a capacidade de mineralização destas células (AKIYAMA *et al.*, 2014; AL HALABIAH *et al.*, 2005). Akiyama e colaboradores (2014) demonstraram por meio de uma linhagem celular humana de osteoblastos (MG63) superexpressando a proteína CD271 que estas células após diferenciação exibiam maior expressão gênica de genes associados à diferenciação osteogênica (osterix e sialoproteína óssea) e aumento da atividade da fosfatase alcalina quando comparadas as células MG63 não modificadas. Na ocasião, eles demonstraram ainda que estas células possuíam todos os receptores Trk e o receptor NogoR que poderiam ser as vias de sinalização ativadas nesse processo.

Nossos resultados demonstraram que ambas as populações celulares CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} do tecido adiposo foram capazes de diferenciar-se nas três linhagens mesodérmicas (osteócitos, adipócitos e condrócitos), de acordo com os critérios estabelecidos pela ISCT para caracterização das CTMs (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, a fração celular CD34^{pos}CD271^{pos} apresentou um potencial de diferenciação osteogênica significativamente maior em relação a FEV e CD34^{pos}CD271^{neg}, indicando que a expressão de CD271 pode influenciar a capacidade de produção de matriz mineralizada pelas CTMs do tecido adiposo.

Em adição a estas vias de sinalização durante a diferenciação osteogênica, Maeda e colaboradores (2002) relataram através de estudos com CTMs da medula óssea humana que o gene *SORTILINA* estava aumentado durante o processo de diferenciação osteogênica das CTMs, e quando superexpresso através de vetores virais este processo de diferenciação era acelerado. Ao avaliar os efeitos da lipoproteína lipase (LPL), presente em adipócitos e que se liga ao receptor sortilina, eles verificaram que esta proteína poderia levar a inibição do processo de mineralização das CTMs (MAEDA *et al.*, 2002). De fato, embora em nosso estudo não se tenha mensurado os níveis de LPL nas populações celulares avaliadas, dos quatro tecidos submetidos à diferenciação osteogênica apenas dois foram capazes de diferenciar-se em osteócitos. Fato este já relatado por nosso grupo anteriormente, no qual não se observou a diferenciação em osteócitos de CTMs do tecido adiposo (COVAS *et al.*, 2008).

Por outro lado, Maeda e colaboradores (2002) demonstraram que quando o gene sortilina foi superexpresso nas CTMs este era capaz de bloquear o efeito inibitório da LPL. Considerando, portanto, que o CD271 pode atuar como co-receptor junto ao receptor sortilina,

é possível que a interação entre esses receptores possa ter aumentado a atividade do receptor sortilina nas CTMs e levado ao aumento da mineralização por estas células. Contudo, como estas vias são ativadas e porque eles são ativadas em apenas algumas células não está resolvido. Mais estudos envolvendo modelos animais knockdown para esses receptores e/ou superexpressão dos mesmos serão necessários para estabelecer uma relação causal entre expressão de CD271 e a diferenciação osteogênica.

Em resumo, estes diferentes resultados observados por nosso trabalho e outros grupos demonstram que nem todos os tipos celulares acima citados respondem a presença do CD271 de forma idêntica, demonstrando que o contexto celular e molecular pode promover a inibição ou promoção dos processos de diferenciação, proliferação ou mesmo sobrevivência, e estes podem ser influenciados pela ausência ou presença dos co-receptores associados ao CD271, o que dificulta sugerir um único modo de ação para esta proteína.

Por outro lado, apesar de todas essas caracterizações *in vitro* serem fundamentais para a compreensão sobre estas células para a utilização clínica e entendimento dos mecanismos que governam os processos desempenhados por elas, é cada vez mais aceita a visão que a biologia *in vivo* das CTMs é diferente desta observada *in vitro* (revisados por CAPLAN; CORREA, 2011; MURRAY *et al.*, 2014). A comparação entre os fenótipos destas células *in vivo* e o observado após períodos de cultura demonstra que eles são fortemente modificados pelo microambiente artificial criado na cultura celular (LIN *et al.*, 2010; MITCHELL *et al.*, 2006). De fato, nossos resultados de citometria de fluxo revelaram que marcadores associados à CTMs-TA e pericitos, como CD73, CD90, NG2, CD146 e PDGFRs, passam a ser expressos em porcentagens muito superiores após um tempo em cultura em relação às células não cultivadas.

Existe uma ampla literatura que suporta a hipótese que, independente da fonte anatômica, as CTMs ocupam o espaço perivascular dos vasos sanguíneos (revisado por BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008). No entanto, a exata localização e a identidade apresentada por elas neste nicho não são totalmente compreendidas. Alguns pesquisadores postularam que estas células correspondam a pericitos *in vivo*, principalmente devido a identificação de alguns marcadores de superfície celular associados à pericitos capazes de gerar células com características de CTMs *in vitro* (COVAS *et al.*, 2008; CRISAN *et al.*, 2008; MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2010; TRAKTUEV *et al.*, 2008; ZANNETTINO *et al.*, 2008).

A concepção de que CTMs-TA também seriam pericitos foi proposta por Traktuev e

colaboradores (2008), os quais observaram a presença de células CD34^{pos}CD31^{neg} e células CD140b^{pos}CD31^{neg} próximo ao endotélio através de análises *in situ*. Estes achados os levaram a sugerir uma identidade pericítica para as CTMs-TA. Contudo, eles não providenciaram evidências demonstrando se as células CD34^{pos} eram também CD140b^{pos}, sendo inconclusivos seus resultados. Além disso, embora eles tenham enfatizado esta teoria com base na expressão de marcadores de pericitos *in vitro*, hoje se sabe que estas características são adquiridas pela cultura celular e não reflexo do fenótipo *in vivo*.

Pericitos são normalmente definidos com base na sua localização *in vivo*, presentes em regiões subendoteliais de microvasos como arteríolas, capilares e vênulas. Contudo, esta definição tem sido reconsiderada visto que células com estas características podem também ser observadas em regiões subendoteliais de grandes vasos (revisado por DIAZ-FLORES *et al.*, 1991). As diferenças entre pericitos e CTMs e se estas de fato correspondem a diferentes tipos celulares ainda é alvo de intenso debate na comunidade científica. Alguns trabalhos realizados por nosso grupo já identificaram células com propriedades de CTMs na veia safena (COVAS *et al.*, 2005) e cordão umbilical (COVAS *et al.*, 2003), demonstrando que CTMs podem não ser exclusivas de microvasos contendo pericitos. De fato, mais recentemente algumas evidências têm demonstrado que a adventícia de diferentes vasos pode ser uma reserva de células com características de CTMs, questionando a hipótese de CTMs como pericitos (CORSELLI *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2008; MAUMUS *et al.*, 2011).

As análises de imunofluorescência *in situ* deste trabalho vão de encontro à possibilidade da existência de CTMs-TA em grandes vasos no tecido adiposo, mais especificamente na túnica adventícia. As imagens obtidas da dupla marcação de CD34 e CD31 parecem corroborar uma localização das CTMs-TA (CD34^{pos}CD31^{neg}) na camada mais externa de vasos sanguíneos, acima da túnica média (caracterizada por células musculares) e túnica íntima (composta de células endoteliais). Estes resultados assemelham-se com os achados de Lin e colaboradores (2008), que demonstraram através de técnicas de imunohistoquímica a existência de distintas populações nos vasos sanguíneos do tecido adiposo, uma mais interna com dupla marcação para o CD31 e CD34, as quais seriam células endoteliais, e outra localizada na túnica adventícia, com marcação apenas para o CD34. Em adição, eles demonstraram ainda que estas células não expressavam alguns marcadores relacionados a pericitos e músculo liso como CD140b e α SMA, respectivamente.

Outros grupos de pesquisa deram ênfase a esta hipótese nos últimos anos, demonstrando a presença de CTMs na túnica adventícia e que estas não expressavam

marcadores clássicos de pericitos, como NG2, CD146, CD140b e α SMA, e exibiam marcadores de CTMs como CD90 e C73 *in situ* (MAUMUS *et al.*, 2011; ZIMMERLIN *et al.*, 2010, 2013).

Embora em nossas marcações de imunofluorescência não tenha se identificado nenhum dos marcadores associados à pericitos *in situ*, demonstrou-se através de análises de expressão gênica que estas células sem cultivo apresentavam baixa expressão de genes relacionados a este tipo celular, como CD146, desmina e NG2. Corselli e colaboradores (2012) recentemente comprovaram por meio de técnicas de imunofluorescência que estas células adventícias não co-expressavam o marcador CD146 *in situ* e que, além disso, estas células quando cultivadas apropriadamente apresentavam características típicas de CTMs *in vitro*, sendo negativas para os principais marcadores associados a pericitos, como NG2, CD140b, α SMA e CD146 *in vitro* (CORSELLI *et al.*, 2012).

Por outro lado, nossos resultados de PCR em tempo real revelaram alta expressão de transcritos que codificam os genes *CD140b* e *CD140a* em ambas as frações celulares estudadas. Ao se averiguar a presença da proteína CD140B nestas células observou-se que esta era expressa apenas na fração celular CD34^{pos}CD271^{pos}. Alguns grupos de pesquisa postulam que pericitos do tecido adiposo expressam este marcador tanto *in vitro* como *in vivo* (CORSELLI *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2008; ZIMMERLIN *et al.*, 2010). De maneira semelhante, os dados de expressão gênica revelaram que o gene *NESTINA* foi expresso em maiores níveis na fração celular CD34^{pos}CD271^{pos} em relação as células CD34^{pos}CD271^{neg} e FEV. No entanto, a análise proteica deste marcador não pôde ser realizada, não permitindo confirmar se a proteína é também expressa por estas células.

Ao analisar a localização *in situ* do CD271 no tecido adiposo, as imagens de microscopia confocal revelaram que este antígeno parece localizar-se na camada mais próxima a túnica íntima dos vasos sanguíneos, semelhante aos pericitos, os quais são justapostos ao endotélio. Contudo, estas marcações mostraram-se inconclusivas visto que não foi possível identificar a co-localização com o marcador CD31, para definir esta proximidade ao endotélio, ou o α -SMA, para identificar a túnica média.

Poucos trabalhos investigaram a localização do CD271 *in situ*, sendo que em um deles as análises de dupla marcação com CD31, CD146 ou α -SMA diferentemente demonstraram que o CD271 identifica células na adventícia de vasos da medula óssea (TORMIN *et al.*, 2011). Logo, a falta de estudos *in situ* para este receptor no tecido adiposo ou outras fontes celulares dificulta uma discussão mais detalhada de sua localização *in vivo*.

Um trabalho recente demonstrou que CTMs-TA poderiam ser obtidas *in vitro* tanto de células da adventícia (CD34^{pos}CD31^{neg}CD146^{neg}) como de pericitos (CD34^{neg}CD31^{neg}CD146^{pos}), e que estas células apresentavam similar capacidade proliferativa e de diferenciação, sugerindo que ambos os tipos celulares poderiam corresponder às CTMs-TA (BRAUN *et al.*, 2013). Na ocasião, eles demonstraram ainda que ambas as frações celulares estudadas expressavam o marcador CD271.

Recentemente, Zhao e colaboradores (2014) então providenciaram fortes evidências indicando que as CTMs adventícias seriam as células progenitoras mais primitivas e que dariam origem aos pericitos. Eles demonstraram que células Gli1^{pos} de dentes incisivos de camundongo ocupavam a camada mais externa em torno de arteríolas e eram capazes de originar todas as células estromais durante a renovação do mesênquima e reparo após danos no tecido, o que não foi observado por pericitos NG2^{pos}. A partir disto, eles provaram através de um modelo Cre-recombinase para rastreamento de linhagens *in vivo*, que células periarterial Gli1^{pos} davam origem aos pericitos NG2^{pos} *in vivo*. Após cultura das CTMs obtidas do mesênquima do dente, todas as células eram capazes de diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos e possuíam um perfil imunofenotípico compatível com CTMs. Contudo, mais de 95% destas células eram derivadas das células Gli1^{pos} e apenas 5% eram pericitos NG2^{pos}, demonstrando assim, que pericitos NG2^{pos} praticamente não contribuíram para a renovação do mesênquima em dentes de camundongo (ZHAO *et al.*, 2014).

Nossos resultados em células não cultivadas e *in situ*, além dos trabalhos acima mencionados, podem dar suporte para a discussão se pericitos e CTMs correspondem ao mesmo tipo celular. Até o momento, as principais evidências que demonstram existir diferenças entre elas nos tecidos humanos são baseadas na ausência da expressão do CD146 por CTMs, visto que este é comumente associado a células designadas como pericitos (COVAS *et al.*, 2008; CRISAN *et al.*, 2008) e por suas diferentes localizações *in vivo*. No entanto, outros marcadores podem ser diferencialmente expressos por estas células, como a desmina, um dos poucos antígenos relatados apenas em pericitos (NEHLS; DENZER; DRENCKHAHN, 1992) e não nas CTMs (CHAN *et al.*, 2006) até o momento. Os dados de expressão gênica deste trabalho não indicaram a presença deste gene em ambas às frações celulares obtidas do *sorting*, mas análises proteicas precisariam ser realizadas para confirmar a ausência da proteína.

Em resumo, os resultados revelam diferenças entre as frações celulares CD34^{pos}CD271^{pos} e CD34^{pos}CD271^{neg} não cultivadas, sendo que a primeira apresentou

algumas semelhanças fenotípicas com pericitos, como superior expressão do gene *NESTINA* e expressão da proteína CD140B. Além disso, células CD271^{pos} parecem estar justapostas ao endotélio nos vasos sanguíneos do tecido adiposo. Por outro lado, as análises da frequência de CFU-Fs destas células, demonstraram que células CD34^{pos}CD271^{neg} possuem maior potencial de formação de colônias, corroborando outros trabalhos que relatam que células presentes na adventícia de grandes vasos no tecido adiposo são mais clonogênicas que outros tipos de células perivasculares, como pericitos (BRAUN *et al.*, 2013).

A utilização de modelos animais que permitam rastrear estas linhagens *in vivo* poderá auxiliar na caracterização de CTMs e pericitos e definir quais as diferenças existentes entre elas, permitindo no futuro traçar um perfil imunofenotípico mais fidedigno ao *in vivo*. Além disso, para efetivamente comprovar que estas CTMs-TA são verdadeiras células-tronco, ensaios a nível clonal e *in vivo* tornam-se necessários, para assim demonstrar a capacidade de multipotencialidade, autorrenovação e a “*stemness*” destas células.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

As CTMs-TA obtidas nesse trabalho apresentam os aspectos morfológicos, fenotípicos e de diferenciação nas três linhagens mesodérmicas característicos das CTMs *in vitro*, como estabelecido pelo ISCT. Nossos dados demonstram que estas células apresentam o perfil imunofenotípico descrito para as CTMs-TA nos últimos anos ($CD31^{neg}CD45^{neg}CD34^{pos}CD146^{neg}$), no entanto, existem algumas diferenças entre as frações celulares $CD34^{pos}CD271^{pos}$ e $CD34^{pos}CD271^{neg}$, com a primeira apresentando algumas similaridades com pericitos.

Embora a fração celular $CD271^{pos}$ seja enriquecida com CTMs na medula óssea, nossos resultados demonstram que, no tecido adiposo, células com características de CTMs podem estar presentes em ambas as populações $CD271^{pos}$ e $CD271^{neg}$, o que comprova que os marcadores moleculares podem ser afetados pelo microambiente nativo do tecido.

Em adição, é possível que a presença do receptor CD271 nas CTMs-TA esteja relacionada com vias de sinalização que aumentam o potencial de mineralização destas células. No entanto, estudos investigando em maiores detalhes a forma de interação desta proteína com vias de sinalização relacionadas principalmente aos co-receptores Trks, NOGO-R e SORT-1, por exemplo, serão necessários para clarificar a verdadeira relação e função deste receptor na capacidade de diferenciação em osteócitos das CTMs.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- AHRARI, I. et al. CD271 enrichment does not help isolating mesenchymal stromal cells from G-CSF-mobilized peripheral blood. **Molecular Biology**, v. 47, n. 5, p. 685–691, 2013.
- AKIYAMA, Y. et al. The P75 neurotrophin receptor regulates proliferation of the human MG63 osteoblast cell line. **Differentiation**, v. 87, n. 3-4, p. 111–118, 2014.
- AL HALABIAH, H. et al. Expression pattern of NOGO and NgR genes during human development. **Gene expression patterns**, v. 5, n. 4, p. 561–8, 2005.
- ASAHARA, T. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964–966, 1997.
- BATTULA, V. L. et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. **Haematologica**, v. 94, n. 2, p. 173–84, 2009.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313–9, 2008.
- BILLON, N. et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2283–92, 2007.
- BILLON, N.; MONTEIRO, M. C.; DANI, C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. **Biology of the cell**, v. 100, n. 10, p. 563–75, 2008.
- BLANPAIN, C. et al. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**, v. 118, n. 5, p. 635–48, 2004.
- BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641–8, 2013.
- BRACCI-LAUDIERO, L. et al. CD34-positive cells in human umbilical cord blood express nerve growth factor and its specific receptor TrkA. **Journal of Neuroimmunology**, v. 136, n. 1-2, p. 130–139, 2003.

- BRAUN, J. et al. Concerted regulation of CD34 and CD105 accompanies mesenchymal stromal cell derivation from human adventitial stromal cell. **Stem cells and development**, v. 22, n. 5, p. 815–27, 2013.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research**, v. 9, n. 5, p. 641–50, 1991.
- CAPLAN, A. I.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell stem cell**, v. 9, n. 1, p. 11–5, 2011.
- CATTORETTI, G. et al. Bone marrow stroma in humans: anti-nerve growth factor receptor antibodies selectively stain reticular cells in vivo and in vitro. **Blood**, v. 81, n. 7, p. 1726–38, 1993.
- CHAN, J. et al. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. **Stem cells**, v. 24, n. 8, p. 1879–91, 2006.
- CHURCHMAN, S. M. et al. Yield optimisation and molecular characterisation of uncultured CD271 + mesenchymal stem cells in the reamer. **European Cells and Materials** v. 26, p. 252–262, 2013.
- CIVIN, C.; STRAUSS, L.; BROVALL, C. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol**, n. 24, p. 157–165, 1984.
- CORSELLI, M. et al. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 30, n. 6, p. 1104–9, 2010.
- CORSELLI, M. et al. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 8, p. 1299–308, 2012.
- COVAS, D. T. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 36, n. 9, p. 1179–83, 2003.
- COVAS, D. T. et al. Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental cell research**, v. 309, n. 2, p. 340–4, 2005.
- COVAS, D. T. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+

- perivascular cells and fibroblasts. **Experimental hematology**, v. 36, n. 5, p. 642–54, 2008.
- CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 301–13, 2008.
- CUEVAS-DIAZ DURAN, R. et al. Age-related yield of adipose-derived stem cells bearing the low-affinity nerve growth factor receptor. **Stem cells international**, v. 2013, p. 372164, 2013.
- DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204–13, 2006.
- DIAZ-FLORES, L. et al. Microvascular pericytes: A review of their morphological and functional characteristics, **Histology and Histopathology**, v. 6, n. 2, p. 269-86, 1991.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–7, 2006.
- DRAGOO, J. L. et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. **Journal of orthopaedic research**, v. 21, n. 4, p. 622–9, 2003.
- ERICKSON, G. R. et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 290, n. 2, p. 763–9, 2002.
- FINA, L.; MOLGAARD, H. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. **Blood**, v.75, n. 12, p. 2417-26, 1990.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381–390, 1966.

- GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A.; GUILAK, F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. **Regenerative medicine**, v. 7, n. 2, p. 225–35, 2012.
- GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. **Circulation Research**, v. 100, n. 9, p. 1249–1260, 2007.
- GRIESCHE, N. et al. A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of adipose-derived stem cells. **Cells, tissues, organs**, v. 192, n. 2, p. 106–15, 2010.
- HEALY, L. et al. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 26, p. 12240–4, 1995.
- 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. 393–5, 2005.
- HU, Y.; XU, Q. Adventitial biology: differentiation and function. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 31, n. 7, p. 1523–9, 2011.
- JOE, A. W. B. et al. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. **Stem cells**, v. 27, n. 10, p. 2563–70, 2009.
- JONES, E. A. et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. **Arthritis and rheumatism**, v. 46, n. 12, p. 3349–60, 2002.
- KAISER, S. et al. BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. **Cytotherapy**, v. 9, n. 5, p. 439–50, 2007.
- KARYSTINO, A. et al. Distinct mesenchymal progenitor cell subsets in the adult human synovium. **Rheumatology**, v. 48, n. July, p. 1057–1064, 2009.
- KUÇI, S. et al. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. **Haematologica**, v. 95, n. 4, p. 651–9, 2010.
- LEE, R. H. et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular physiology and biochemistry**, v. 14, n. 4-6, p. 311–24, 2004.

- LIN, C. et al. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. **Histology and histopathology**, v. 25, p. 807–15, 2010.
- LIN, G. et al. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. **Stem cells and development**, v. 17, n. 6, p. 1053–63, 2008.
- LUUKKO, K. et al. Expression of neurotrophin receptors during rat tooth development is developmentally regulated, independent of innervation, and suggests functions in the regulation of morphogenesis and innervation. **Developmental dynamics**, v. 206, n. 1, p. 87–99, 1996.
- LV, F.-J. et al. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 32, n. 6, p. 1408–19, 2014.
- MABUCHI, Y. et al. LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) Cells Reveal Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells. **Stem cell reports**, v. 1, n. 2, p. 152–65, 2013.
- MAEDA, S. et al. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. **Journal of cellular physiology**, v. 193, n. 1, p. 73–9, 2002.
- MAUMUS, M. et al. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. **International journal of obesity**, v. 35, n. 9, p. 1141–53, 2011.
- MCKAY, R. Stem Cells in the Central Nervous System. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 66–71, 1997.
- MÉNDEZ-FERRER, S. et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829–34, 2010.
- MEYERROSE, T. E. et al. In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. **Stem cells**, v. 25, n. 1, p. 220–7, 2007.
- MIKAMI, Y. et al. CD271/p75(NTR) inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. **Stem cells and development**, v. 20, n. 5, p. 901–13, 2011.
- MIRANVILLE, A et al. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. **Circulation**, v. 110, n. 3, p. 349–55, 2004.

- MITCHELL, J. B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem cells**, v. 24, n. 2, p. 376–85, 2006.
- MITSIADIS, T. A. et al. Patterns of nerve growth factor (NGF), proNGF, and p75 NGF receptor expression in the rat incisor: comparison with expression in the molar. **Differentiation**, v. 54, n. 3, p. 161–175, 1993.
- MIZUNO, H. et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 109, n. 1, p. 199–209, 2002.
- MORRISON, S. J. et al. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. **Cell**, v. 96, n. 5, p. 737–49, 1999.
- MURRAY, I. R. et al. Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 8, p. 1353–74, 2014.
- NEHLS, V.; DENZER, K.; DRENCKHAHN, D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. **Cell and Tissue Research**, v. 270, n. 3, p. 469–474, 1992.
- NIELSEN, J. S.; MCNAGNY, K. M. CD34 is a key regulator of hematopoietic stem cell trafficking to bone marrow and mast cell progenitor trafficking in the periphery. **Microcirculation**, v. 16, n. 6, p. 487–96, 2009.
- OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.
- PALAZZO, E. et al. Role of neurotrophins on dermal fibroblast survival and differentiation. **Journal of cellular physiology**, v. 227, n. 3, p. 1017–25, 2012.
- PHINNEY, D. G.; SENSEBÉ, L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. **Cytotherapy**, v. 15, n. 2, p. 140–5, 2013.
- PITTENGER, M. F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999.
- POLONI, A. et al. Selection of CD271(+) cells and human AB serum allows a large expansion of mesenchymal stromal cells from human bone marrow. **Cytotherapy**, v. 11, n. 2, p. 153–62, 2009.

- PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71–74, 1997.
- PYLE, A. D.; LOCK, L. F.; DONOVAN, P. J. Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 344–50, 2006.
- QUIRICI, N. et al. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. **Experimental hematology**, v. 30, n. 7, p. 783–91, 2002.
- QUIRICI, N. et al. Anti-L-NGFR and -CD34 monoclonal antibodies identify multipotent mesenchymal stem cells in human adipose tissue. **Stem cells and development**, v. 19, n. 6, p. 915–25, 2010.
- RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. **Stem cell reviews**, v. 7, n. 1, p. 64–76, 2011.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. i. effects of hormones on glucose. **The Journal of biological chemistry**, v. 239, p. 375–380, 1964.
- SACCHETTI, B. et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. **Cell**, v. 131, n. 2, p. 324–36, 2007.
- SAFFORD, K. M. et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 294, n. 2, p. 371–9, 2002.
- SCHÄFFLER, A.; SCHÖLMERICH, J.; BÜCHLER, C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in intestinal and mesenteric diseases. **Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology**, v. 2, n. 2, p. 103–11, 2005.
- SEO, M. J. et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 328, n. 1, p. 258–64, 2005.
- SIMMONS, P. J.; TOROK-STORB, B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. **Blood**, v. 78, n. 11, p. 2848–53, 1991.
- SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 457–78, 2011.

- SLACK, J. M. Stem Cells in Epithelial Tissues. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1431–1433, 2000.
- STENMARK, K. R. et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 23–47, 2013.
- STOLZING, A et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. **Mechanisms of ageing and development**, v. 129, n. 3, p. 163–73, 2008.
- STRIOGA, M. et al. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 14, p. 2724–52, 2012.
- SUGA, H. et al. Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. **Stem cells and development**, v. 18, n. 8, p. 1201–10, 2009.
- TAKASHIMA, Y. et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1377–88, 2007.
- THOMSON, T. M. et al. Expression of human nerve growth factor receptor on cells derived from all three germ layers. **Experimental cell research**, v. 174, n. 2, p. 533–9, 1988.
- TOMELLINI, E. et al. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. **Cellular and molecular life sciences**, v. 71, n. 13, p. 2467–81, 2014.
- TORMIN, A. et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5067–77, 2011.
- 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.
- UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726–36, 2008.
- UNDERWOOD, C. K.; COULSON, E. J. The p75 neurotrophin receptor. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 40, n. 9, p. 1664–8, 2008.
- WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157–68, 2000.

- WONG, C. E. et al. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **The Journal of cell biology**, v. 175, n. 6, p. 1005–15, 2006.
- YAMADA, T. et al. Age-related changes of p75 neurotrophin receptor-positive adipose-derived stem cells. **Journal of dermatological science**, v. 58, n. 1, p. 36–42, 2010.
- YAMAMOTO, N. et al. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of dermatological science**, v. 48, n. 1, p. 43–52, 2007.
- YOSHIMURA, K. et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **Journal of cellular physiology**, v. 208, n. 1, p. 64–76, 2006.
- ZANNETTINO, A C. W. et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **Journal of cellular physiology**, v. 214, n. 2, p. 413–21, 2008.
- ZHANG, X. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 4, p. 1206–18, 2011.
- ZHAO, H. et al. Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor. **Cell stem cell**, v. 14, n. 2, p. 160–73, 2014.
- ZIMMERLIN, L. et al. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. **Cytometry. Part A**, v. 77, n. 1, p. 22–30, 2010.
- ZIMMERLIN, L. et al. Mesenchymal markers on human adipose stem/progenitor cells. **Cytometry. Part A**, v. 83, n. 1, p. 134–40, 2013.
- ZUK, P. A et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211–28, 2001.
- ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 12, p. 4279–95, 2002.

APÊNDICE

Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário Monte Alegre

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Coleta de tecido adiposo

NOME DA PESQUISA:

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES CELULARES DO
TECIDO ADIPOSE**

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Liziane Raquel Beckenkamp / Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Prezado (a) paciente,

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto tem por finalidade estudar melhor as características das células mesenquimais, que são células adultas presentes na gordura humana (tecido adiposo) e que podem dar origem a tecidos no corpo como osso, músculo e tecido adiposo, podendo assim ajudar em estudos de novos tratamentos para diversas doenças.

A sua participação é voluntária.

Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se você estiver interessado (a) em participar, pedimos que assine este documento. Ainda será entregue uma cópia deste documento a você, devidamente assinado pelos pesquisadores responsáveis.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

As células mesenquimais são células presentes em todo o nosso corpo e que compõem tecidos como osso, músculo e gordura. Por esse motivo espera-se que esta célula possa ser

utilizada para o tratamento de diferentes doenças no futuro, substituindo as células que foram perdidas ou danificadas por causa de alguma doença. A intenção que temos ao estudar melhor esta célula é entender como ela funciona no nosso corpo e quais as características que elas possuem no início e ao longo do seu crescimento, para assim utilizá-la de uma forma melhor no tratamento de doenças.

Como será feita esta pesquisa?

Se você concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo de consentimento, utilizaremos a gordura que seria descartada após o seu procedimento cirúrgico. Nós coletaremos até 500ml de gordura, que corresponde a cerca de meia caixa de leite. Esta gordura será utilizada para obter as células mesenquimais e serão avaliadas todas as características dessas células ao longo de seu crescimento fora do corpo. Estas células não serão aplicadas em seres humanos.

Quanto tempo durará a pesquisa?

A pesquisa será concluída até setembro de 2014.

Quais são os riscos que podem ocorrer?

Considerando que a gordura seria descartada após o procedimento cirúrgico, não há nenhum risco para você além dos riscos próprios da cirurgia.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso você não concorde em participar da pesquisa, o procedimento cirúrgico será da mesma forma, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a entender melhor as células mesenquimais que estão presentes na gordura com o objetivo de melhorar ou criar novos tratamentos utilizando estas células.

Sigilo das informações, cancelamento da participação e informações sobre a pesquisa.

Afirmamos que as informações obtidas nesta pesquisa serão guardadas de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento.

Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Liziane Raquel Beckenkamp pelo telefone (016) 21019300 – ramal 9617 ou pelo e-mail: lizianeraquel@yahoo.com.br

OBRIGADO POR SUA ATENÇÃO

Eu, _____

RG n°: _____, autorizo a utilização de fragmentos do tecido adiposo que seriam descartados após a minha cirurgia para a realização da pesquisa **“Caracterização e comparação de subpopulações celulares do tecido adiposo e da medula óssea.”** e guardar as amostras obtidas em um Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP para realização de pesquisas adicionais. Fui informado (a) sobre o procedimento e que este procedimento não causará dano a minha saúde e também de que a finalidade dessa pesquisa é de compreender melhor a biologia das células mesenquimais presentes na gordura (tecido adiposo), visando o aprimoramento de terapias utilizando essas células. Declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que tenho pleno conhecimento dos direitos que me foram assegurados. Declaro ainda que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente Voluntário ou responsável legal

Liziane Raquel Beckenkamp
Assinatura do Pesquisador Responsável

ANEXO

Anexo A - Termo de aprovação do comitê de ética em pesquisa

Continuação do Parecer: 286.619

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Retifica-se a necessidade do projeto de pesquisa ser submetido à apreciação da CONEP, uma vez esclarecida a nomenclatura "células estromais mesenquimais multipotentes" vs. "células tronco mesenquimais".

Lembra-se aos pesquisadores:

- (1) a necessidade de coleta do Termo de Guarda de Amostra Biológica (aprovado quando do processo HCRP 920/2009);
- (2) a necessidade de que o TCLE e o Termo de Guarda de Amostra Biológica sejam rubricados pelo pesquisador e voluntário quando de textos de duas páginas ou mais.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

RIBEIRÃO PRETO, 28 de Maio de 2013

Assinador por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO			
Bairro: MONTE ALEGRE	CEP: 14.048-900		
UF: SP	Município: RIBEIRÃO PRETO		
Telefone: (16)3602-2228	Fax: (16)3633-1144	E-mail: cep@hcrp.usp.br	