

NATALIA LANGENFELD FUOCO

**DIFERENTES METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO, EXPANSÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia

São Paulo
2014

NATALIA LANGENFELD FUOCO

**DIFERENTES METODOLOGIAS PARA ISOLAMENTO, EXPANSÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO
ADIPOSO HUMANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Fuoco, Natalia Langenfeld.

Diferentes metodologias para isolamento, expansão e caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano / Natalia Langenfeld Fuoco. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Terapia celular.

Versão do título para o inglês: Different methodologies for isolation and cultivation human adipose-derived stem cells.

1. Células-tronco 2. Tecido adiposo 3. Lisado de plaquetas 4. Soro fetal bovino 5. Digestão enzimática 6. Dissociação mecânica I. Paes, Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0133/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Natalia Langenfeld Fuoco.

Título da Dissertação: Diferentes metodologias para isolamento, expansão e
caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo
humano.

Orientador(a): Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
LETRAS - UNESP/ CAMPUS DE
ASSIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diferentes metodologias para isolamento, expansão e caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano

Pesquisador: João Tadeu Ribeiro Paes

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 3

CAAE: 16624813.1.0000.5401

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências e Letras - UNESP/ Campus de Assis

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 472.051

Data da Relatoria: 16/10/2013

Apresentação do Projeto:

No presente projeto serão comparados dois métodos distintos para isolamento de células-tronco do tecido adiposo: a digestão enzimática que será realizada com colagenase e a dissociação mecânica. Serão ainda avaliados no estudo o potencial de expansão das células em meio de cultura suplementados com soro bovino fetal (comumente empregado) ou lisado de plaquetas. Com a finalidade de verificar as diferentes metodologias empregadas, as culturas serão submetidas a uma cinética de crescimento durante 15 dias. As células utilizadas serão caracterizadas a partir de citometria de fluxo e diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

Objetivo da Pesquisa:

A proposta tem por objetivo analisar diferentes parâmetros metodológicos para isolamento, expansão e caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano. Para tanto, o pesquisador irá se utilizar de 04 amostras de tecido adiposo, obtidas de indivíduos saudáveis que tenham se submetido ao procedimento de dermolipectomia abdominal no interior de hospitais e/ou clínicas de cirurgia plástica autorizadas para a realização de tais procedimentos cirúrgicos. De posse das amostras, elas serão colocadas na presença de diferentes meios de cultura para

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Vila Tênis Clube

CEP: 19.806-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5607

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cep@assis.unesp.br



Continuação do Parecer: 472.051

diferenciação e enriquecimento de células-tronco. Um destes meios de crescimento será obtido através do lisado de plaquetas humanas oriundas de bolsas de concentrado de plaquetas com prazo de validade expirado, que serão cedidas pelo Hospital Regional de Assis.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O pesquisador informa:

Riscos: "No presente projeto serão utilizadas bolsas de sangue com prazo de validade expirado e tecido adiposo proveniente de cirurgias eletivas de dermolipectomia abdominal, que seriam descartados. Desta forma, os materiais biológicos empregados no projeto não acarretarão nenhum risco aos doadores, uma vez que não haverá nenhum procedimento adicional para obtenção dos materiais. O material obtido será manipulado no Laboratório

de Genética e Terapia Celular ζ Gente Cel - UNESP (Assis). Tanto o sangue com prazo de validade expirado quanto o tecido adiposo de origem humana, representam materiais potencialmente contaminantes e, como tal, exigem cuidados específicos na sua manipulação. Assim, para proteção individual dos pesquisadores e/ou técnicos de laboratórios envolvidos do projeto, as medidas de segurança sugeridas pelo Ministério da Saúde para

manipulação de materiais biológicos, deste tipo, serão rigorosamente seguidas. Desta forma, serão utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como jalecos, luvas, máscaras e sapatos adequados, com finalidade de reduzir a exposição do profissional ao material orgânico, e todo o material perfuro-cortante utilizado será devidamente manipulado e descartado, ainda conforme as normas sugeridas pelo Ministério da Saúde. Toda a manipulação do material orgânico será realizada em câmara asséptica, a fim de evitar a contaminação da amostra por qualquer contaminante presente no meio externo, bem como, impedindo a contaminação do meio externo por qualquer contaminante desconhecido da amostra. Após o término da pesquisa, todo o material biológico utilizado será devidamente acondicionado e descartado."

Benefícios: "Fundamentado na necessidade de ampliar o conhecimento acerca da segurança e eficácia das ASC, o presente projeto pretende aprimorar a técnica de isolamento e expansão de células tronco derivadas do tecido adiposo, uma vez que propõe uma metodologia que elimina as componentes xenobióticos, normalmente empregados neste tipo de cultura. Sendo assim, o procedimento apresentado poderá tornar-se um promissor substituinte da metodologia usual, impedindo, dessa forma, reações imunológicas e transmissão de doenças infecto-contagiosas. Além disso, estará seguindo a resolução da Agência de Vigilância Sanitária ζ ANVISA (RDC nº 9, de 14 de março de 2011), que preconiza a não utilização de produtos de origem não humana."

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Vila Tênis Clube

CEP: 19.806-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5607

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cep@assis.unesp.br



Continuação do Parecer: 472.051

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa de grande relevância e impacto para a área de saúde humana. De acordo com a Resolução CNS 441/2011, há a necessidade de ser observada aos Direitos Humanos na coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano. Sendo assim, há a necessidade de consentimento do sujeito para utilização do material biológico humano descartado para pesquisa.

Além disso, o pesquisador solicita modificação na Área Temática Especial do projeto para a área de "Pesquisa Envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP." A respeito do assunto, este CEP consultou os seus membros especialistas na área de genética e em reunião deliberou acatar a solicitação do pesquisador, considerando a seguinte legislação:

- Resolução 466, 2012 do CONEP: Das atribuições do CONEP, caberá análise da CONEP quando o projeto envolver projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embionárias e organismos que representem alto risco coletivo, incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte.

- Resolução - RDC no.9, de 14 de março de 2011 (ANVISA), que dispõe sobre o funcionamento dos Centros de Tecnologia Celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências, o Artigo no.7 diz "Células humanas e seus derivados só poderão ser disponibilizados para pesquisa clínica e/ou terapia pelos CTCs, mediante a comprovação de aprovação da pesquisa clínica pelo sistema CEP/CONEP ou comprovação de que o procedimento terapêutico é autorizado pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) ou Conselho Federal de Odontologia (CFO). O mesmo documento define pesquisa clínica como: estudo sistemático que segue métodos científicos aplicáveis a experimentações com células humanas e seus derivados em seres humanos, de acordo com exigências legais e éticas".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador anexa o TCLE que é apresentado para o doador de sangue no momento da triagem no Banco de Sangue. Segundo o item 4 deste documento, o doador assina:

"4. Autorizo a utilização do meu sangue para estudos e pesquisas, devidamente autorizados por uma comissão de ética e desde que durante o estudo ou publicação minha identidade seja

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Vila Tênis Clube

CEP: 19.806-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5607

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cep@assis.unesp.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS E
LETRAS - UNESP/ CAMPUS DE
ASSIS



Continuação do Parecer: 472.051

preservada."

No entanto, o documento é apresentado no formato DOC e não apresenta qualquer identificação do Banco de Sangue do Hospital Regional de Assis.

Recomendações:

nihil

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas pelo CEP foram devidamente justificadas e/ou atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

- O Regimento Interno do CEP prevê que o pesquisador apresente relatórios, de acordo com as datas estabelecidas pelo CEP. O não encaminhamento dos relatórios implicará no impedimento temporário da apresentação de novos protocolos, até que este regularize a situação pendente. O RELATÓRIO deverá ser apresentado em ABRIL/2014. Neste relatório deverá se informado como foi realizada a devolutiva do resultado da pesquisa aos sujeitos. ATENÇÃO: QUALQUER ALTERAÇÃO NO PROJETO DEVE SER INFORMADA AO CEP COMO EMENDA AO PROJETO.

ASSIS, 28 de Novembro de 2013

Assinador por:
Regiani Aparecida Santos Zacarias
(Coordenador)

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Vila Tênis Clube

CEP: 19.806-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5607

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cep@assis.unesp.br

À minha família e amigos pelo apoio e
incentivo constante.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Vitória, pelo apoio, amizade e paciência em todos os momentos da minha vida, permanecendo ao meu lado nas dificuldades e vitórias.

Ao meu irmão, Sérgio e todos os meus familiares pelo companheirismo e incentivo.

As minhas amigas, Amanda Loesch, Daniela Armelin, Mariana Moreira, Marina Macruz, Camila Schvartman e Anna Luisa Bartoletti que estiveram me apoiando durante todo o processo.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, meu orientador, pelos ensinamentos oferecidos e por toda a atenção dispensada.

A Profa. Dra. Elenice Deffune, do Laboratório de Engenharia Celular da Unesp – Botucatu, pelo auxílio prestado durante o desenvolvimento deste estudo.

A Profa. Dra. Renata Bittencourt pelos conhecimentos transmitidos, disposição, paciência e boa vontade.

Aos companheiros do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel, da Unesp – Campus de Assis, em especial, Monica Yonashiro Marcelino, Rafael Guilen e Felipe Azevedo Borges, pela amizade, companheirismo, parcerias científicas e festivas, e por terem proporcionados momentos tão bons e agradáveis durante o decorrer do meu mestrado.

Ao José Gilberto Milani (Giba) e ao Allan Chiea de Souza pela amizade, apoio técnico e ajuda incondicional nos momentos de dificuldades.

A Eliana, Fábria e Marcos, da Secretária de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, pela atenção e por sempre estarem dispostos a colaborar.

A todos que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

RESUMO

Fuoco NL. Diferentes metodologias para isolamento, expansão e caracterização de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano. [dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A utilização de tecido adiposo para obtenção células-tronco mesenquimais (CTM) tem aumentado consideravelmente, sobretudo nos últimos 10 anos. No entanto, os procedimentos para uso clínico exigem, grandes quantidades de células, por isso, em geral os protocolos envolvem procedimentos de expansão e cultura celular *in vitro*. As metodologias utilizadas rotineiramente para o cultivo celular de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CT-TA) envolvem a utilização de componentes xenobióticos, como por exemplo, a colagenase (de origem bacteriana) e o soro fetal bovino (SFB), que podem conter quantidades consideráveis de contaminantes, como endotoxinas e outros peptídeos, que representam riscos potenciais de reações imunológicas e transmissão de doenças infecciosas. Sendo assim, pretendeu-se no presente estudo analisar diferentes parâmetros metodológicos para isolamento e expansão de CT-TA, na ausência de componentes xenobióticos. Para tanto, as células-tronco foram isoladas do tecido adiposo por digestão enzimática (utilizando colagenase) e dissociação mecânica. Em seguida, as células foram submetidas à expansão na presença de SFB ou lisado de plaquetas humano (LP). Procedeu-se a análise comparativa dos métodos por meio de curvas de crescimento. A caracterização celular foi realizada por citometria de fluxo e diferenciação em condrócitos, adipócitos e osteócitos. Os resultados mostraram que a metodologia de dissociação mecânica representa uma alternativa viável e eficiente para cultivo de CT-TA, e que o emprego de LP como suplemento para o meio de cultura aumentou de forma significativa a proliferação celular. Entretanto, foram observadas diferenças na morfologia das células cultivadas com LP. A capacidade de diferenciação das células foi mantida em todos os grupos e a caracterização por citometria de fluxo mostrou baixa contaminação das culturas por outros tipos celulares, exceto para o grupo isolado por digestão enzimática e cultivado com SFB. Em função desses resultados, pode-se concluir que é possível a implementação de técnicas de isolamento e expansão de CT-TA, prescindindo-se de componentes xenobióticos. Além de que essa abordagem metodológica, coloca-se em consonância com as recomendações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), quando preconiza que se evite o emprego de produtos xenobióticos para a cultura de células-tronco provenientes de tecido adiposo, sobretudo quando as células em cultura tenham por finalidade procedimentos de terapia celular em pacientes humanos.

Palavras chave - Células-tronco. Tecido Adiposo. Lisado de Plaquetas. Dissociação Mecânica. Digestão Enzimática. Soro Fetal Bovino (SFB). Colagenase.

ABSTRACT

Fuoco NL. Different methodologies for isolation and cultivation human adipose-derived stem cells [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

The use of adipose tissue for obtaining mesenchymal stem cells (MSC) has increased substantially, especially in the last 10 years. However, the procedures for clinical use require large quantities of cells so that protocols generally involve isolation and in vitro expansion of MSC. The methods routinely used for the culture of adipose-derived stem cells (ASC) involve the use of xenobiotic components, such as collagenase (bacterial origin) and fetal bovine serum (FBS), which may contain large amounts of contaminants, xenoproteins, endotoxins and other peptides representing potential risk of immunological reactions and risk of transmission of infectious diseases. Accordingly, in the present study it was intended to analyze different methodological parameters for the isolation, expansion and characterization of ASC in the absence of xenobiotic components. Therefore, stem cells were isolated from adipose tissue by enzymatic digestion (using collagenase) and mechanical dissociation. Then, the cells were submitted to expansion in the presence of FBS or human platelet lysate (PL). A comparative analysis was made by means of growth curves and the cell characterization was performed by flow cytometry and differentiation into chondrocytes, adipocytes and osteocytes. The results presented that the mechanical dissociation method represents an effective and practicable alternative in ASC's growth and that the use of PL as a supplement to the culture medium has significantly increased the cellular proliferation. The ability of cells to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes was maintained in all groups and characterization by flow cytometry showed low contamination rates by other cell types except for the group isolated by enzymatic digestion and cultured with FBS. Thus, we may conclude that it is possible to implement techniques of isolation and expansion of ASC dispensing xenobiotic components for obtaining and cultivating stem cells from adipose tissue, in consonance with the recommendations of the National Health Surveillance Agency (ANVISA), avoiding the use of xenobiotic materials with purposes of cell therapy in human patients.

Keywords - Stem Cell. Adipose Tissue. Platelet Lysate. Fetal Bovine Serum. Enzymatic Digestion. Mechanical Dissociation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma.....	33
Figura 2 - Dissociação mecânica das células-tronco derivadas de tecido adiposo.....	35
Figura 3 - Fomação de botão e celular e resíduos de superfície durante o preparo do lisado de plaquetas.....	40
Figura 4 - Gráfico do crescimento da população de CT-TA cultivadas nos lisados de plaquetas com adição de heparina antes e depois, somente antes e somente depois do processo de lise celular	41
Figura 5 - Características das células isoladas de tecido adiposo ao longo do cultivo..	43
Figura 6 - Microscopia das células cultivadas em com soro fetal bovino e lisado de plaquetas, evidenciando as diferenças morfológicas.....	44
Figura 7 - Curva de crescimento das CT-TA isoladas por digestão enzimática ou dissociação mecânica e cultivadas com soro fetal bovino ou lisado de plaquetas.....	45
Figura 8 - Gráficos representativos da citometria de fluxo.....	48
Figura 9 - Diferenciação das CT-TA em adipócitos, condrócitos e osteócitos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças entre células-tronco adultas e células-tronco embrionárias	21
Tabela 2- Principais fatores de crescimento plaquetários e suas funções.....	27
Tabela 3- Adição de heparina na preparação dos lisados de plaquetas	32
Tabela 4- Tempo de dobramento da população celular das CT-TA.....	46
Tabela 5- Caracterização das CT-TA por citometria de fluxo	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
bFGF – “Basic Fibroblast Growth Factor”
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CFU-F – “Colony Forming Unit Fibroblastic”
CT – Células-tronco
CTA – Células-tronco Adultas
CTE – Células-tronco Embrionárias
CTGF – “Connective Tissue Growth Factor”
CTH – Células-tronco Hematopoiéticas
CTM – Células-tronco Mesenquimais
CT-TA – Células-tronco Derivadas de Tecido Adiposo
DE – Digestão Enzimática
DM – Dissociação Mecânica
DMEM-F12 – “Dulbecco’s Modified Eagle Medium – F12”
EGF – “Epidermal Growth Factor”
GP – Gel de Plaquetas
IAM – Instituto de Atendimento Médico Hospitalar
ISCT – “International Society for Cellular Therapy”
LP – Lisado de Plaquetas
MO – Medula Óssea
MTT - (2-(4,5-dimetil-2-tiazol)-3,5-difenil-)
PDGF – “Platelet Derived Growth Factor”
PDT – “Population Doubling Time”
PRP – Plasma Rico em Plaquetas
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
SFB – Soro Fetal Bovino
TA – Tecido Adiposo
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β – “Transforming Growth Factor Beta”
VEGF – “Vascular Endothelial Growth Factor”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Células-tronco.....	18
<i>1.1.1 Células-tronco Embrionárias.....</i>	<i>18</i>
<i>1.1.2 Células-tronco adultas.....</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2.1 Células-tronco Hematopoiéticas.....</i>	<i>20</i>
<i>1.1.2.2 Células-Tronco Mesenquimai.....</i>	<i>21</i>
<i>1.1.2.3 Células-tronco derivadas do tecido adiposo.....</i>	<i>23</i>
1.2 Isolamento das Células-Tronco Derivadas de Tecido Adiposo.....	24
1.3 Lisado de Plaquetas.....	25
1.4 Cultura de células-tronco derivadas de tecido adiposo.....	28
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Obtenção e Descarte dos materiais biológicos.....	31
<i>3.1.1 Obtenção e Descarte do Tecido Adiposo.....</i>	<i>31</i>
<i>3.1.2 Obtenção e Descarte do Concentrado de Plaquetas.....</i>	<i>31</i>
3.2 Preparo do lisado de plaquetas para teste de adição de heparina.....	31
3.3 Desinfecção do Tecido Adiposo.....	33
3.4 Isolamento das células-tronco derivadas do tecido adiposo.....	33
<i>3.4.1 Fluxograma.....</i>	<i>33</i>
<i>3.4.2 Digestão enzimática.....</i>	<i>33</i>
<i>3.4.3 Dissociação mecânica.....</i>	<i>34</i>
3.5 Manutenção das Culturas Celulares.....	35
3.6 Ensaio com 2-(4,5-dimetil-2-tiazol)-3,5-difenil (MTT).....	36
<i>3.6.1 Teste do cultivo de células-tronco do tecido adiposo (CT-TA) usando como suplemento lisados de plaquetas preparados por meio de diferentes metodologias.....</i>	<i>36</i>
<i>3.6.2 Cinética de Crescimento das CT-TA.....</i>	<i>36</i>
3.7 Cálculo do Tempo de Dobramento da População Celular.....	37
3.8 Citometria de fluxo.....	37
3.9 Capacidade de diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo..	37
<i>3.9.1 Diferenciação Condrogênica.....</i>	<i>37</i>
<i>3.9.2 Diferenciação Osteogênica.....</i>	<i>37</i>
<i>3.9.3 Diferenciação Adipogênica.....</i>	<i>38</i>
3.10 Aspectos Éticos.....	38
4 RESULTADOS.....	39
4.1 Teste da adição de heparina.....	39
4.2 Teste do Cultivo de Células-tronco Derivadas do Tecido Adiposo (CT-TA) em Lisados de Plaquetas com Diferentes Concentrações de Heparina	40
4.3 Isolamento e expansão celular.....	41
4.4 Curva de Crescimento.....	44
4.5 Tempo de Dobramento da População Celular (PDT).....	46

4.6 Citometria de Fluxo.....	46
4.7 Diferenciação das células-tronco do tecido adiposo (CT-TA).....	49
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO.....	66
Termo de Consentimento Livre Esclarecido para coleta de tecido adiposo.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-tronco

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas, que apresentam como características fundamentais: (1) a auto renovação e (2) a capacidade de dar origem a células diferenciadas (Amorin et al., 2012; Melton, Cowan, 2004; NHI, 2001; Ribeiro-Paes et al., 2009; Rocha et al., 2012; Yarak, Okamoto, 2010). As células-tronco têm sido, clássica e convencionalmente, classificadas em dois grupos gerais: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas (Amorin et al., 2012; Maron-Gutierrez et al., 2009; Rocha et al., 2012; Silva, Leoi, 2010; Yarak, Okamoto, 2010) Considerando-se, por sua vez, o potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser consideradas: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes: (Bongso, Richards, 2004; Maron-Gutierrez et al., 2009; Rocha et al., 2012; Silva, Leoi, 2010; Souza et al., 2003; Yarak, Okamoto, 2010). Sendo:

- Totipotentes: células capazes de originar todos os tipos celulares, sendo encontradas apenas nas primeiras etapas da divisão embrionária (quando o embrião tem de 3 a 4 dias). Ex: zigoto e células embrionárias na fase de mórula.
- Pluripotentes: apresentam capacidade de originar todos os tipos celulares provenientes das três camadas germinativas (endoderma, mesoderma e ectoderma). Entretanto são incapazes de diferenciar-se nos anexos embrionários (placenta, âmnion e córion). Ex: AS células presentes na massa celular interna do blastocisto.
- Multipotentes: células encontradas em diversos tecidos e órgãos que apresentam capacidade de originar tipos celulares do mesmo folheto embrionário. Ex: células-tronco hematopoéticas
- Unipotentes: células capazes de originar apenas um tipo celular de um mesmo folheto embrionário. Ex: células da camada germinativa da epiderme, eritroblastos e espermatogônias dos testículos.

1.1.1 Células-tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes, ou seja, capazes de originar virtualmente, todos os tecidos do corpo, excetuando-se a placenta e anexos embrionários. Correspondem às células presentes na massa celular interna do blastocisto e apresentam capacidade de auto-renovação e manutenção do estado indiferenciado *in vitro*.

(Amorin et al., 2012; Aragão, Bezerra, 2012; Barbosa et al., 2013; Bongso, Fong, 2013; Bringnier, Gewirtz, 2010; Rocha et al., 2012; Yarak, Okamoto, 2010).

As células-tronco embrionárias foram, pioneiramente isoladas, em 1981, por dois grupos independentes de pesquisadores. O grupo da Universidade de Cambridge (Reino Unido) liderado por Martin J. Evans em colaboração com Mathew Kaufman, estabeleceram a primeira cultura de células-tronco de embriões de ratos. Paralelamente, no mesmo ano de 1981, a pesquisadora Gail R. Martin, da Universidade da Califórnia (Estados Unidos da América), obteve uma linhagem de células pluripotentes a partir da massa celular interna de blastocisto de camundongos (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estes trabalhos abriram caminho para o desenvolvimento das técnicas de modificação gene-específicas em camundongos utilizando células-tronco embrionárias. Por essa razão, Martin John Evans, foi agraciado, em 2007, juntamente com Mario Capecchi e Oliver Smithies, com o Prêmio Nobel de Medicina.

A partir dos trabalhos pioneiros de isolamento e cultivo de células embrionárias da massa celular interna de blastocistos, abriram-se inúmeras novas linhas de pesquisa e grande número de grupos de trabalho passaram a se dedicar às pesquisas básicas e aplicadas com CTE. As pesquisas visam principalmente: a aplicação de CTE para reparação de tecidos e órgãos lesados, testes de novas drogas *in vitro*, produção de gametas e embriões, estudos sobre câncer, desenvolvimento embrionário e anomalias congênitas (Barbosa et al., 2013; Bongso, Richards, 2004; Ramirez, Balea, 2004; Rocha et al., 2012).

Apesar dos avanços nas pesquisas, a utilização de embriões para extração de CTE têm sido limitada por uma série de questões éticas e religiosas. A Lei de Biossegurança (11.105/05), autorizou a utilização de CTE oriundas de embriões humanos armazenados há mais de três anos em clínicas de fertilização, exclusivamente para fins de pesquisa (Aragão, Bezerra, 2012; Barbosa, Carvalho, 2013; Gerech-Nir, Itskovitz-Eldor, 2007; Sipoli et al., 2013).

A possibilidade de emprego terapêutico de células-tronco embrionárias em pacientes humanos encontram limitações não apenas no que se refere a aspectos éticos e religiosos, mas também, em questões de ordem técnica, uma vez que, ainda não se dispõe de conhecimento técnico que permita o controle da diferenciação das CTE, que sendo pluripotentes, poderiam se diferenciar em qualquer tecido derivado dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), e como consequência, levar ao desenvolvimento de teratomas (Rocha et al., 2012; Tavares, 2011).

1.1.2 Células-tronco adultas

O conceito de células tronco adultas foi proposto no final do século XIX, como resposta à tentativa de elucidar a capacidade regenerativa do corpo humano para reparar e substituir células de tecidos e órgãos em situação de lesão e de manutenção da homeostase normal (Bianco et al., 2008; NIH, 2001).

Define-se as células-tronco adultas (CTA) como um grupo celular que apresenta o potencial de auto-renovação, por longos períodos de tempo e capacidade de originar todos os tipos celulares especializados do tecido do qual se originaram (NHI, 2001) Podem ser encontradas na maioria dos tecidos e órgãos, incluindo placenta, tecidos fetais e sangue de cordão umbilical (Lindroos et al., 2011; Raff 2003; Young, Black, 2004). Há dois grupos gerais de CTA: células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Bianco et al., 2008; NIH, 2001)

A presença das CTA nos diversos tecidos justifica-se pela sua capacidade de manter a homeostase tecidual, visto que repõe as células que sofreram injúrias ou apoptose (Amorin et al., 2012; Cabral et al.,2008; Pereira, 2008; Raff, 2003; Ramirez, Balea, 2004). Apesar das CTA apresentarem uma capacidade de diferenciação mais limitada, as possibilidades de terapia empregando esse tipo celular consolidam-se progressivamente em termos terapêuticos e vem sendo, cada vez mais utilizada por diferentes grupos de pesquisadores com a finalidade de regenerar tecidos lesados ou corrigir funcionalmente órgãos primariamente acometidos por diferentes patologias (Alves-de-Morais et al., 2013; Amorin et al., 2012; Faria et al., 2012; Ribeiro-Paes et al., 2009; Ribeiro-Paes et al., 2014).

A Tabela 1 apresenta as diferenças entre as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

Tabela 1 - Diferenças entre células-tronco adultas e células-tronco embrionárias

Células-tronco Embrionárias	Células-tronco Adultas
Pluripotente/ Totipotente	Multipotente
Auto-renovação ilimitada	Auto-renovação limitada
Apoptose tardia	Apoptose rápida
Oferece riscos de formação de teratomas após transplante	Não oferece risco de formação de teratomas após transplante
Uso limitado por questões éticas	Seu uso não envolve questões éticas
Utilização em transplantes heterólogos	Utilização em transplantes autólogos e heterólogos

Fonte: Modificado de Bongso e Richards, 2004

1.1.2.1 Células-tronco Hematopoiéticas

As CTA primariamente identificadas, isoladas e empregadas clinicamente foram às células-tronco hematopoiéticas (CTH). A implementação do uso dessas células foi pioneiramente elucidada por Thomas em 1956, quando os autores observaram a remissão de leucemia em pacientes após a infusão de medula óssea. No entanto inicialmente os transplantes só tiveram sucesso entre gêmeos idênticos devido à ocorrência de rejeição em pacientes não gêmeos. Após o desenvolvimento de estudos de histocompatibilidade iniciados por Jean Dausset em 1952 (Dausset, 1954), Thomas realizou com êxito em 1969 o primeiro transplante de medula óssea onde o receptor e o doador não eram gêmeos (Thomas, 2000). Por conta, destes trabalhos de imenso impacto científico e repercussão clínica Edward D. Thomas foi, juntamente com Joseph E. Murray, agraciado, em 1990, com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina.

Os trabalhos de Till e McCulloch, em 1961, foram determinantes para estabelecer o conceito de células-tronco. Os autores observaram a reconstituição do sistema hematopoiético de animais submetidos a doses letais de radiação após o transplante de medula óssea proveniente de animais saudáveis e singênicos. Essas observações resultaram mais tarde no entendimento das propriedades de autorenovação e diferenciação das CTH. Posteriormente, foram realizados vários avanços que culminaram na purificação e reconhecimento dos antígenos de superfície das CTH (Baum et al., 1992), na identificação de células precursoras do sistema hematopoético (Morrison, Weissman 1994) e na caracterização de uma série de citocinas e fatores de crescimento (Moore, 2002).

1.1.2.2 Células-Tronco Mesenquimais

Após a identificação das CTH, foi demonstrada a existência de outros tipos de células-tronco adultas de origem não-hematopoiética (Amorin et al., 2012). Essas células foram pioneiramente identificadas por Friedenstein et al. (1966). Neste estudo, observou-se a presença de um pequeno grupo celular oriundo da medula óssea, composto por células aderentes de formato fusiforme e com capacidade de diferenciação em osso e cartilagem (Friedenstein et al., 1968). Desde então, baseado nas considerações iniciais de Friedenstein et al. (1966), uma série de estudos passaram a ser realizados com a finalidade de identificar e caracterizar este tipo celular (Owen, 1988; Piersma et al., 1985).

Ao longo dos anos, foram propostas uma série de nomenclaturas para essas células tais como Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-F – *Colony Forming Unit Fibroblast*), Células-tronco ou Progenitoras Mesenquimais e Células Estromais de Medula Óssea (Caplan, 1991; Horwitz et al., 2005; Owen et al., 1988; Prockop et al., 1997). Neste contexto, em 2005 a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* – ISCT) propôs a denominação Células Estromais Mesenquimais Multipotentes, para referir-se a esse grupo de células-tronco não-hematopoiéticas. (Dominici et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) constituem uma subpopulação de células estromais, multipotentes não-hematopoiéticas, que apresentam aspecto fibroblastóide alongado, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma abundante (Amorin et al., 2012; Shi et al., 2012). Segundo a ISCT há 3 critérios mínimos para que uma célula seja considerada mesenquimal: capacidade de aderência à superfície plástica; presença ($\geq 95\%$) de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e ausência (≤ 2) dos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II; potencial de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo, sob determinadas condições *in vitro* (Dominici et al., 2006).

O emprego das CTM tem sido considerado como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos (Frenette et al., 2013; Longhini-dos-Santos et al., 2013; Marcelino et al., 2014; Meirelles et al., 2009; Ren et al., 2012; Yarak, Okamoto, 2010). Segundo Frenette et al. (2013) há cerca de 220 estudos clínicos em andamento utilizando células-tronco mesenquimais para terapia de diversas doenças como: Alzheimer, doença de Parkinson, anemias, cardiopatia dilatada, cirrose hepática, diabetes tipo 1 e 2, doença de Crohn, esclerose múltipla, doença enxerto-versos-hospedeiro, infarto do miocárdio, osteoartrite, reparos ósseos e de cartilagem entre outras.

O grande interesse nas CTM para a terapia celular deve-se ao fato: de que são facilmente obtidas, muitas vezes do próprio paciente, em quantidades adequadas para transplante ou facilmente expandidas *in vitro*; e apresentam com baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade (HLA) (Shi et al., 2011) possibilitando, assim, transplantes alogênicos. Além disso, possuem, segundo alguns autores, a capacidade de integração no tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente (Escobedo-Lucea et al., 2013; Baer, Geiger, 2012; Yarak, Okamoto, 2010).

Outra vantagem da utilização de CTM é que podem ser isoladas de várias fontes biológicas, como medula óssea, cordão umbilical, placenta, polpa de dente, pele, músculo esquelético, líquido amniótico, feto, baço, pulmão, pâncreas, rins e em especial o tecido adiposo (Amorin et al., 2012; Baer, Geiger, 2012; Chase et al., 2010; Escobedo-Lucea et al., 2013; Filho et al., 2013; Lindroos et al., 2011; Moroni, Fornasari, 2012;).

1.1.2.3 Células-tronco derivadas do tecido adiposo

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (CT-TA) representam um tipo de CTM, obedecendo os mesmos critérios de aderência, diferenciação (nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica) e caracterização por meio de marcadores de superfície (Bourin et al., 2013; Filho et al., 2013; Gimble et al., 2011; Patrikoski et al., 2013).

A ação das CT-TA na regeneração de tecidos também é semelhante a das CTM. Ambas parecem agir secretando citocinas e fatores de crescimento que apresentam propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e que estimulam a angiogênese. (Longhini-dos-Santos et al., 2013; Mizuno et al., 2012)

Neste contexto, a utilização de tecido adiposo para obtenção CTM tem aumentado substancialmente, sobretudo nos últimos 10 anos (Bourin et al., 2013; Eslaminejad et al., 2011; Mizuno, 2009; Niemelä, et al., 2008; Zhu et al., 2008;). Uma série de vantagens podem ser relacionadas para justificar a escolha dessa fonte. Entre elas esta o fato de que o tecido adiposo pode ser extraído em quantidades abundantes, por meio de cirurgias eletivas como abdominoplastias e lipoaspirações, que são pouco invasivas e apresentam baixos índices de morbi-mortalidade (Baer, Geiger, 2012; Broccaioli et al., 2013; Dromard et al., 2011; Filho et al., 2013; Ginani et al., 2013; Mizuno, 2009; Moroni et al., 2012).

Embora a medula óssea (MO) seja considerada a principal fonte não-hematopoética de células-tronco mesenquimais, é possível verificar que a quantidade de CTM no tecido adiposo (TA) é superior a encontrada na MO (Baer, Geiger, 2012; Bourin et al., 2013

Escobedo-Lucea et al., 2013; Mizuno, 2009; Yarak, Okamoto, 2011). Segundo Baer e Geiger (2012) na medula óssea são extraídas aproximadamente 6×10^6 células nucleadas, sendo que 0,001- 0,01% são mesenquimais, enquanto no tecido adiposo podem ser isoladas aproximadamente $0,5 \times 10^4$ a 2×10^5 células mesenquimais por grama de tecido adiposo.

Fundamentada nas características apresentadas, a pesquisa clínica envolvendo CT-TA vem aumentando progressivamente e muitos estudos vêm sendo realizados com o propósito de analisar o emprego dessas células na medicina regenerativa e engenharia tecidual (Baer, Geiger, 2012; Bassi et al., 2012; Broccaioli et al., 2013; Casteilla et al., 2013; Filho et al. 2013; Gimble et al., 2011; Lorico et al., 2012; Song et al., 2013; Yang et al., 2012;)

1.2 Isolamento das Células-Tronco Derivadas de Tecido Adiposo

O tecido adiposo é constituído por diferentes tipos celulares: adipócitos (1/3 a 2/3 do total de células do TA), fibroblastos, células musculares lisas, fibras nervosas, células imunes (leucócitos e macrófagos), nódulos linfáticos, pericitos, células endoteliais, pequenos vasos sanguíneos, pré-adipócitos (células progenitoras adipogênicas) e células-tronco mesenquimais (Ginani et al., 2012; Rada et al., 2009; Trayhurn et al., 2013; Yarak, Okamoto, 2010). Devido à complexa composição do tecido adiposo, com diferentes tipos celulares é necessário o emprego de técnicas especiais de isolamento das CT-TA antes do processo de cultura e expansão (Bassi et al., 2012; Bourin et al., 2013; Choi et al., 2012; Yang et al., 2012).

As CT-TA são classicamente isoladas a partir de digestão enzimática. A utilização desse método foi sugerido pela primeira vez por Rodbell et al., em 1966. Nesse trabalho os autores isolaram células da fração estromal do tecido adiposo de ratos, empregando a enzima colagenase. Posteriormente, em 2001, Zuk et al. empregaram uma metodologia semelhante, com o mesmo tipo de enzima (colagenase) , para isolar células de tecido adiposo humano, . Neste trabalho, os autores demonstraram que as células isoladas de tecido adiposo podem ser mantidas *in vitro* durante períodos prolongados. Propuseram, também, que as células isoladas são, em sua maioria, de origem mesenquimal (com baixos níveis de contaminação por pericitos, células endoteliais e musculares lisas) e que apresentam capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

A técnica de isolamento por digestão enzimática, classicamente empregada para o isolamento e cultivo de CT-TA, consiste, de modo geral, na lavagem do tecido, seguida de

digestão com a enzima colagenase, isolada da bactéria *Clostridium histolyticum* (Bourin et al., 2013; Lindroos et al., 2011; Mizuno, 2009; Yarak, Okamoto, 2010).

Uma série de variações da metodologia original tem sido propostas, visando principalmente a retirada de componentes de origem animal (xenobióticos - como a colagenase), maior rendimento e menor custo (Gimble et al., 2011; Jung et al., 2013; Patrikosk et al., 2013). As alterações podem ser encontradas nas diversas etapas do procedimento, tais como: local e forma de extração do tecido, período e método de desinfecção, quantidade de lavagens a que o tecido é submetido, utilização de diferentes tipos de enzimas, velocidade e tempo de centrifugação, inclusão de processo de filtração e utilização de substâncias para lise dos glóbulos vermelhos (Bourin et al., 2013; Broccaioli et al., 2013; Choi et al., 2012; Fan et al., 2013; Leslie et al., 2013)

A utilização da enzima é o aspecto mais importante do procedimento. Como anteriormente mencionado, a metodologia original utiliza colagenase, que representa atualmente a opção clássica para isolamento de CT-TA. Entretanto, é possível observar trabalhos que apresentem alternativas metodológicas, utilizando enzimas como tripsina, dispase e hialuronidase, ou soluções contendo combinações de mais de um desses tipos enzimáticos (Bourin et al., 2013; Ginani et al., 2013; Leslie et al., 2013).

Ainda que a digestão enzimática seja rotineiramente empregada para o isolamento de CT-TA, trata-se de uma metodologia com algumas limitações. As enzimas utilizadas no processo podem, eventualmente, conter quantidades consideráveis de contaminantes, xenoproteínas, endotoxinas e outros peptídeos. Além disso, a inclusão dessas enzimas digestivas aumenta substancialmente o custo da técnica (Carvalho et al., 2013; Escobedo-Lucea et al., 2013; Gimble et al., 2011; Williams et al., 1995)

Neste contexto, o desenvolvimento de um procedimento de isolamento que torne prescindível o uso de enzimas de origem bacteriana mostra-se extremamente atraente. Na literatura são apresentadas algumas alternativas para a retirada dos componentes enzimáticos usualmente empregados. Destacam-se o isolamento por diferença de densidade ou por centrifugação direta (Carvalho et al., 2013; Gimble et al., 2011; Yoshimura et al., 2006; Wu et al., 2013).

1.3 Lisado de Plaquetas

As plaquetas são elementos sanguíneos anucleados, provenientes da fragmentação de megacariócitos. Representam de 0,1 a 0,25% do sangue total e persistem de 5 a 10 dias na

circulação sanguínea (Copland et al., 2013; Fernandez-Delgado et al., 2012). No citoplasma plaquetário encontram-se grânulos- α , que contêm proteínas, citocinas e fatores bioativos (Copland et al., 2013; Flaumechaft, 2012; Kon et al., 2011; Vendruscolo et al., 2012).

A existência de fatores de crescimento contidos nas plaquetas foi sugerida pela primeira vez por Balk (1971), quando o autor promoveu o crescimento de fibroblastos de frango em meio suplementado com 5% de plasma de galinha. Atualmente, sabe-se que as plaquetas representam uma rica fonte de fatores de crescimento e citocinas que atuam como peptídeos sinalizadores, responsáveis pela regulação do metabolismo celular e pela interação com um organizado complexo de receptores de superfície celular. Esta interação resulta no aumento da transcrição gênica e consequentemente na produção de proteínas que desencadeiam a proliferação e diferenciação celular, além do aumento da produção da matriz extracelular e angiogênese (Bosch et al., 2011; Kon et al., 2011; Schliephake et al., 2013; Vendruscolo et al., 2012)

Neste contexto, a utilização de plaquetas e seus derivados, como o plasma rico em plaquetas (PRP), o lisado de plaquetas (LP) e gel de plaquetas (GP), tem sido objeto de uma série de estudos, apresentando resultados promissores na regeneração de diferentes tecidos e na substituição de soros de origem animal, como o soro fetal bovino, em procedimentos de cultura celular (Anitua et al., 2013; Burnouf et al., 2013; Hernandez, 2012; Metcalf et al., 2013; Smyth et al., 2013; Suzuki et al., 2012; Vetrano et al., 2013; Villa-Diaz et al., 2013)

A Tabela 2 sintetiza os principais fatores plaquetários e suas funções:

Tabela 2 - Principais fatores de crescimento plaquetários e suas funções

Fator de Crescimento	Atividade da Molécula
Fator de crescimento derivado de plaquetas (Platelet Derived Growth Factor - PDGF)	Mitogênico para células mesenquimais e osteoblastos; estimulante da quimiotaxia e mitogênese em fibroblastos, células musculares lisas, células da glia; regulador da secreção e síntese de colágeno e estimulante da quimiotaxia de macrófagos e neutrófilos
Fator de crescimento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF)	Aumenta a angiogênese e permeabilidade vascular; estimulante da mitogênese de células endoteliais
Fator de transformação do crescimento beta (Transforming Growth Factor Beta-TGF – β)	Estimulante da proliferação de células mesenquimais indiferenciadas; regulador da mitogênese endotelial fibroblástica e osteoblástica; estimulante da quimiotaxia e angiogênese; inibidor da proliferação de macrófagos e linfócitos.
Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos (Basic Fibroblast Growth Factor - bFGF)	Promove o crescimento e diferenciação dos condrócitos e osteoblastos; mitogênico para células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos.
Fator de Crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor - EGF)	Estimulante da quimiotaxia e angiogênese endotelial; regulador da secreção de colagenase; e estimulante da mitogênese epitelial e mesenquimal
Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo (Connective Tissue Growth Factor - CTGF)	Promove a angiogênese e regeneração da cartilagem

Fonte: Adaptada de Fernandez-Delgado et al., 2012.

1.4 Cultura de células-tronco derivadas de tecido adiposo

Apesar do elevado rendimento de CTM derivadas do tecido adiposo, os procedimentos para uso clínico, requerem quantidades expressivas de células (variando entre 10^7 a 10^8 células por kg do paciente). Dessa forma, os protocolos para emprego terapêutico experimental envolvem metodologias de cultura celular, onde uma pequena fração de células isoladas do tecido adiposo é expandida com o propósito de se obter um número adequado e suficiente de células que possua efetividade clínica (Baer, Geiger, 2012; Bassi et al., 2012; Bieback et al., 2012 A; Bieback et al., 2012 B; Escobedo-Lucea et al., 2013; Jung et al., 2012; Yang et al., 2012).

No processo de cultivo, é necessária a utilização de suplementos que enriquecem o meio de cultura a fim de sustentar a expansão celular (Bernardi et al., 2013; Bieback et al., 2012 B). Os suplementos fornecem fatores de crescimento, nutrientes para a proliferação e diferenciação, fatores de ligação e de inativação de compostos tóxicos. Além disso, também regulam a permeabilidade da membrana celular e servem como veículo para a entrada de lipídios, enzimas, micronutrientes e oligoelementos na célula. Apresentam ainda, características que sustentam as propriedades físicas do sistema de cultura, tais como o pH, viscosidade, pressão osmótica e troca gasosa (Bieback et al., 2012 B; Jung et al., 2012; Stein, 2007)

Frequentemente, utiliza-se de 10-20% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de vitelo para suplementação do meio (Fan et al., 2013; Frazier et al., 2013; Hutton et al., 2013; Santos et al., 2011; Villa-Diaz et al., 2013). Essas substâncias contêm mais de 1000 diferentes componentes, incluindo proteínas, eletrólitos, lipídios, carboidratos, hormônios, enzimas e outros componentes indefinidos (Burnouf et al., 2013; Stein, 2007)

Embora o soro seja de importância vital para o crescimento das células em cultura alguns aspectos limitam a sua utilização (Bassi et al., 2012; Bernardi et al., 2013; Bieback et al., 2012 B; Burnouf et al., 2013; Carvalho et al., 2013; Escobedo-Lucea et al., 2013; Hanley et al., 2013; Jung et al., 2012). Entre os fatores limitantes pode-se destacar:

- Risco de contaminação das células por patógenos, como vírus, micoplasmas, prions, ou agentes zoonóticos, não identificados;
- Elevado teor de proteínas xenogênicas que podem ser associadas às células durante o período de cultura e posteriormente causar reações imunológicas no paciente;
- Variação de lote para lote, causando inconsistência na qualidade das células, tornando a padronização da produção celular um processo difícil.

- Presença de inibidores de crescimento, substâncias citotóxicas e agentes de diferenciação;
- Exigência de um controle de qualidade rigoroso para minimizar o risco de contaminação e para selecionar lotes adequados para promover o crescimento de células mantendo suas propriedades biológicas;
- Presença de fatores ainda não identificados, como hormônios e fatores de crescimento que podem causar interferências;
- Disponibilidade limitada;
- Questões éticas.

Neste contexto, vários grupos de pesquisa vêm se dedicando ao desenvolvimento de suplementos alternativos para o meio de cultura, baseados em derivados sanguíneos. Na literatura é possível encontrar trabalhos utilizando: soro humano, plasma rico em plaquetas, plasma ativado com trombina, lisado de plaquetas, soro do sangue de cordão umbilical e plasma sanguíneo (Bernardi et al., 2013; Bieback et al., 2012 A; Burnouf et al., 2013; Jung et al., 2012; Lindroos et al., 2009; Patrikson et al., 2013; Rajala et al., 2010).

Diante disso, o presente estudo pretende analisar diferentes parâmetros metodológicos para isolamento e expansão de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano, com o propósito de elaborar um protocolo para isolamento e cultivo de células-tronco de tecido adiposo (CT-TA) na ausência de componentes como a colagenase e o soro fetal bovino de forma que a capacidade de crescimento e as características biológicas das células sejam mantidas, porém minimizados os riscos eventuais de contaminação, que podem estar vinculados ao emprego desses produtos de origem bacteriana e/ou animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar diferentes parâmetros metodológicos para isolamento, expansão e caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar um protocolo eficiente para a produção de lisado de plaquetas.
- Comparar as técnicas de isolamento de CT-TA por meio de digestão enzimática e dissociação mecânica.
- Comparar as técnicas de cultivo de CT-TA com meio suplementado com soro fetal bovino e lisado de plaquetas.
- Caracterizar a população celular isolada através da análise de antígenos de superfície.
- Avaliar o potencial de diferenciação das CT-TA nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica
- Determinar um protocolo para cultura e expansão da CT-TA que apresente boa proliferação celular e reprodutibilidade de resultados eliminando-se produtos como a colagenase e o soro fetal bovino.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e Descarte dos materiais biológicos

3.1.1 Obtenção e Descarte do Tecido Adiposo

O tecido adiposo humano foi obtido de indivíduos em bom estado geral de saúde, do sexo feminino com idade entre 53 e 56 anos, por meio de procedimento de dermolipectomia abdominal. O material foi cedido pelo Instituto de Atendimento Médico Hospitalar (IAM), que está devidamente autorizado para realização do procedimento. O doador foi devidamente esclarecido a respeito da pesquisa e, estando de acordo, assinou o termo de consentimento livre e esclarecido, em anexo, autorizando a utilização do material biológico.

O material biológico foi transportado para o Laboratório de Genética e Terapia Celular da Unesp - Campus Assis para processamento. Após a utilização, o descarte dos resíduos biológicos foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004.

3.1.2 Obtenção e Descarte do Concentrado de Plaquetas

Foram utilizadas bolsas de concentrado de plaquetas com prazo de validade expirado (após a data permitida para utilização das plaquetas para transfusão). As bolsas foram cedidas pelo Hospital Regional de Assis. O material foi processado no Laboratório de Genética e Terapia Celular da Unesp - Campus Assis

Após a utilização, o descarte das bolsas de sangue vazias e das bolsas com material não utilizado, também foi realizado de acordo com as recomendações da ANVISA (RDC nº 306, de 07 de dezembro de 2004).

3.2 Preparo do lisado de plaquetas para teste de adição de heparina

O lisado de plaquetas foi preparado à partir de bolsas de concentrado de plaqueta com prazo de validade expirado (após a data permitida para utilização das plaquetas para transfusão). As bolsas contendo aproximadamente $8,5 \times 10^8$ plaquetas/mL foram inicialmente divididas em quatro grupos (grupos A, B, C e D).

Foi adicionado heparina (Hemofol® - Cristália, São Paulo, Brasil) aos grupos A e B na concentração de 100UI/ml de lisado. Em seguida o material de todos os grupos, contendo ou não heparina, foi submetido a quatro processos consecutivos de congelamento, a -80 °C por 6 horas, e descongelamento, em banho-maria a 37 °C por 15 minutos, para promover a lise celular.

Após o processo de lise, as soluções obtidas foram centrifugadas 4 vezes a 3600g durante 30 minutos, para remoção dos restos celulares. Nos intervalos entre as centrifugações as amostras foram fotografadas e observadas quanto ao volume do sobrenadante, formação de coágulos, precipitados, sedimentação e agregados de superfície, para registrar a possível ocorrência de diferenças entre os lisados de plaquetas que continham ou não heparina. Por fim, os conteúdos foram filtrados em filtros de 0,22µm (Jet Biofil, São Paulo, Brasil) e congelados a -20 °C até o momento do uso.

Para a preparação dos meios de cultura contendo os lisados de plaquetas pertencentes aos grupos A e C, foi adicionada 2UI/ml de meio de heparina.

A Tabela 3 indica a o momento e a concentração de heparina adicionada em cada um dos grupos.

Tabela 3 - Adição de heparina na preparação dos lisados de plaquetas

Grupos	Adição de heparina antes do processo de lise	Adição de heparina após o processo de lise
A	100 UI/ml	2 UI/ml
B	100 UI/ml	-
C	-	2 UI/ml
D (Controle)	-	-

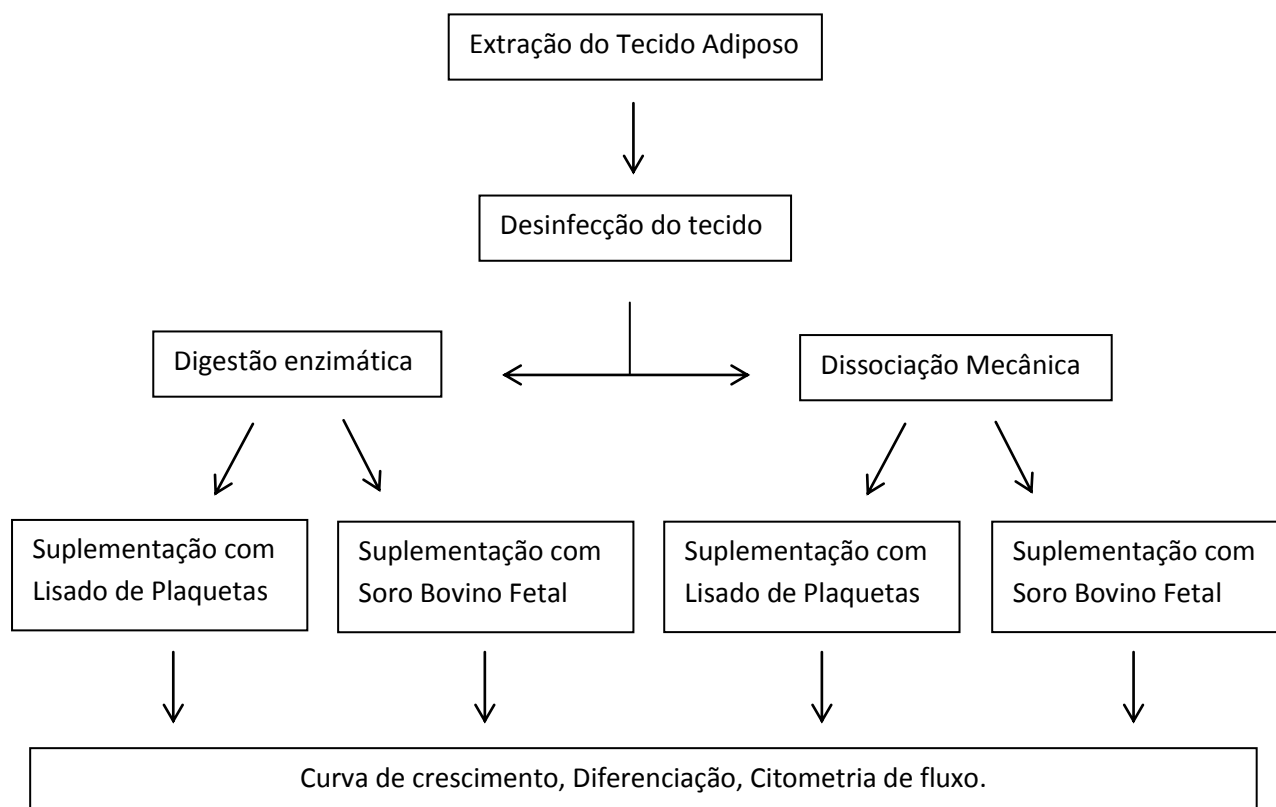
3.3 Desinfecção do Tecido Adiposo

Após o procedimento cirúrgico, o tecido adiposo obtido foi acondicionado em recipiente estéril contendo Tampão Fosfato pH: 7,2 (PBS - LGC®, São Paulo, Brasil) suplementado com 2% de uma solução de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomina e Fungizona; Gibco®, New York, USA), permanecendo em repouso por 24h a 4 °C, para desinfecção.

3.4 Isolamento das células-tronco derivadas do tecido adiposo

3.4.1 Fluxograma

Figura 1 - Fluxograma



3.4.2 Digestão enzimática

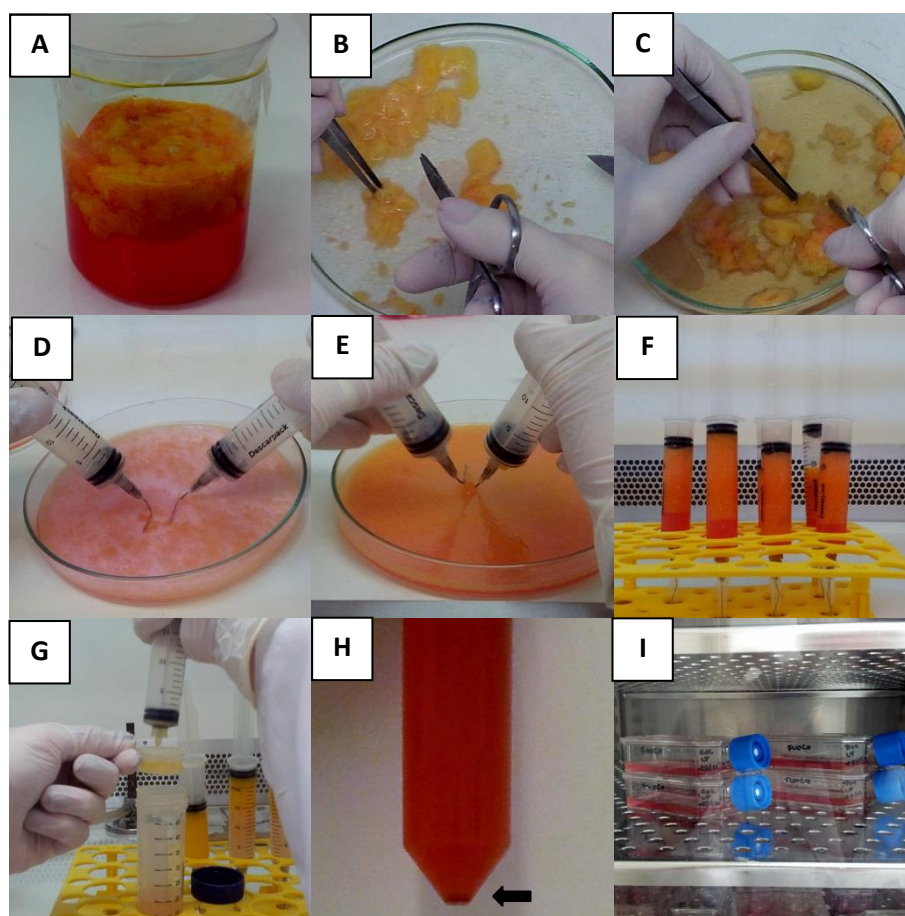
Para digestão enzimática foi empregado o método proposto por Zuk et al. (2001) com pequenas modificações. Após o período de desinfecção, 100 g de tecido adiposo foram triturados e submetidos à digestão enzimática com colagenase tipo I (Gibco, New York, USA), isolada de *Clostridium histolyticum*, a uma concentração de 0,25%. A suspensão obtida foi incubada a 37 °C por 1h e 30 minutos. Em seguida, a enzima foi neutralizada mediante adição de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium – F12 (DMEM-F12 - Gibco, New York, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Gibco, New York, USA) ou lisado de plaquetas, conforme apresentado na Figura 1. Posteriormente, o material foi filtrado, em filtro de 70 µm (Cell Strainer – BD, New Jersey, USA) para separação dos restos celulares. A suspensão celular resultante foi centrifugada durante 10 minutos a 900 g. O precipitado (pellet) obtido foi ressuspensão e uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem e determinação da viabilidade. Finalmente, as células foram

semeadas em frascos de cultura celular (BD, New Jersey, USA), a uma concentração de 1×10^5 células/cm², em meio de cultura DMEM –F12 (Gibco, New York, USA) suplementado com 1% de uma solução de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomicina e Fungizona; Gibco®, New York, USA) e 10% de SFB (Gibco, New York, USA) ou 10% de lisado de plaquetas. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

3.4.3 Dissociação mecânica

Posteriormente ao processo de desinfecção, 100 g do tecido adiposo foram colocados em uma placa de Petri, contendo meio DMEM-F12 (Gibco, New York, USA). O tecido foi submetido a dissociação mecânica com o auxílio de duas agulhas de seringa (BD, New Jersey, USA) dobradas em forma de L, para separação das células (conforme apresentado na Figura 2). O meio contendo as células dissociadas foi colocado em seringas que permaneceram em posição vertical, por cerca de dez minutos. Em seguida, a solução celular foi filtrada em um filtro de 70 µm (Cell Strainer – BD, New Jersey, USA) para a separação de restos celulares e de adipócitos maduros. O material coletado foi centrifugado durante 10 minutos a 900 g. O precipitado (“pellet”) obtido foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura e uma alíquota de 10 µL foi retirada para contagem e determinação da viabilidade. Finalmente, as células foram semeadas em frascos de cultura celular (BD, New Jersey, USA), a uma concentração de 1×10^5 células/cm², em meio de cultura DMEM –F12 (Gibco, New York, USA) suplementado com 1% de uma solução de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomicina e Fungizona; Gibco®, New York, USA) e 10% de SFB (Gibco, New York, USA) ou lisado de plaquetas. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Figura 2 - Dissociação mecânica das células-tronco derivadas de tecido adiposo.



A: desinfecção do tecido; B e C: limpeza do tecido adiposo; D e E: dissociação mecânica; F: separação de células e restos celulares por diferença de densidade; G: filtração; H: formação de precipitado após centrifugação; I: incubação em estufa de CO₂.

3.5 Manutenção das Culturas Celulares

O meio de cultura, das células provenientes de ambos os processos de isolamento, foi trocado pela primeira vez após 72h de incubação. As demais trocas de meio foram realizadas a cada 48h durante todo o processo de cultivo.

Ao atingirem 70-80% de confluência as células foram dissociadas com a utilização de Tryple™ (Gibco, New York, USA), uma enzima recombinante de origem não xenogênica, contadas em câmara de Neubauer, com a utilização de Azul de Trypan e novamente semeadas em placas de cultura na concentração de 1×10^5 células/cm². As culturas foram mantidas até a quinta passagem.

3.6 Ensaio com 2-(4,5-dimetil-2-tiazol)-3,5-difenil (MTT)

O ensaio envolve a conversão do sal hidrossolúvel MTT em um material insolúvel de formazan, formando um produto colorido que é proporcional à atividade de desidrogenase das mitocôndrias. O formazan solubilizado tem a concentração determinada por densidade óptica a 540 nm, tornando possível a mensuração da proliferação celular.

Para a realização do ensaio foi utilizado o Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (Gibco, New York, USA) seguindo as instruções do fabricante, e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Multiskan FC Versão 1.0079 – Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 540nm.

3.6.1 Teste do cultivo de células-tronco do tecido adiposo (CT-TA) usando como suplemento lisados de plaquetas preparados por meio de diferentes metodologias

Células na 3ª passagem de cultivo isoladas por colagenase foram plaqueadas em triplicata a uma densidade de 1×10^3 células/cm² em placa de cultura de 96 poços (BD, New Jersey, USA) com meio DMEM-F12 suplementado com 10% dos lisados de plaqueta A, B ou C (conforme citado no item 2) e 1% de uma solução de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomina e Fungizona; Gibco®, New York, USA). Testes de MTT foram aplicados às amostras com 24, 48 e 72 horas de incubação, para observação do crescimento celular. As células foram fotografadas para análise da morfologia celular.

O teste foi repetido, utilizando-se três lotes distintos de concentrados de plaquetas provenientes de diferentes pacientes.

3.6.2 Cinética de Crescimento das CT-TA

Células cultivadas até a 5ª passagem foram semeadas em triplicata a uma densidade de 1×10^3 células/cm² em placa de cultura de 96 poços (BD, New Jersey, USA) com meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB ou 10% de lisado de plaquetas e 1% de uma solução de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomina e Fungizona; Gibco®, New York, USA). Os testes de MTT foram iniciados após 24h de incubação, e realizados conforme instruções do fabricante (Gibco, New York, USA). A cada dia, 3 poços foram submetidos a leitura de absorbância (540nm). Esse procedimento foi repetido durante 10 dias consecutivos, possibilitando a construção de curvas de crescimento.

3.7 Cálculo do Tempo de Dobramento da População Celular

O tempo de dobramento da população (PDT – *Population Doubling Time*), período em que a população celular duplica, foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $PDT = t \times \ln(2) / \ln(N/N_0)$, onde: t: tempo, N: número de células final e N_0 : número de células inicial, conforme descrito por Arrigoni et al., 2009.

3.8 Citometria de fluxo

Foram realizados ensaios para caracterizar as subpopulações celulares presentes na cultura das CT-TA. Os anticorpos monoclonais selecionados para a marcação das células foram dirigidos contra proteínas de superfície características de células-tronco mesenquimais e “gate” de exclusão, conforme proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006). As células cultivadas até a 6ª passagem foram marcadas com CD90, CD73, CD105, CD45, CD34, HLA-DR, CD19 e CD11b (BD, New Jersey, USA) A técnica de marcação consiste em lavagens da amostra com PBS e aquisição (5000 eventos). no Citômetro de Fluxo FACSCalibur® (BD, New Jersey, USA).

3.9 Capacidade de diferenciação das células-tronco derivadas do tecido adiposo

3.9.1 Diferenciação Condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, as CT-TA cultivadas até a 5ª passagem foram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 60-80%. Em seguida, as células foram cultivadas durante 14 dias em presença do kit de diferenciação condrogênica StemPro® (Gibco®, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA).

3.9.2 Diferenciação Osteogênica

Para induzir a diferenciação osteogênica, as CT-TA cultivadas até a 5ª passagem foram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 60-80%. Em seguida, as células foram cultivadas durante 21 dias na presença do kit de diferenciação osteogênica StemPro® (Gibco®, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA).

3.9.3 Diferenciação Adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, as CT-TA cultivadas até a 5ª passagem foram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 60-80%. Em seguida, as células foram cultivadas durante 7 dias na presença do kit de diferenciação adipogênica StemPro[®] (Gibco[®], New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich[®], Missouri, USA).

3.10 Aspectos Éticos

O projeto foi registrado na Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Faculdade de Ciências e Letras de Assis - UNESP – Campus de Assis (Assis, São Paulo, Brasil) sob o número de registro CAAE: 16624813.1.0000.5401.

4 RESULTADOS

4.1 Teste da adição de heparina

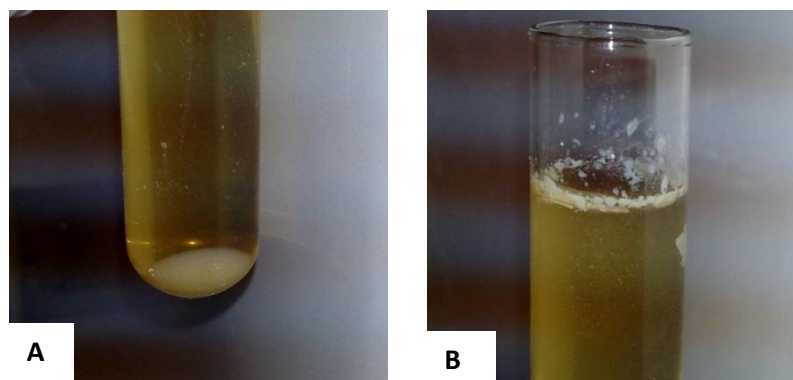
A fim de testar a ação da heparina na formação de gel e de coágulos no meio de cultura, a heparina foi adicionada: 1) antes e após a lise das plaquetas (grupo A), 2) somente antes da lise (grupo B) e 3) somente depois da lise (grupo C), nas concentrações indicadas na Tabela 3, e comparadas com os resultados obtidos com o grupo D (controle) isento de heparina.

Os grupos foram analisados quanto ao volume de sobrenadante, formação de coágulos, precipitados, sedimentação e agregados de superfície entre cada centrifugação. As observações evidenciaram:

- Ausência da formação de coágulos
- Agregados de superfície nas 2 primeiras centrifugações.
- Resíduos em suspensão presentes nos 4 ciclos de centrifugação, em quantidades iguais, não sendo dependente da dose ou momento de adição da heparina (Figura 3)
- Presença de botão celular, sendo que este diminuiu progressivamente entre as centrifugações, tornando-se praticamente ausente na última (Figura 3)
- Pequena diminuição no volume de sobrenadante entre a primeira e segunda centrifugação e uma diminuição progressiva entre as demais centrifugações.

Resultados semelhantes foram observados em todos os grupos. Não houve mudança digna de nota decorrente do momento de adição e concentração de heparina, com exceção do grupo controle (grupo D) onde observou-se a formação de gel quando o lisado de plaquetas foi colocado em contato com o meio de cultura. Este efeito deve, provavelmente, ser decorrente do conteúdo de cálcio, ativando a cascata de coagulação. Desta forma, esse grupo foi descartado como alternativa para utilização em cultura. A ausência na formação de coágulos e géis nos demais grupos indica que mesmo no grupo C, onde havia uma concentração menor de heparina, foi possível impedir o processo de coagulação. A presença de agregados de superfície, resíduos em suspensão e botão celular, bem como a diminuição no volume de sobrenadante, que ocorreram de forma semelhante em todos os grupos, indicam que o processo de lise celular ocorreu de forma similar nos grupos A, B, C e D independentemente da adição ou não de heparina.

Figura 3 - Fomação de botão e celular e resíduos de superfície durante o preparo do lisado de plaquetas.

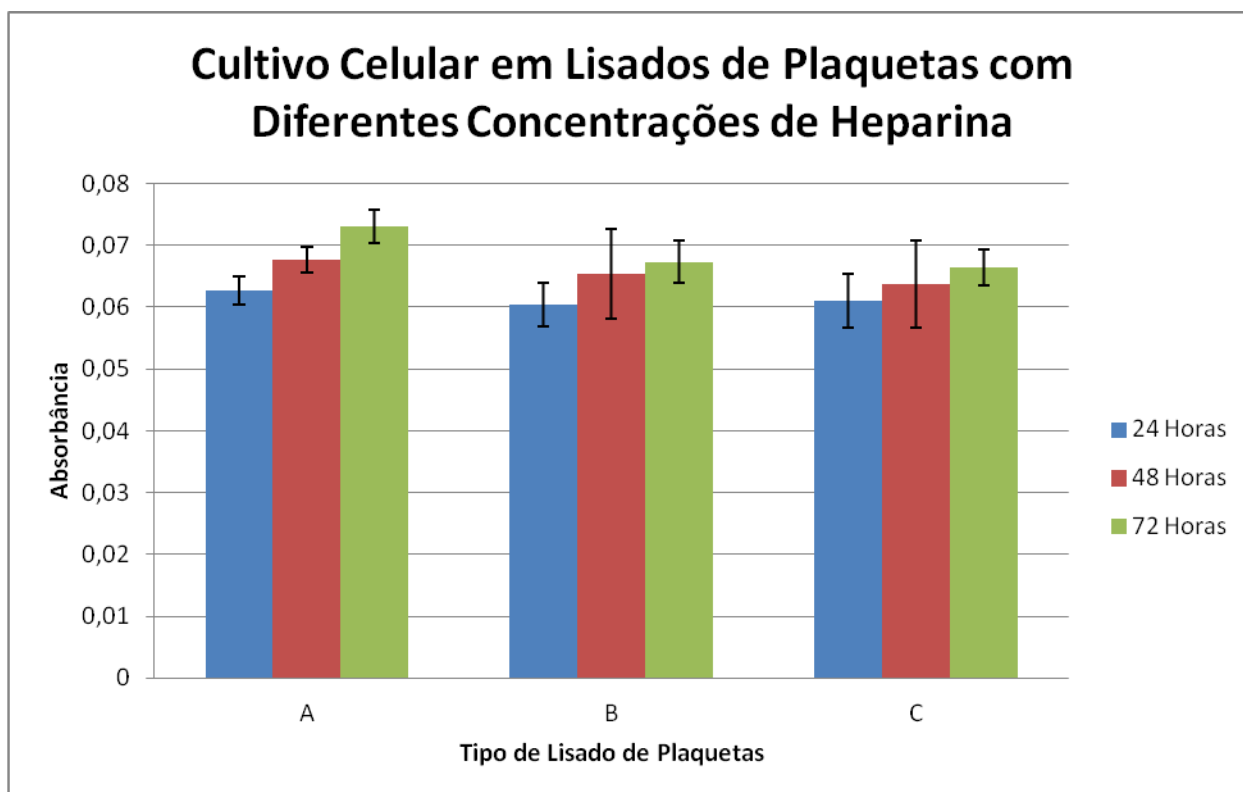


Fomação de botão e celular (A) e resíduos de superfície (B) durante o preparo do lisado de plaquetas.

4.2 Teste do Cultivo de Células-tronco Derivadas do Tecido Adiposo (CT-TA) em Lisados de Plaquetas com Diferentes Concentrações de Heparina

Os lisados de plaquetas A, B e C, utilizados no teste de heparina (item 1), foram avaliados no cultivo de CT-TA, buscando verificar a ocorrência de diferenças na adesão e crescimento celular. O teste de cultivo celular não revelou diferenças no crescimento e adesão das CT-TA, conforme ilustrado na Figura 4. Desta forma a metodologia de preparo de lisado de plaquetas C foi escolhida para os demais testes, por conter uma concentração menor de heparina e impedir, de forma semelhante aos demais grupos, a formação de coágulos.

Figura 4 - Gráfico do crescimento da população de CT-TA cultivadas nos lisados de plaquetas com adição de heparina antes e depois, somente antes e somente depois do processo de lise celular



Grupo A: adição de heparina antes e depois do processo de lise celular; Grupo B: adição de heparina somente antes do processo de lise celular; Grupo C: adição de heparina somente depois do processo de lise celular. Todos os grupos foram analisados em triplicata.

4.3 Isolamento e expansão celular

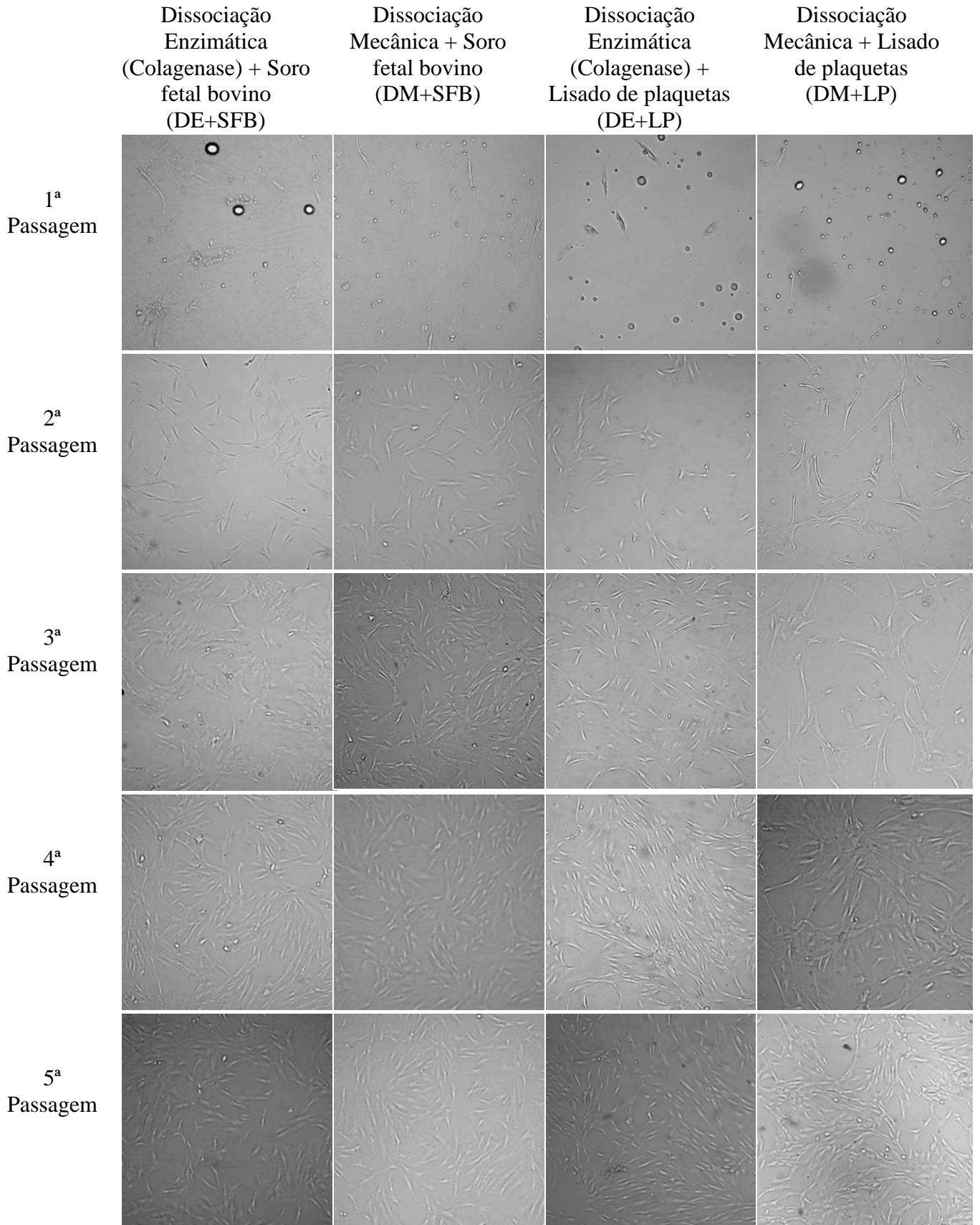
As células isoladas por digestão enzimática ou por dissociação mecânica foram inicialmente plaqueadas a uma densidade de 1×10^5 células/cm². Em todos os grupos de cultivo foi possível observar a adesão celular após 2 dias de incubação e a formação das primeiras colônias de aspecto fibroblastóide após 3 a 5 dias.

A confluência de 70-80% para a primeira dissociação com Tryple (Gibco, New York, USA) foi atingida no 8º dia para as culturas isoladas por digestão enzimática e no 10º dia de cultivo para as culturas celulares isoladas por dissociação mecânica. As demais passagens ocorreram no mesmo tempo para ambos os grupos, levando entre 4 a 5 dias de cultivo. Todas as culturas foram mantidas até a 5ª passagem.

Na cultura primária, observou-se hemácias e adipócitos maduros, em todos os grupos, com maior incidência nas culturas isolados por dissociação mecânica. Estas células foram eliminadas ao longo do cultivo, durante as trocas de meio e dissociações com Tryple, de

forma que, na terceira passagem todas as culturas apresentavam aspecto de monocamada homogênea de células, com morfologia fibroblásticoide que foi mantida até o fim do cultivo (Figura 5).

Figura 5 - Características das células isoladas de tecido adiposo ao longo do cultivo

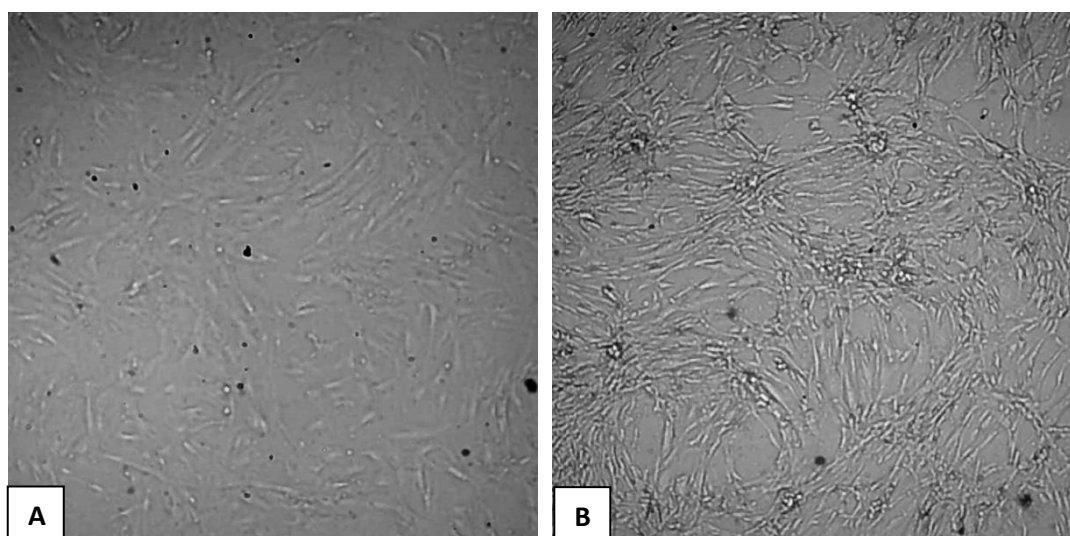


Células isoladas por digestão enzimática e cultivadas com SFB (DE+SFB), células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com SFB (DM+SFB), células isoladas por digestão enzimática e

cultivadas com lisado de plaquetas (DE+LP) e células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com lisado de plaquetas (DM+LP) (Aumento original de 4X).-

O aspecto fibroblastóide, característico das CT-TA, pode ser observado em todos os grupos. Entretanto, a culturas mantidas com lisado de plaquetas apresentaram células maiores e com citoplasma com melhor definição, quando comparadas Às células cultivadas com SFB (Figura 6).

Figura 6 - Microscopia das células cultivadas em com soro fetal bovino e lisado de plaquetas, evidenciando as diferenças morfológicas



A: células cultivadas com soro fetal bovino; B: células cultivadas com lisado de plaquetas. (Aumento original 4x).

4.4 Curva de Crescimento

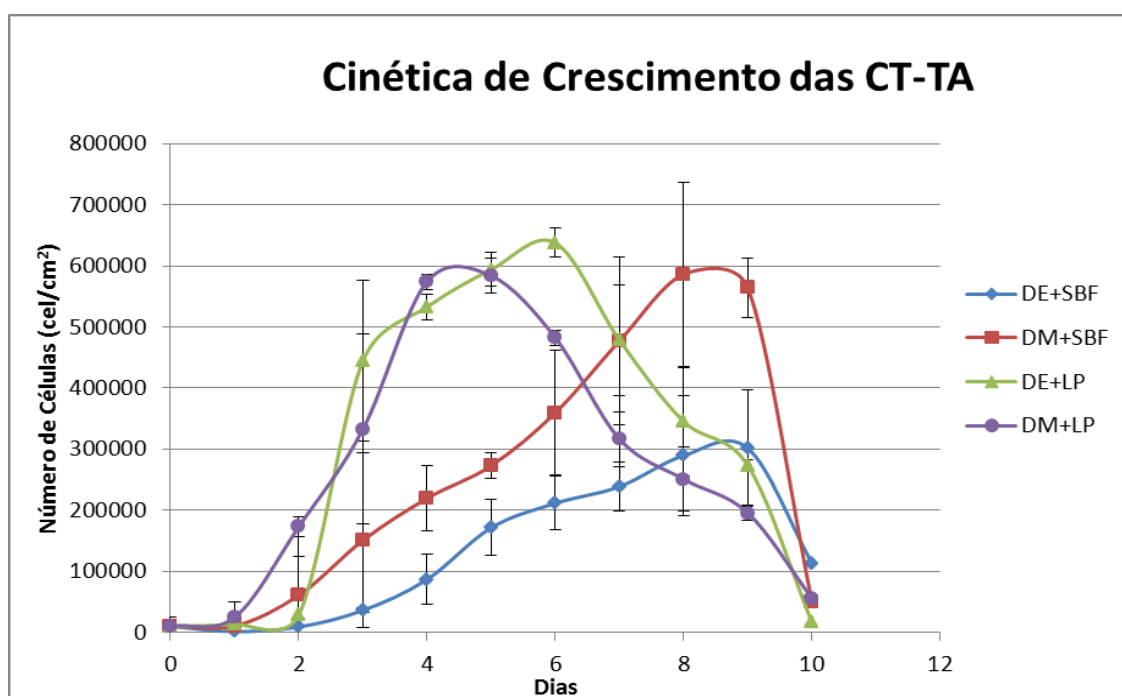
Para investigar o potencial de adesão e proliferação das células isoladas por dissociação mecânica (DM) ou digestão enzimática (DE) e cultivadas com soro fetal (SFB) ou lisado de plaquetas (LP), foi realizada, por meio da leitura de MTT, uma curva de crescimento com duração de 10 dias. As curvas de crescimento estão ilustradas na Figura 7.

Inicialmente todos os grupos apresentaram uma fase de crescimento lenta (fase lag) que representa o período de adaptação metabólica das células após o plaqueamento, para que haja a adesão, alongamento e a produção dos componentes necessários para a expansão celular. Nos grupos isolados por dissociação mecânica (DM+LP e DM+SFB) essa fase pode ser observada apenas nas primeiras 24 horas de cultivo, porém nos grupos isolados por digestão enzimática (DE+LP e DE+SFB), a fase lag se estendeu durante as primeiras 48 horas após o plaqueamento.

Posteriormente a esse período de crescimento lento, as células apresentaram uma fase de crescimento exponencial (fase log). Durante essa fase os grupos apresentaram comportamentos diferentes. Comparando-se os tipos de suplemento, observa-se na Figura 7, que os grupos que tiveram meio de cultura suplementado com lisado de plaquetas (DE+LP e DM+LP) apresentaram um crescimento inicial superior aos grupos suplementados com SFB (DM+SFB e DE+SFB). Entretanto, a fase log dos grupos DE+LP e DM+LP manteve-se por apenas 6 e 5 dias respectivamente, enquanto os grupos DM+SFB e DE+SFB, apesar do crescimento mais lento, mantiveram a proliferação celular até o 8° e o 9° dias respectivamente. Não foi possível observar, no entanto, com relação as técnicas de isolamento, diferenças na fase log dos grupos DE+LP e DM+LP, porém foi possível observar um crescimento mais acentuado no grupo DM+SFB quando comparado com DE+SFB. Após a fase log nenhum dos grupos apresentou fase estacionária todos entraram na fase de declínio.

De forma geral, foi possível observar que todas as técnicas empregadas mostraram viabilidade para o cultivo de CT-TA, porém as curvas mostraram uma taxa proliferativa maior nas células pertencentes aos grupos suplementados com LP.

Figura 7 - Curva de crescimento das CT-TA isoladas por digestão enzimática (DE) ou dissociação mecânica (DM) e cultivadas com soro fetal bovino (SFB) ou lisado de plaquetas (LP).



4.5 Tempo de Dobramento da População Celular (PDT)

Com base na curva de crescimento foi calculado o tempo de dobramento da população celular (PDT), que representa um importante marcador da capacidade proliferativa das células, os resultados estão sintetizados na Tabela 4. As médias do tempo de dobramento da população celular refletem comportamento semelhante, conforme se observava nas curvas de crescimento. Quando comparados os tipos de suplemento, evidencia-se um processo proliferativo acentuado nos grupos suplementados com lisado de plaquetas. Quando se compara os tipos de isolamento, verifica-se uma proliferação mais acentuada nos grupos decorrentes da dissociação mecânica.

Tabela 4 - Tempo de dobramento da população celular das CT-TA

Grupo	PDT (horas)
DE+SFB	59.59
DM+SFB	49.75
DE+LP	39.96
DM+LP	20.69

Onde: DE+SFB= Células isoladas por digestão enzimática e cultivadas com SFB

DM+SFB= Células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com SFB

DE+LP= Células isoladas por digestão enzimática e cultivadas com lisado de plaquetas

DM+LP= Células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com lisado de plaquetas

4.6 Citometria de Fluxo

Com o propósito de analisar as subpopulações celulares que foram isoladas por cada uma das técnicas de cultivo empregadas, as amostras foram submetidas a citometria de fluxo. Os resultados obtidos estão sintetizados na Tabela 5 e na Figura 8 e mostram que, de forma geral, os grupos cultivados com lisado de plaquetas apresentam, para os diferentes marcadores, valores próximos àqueles preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* – ISCT), conforme reportado por Dominicci et al., (2006). Esses resultados indicam um baixo índice de contaminação por outros tipos celulares. Entretanto, as amostras cultivadas com soro fetal bovino apresentaram, para os antígenos de superfície CD73/CD105 e CD90/CD105, valores inferiores a 95 %, conforme os resultados apresentados na Tabela 5 e Figura 8, estando, portanto, os valores percentuais dos marcadores obtidos nos grupos experimentais

cultivados com SFB, aquém daqueles (acima de 95 %) propostos pela ISCT (Dominicci et al., 2006).

Tabela 5 - Caracterização das CT-TA por citometria de fluxo

Marcadores	DE+SFB	DM+SFB	DE+LP	DM+LP
CD73/CD90 ($\geq 95\%$)	98,39%	88,07%	99,62%	93,12%
CD73/CD105 ($\geq 95\%$)	64,43%	79,82%	97,11%	92,5%
CD90/CD105 ($\geq 95\%$)	60,46%	77,98%	98,93%	98,12%
CD34 ($\leq 2\%$)	0%	0%	0%	0%
CD11b ($\leq 2\%$)	0,10%	1,17%	0,06%	1,05%
HLA-DR ($\leq 2\%$)	0,8%	1,79%	0,3%	0%
CD19 ($\leq 2\%$)	0%	0,39%	0,1%	0%
Total de CT-TA	60,46%	77,98%	97,11%	92,5%

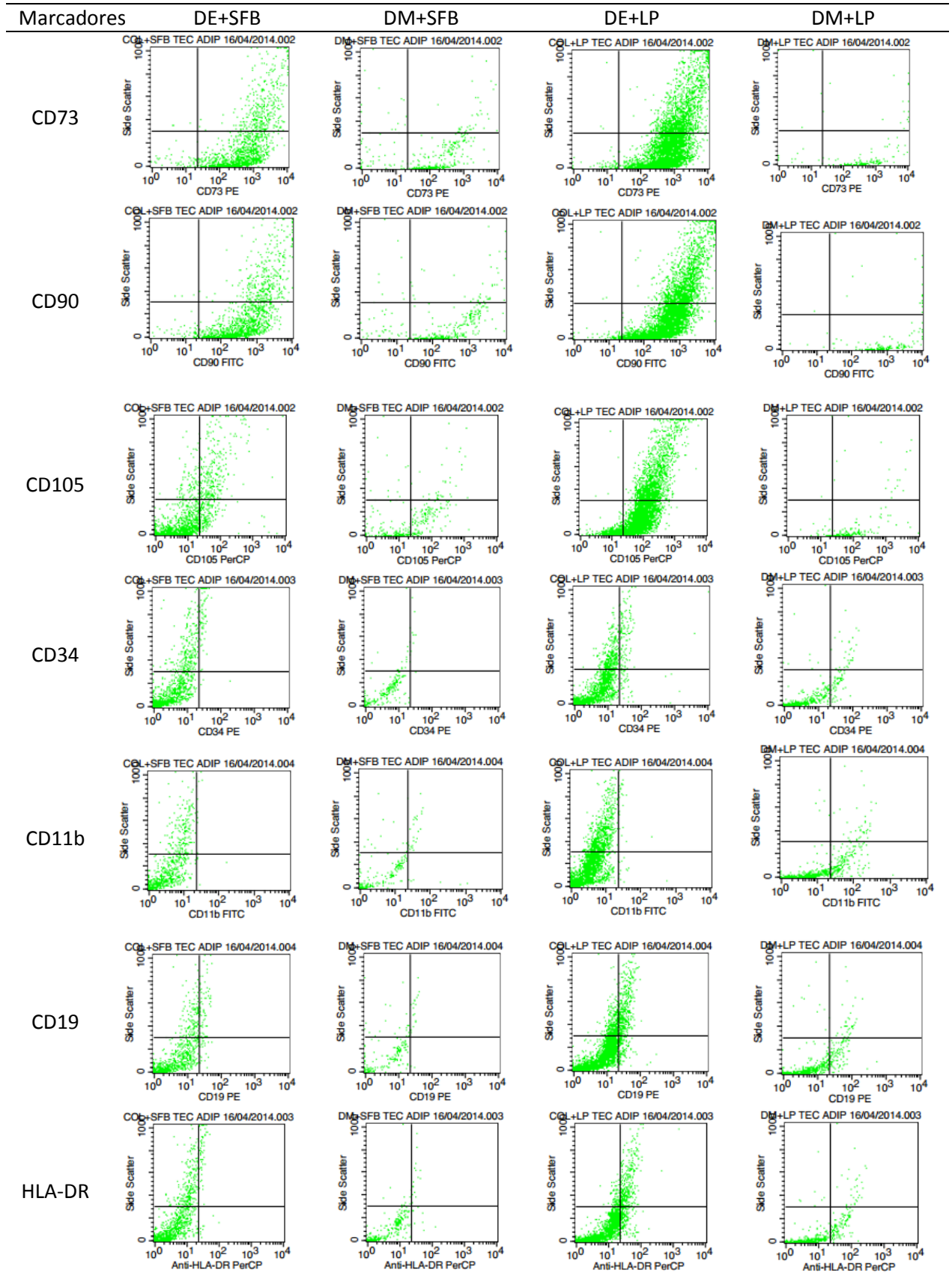
Onde: DE+SFB= Células isoladas por digestão enzimática e cultivadas com SFB

DM+SFB= Células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com SFB

DE+LP= Células isoladas por digestão enzimática e cultivadas com lisado de plaquetas

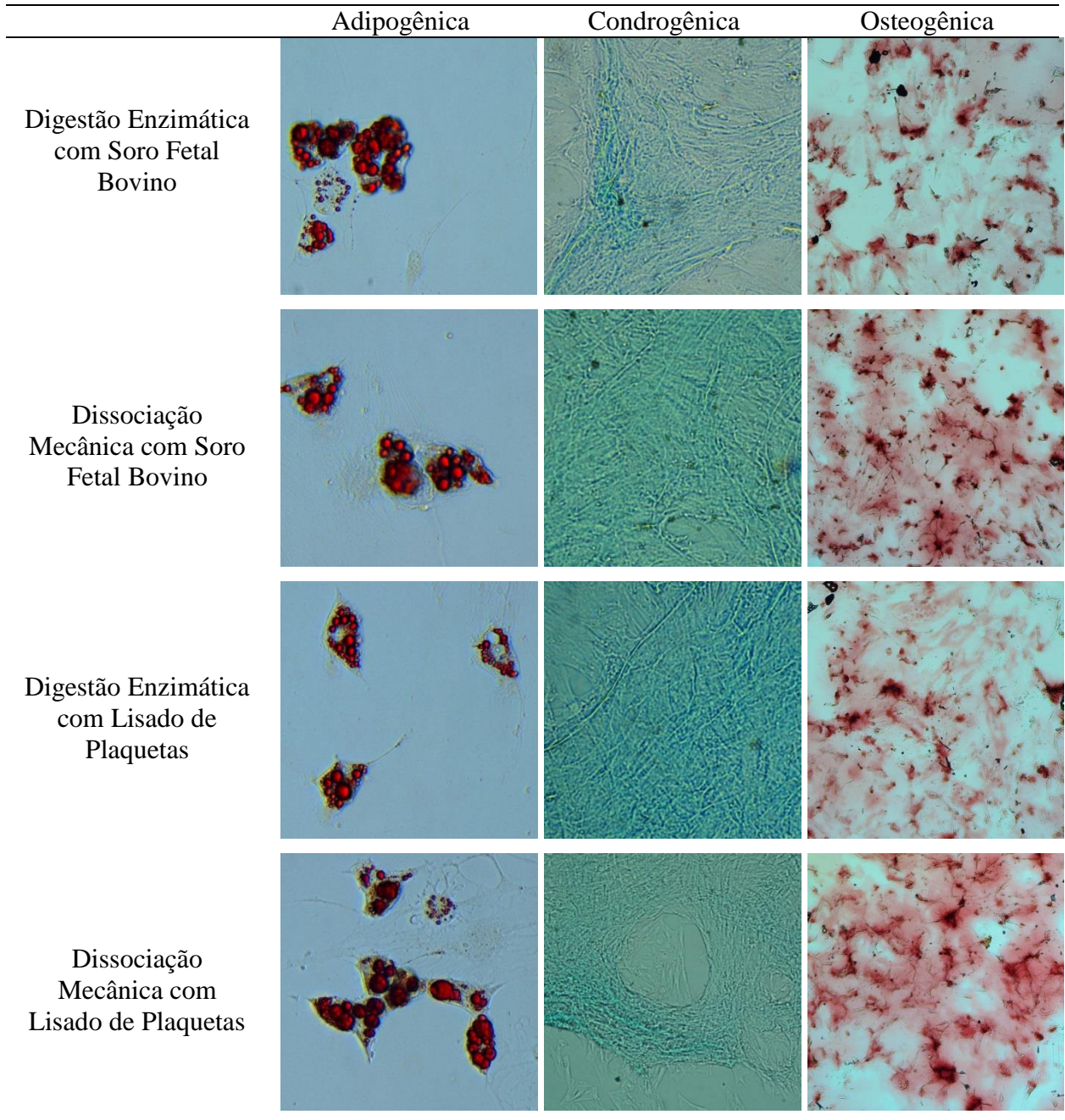
DM+LP= Células isoladas por dissociação mecânica e cultivadas com lisado de plaquetas

Figura 8 - Gráficos representativos da citometria de fluxo



4.7 Diferenciação das células-tronco do tecido adiposo (CT-TA)

O potencial de diferenciação das CT-TA em adipócitos, osteócitos e condrócitos, foi investigado com o intuito de averiguar se as células isoladas pelos diferentes métodos descritos na metodologia apresentam os requisitos básicos para que possam ser definidas e caracterizadas como células-tronco mesenquimais. Conforme os resultados apresentado na Figura 9, todos os grupos demonstraram o potencial de diferenciação nas três linhagens. A diferenciação adipogênica foi confirmada por meio da presença de vacúolos lipídicos indicados pela coloração com Oil Red O. A osteogênese foi verificada mediante coloração da matriz óssea com Alizarin Red S. Finalmente, confirmou-se a diferenciação condrogênica com o corante Alcian Blue. O azul indica a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos.

Figura 9 - Diferenciação das CT-TA em adipócitos, condrócitos e osteócitos

Adipócitos: coloração com Oil Red; Condrócitos: coloração com Alcian Blue; Osteócitos: coloração com Alizarin Red. Aumento original de 20x.

5 DISCUSSÃO

O transplante de CT-TA representa uma nova alternativa terapêutica com grande potencial de aplicabilidade no reparo e regeneração de órgãos e/ou tecidos lesados aguda ou cronicamente (Bourin et al., 2013; Eslaminejad et al., 2011; Marcelino et al., 2014). Desta forma, torna-se necessário ampliar o conhecimento acerca das características das CT-TA, bem como sobre as técnicas de manipulação do tecido adiposo e seus constituintes celulares, adequando o cultivo celular para a prática clínica de forma que os métodos adotados sejam, não apenas eficazes para emprego em terapia celular, mas também, seguros e idealmente, isentos de efeitos adversos.

As recomendações preconizadas pela ANVISA, na Resolução da Diretoria Colegiada - RCD nº 9, de 14 de março de 2011, postulam que se evite o emprego de produtos de origem animal (xenobióticos) em cultura de células para terapia celular em pacientes humanos. Assim, justifica-se a introdução de novas metodologias de cultivo que permitam e viabilizem a substituição dos componentes xenobióticos, tais como a colagenase bacteriana e o soro fetal bovino (SFB), rotineiramente empregados, nos processos de isolamento e expansão de CT-TA. (Bassi et al., 2012; Bernardi et al., 2013; Bieback et al., 2012 B; Burnouf et al., 2013; Carvalho et al., 2013; Escobedo-Lucea et al., 2013; Hanley et al., 2013; Jung et al., 201, Marcelino et al., 2014).

Neste contexto, o lisado de plaquetas (LP) representa uma alternativa promissora para substituição do soro fetal bovino (Anitua et al., 2013; Bournof et al., 2013; Hernandez, 2012; Metcalf et a., 2013; Smyth et al., 2013; Suzuki et al., 2012; Vetrano et al., 2013; Villa-Diaz et al., 2013). Os resultados obtidos neste trabalho decorrentes de diferentes metodologias empregadas para a produção do lisado de plaquetas, mostraram que não houve diferença qualitativas quanto ao volume do sobrenadante, formação de coágulos, precipitados, sedimentação e agregados de superfície entre os grupos tratados com heparina, conforme apresentado na Figura 3. Esses resultados corroboram aqueles descritos anteriormente por outros autores, como Yoshito (2011) e Altran (2011), que também avaliaram os mesmos parâmetros para comparação de lisado de plaqueta com adição de heparina antes ou depois processo de lise celular. O preparo de lisado de plaquetas, sem adição de heparina, no entanto, demonstra que a suplementação de meio de cultura com lisado de plaquetas, na ausência de heparina, determina a formação de um composto de aspecto gelatinoso, o que torna, portanto, essa metodologia inviável para a utilização do lisado em cultivo celular. A partir desses resultados esta variante metodológica para produção e emprego de LP em

substituição ao SFB foi, portanto, descartada nos experimentos subsequentes de cultura celular.

Diante dos resultados encontrados no teste de adição de heparina, avaliou-se o crescimento celular em meio de cultura suplementado com 10% de lisado de plaquetas dos grupos A (adição de heparina na concentração de 100 UI/ml de lisado de plaquetas antes do processo de lise celular e 2 UI/ml de meio depois), B (adição de heparina de 100 UI/ml somente antes da lise) e C (adição de heparina de 2 UI/ml de meio de cultura somente após a lise celular). Reiteradamente, não foram observadas diferenças significativas. Os parâmetros de adesão, crescimento e morfologia celular foram mantidos de forma semelhante nos três grupos. Deve-se ressaltar que, ao comparar o desenvolvimento de CT-TA em meio de cultura suplementado com lisado de plaquetas contendo diferentes doses de heparina (0,61 UI/ml e 156 UI/ml), Hemada et al., (2013) relataram diminuição na expansão e capacidade de formação de colônias e aumento no tempo de dobramento da população de CT-TA quando utilizadas concentrações mais altas de heparina (156 UI/ml).

Em decorrência dos resultados encontrados, nos testes anteriores (teste de adição de heparina e cultivo de células em meio suplementado com lisado de plaquetas contendo diferentes doses de heparina) e, em conformidade com os resultados obtidos por Hemada et al., (2013), padronizou-se o preparo do lisado de plaquetas com adição de heparina na concentração de 2 UI/ml de meio de cultura após o processo de lise celular (metodologia utilizada no grupo B), uma vez que, essa é, entre todas as variantes testadas, a metodologia que utiliza menor dose de heparina sem que haja formação de gel ou coágulo.

Além de substituir o SFB utilizado nas culturas, pretendeu-se, também, no presente trabalho a eliminação de outra componente de origem xenobiótica: a colágenase (obtida da bactéria *Clostridium histolyticum*). Neste sentido, propôs-se a dissociação mecânica como método alternativo para o isolamento das CT-TA. O emprego desta variante metodológica apresentou resultados promissores, mostrando eficiência no isolamento de CT-TA. Esses resultados estão em conformidade com aqueles reportados outros autores, como Bianchi et al., (2013) e Shah et al., (2013), que propuseram diferentes metodologias de isolamento de CT-TA sem emprego de enzimas. No trabalho de Shah et al., (2013) a metodologia proposta baseia-se na lavagem de lipoaspirado com tampão fosfato e posterior centrifugação do sobrenadante, já no trabalho de Bianchi et al., (2013) os autores propuseram um aparato fechado para imersão do lipoaspirado, **contendo** pequenas esferas de aço inoxidável, que, sob agitação, **augmentam progressivamente a fragmentação do** tecido, liberando,

consequentemente, as CT-TA. Apesar de se tratar de metodologias distintas, tanto o presente trabalho quanto os trabalhos de outros autores, reportados anteriormente, **permitem** concluir que o isolamento das CT-TA prescindindo-se do uso de enzimas, representa uma alternativa viável e exequível, mostrando resultados reprodutíveis e conferindo sustentação às recomendações preconizadas pela ANVISA, para que se evite por completo ou tanto quanto possível, o emprego de produtos xenobióticos em cultivo de células, que tenham por finalidade o emprego em procedimentos de terapia celular de pacientes humanos.

Com relação às taxas proliferativas das células isoladas por métodos não-enzimáticos, os resultados observados na curva de crescimento e no tempo de dobramento da população celular são discordantes. Àqueles descritos por Shah et al., (2013), esses autores, observaram que as células isoladas pelo método de lavagem de lipoaspirado, apresentam capacidade de proliferação 19 vezes inferior à taxa encontrada para células isoladas por collagenase. O mesmo, não ocorre com a metodologia de dissociação mecânica, proposta no presente estudo, que exibe crescimento superior ao encontrado em células isoladas por digestão enzimática, conforme os resultados apresentados na Figura 7 e na Tabela 4.

A utilização de lisado de plaquetas como suplemento para o meio de cultura também alterou o crescimento celular, resultando em uma taxa proliferativa superior àquela encontrada nos grupos suplementados com SFB. Essas observações são concordantes com as encontradas na literatura, Lindroos et al., (2010), Bieback et al., (2012), Blande et al., (2009) e Shih et al., (2010) descreveram, também resultados muito semelhantes, quando compararam o crescimento de CT-TA cultivadas em meio suplementado com 10% de SFB ou LP. Entretanto, conforme os resultados obtidos neste trabalho verifica-se que apesar do crescimento acelerado as células cultivadas com LP apresentaram diferenças na morfologia celular (Figura 6). Estes resultados também estão de acordo e corroboram as observações de outros autores como Bieback et al., (2010), Bieback et al., (2012), Kocaoemer et al., (2007) e Kolle et al., (2013) que também verificaram a ocorrência de células com citoplasma maior e mais bem definido quando cultivadas com 10% de LP.

Após analisar a capacidade proliferativa das células isoladas e cultivadas nas diferentes condições propostas, foi realizada a caracterização celular (imunofenotipagem) por meio de citometria de fluxo. Os resultados (Tabela 5) mostraram que as células cultivadas com lisado de plaquetas apresentaram baixos níveis de contaminação por outros tipos celulares atendendo às proposições da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (Dominici et al., 2006) para caracterização de células-tronco mesenquimais, onde os marcadores

CD105, CD73 e CD90 devem apresentar valores percentuais acima de 95% das células. Enquanto para os antígenos de superfície CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR os valores percentuais devem estar abaixo de 2%. Mais recentemente, a ISCT estabeleceu diretrizes mais específicas para a caracterização de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo, determinando que os marcadores CD105, CD90, e CD73 deveriam estar presentes em mais de 70% das células (Bourin et al., 2013), desta forma, o grupo DM+SFB também inclui-se entre os grupos que atendem aos critérios sugeridos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT (Bourin et al., 2013). Deste modo, o único grupo que não atingiu os percentuais propostos pela ISCT foi o grupo DE+SFB, que apresentou marcação positiva de 64,43% para CD73/CD105 e 60,46% para CD90/CD105. Resultados semelhantes foram, também, reportados por outros grupos de pesquisa (Koacamer et al., 2007; Patrikoks et al., 2013) que descreveram diminuição dos marcadores CD73 e CD105 quando células isoladas por colagenase e cultivadas com SFB foram analisadas após a 5ª passagem. O mesmo pode ter ocorrido no presente estudo uma vez que as células foram analisadas apenas na 7ª passagem.

Por fim, para completar a caracterização celular, as células foram induzidas a diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Conforme os critérios recomendados pela ISCT (Dominicci et al., 2006) e adotados por diferentes autores (Blande et al., 2009; Kocaoemer et al., 2007; Kolle et al., 2013; Lindroos et al., 2009; Patrikosk et al., 2013; Rajala et al., 2010), tanto as células cultivadas com SFB quanto as células cultivadas com lisado de plaquetas apresentaram capacidade de diferenciação nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica, conforme apresentado na figura 9.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudos permitem concluir que o lisado de plaquetas é eficiente para manter a expansão de CT-TA, substituindo o uso de SFB, que pode, eventualmente, representar riscos potenciais de reações imunológicas e transmissão de zoonoses, vírus ou príons. Estudos adicionais, no entanto, são necessários com relação à padronização da metodologia de obtenção do lisado de plaquetas, sobretudo no que diz respeito à quantidade de heparina utilizada.

Considerando, ainda os resultados obtidos é possível concluir que a metodologia de dissociação mecânica e o emprego de lisado de plaquetas representam alternativas viáveis, reprodutíveis e eficientes para isolamento e cultivo de CT-TA, tornando, como consequência, prescindível o emprego de xenobióticos, como a colagenase e o SFB sem, no entanto, comprometer a eficiência do processo. Esses resultados representam uma alternativa metodológica extremamente promissora e constituem suporte experimental para implementação das recomendações da ANVISA, no sentido de, além de diminuir os custos, conferir maior segurança aos procedimentos de terapia celular prescindindo-se do emprego de produtos xenobióticos para cultivo de células tronco provenientes de tecido adiposo, particularmente quando se pretende o posterior emprego das células em procedimentos de terapia celular em pacientes humanos.

REFERÊNCIAS¹

- Altran SC. Substituição dos componentes xenobióticos empregados no meio de cultura para manutenção de queratinócitos humanos por similares de origem humana. [Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear - aplicações)]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2011.
- Alves-de-Moraes LB, Ribeiro-Paes JT, Longoc BM, Ferrazoli EG, Andrade TGACS. Effect of the bone marrow cell transplantation on elevated plus-maze performance in effect of the bone marrow cell transplantation. *Behav Brain Res.* 2013; 248: 32– 40.
- Amorin B, Valim VS, Lemos NE, Júnior LM, Silva AMP. Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. *Revista HCPA.* 2012; 32(1):71-81.
- Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anatomy.* 2013; 30: 1-6.
- Aragão MAC, Bezerra FTG. Brazil and stem cell research: an overview, *Rev Biologia.* 2012; 9(1): 12-5.
- Arrigoni E, Lopa S, Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Res.* 2009; 338: 401–11.
- Baer PC, Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012; 2012: 1-11.
- Balk SD. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *P Natl Acad Sci.* 1971; 68(2): 271-5.
- Barbosa AS, Carvalho PAL, Ferreira LN, Boery RNSO, Sena ELS. Implicações bioéticas na pesquisa com células-tronco embrionárias. *Acta Bioethica.* 2013; 19 (1): 87-95.
- Bassi G, Pacelli L, Carusone R, Zanoncello J, Krampera M. Adipose-derived stromal cells (CT-TAs). *Transfus Apher Sci.* 2012; 47: 193–8.
- Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89: 2804–8.
- Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, Chierigato K, Lievore C, Madeo D, Rodechiero F, Astori G. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2013; 15: 920-9.
- Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G, Valente S, Mendez AJ, Ricordi C, Raffaini M, Tremolada C, Ventura C. A new nonenzymatic method and device to obtain a

¹De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 jul15]. Available from: <http://icmje.org>.

fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant*. 2013; 22: 2063–77.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; 2: 313-9.

Bieback K, Ha VA, Hecker A, Grassl M, Kinzebach S, Solz H, Sticht C, Klüter H, Bugert P. Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Eng*. 2010; 16(11): 3467-84.

Bieback K, Hecker A, Schlechter T, Hofmann I, Brousos N, Redmer T, Besser D, Klüter H, Müller AM, Becker M. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy*. 2012; 14(5): 570-83.A

Bieback K, Wuchter P, Besser D, Franke W, Becker M, Ott M, Pacher M, Ma N, Stamm C, Klüter H, Müller A, Ho AD. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J Mol Med*. 2012; 90: 773–82.B

Blande IS, Bassaneze V, Lavini-Ramos C, Fae KC, Kalil J, Miyakawa AA, Schettert IT, Krieger JE. Adipose tissue mesenchymal stem cell expansion in animal serum-free medium supplemented with autologous human platelet lysate. *Transfusion*. 2009; 49: 2680-5.

Bongso A, Fong CY. The therapeutic potential, challenges and future clinical directions of stem cells from the wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cell Rev Rep*. 2013; 9: 226–40.

Bongso A, Richards M. History and perspective of stem cell research. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004; 18(6): 827–42.

Bosch G, Moleman M, Barneveld A, Weeren, PRV, Schie HTMV. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Spor*. 2011; 21(4): 554-61.

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshinura K, Gimble JM. 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 (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013; 15: 641-8.

Brasil. Lei de Biossegurança. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 mar 2005 a.

Bringnier AC, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2010; 125(2): 336-43.

Broccaioli E, Niada S, Rasperini G, Ferreira LM, Arrigoni E, Yenagi V, Brini AT. Mesenchymal stem cells from bichat's fat pad: in vitro comparison with adipose-derived stem cells from subcutaneous tissue. *Bio Res Open Access*. 2013; 2(2): 107-17.

Buehrer BM, Cheatem B. Isolation and characterization of human adipose-derived stem cell for use in tissue engineering. *Methods Mol Biol*. 2013; 1001: 1-11.

Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* 2013; 27: 77-89.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(1): 25-35.

Cabral ACV, Ângelo PC, Leite HV, Pereira AK, Lopes APBM, Oliveira MB, Borges KBG, Pardini VC, Ferreira ACS. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células-tronco de líquido amniótico. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54(6): 489-93.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991; 9(5): 641-50.

Carvalho PP, Gimble JM, Dias IR, Gomes ME, Reis RL. Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells. *Tissue Eng.* 2013; 19(6): 473-8.

Casteilla L, Planat-Benard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells.* 2011; 3: 25-33.

Centeno CJ, Schultz JR, Cheever M, Robinson B, Freeman M, Marasco W. Safety and complications reporting on the re-implantation of culture-expanded mesenchymal stem cells using autologous platelet lysate technique. *Current Stem Cell Res Ther.* 2010; 5: 81-93.

Chase LG, Lakshmiathy U, Solchaga LA, Rao MS, Vemuri MC. A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1(8): 1-11.

Choi YS, Vincent LG, Lee AR, Dobke MK, Engler AJ. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* 2012; 33(8): 2482-91.

Copland IB, Garcia MA, Waller EK, Roback JD, Galipeau J. The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials.* 2013; 34: 7840-50.

Dausset J. Presence of A e B antigens in leukocytes disclosed by agglutination tests. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1954; 148(19-20): 1607-8.

Diretoria colegiada BRASIL. Resolução RDC nº 9, 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos centros de tecnologia celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 16 de março de 2011

Diretoria Colegiada BRASIL. Resolução RDC nº 306 de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de dezembro de 2004

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8 (4): 315-7.

Dromard C, Bourin P, Andre M, De Barros S, Casteilla L, Planat-Benard V. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp Cell Res.* 2011; 317(6): 770-80.

- Escobedo-Lucea C, Bellver C, Gandia C, Sanz-Garcia A, Esteban FJ, Mirabet V, Forte G, Moreno I, Lezameta M, Ayuso-Sacido A, Garcia-Verdugo JM. A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses. *PloS One*. 2013; 8(7): 1-12.
- Eslaminejad MB, Mardpour S, Ebrahimi M. Mesenchymal stem cells derived from rat epicardial versus epididymal adipose tissue. *Iran J Basic Med Sci* 2011; 14(1): 25-34.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292(9): 154-6.
- Fan J, Tan Y, Jie L, Wu X, Yu R, Zhang M. Biological activity and magnetic resonance imaging of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeled adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013; 4(2): 44-54.
- Faria CA, Kozma RH, Stessuk T, Ribeiro-Paes JT. Experimental basis and new insights for cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Stem Cell Rev Rep*. 2012; 8:1236–44.
- Fekete N, Rojewski MT, Lotfi R, Schrezenmeier H. Essential components for ex vivo proliferation of mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng*. 2013; 1-11
- Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barrios M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter*. 2012; 28(3): 200-16.
- Filho STLP, Treichel TLE, Junior JSA, Rosa MB, Dalmolin F, Brun MV, Krause A, Pippi NL. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Vet Zootec*. 2013; 20 (Edição Comemorativa): 49-59.
- Flaumenhaft R. Monitoring granule traffic in megakaryocytes. *Blood*. 2012; 120(19): 3869-70.
- Frazier TP, Gimble JM, Khetarpal I, Rowana BG. Impact of low oxygen on the secretome of human adipose-derived stromal/stem cell primary cultures. *Biochimie*. 2013; 1-11.
- Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31: 285–316.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morph*. 1966; 16: 381-90.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6: 230–47.
- Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J. The promise of human embryonic stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2004; 18(6): 843–52.
- Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 2011; 29: 749–54.

Ginani F, Soares DM, Barboza CAG. Rendimento de células mesenquimais do tecido adiposo submetidas a diferentes protocolos de extração. *Rev Bras de Ciênc da Saúde*. 2013; 17(1): 65-70.

Hanley PJ, Mei Z, Cabreira-Hansen MG, Klis M, Li W, Zhao Y, Duretti AG, Zheng X, Wang Y, Gee AP, Horwitz EM. Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. *Cytotherapy*. 2013; 15(4): 416-22.

Hemada H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2013; 0: 1-8.

Hernández AAB. Los derivados plaquetarios en medicina regenerativa. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter*. 2012; 28(4): 308-9.

Horwitz E, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. International society for cellular therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7: 393-5.

Hutton DL, Moore EM, Gimble JM, Grayson WL. Platelet-derived growth factor and spatiotemporal cues induce development of vascularized bone tissue by adipose-derived stem cells. *Tissue Eng*. 2013; 1-11.

Jarra J. Isolamento, quantificação e caracterização morfológica de células mesenquimais de sangue do cordão umbilical canino [Dissertação (Mestrado em Anatomia do animais domésticos e silvestres)]. São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo; 2008.

Jung S, Panchalingam KM, Wuerth RD, Rosenberg L, Behie LA. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. *Biotechnol Appl Bioc*. 2012; 59(2): 106-20.

Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cell*. 2007; 25: 1270-8.

Kolle ST, Oliveri RS, Glovinski PV, Kirchhoff M, Mathiasen AR, Elberg J, Stemann P, Andersen T, Drezewiecki KT, Fischer-Nielsen A. Pooled human lysate versus fetal bovine serum—Investigating the proliferation rate, chromosome stability and angiogenic potential of human adipose tissue derived stem cells intended for clinical use. *Cytotherapy*. 2013; 1-12.

Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011; 19(4): 516-27.

Leslie SK, Cohen DJ, Sedlacek J, Pinsker EJ, Boyan BD, Schwartz Z. Controlled release of rat adipose-derived stem cells from alginate microbeads. *Biomaterials*. 2013; 30: 1-13.

Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep*. 2011; 7:269-91

Longhini-Dos-Santos N, Barbosa-de-Oliveira VA, Kozma RH, Faria CA, Stessuk T, Frei F, Ribeiro-Paes JT. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. *Stem Cell Rev.* 2013; 2: 210-8.

Lorico LA, Aguenta MT, Passos-Bueno MR, Alonso N. Effects of different liposuction techniques on the isolation of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Cir Plást.* 2012; 27(4): 509-13.

Marcelino MY, Fuoco NL, Quaglio AEV, Bittencourt RAC, Garms BC, Conceição THM, Di Stasi LC, Ribeiro-Paese JT. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. *J Coloproctol.* 2014.

Maron-Gutierrez T, Araujo I, Morales MM, Garcia CSNB, Rocco PRM. Stem cell therapy in acute respiratory distress syndrome. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2009; 21(1): 51-7.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells (embryonic stem cells/inner cell masses/differentiation in vitro/embryonal carcinoma cells/growth factors). *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 78(12): 7634-8.

Meirelles LS, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth F R.* 2009; 20: 419–27.

Melton DA, Cowan C. “Stemness”: definitions, criteria, and standards. In: Lanza R (editor). *Handbook of Stem Cells.* New York: Elsevier/Academi Press; 2004. v.1, 25-31.

Metcalf KB, Mandelbaum BR, McIlwraith CW. Application of platelet-rich plasma to disorders of the knee joint. *Cartilage.* 2013; 1-18.

Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009; 76(2): 56-66.

Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* 2012; 30(5): 804-10.

Moore MA. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. *J Cell Biochem.* 2002; 38:29–38.

Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol.* 2013; 228(4): 680-7.

Morrison SJ, Weissman IL. The longterm repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity.* 1994; 1:661–73.

National Institute of Health (NHI). Stem cells: scientific progress and future research directions. Bethesda, 2001. Cap. 1-4.

Niemelä S, Miettinen S, Sarkanen JR, et al. Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering. In: Ashammakhi N, Reis R, Chiellini F, eds. *Applications. Topics in Tissue Engineering.* 2008. Disponível em: http://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/abstracts/niemela.pdf Acessado em: Ago, 2013.

Niemelä SM, Miettinen S, Konttinen Y, Waris T, Kellomäki M, Ashammakhi NA, Ylikomi T. Fat Tissue: Views on Reconstruction and Exploitation. *J Craniofac. Surg.* 2007; 18(2): 325-35.

Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988; 10: 63–76.

Patrikoski M, Juntunen M, Boucher S, Campbell A, Vemuri MC, Mannerström B, Miettinen S. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013, 4: 27-42.

Pereira LV. The importance of the use of stem cells for public health. *Ciênc Saúde Colet.* 2008; 13(1):7-14.

Piersma AH, Brockbank KG, Ploemacher RE, Van-Vliet E, Peer KMB, Visser PJ. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. *Exp Hematol.* 1985; 13: 237–43.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276(5309): 71-4.

Rada T, Reis RL, Gomes ME. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.* 2009; 15(2): 113-25.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:1–22.

Rajala K, Lindroos B, Hussein SM, Lappalainen RS, Pekkanen-Mattila M, Inzunza J, Rozell B, Miettinen S, Narkilahti S, Kerkelä E, Aalto-Setälä K, Otonkoski T, Suuronen R, Skottman H. A defined and xeno-free culture method enabling the establishment of clinical-grade human embryonic, induced pluripotent and adipose stem cells. *PLoS One*, 2010; 5(4): 1-14.

Ramirez PH, Balea ED. Medicina regenerativa. Células madre embrionarias y adultas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2004 [acesso em 2013 ago 9]; 20(3). Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892004000300001#autor

Ren G, Chen X, Dong F, Li W. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med.* 2012; 1: 51–8.

Ribeiro-Paes JT, Bilaqui A, Greco OT, Ruiz MA, Alvez-de-Moraes LBC, Faria CA, Stessuk T. Cell therapy in pulmonary diseases: are there perspectives?. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009; 31(1):140-8

Ribeiro-Paes JT, Stessuk T, Marcelino MY, Faria CA, Marinelli T, Ribeiro-Paes MJ. A protocol proposition of cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Port Pneumol.* 2014; 20(2): 84-91.

Rocha AS, Maia L, Guastali MD, Volpato R, Alvarenga FCL. Considerações sobre células-tronco embrionárias. *Vet Zootec.* 2012; 19(3): 303-13.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects off phospholipase c (clostridium perfringens alph toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem.* 1966; 24:130-9.

Santos FD, Andrade PZ, Abecasis MM, Gimble JM, Chase LG, Campbell AM, Boucher S, Vemuri MC, Silva CL, Cabral JM. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: a microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng.* 2011; 17(12): 1201-10.

Schliephake H. Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review. *CIDRR.* 2013; 1-27.

Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy*, 2013; 15: 979-85.

Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2011; 164(1):1-8.

Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdanský S, Atkinson BL. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Eng.* 2012; 18 (13-14): 1313-21.

Shih DT, Chen JC, Chen W, Kuo Y, Su C, Burnouf T. Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion.* 2011; 51:770-8.

Silva MO, Leoi LCT. Banco de sangue de cordão umbilical e placentário no Brasil. *Ensaio e C.* 2010; 14(2): 125-42.

Sipoli AL, Rebouças D, Simas G, Ferreira I, Gleide M, Silva J. A (in)constitucionalidade do uso de células-tronco originárias para fins de pesquisa e terapia. 2013; 1-12.

Smyth NA, Murawski CD, Fortier LA, Cole BJ, Kennedy JG. Platelet-rich plasma in the pathologic processes of cartilage: review of basic science evidence. *Arthroscopy.* 2013; 29(8): 1399-409.

Song K, Wang Z, Li W, Zhang C, Lim M, Liu T. In vitro culture, determination and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013; 170: 459-70.

Souza VF, Lima LMC, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco: uma breve revisão. *R Ci Méd Biol.* 2003; 2(2): 251-6.

Stein A. Decreasing variability in your cell culture. *Biotechniques.* 2007; 43(2): 228-9.

Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y. Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl.* 2013; 1-12.

Tavares RLC. Células-tronco embrionárias: o que falta para utilizá-las no tratamento clínico. *Femina.* 2011; 39(10): 467-70.

Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New Eng J Med.* 1957; 257(11): 491-6.

Thomas ED, Lochte HL, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 1959; 38: 1709-16.

Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg.* 2000; 24(7): 815– 8.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961; 14:213-22.

Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev.* 2013; 93(1): 1-21.

Vendruscolo CDP, Watanabe M.J, Maia L, Carvalho AMD, Alves ALG. Plasma rico em plaquetas: uma nova perspectiva terapêutica para medicina equina. *Vet Zootec.* 2012; 19(1): 33-43.

Vetrano M, Castorina A, Vulpiani MC, Baldini R, Pavan A, Ferretti A. Platelet-rich plasma versus focused shock waves in the treatment of jumper's knee in athletes. *Am J Sport Med.* 2013; 41(4): 795-803.

Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, Krebsbach PH. Concise review: the evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells.* 2013; 31(1): 1-7.

Williams SK, Mckenney S, Jarrell BE. Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. *Cell Transplant.* 1995; 4(3): 281-9.

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev.* 2005; 85: 635–78.

Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytherapy.* 2013; 15(8): 979-85.

Yang S, Pilgaard L, Chase LG, Boucher S, Vemuri MC, Fink T, Zachar V. Defined xenogeneic-free and hypoxic environment provides superior conditions for long-term expansion of human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng.* 2012; 18(8): 593-602.

Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(5):647-56.

Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006; 208(1): 64-76.

Yoshito D. Cultivo e Irradiação de Fibroblastos Humanos em Meio Enriquecido com Lisado de Plaquetas para a Obtenção de Camada de Sustentação em Cultura de Células da Epiderme. [Dissertação (Mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear - aplicações). São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo; 2011.

Young HE, Black JR. Adult stem cells. *Anat. Rec.* 2004; 276(A): 75-102.

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008; 26: 664–75.

Zuk PA, Zhu Y, Mizuno H, Huang J, Futrell W, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7(2):211-28.

ANEXO

Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

O(a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “Diferentes metodologias para isolamento, expansão e caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano”, sob a responsabilidade do pesquisador Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, RG nº 709035-0.

Este termo deverá ser elaborado em duas vias. Depois de lido, rubricado e assinado, uma via ficará em poder do sujeito ou de seu representante legal e a outra via em poder do pesquisador responsável.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Campus de Assis. Qualquer dúvida quanto aos aspectos éticos poderão ser esclarecidas no telefone (18) 3302-5607 ou pelo e-mail cep@assis.unesp.br, ou diretamente com o pesquisador no telefone (18) 3302-5856 ou e-mail jtrpaes@yahoo.com.br

A pesquisa será realizada com células-tronco retiradas do tecido adiposo (gordura). Será utilizado apenas uma parte do material retirado da região da barriga. O restante, conforme o procedimento que o(a) Senhor(a) conversou com seu médico, será descartado.

A gordura coletada será levada para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação das células-tronco. As células obtidas serão cultivadas por métodos diferentes e depois serão analisadas para avaliar qual metodologia utilizada é mais eficiente para o cultivo, bem como se essas células mantêm suas características após o cultivo. Estas informações são importantes para que, a partir deste estudo, seja possível ou não utilizar essas células depois de mantidas em laboratório para tratamento de algumas doenças.

O seu médico já esclareceu ao Senhor(a) os riscos e benefícios do procedimento de retirada da gordura. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos parte do material coletado pelo médico cirurgião. Se o(a) Senhor(a) concordar em doar parte da gordura retirada da barriga, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, após o procedimento cirúrgico.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas os dados necessários para esta pesquisa, tais como, faixa etária. Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas, repetindo, sua identidade será mantida em sigilo.

O(a) Senhor(a) pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento.

O(a) Senhor(a) deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com o pesquisador responsável cujo nome, telefone e endereço está abaixo colocado:

Pesquisadores responsáveis: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

Fone (18) 33025848

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100 – Assis/ SP, cep: 19806900

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa “Diferentes metodologias para isolamento, expansão e caracterização das células-tronco derivadas de tecido adiposo humano”. Fui devidamente informado(a) e esclarecido pelo pesquisador Dr. João Tadeu Ribeiro Paes sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que () concordo / () não concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

Local e data _____, ____ de _____ de _____.

Assinatura

Eu, Dr. João Tadeu Ribeiro Paes, pesquisador responsável pelo estudo, obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa.

Assinatura do Pesquisador