

MARIA JOSÉ MALAGUTTI FERREIRA

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE GENÔMICA POR MEIO DO ENSAIO COMETA
E TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS - TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.**

ASSIS

2016

MARIA JOSÉ MALAGUTTI FERREIRA

**ANÁLISE DA INTEGRIDADE GENÔMICA POR MEIO DO ENSAIO COMETA
E TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS - TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes

ASSIS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

F383a Ferreira, Maria José Malagutti
Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células - tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo / Maria José Malagutti Ferreira. Assis, 2016.
62 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista
Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Células-tronco. 2. Toxicologia genética. 3. Testes de mutagenicidade. 4. Tecido adiposo. 5. Terapia celular. I. Título.

CDD 616.02774

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA JOSE MALAGUTTI FERREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS.

Aos 17 dias do mês de março do ano de 2016, às 09:00 horas, no(a) Sala de Videoconferência 2 - Prédio I, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis, Prof. Dr. DARÍO ABEL PALMIERI do(a) Ciências Biológicas / UNESP/Assis, Profa. Dra. ALEXÉIA BARUFATTI GRISÓLIA do(a) , sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIA JOSE MALAGUTTI FERREIRA, intitulada **ANÁLISE DA INTEGRIDADE GENÔMICA POR MEIO DO ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS - TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.** Após a exposição, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: aprovado . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES


Prof. Dr. DARÍO ABEL PALMIERI


Profa. Dra. ALEXÉIA BARUFATTI GRISÓLIA

MARIA JOSE MALAGUTTI FERREIRA

ANÁLISE DA INTEGRIDADE GENÔMICA POR MEIO DO
ENSAIO COMETA E TESTE DO MICRONÚCLEO EM
CÉLULAS - TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO
TECIDO ADIPOSEO

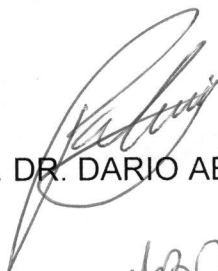
Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências e Letras – UNESP para a obtenção
do título de Mestrado Acadêmico em
Biotecnologia (Área de Conhecimento:
Caracterização e Aplicação da Diversidade
Biológica)

Data da Aprovação: 17/03/2016

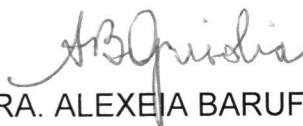
COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROF. DR. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES - UNESP/Assis



Membros: PROF. DR. DARIO ABEL PALMIERI - UNESP/Assis



PROFA. DRA. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA - UFGD/Dourados

*Dedico este trabalho à
minha família.*

*Meu esposo Uelinton,
minhas filhas: Giovanna
e Maria Eduarda. Que
sempre me apoiaram e me
ajudaram, com muito amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me sustentar nas alegrias e dificuldades e por sempre permanecer fiel.

Ao meu marido Uelinton pelo amor, apoio e incentivo.

As minhas filhas, Giovanna e Maria Eduarda pela paciência, apoio e incentivo.

A minha mãe Albertina pelo amor, esforço e dedicação.

A minha irmã Célia, pela ajuda e companherismo.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro-Paes, meu orientador, pela confiança, mesmo sem me conhecer abriu as portas do seu laboratório e pelos ensinamentos oferecidos.

A minha amiga Dra. Talita Stessuk, pelos ensinamentos, carinho, atenção e suporte para execução desse trabalho.

Ao Laboratório de Genética da Unesp Assis/SP, pela parceria no trabalho.

A Prof^a Edislaine Barreiro de Souza, pela colaboração, parceria, companherismo e pelo auxílio prestado.

A minha amiga Amanda Viel trocas de experiências e amizade.

A minha amiga Amanda da Costa Gomes, ajuda, colaboração, amizade.

A Dra Aléxia Barufatti Grisólia, da UFGD de Dourados, pelas considerações e apoio a pesquisa.

Ao meu amigo Bruno Crispim do Amaral, pela ajuda incondicional, pela atenção, paciência, dedicação.

A minha amiga Sabrina, prestativa, amorosa, dedicada.

Aos meus amigos de Laboratório GenTeCel, pela troca de experiências e ensinamentos: Allyana, Natália, Caetano, Lucas, Vanessa, Daniele, Laís, Heloísa, Gabriela, Rafael, Letícia e Franciana.

A Victória Cortez pela ajuda na execução do Teste Cometa na primeira fase.

Ao Guilherme Pires Castelo pela colaboração e dedicação.

A Eliana, pela atenção e por estar sempre disposta a colaborar.

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

A Fontana Della Gioventú Hospital Cirurgia Plástica, pela doação do material.

Ao Hemocentro- Faculdade de Medicina de Marília, especialmente a Dra Roseli Nunes da Silveira Antunes, pela colaboração e atenção, apoiando a pesquisa com suas especialidade.

Enfim, a todos os amigos, familiares e conhecidos, que de alguma forma torceram por mim, meus sinceros agradecimentos.

A ciência humana de maneira nenhuma, nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.

(Galileu Galilei)

MALAGUTTI-FERREIRA, Maria José. **Análise da integridade genômica por meio do ensaio cometa e teste do micronúcleo em células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo**. 2016. 61.f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

O tecido adiposo (TA) representa, atualmente, uma importante fonte de células-tronco mesenquimais (CTM), uma vez que pode ser obtido de forma relativamente fácil, por meio de procedimentos pouco invasivos, com baixa incidência de morbi-mortalidade e com grande disponibilidade de material para pesquisa aplicada. Para utilização das CTM derivadas do TA, em protocolos de terapia celular em pacientes humanos, emprega-se, em média, uma quantidade significativa de células, da ordem 10^7 a 10^8 células/kg do paciente. A partir de uma pequena fração de tecido adiposo autólogo ou heterólogo pode-se expandir o número de células, por meio de procedimentos de cultivo celular “*in vitro*”, a fim de se obter um número adequado de células que resulte em eficácia terapêutica. Os procedimentos de cultivo prolongado “*in vitro*”, podem, no entanto, provocar efeitos genotóxicos e mutagênicos. Neste sentido, é de extrema importância o monitoramento da análise da estabilidade genética durante as culturas de CT destinadas aos procedimentos de terapia celular em pacientes humanos. Em função destes aspectos, este trabalho teve por objetivo analisar, por meio do Ensaio Cometa (EC) e Teste de micronúcleo (MCN), a integridade genômica de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo (CT-TA), mantidas em cultura até a décima primeira passagem, avaliando os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos do cultivo celular prolongado. Os resultados mostraram que no teste EC, não houve diferença estatística entre os controles e células mantidas em cultivo por diferentes passagens. Os testes de MCN, no entanto, mostraram aumento de micronúcleos, a partir da terceira passagem de cultivo celular, com aumento significativo a partir da sétima passagem, em relação à primeira passagem. Os resultados mostram efeitos genotóxicos sobre células-tronco mantidas em cultura para expansão celular e indicam a necessidade de novas análises, a fim de se avaliar com maior segurança o emprego com células-tronco em terapia celular resultantes de culturas celulares expandidas “*in vitro*” durante diferentes passagens.

Palavras-chave: Célula-tronco, genotoxicidade, mutagenicidade, tecido adiposo, terapia celular.

MALAGUTTI-FERREIRA, Maria José. **Analysis of genomic integrity through the and micronucleus test in mesenchymal stem cells derived from adipose tissue.** 2016. 61.f Dissertation (Master em Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

The adipose tissue (AT) currently represents a major source of mesenchymal stem cells (MSC), since it can be obtained relatively easily by means of minimally invasive procedures, with low incidence of morbidity and mortality and a large availability of material for applied research. For use of MSC derived from AT in cell therapy protocols in human patients, is employed, on average, a significant amount of cells of the order 10^7 - 10^8 cells / kg patient. From a fraction of autologous adipose tissue or heterologous one can expand the number of cells through cell culture procedures "in vitro" in order to obtain an adequate number of cells resulting in therapeutic efficacy. Prolonged culture procedures "in vitro" may, however, cause genotoxic and mutagenic effects. Therefore, it is extremely important to monitor the analysis of the genetic stability during CT crops to cell therapy procedures in human patients. Based on these aspects, this study aimed to analyze, through the comet assay (AC) and micronucleus test (MCN), the genomic integrity of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (CT-AT), maintained in culture until the eleventh passage, evaluating the possible genotoxic and mutagenic effects of prolonged cell culture. The results showed that the AC test, there was no statistical difference between the control and cells maintained in culture for different passages. The MCN tests, however, showed an increase in micronuclei after the third passage of cell culture, significant increase from the seventh passage to the first passage. The results show genotoxic effects on stem cells maintained in culture for cell expansion and indicate the need for further analysis in order to assess with greater certainty employment stem cells in cell therapy resulting from expanded cell cultures "in vitro" during different passages.

Keywords: stem cell, genotoxicity, mutagenicity, adipose tissue, cell therapy.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	9
1 Células-tronco.....	9
1.1.1 Células-tronco Embrionárias.....	9
1.1.2 Células-tronco Adultas.....	10
1.1.2.1 Células-tronco Hematopoiéticas.....	11
1.1.2.2 Células-tronco Mesenquimais	11
1.1.2.3 Células-tronco oriundas do tecido adiposo.....	13
1.2 Estabilidade genética das células-tronco mesenquimais: Teste Cometa e Teste de micronúcleo	15
2 OBJETIVO	18
3 REFERÊNCIAS	19
CAPITULO ÚNICO	26
1 Introdução.....	27
2 Materiais e métodos	28
2.1 Obtenção do tecido adiposo humano.....	28
2.2 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CT-TA).....	29
2.3 Viabilidade celular.....	30
2.4 Diferenciações das células-tronco derivadas do tecido adiposo	30
2.4.1 Diferenciação adipogênica	30
2.4.2 Diferenciação condrogênica	31
2.4.3 Diferenciação osteogênica	31
2.5 Ensaio Cometa	31
2.6 Teste do Micronúcleo	32
2.7 Análises estatísticas	33
2.8 Aspectos éticos.....	33
3 Resultados	33
4 Discussão	36
5 Conclusão.....	38
6 Referência	39
ANEXO A - Normas para publicação Mutation Research	42
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	60

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Células-tronco

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas que apresentam como principais características a autorrenovação e a capacidade de dar origem à células diferenciadas (MELTON; COWAN, 2004; NIH, 2001). As células-tronco têm sido classificadas quanto ao tipo e ao potencial de diferenciação (ERIDANI, 2014). Quanto ao tipo: células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA). Quanto ao potencial de diferenciação (NIH, 2001), as células-tronco classificam-se em:

- Totipotentes: células capazes de dar origem a um organismo completo, incluindo-se os anexos embrionários.
- Pluripotentes: correspondem à massa celular interna do blastocisto, podendo, virtualmente, originar todos os tipos celulares de um organismo adulto, não formam, no entanto, os anexos embrionários.
- Multipotentes: são capazes de originar vários tipos de células de um mesmo folheto embrionário.
- Oligopotentes: originam duas ou mais linhagens de um mesmo tecido.
- Onipotentes: aquelas que originam apenas um tipo celular maduro.

1.1.1 Células-tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes, ou seja, podem originar virtualmente todos os tecidos do corpo, exceto a placenta e anexos embrionários. Correspondem à massa celular interna de embriões no estágio de blastocisto e apresentam capacidade de autorrenovação e manutenção prolongada do estado indiferenciado *in vitro*. (AMORIN et al., 2012; ARAGÃO; BEZERRA, 2012; BARBOSA et al., 2013; 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.

Em sequência aos trabalhos pioneiros, novas linhas de pesquisa e grupos de trabalhos passaram a se dedicar às pesquisas básicas e aplicadas com CTE, visando a reparação de tecidos e órgãos lesados, anomalias congênitas, desenvolvimento embrionário, estudos sobre câncer e testes de novas drogas *in vitro* (ROCHA et al., 2012).

O uso terapêutico das CTE, apesar do imenso potencial de diferenciação e avanço significativo nas pesquisas básicas, é limitado por questões de ordem técnica e restrições éticas, morais e religiosas (HAAS; WEIDNER; WINKLER, 2005; ZAGO; COVAS, 2006). As questões de ordem ética e religiosas remetem a uma discussão complexa sobre o emprego de embriões como fonte básica para obtenção de CTE.

Os aspectos éticos e religiosos, não são as únicas limitações no que se refere à utilização das CTE em terapia celular em pacientes humanos, também existem questões de ordem técnica e metodológica, que se referem basicamente ao controle dos processos de diferenciação, pois ainda não se dispõe de conhecimento técnico que permita o controle da diferenciação das CTE, que em 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 ou teratocarcinomas (ROCHA et al., 2012; TAVARES, 2011).

Neste contexto, as células-tronco adultas representam, atualmente, uma alternativa viável e potencialmente promissora em terapia celular.

1.1.2 Células-tronco adultas

As CTA são definidas como um grupo celular que apresenta o potencial de autorrenovação, bem como a capacidade de originar todos os tipos celulares especializados do tecido de origem (MERCIER; RAGU; SCADDEN, 2012; NIH, 2001). Estas células são encontradas em pequenas quantidades em diversos tecidos maduros e são ativadas para reposição tecidual decorrente de processos degenerativos e traumas, tendo, papel fundamental na manutenção da homeostasia e integridade tecidual (HORWITZ, 2003).

No contexto da medicina regenerativa, o uso de CTA vem se consolidando progressivamente, como nova alternativa terapêutica para restabelecer o funcionamento de

tecidos e órgãos lesados em diferentes patologias agudas ou degenerativas (ALVES-DE-MORAIS et al., 2013; AMORIN et al., 2012; FARIA et al., 2012; RIBEIRO-PAES et al., 2014).

As células-tronco adultas podem ser classificadas em dois grupos gerais: células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM), (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008; NIH, 2001).

1.1.2.1 Células-tronco Hematopoiéticas

As Células-tronco Hematopoiéticas (CTH) representam uma população de células do sistema hematopoiético e imunológico, multipotentes, tem grande importância na manutenção da hematopoese e no *pool* de células-tronco medulares (MERCIER; RAGU; SCADDEN, 2012; WILSON; TRUMPP, 2006).

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, *a posteriori*, no entendimento das propriedades de autorenovação e diferenciação das CTH. Seguiram-se, vários avanços no conhecimento sobre a fisiologia e imunologia do sistema hematopoiético, que culminaram na purificação e reconhecimento dos antígenos de superfície das CTH (BAUM et al., 1992), na identificação de células precursoras do sistema hematopoiético (MORRISON; WEISSMAN, 1994) e na caracterização de uma série de citocinas e fatores de crescimento (MOORE, 2002).

1.1.2.2 Células-tronco Mesenquimais

As CTM foram, pioneiramente, descritas por Friedenstein e colaboradores, a partir dos trabalhos desenvolvidos nas décadas de 60 e 70, do século passado. Os autores observaram uma população de células isoladas da medula óssea, que era aderente à superfície de cultivo, com morfologia fibroblástica, capacidade autorrenovação e diferenciação em linhagem osteogênica. Inicialmente, essas células foram denominadas como unidades formadoras de colônia de fibroblastos (*colony-forming units-fibroblast* - CFU-F) (FRIEDENSTEIN; GORSKAJA; KULAGINA, 1976; FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966). A partir das considerações iniciais de Friedenstein, despertaram o interesse de outros grupos de pesquisa e foram implementados vários estudos

com a finalidade de caracterizar e identificar o grupo de células aderentes de origem mesenquimal (OWEN, 1988; PIERSMA et al., 1985).

Ao longo dos anos, as células aderentes de origem mesenquimal identificadas por Friedenstein, receberam diferentes denominações, tais como Células-tronco ou Progenitoras Mesenquimais e Células Estromais de Medula Óssea (OWEN, 1988; PROCKOP, 1997). Em 1991, Arnold Caplan propôs a denominação Células-tronco Mesenquimais (CAPLAN, 1991). Um grupo de especialistas, durante a reunião da Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy – ISCT*), em 2005, propôs a denominação células estromais mesenquimais multipotentes (*Multipotent Mesenchymal Stromal Cells*) para se referir à população de células-tronco aderentes não hematopoiéticas, recomendando, no entanto, que se mantivesse o acrônimo CTM (HORWITZ et al., 2005).

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 grande interesse despertado pelas CTM decorre de uma série de propriedades inerentes a esse grupo de células, que incluem: a) fácil obtenção, b) alta capacidade de proliferação *in vitro*, c) fácil manipulação em laboratório, d) pouco imunogênicas, com baixa expressão de antígenos HLA-tipo I e, praticamente, ausência na expressão de HLA-tipo II. A baixa expressão de antígenos do complexo MHC, possibilitam que as CTM possam ser empregadas em transplantes autólogos e heterólogos (BARBOZA; GINANI; SOARES, 2014; CHENG et al., 2011; KAKUDO; MORIMOTO; OGAWA, 2014; KERN et al., 2006; LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2013; LV; TUAN; CHEUNG, 2014; MARCELINO et al. 2015; OLIVEIRA, 2013; WOZOWICS; WARD; ZAWISZ, 2014; ZAHER; HARKNESS; JAFARI, 2014; ZUTTON et al., 2013).

Embora a medula óssea tenha sido o primeiro órgão identificado como fonte de CTM, outros órgãos e tecidos tem sido apontados como fontes potenciais dessas células, como o cordão umbilical (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000), placenta (IGURA et al., 2004), fígado, rim e, sobretudo, o tecido adiposo (MARCELINO et al. 2015; ZUK, 2010; ZUK; ZHU; MIZUNO, 2001).

1.1.2.3 Células-tronco oriundas do tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) tem se constituído em uma importante fonte de CTM, uma vez que pode ser obtido de forma relativamente fácil, por meio de procedimentos pouco invasivos, com baixa incidência de morbi-mortalidade e com grande disponibilidade de material para pesquisas básicas e aplicação em procedimentos de terapia celular (ANDRESSO; HOEIJMARKERS; MITCHELL, 2006; WILSON; BOHR, 2007; ZUK, 2010).

Estudos conduzidos por Zuk e colaboradores (2001), comprovaram a existência de CTM no tecido adiposo, tornando-o uma fonte alternativa para esse tipo celular. Ademais, o trabalho realizado comparou o potencial de diferenciação das CTM do tecido adiposo com aquelas extraídas da medula óssea, mostrando grande semelhança entre esses tipos celulares. (FRASER et al., 2008; ZUK; ZHU; MIZUNO, 2001). Entretanto, a obtenção dessas células do tecido adiposo é mais rápida e menos invasiva que a medula óssea, causando mínimo desconforto ao paciente, além de apresentarem potencial proliferativo superior às células da medula óssea (BAPTISTA et al., 2009; GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007). A grande vantagem do tecido adiposo como fonte de CTM é a abundância do material disponível, pois as células podem ser obtidas do produto lipoaspirado de pacientes (ELABD et al., 2007; ROMANOV et al., 2005). Mais de 400 mil lipoaspirações são realizadas somente nos Estados Unidos todo ano, com índice muito baixo de complicações (FRASER et al., 2006), gerando material biológico abundante, considerado como descarte em clínicas de estética, mas que podem ser destinados à pesquisas pré-clínicas.

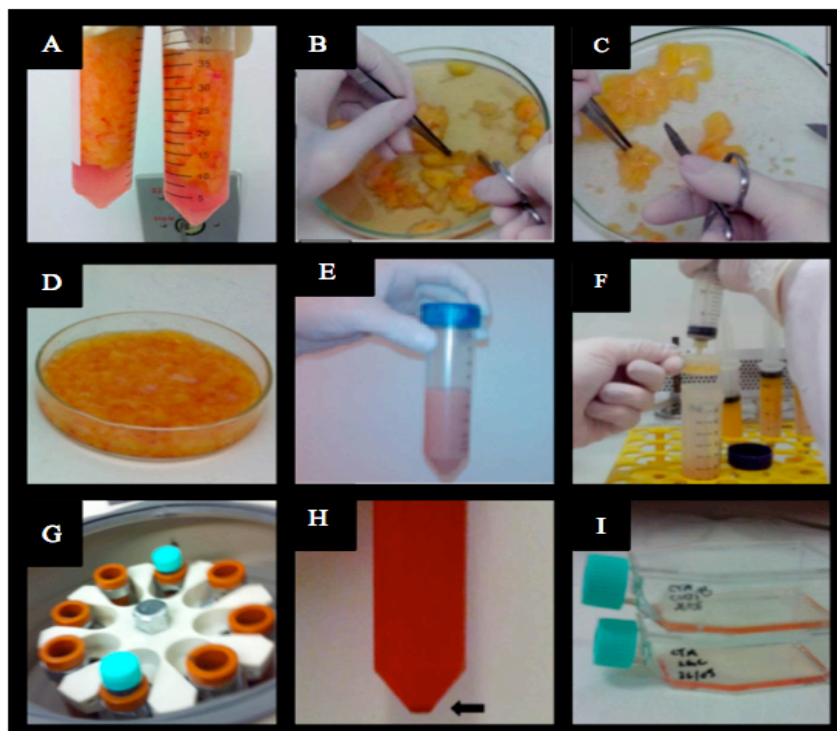
Com o propósito de otimizar a eficácia em um emprego terapêutico, uma pequena fração de células isoladas do TA pode ser utilizada, por meio de cultura *in vitro*, onde as CT-TA podem ser expandidas a fim de que se alcance um número de células adequado que possibilite a eficácia terapêutica (BAER; GEIGER, 2012; BIEBACK et al., 2012a; BIEBACK et al., 2012b; BASSI et al., 2012; ESCOBEDO-LUCIA et al., 2013; JUNG et al., 2012; YANG; KIM; KIM, 2015).

O tecido adiposo é composto com diferentes tipos celulares, em função da composição celular heterogênea do tecido adiposo são necessárias técnicas especiais de isolamento das CT-TA antes do processo de cultura e expansão (BASSI et al., 2012; BOURIN et al., 2003). No processo de cultivo, é necessária a utilização de suplementos que enriqueçam o meio de cultura, a fim de se obter proliferação celular eficaz (BERNARDI et al., 2015). Usualmente, utiliza-se 10-20% de soro fetal bovino (SBF) e (10-200 u/mL) de antibiótico-antimicótico (Penicilina, Streptomomicina e Fungizona; Gibco[®], Nova York, EUA) a

fim de evitar contaminações (BUSCHER et al., 2009). 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., 2003; LINDROOS; SUURONEN; MIETTINEN, 2011; MIZUNO, 2009; YARAK; OKAMOTO, 2010). A utilização da enzima é o aspecto mais importante do procedimento. Como anteriormente mencionado, a metodologia original e mais clássica, conforme proposto por ZUK, 2001(ZUK; ZHU; MIZUNO, 2001), emprega a enzima colagenase. 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., 2003; GINANI; SOARES; BARBOZA, 2013; LESLIE et al., 2013).

A Figura 1 ilustra, de forma geral, o procedimento para isolamento e, posterior, cultivo das CT-TA, empregando a enzima colagenase.

Figura 1. Etapas de isolamento e cultivo de CT-TA. A) Desinfecção do tecido, B) e C) fragmentação e limpeza do tecido adiposo, D) tecido fragmentado, E) tecido adiposo submetido à digestão enzimática com colagenase, F) filtração, G) centrifugação, H) formação do precipitado, I) frascos de cultura.



(Malagutti-Ferreira, 2016).

As CT-TA podem se diferenciar em múltiplas linhagens celulares de maneira reprodutível e regulável. Contudo, os procedimentos de cultura “*in vitro*” prolongados podem resultar danos ao DNA. Neste sentido, é de extrema importância o monitoramento da estabilidade genética durante as culturas de CT, destinadas aos procedimentos de terapia celular (ANDRESSO; HOEIJMARKERS; MITCHELL, 2006; WILSON; BOHR, 2007).

A instabilidade genética e cromossômica representam avaliações importantes em se tratando de futuras aplicações terapêuticas baseadas em linhagens de células-tronco, após sucessivas passagens (MITALIPOVA, 2005). Portanto, as células devem ser avaliadas por meio de técnicas citogenéticas para que os métodos de cultivo e propagação sejam otimizados para cada linhagem celular, de modo a eliminar a possibilidade de utilização de células portadoras de alterações cromossômicas. A identificação de anormalidades cromossômicas em células-tronco com potencial emprego terapêutico é de fundamental importância, uma vez que, *in vivo*, os danos cromossômicos poderiam resultar em diferentes processos patológicos e carcinogênese (CATALINA, 2007).

1.2 Estabilidade genética das células-tronco mesenquimais: Teste Cometa e Teste de micronúcleo

Um dos aspectos mais importantes relacionados a cultura de células-tronco, consiste na manutenção da integridade e estabilidade genômica durante o processo de cultivo e expansão celular (LAMBERT et al., 2011). De maneira geral, células eucarióticas costumam sofrer efeitos genotóxicos provocados por agentes endógenos e exógenos e, conseqüentemente, alterações no material genético. Sendo o sistema de reparo do material genético passível de erros, são imprescindíveis ferramentas que garantam e tenham como propósito o controle de qualidade em cultivos de células *in vitro* com o propósito terapêutico. (PETERSON; COTE, 2014; WILSON; BOHR, 2007).

A cultura de células é uma técnica de grande aplicação em medicina regenerativa, e corresponde a uma valiosa ferramenta para estudos básicos em diferentes áreas da biologia, tais como processos de metabolismo, diferenciação, desenvolvimento, síntese e regulação. Tecnicamente a cultura de células consiste na manutenção e expansão celular *in vitro* com a indução ou não da diferenciação celular, a adição de fatores de crescimento e outros agentes indutores (LUISI et al., 2004).

As técnicas de cultivo celular representam o arcabouço para a engenharia tecidual e medicina regenerativa. O emprego das células cultivadas em terapia celular deve, no entanto,

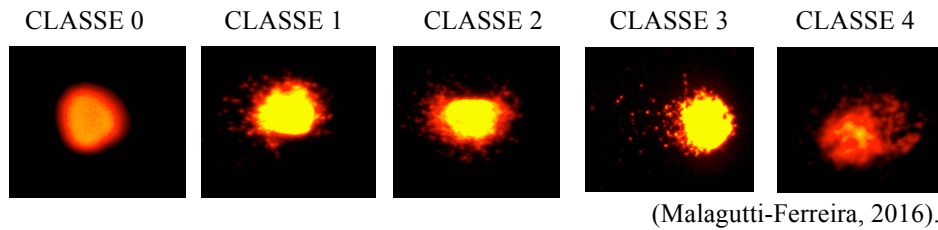
segue protocolos rígidos quanto aos atributos de qualidade e segurança das células mantidas *in vitro* (CASAGRANDE et al., 2011; MITRANO et al., 2010). As culturas celulares mantidas por longos períodos, ou seja, aquelas submetidas a grande número de passagens *in vitro*, estão sujeitas a um maior risco de sofrer efeitos deletérios, tais como efeitos genotóxicos e mutações. Neste sentido, é necessário minimizar, tanto quanto possível, o tempo de proliferação, sobretudo quando as células mantidas em cultura destinam-se a procedimentos de terapia celular em animais e pacientes humanos (MAITRA et al., 2005).

Considerando que, para aplicação clínica das CT-TA, com efeito terapêutico satisfatório, deve-se atingir um número significativo de células, que segundo diferentes autores varia de 10^7 a 10^8 células por quilo de peso do paciente (RIBEIRO-PAES et al., 2014), faz-se necessário um controle rigoroso da qualidade e análise citogenética das células-tronco mantidas em cultura (ZHANG et al., 2006).

A técnica “Ensaio do Cometa” (EC) ou “eletroforese em gel de célula única”, (*Single Cell Gel Electrophoresis* - SCGE), proposta por Östling e Johanson, em 1984, permite detectar quebras na dupla fita de DNA, produzidas por alterações genéticas nas células, por meio de uma técnica de eletroforese em gel sob condições neutras. Posteriormente, a técnica foi modificada por SINGH et al., (1988), para uma técnica sob condições alcalinas e mais eficiente. Tem se destacado como uma técnica padrão para avaliar os danos e a reparação no DNA, devido a sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos desses danos, a sua aplicabilidade em vários tecidos e/ou tipos de células e a exigência de apenas um pequeno número de células por amostra, torna seu desempenho fácil e rápido (FAUST et al., 2004; TICE et al., 2000).

O EC consiste basicamente em fazer passar uma corrente elétrica pelas células, proporcionando a migração dos fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. A extensão da migração dos fragmentos de DNA depende diretamente de danos presentes nas células, desta forma, após a eletroforese, as células que apresentarem núcleo intacto com membrana bem delimitada, são consideradas sem danos, já as células identificadas visualmente com “cauda”, formadas pelos fragmentos de DNA, são consideradas células com danos detectáveis e serão classificadas quanto ao tamanho da cauda, conforme Figura 2 (BETTI; LOPRIENO; BARALE, 1994).

Figura 2. Classificação de danos ao DNA (efeito genotóxico) detectados por meio do Ensaio Cometa.



Considerado uma ferramenta básica, o EC é eficiente para avaliações em diversas áreas de pesquisa, como genética toxicológica, efeitos biológicos das radiações, processos de reparo de DNA, ecotoxicologia genética e biomonitoramento ambiental (GONTIJO; TICE, 2003). Tem se destacado como uma técnica padrão para avaliar os danos e a reparação no DNA, devido a sua sensibilidade para a detecção de níveis baixos desses danos, a sua aplicabilidade em vários tecidos e/ou tipos de células e a exigência de apenas um pequeno número de células por amostra, torna seu desempenho fácil e rápido (FAUST et al., 2004; TICE et al., 2000).

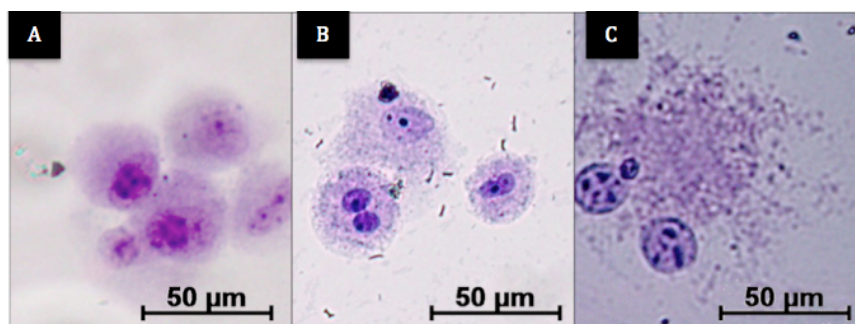
Uma importante aplicação do EC está relacionado à pesquisa do envelhecimento celular (PASSOS; ZGLINICKI, 2006), instabilidade genômica (BURHANS; WEINBERGER, 2007) e apoptose (HINKAL, 2009; ZHENG; CHIANG; LIN, 2005). As CTM estão suscetíveis a alterações associadas a senescência quando expandidas *in vitro* (BONAB et al., 2006; FEHRER; LEPPERDINGER, 2005; SCHALLMOSER; BARTMANN; WAGNER, 2016; WAGNER; HORN; CASTOLDI, 2008), sendo que essas alterações incluem o decréscimo do potencial de proliferação, a acumulação de SA- β -gal (b-galactosidase associada à senescência), encurtamento dos telômeros, danos no DNA e contínuas mudanças na expressão gênica (BONAB et al., 2006; FEHRER; LEPPERDINGER, 2005; GALDERISI et al., 2009; SCHALLMOSER; BARTMANN; WAGNER, 2016; WAGNER; HORN; CASTOLDI, 2008).

A instabilidade cromossômica, caracterizada como uma anormalidade genética, pode, também, ser evidenciada por estudos citogenéticos, como exemplo, a análise de micronúcleo (MCN) (DUESBERG et al., 1998). Estas estruturas são formadas a partir de fragmentos cromossômicos e/ou cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular, resultando na formação de estruturas denominadas micronúcleos (HOLLAND et al., 2008; MEIRELES; CERQUEIRA, 2011).

O MCN foi desenvolvido por Boller e Schmid, em 1970, e possibilita a realização de análises de danos causados por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam introduzir a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos), determinando alterações mutagênicas nos cromossomos e danos ao fuso mitótico, induzindo a formação de micronúcleos (SILVA et al., 2011).

Os MCN constituem pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal. São formados durante a telófase da mitose ou meiose quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas (Figura 3). São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (RIBEIRO; SALVATORI; MARQUES, 2003).

Figura 3. Classificação dos micronúcleos, (efeito mutagênico) detectados por meio do Teste de Micronúcleo. A) célula mononucleada; B) célula binucleada; C) célula binucleada com micronúcleo.



(Malagutti-Ferreira, 2016)

A frequência de MCN nas células aumenta em tecidos expostos aos carcinogêneos, antes que qualquer sintoma clínico se manifeste. Portanto, o teste de MCN é um biomarcador ocupacional em células expostas a agentes químicos genotóxicos, além de possível indicador de sinais carcinogênicos precoces (SINGARAJU et al., 2012).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar a integridade genômica de células-tronco obtidas de tecido adiposo e mantidas em cultivo celular prolongado.

2.2 Objetivos Específicos

Padronizar o cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano por meio da técnica de digestão enzimática.

Padronizar os testes de micronúcleo e ensaio do cometa em células-tronco mesenquimais.

Analisar o número de micronúcleos ao longo das passagens.

Utilizar o ensaio cometa para avaliar o potencial mutagênico das células-tronco mesenquimais ao longo das passagens.

Realizar o teste de viabilidade celular.

Analisar a capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica.

3 Referências bibliográficas

ALVES-DE-MORAES, L. B.; RIBEIRO-PAES, J. T.; LONGO, B. M.; FERRAZOLI, E. G.; ANDRADE T. G. Effect of the bone marrow cell transplantation on elevated plus-maze performance in effect of the bone marrow cell transplantation. **Behav Brain Res.** v. 248, p. 32– 40, 2013.

ANDRESSO, J. O.; HOEIJMARKERS, J. H.; MITCHELL, J. R. Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. **Cell Cycle.** v. 5, p. 2886 - 2888, 2006.

AMORIN, B.; VALIM, VS.; LEMOS, NE.; JÚNIOR, LM.; SILVA, AMP. Mesenchymal stem cells – characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. **Revista HCPA.** 32(1): 71 - 81, 2012.

ARAGÃO, MAC.; BEZERRA, FTG. Brazil and stem cell research: an overview. **Revista de Biologia.** v. 9, n. 1, p. 12 - 5, 2012.

BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells Int.** v. 1, p. 11, 2012.

BARBOSA, AS.; CARVALHO, PAL.; FERREIRA, LN.; BOERY, RNSO.; SENA, ELS. Implicações bioéticas na pesquisa com células-tronco embrionárias. **Acta Bioethica.** v. 19, n. 1, p. 87 - 95, 2013.

BARBOZA, C. A. G.; GINANI, F.; SOARES, D. M. Laser de baixa intensidade induz à proliferação *in vitro* de células-tronco mesenquimais. **Einstein.** v. 12, n. 1, p. 75-81, 2014.

BAPTISTA, L.; DA SILVA, K.; DA PEDROSA, C.; CLAUDIO-DA-SILVA, C.; CARNEIRO, J.; ANICETO, M.; BOROJEVIC, R. "Adipose tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in blood vessel content and resident mesenchymal stem cell population". **Obesity Surgery**, 19, 1304-1312, 2009.

- BASSI, G.; PACELLI, L.; CARUSONE, R.; ZANONCELLO, J.; KRAMPERA, M. Adipose-derived stromal cells (CT-TAs). **Transfus Apher Sci.** 47: 193 - 8, 2012.
- BAUM, B.J.; ALEVIZOS, I.; ZHENG, C.; COTRIM, A. P.; LIU, S.; MCCULLAGH, L.; GOLDSMITH, C. M.; BURBELO, P. D.; CITRIN, D. E.; MITCHELL, J. B.; NOTTINGHAM, L. K.; RUDY, S. F.; VAN WAES, C.; WHATLEY, M. A.; BRAHIM, J. S.; CHIORINI, J. A.; DANIELIDES, S.; TURNER, R. J.; PATRONAS, N. J.; CHEN, C. C.; NIKOLOV, N. P.; IIIEI, G. G. Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. **Proceedings of the National Academy of Sciences Washington**, v. 109, p. 19403-19407, 2012.
- BAUM, C. M.; WEISSMAN, I. L.; TSUKAMOTO, A. S, BUCKLE, A. M.; PEULT, B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. **Proc Natl Acad Sci.** v. 89, p. 2804-8, 1992.
- BERNARDI, M.; ALBIERO, E.; ALGHISI, A.; CHIEREGATO, 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.** v. 15, p. 920-9, 2015.
- BETTI C.; LOPRIENO, T. D. L. G.; BARALE R. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. **Mutat. Res.** v. 307, p. 323-333, 1994.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell.** v. 2, p. 313 - 9, 2008.
- 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.** v.14, n. 5, p. 570-83.A, 2012.
- BIEBACK, K.; WUCHTER, P.; BESSER, D.; FRANKE, W.; BECKER, M.; OTT, M.; PACHER, M.; STAMM, C.; KLÜTER, H.; MÜLLER, AM.; HO, AD. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. **J Mol Med.** v. 90, p. 773-82. B, 2012.
- BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemical mutagenesis in mammals. **Human genetik.** v. 11, n. 1, p. 35-54, 1970.
- BONAB, M. M.; KAMRAN, A.; FATEMEH, T.; SYED, H. G.; ARDESHIR, G.; BEHROUZ, N. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology.** v. 20067, p.14, 2006.
- BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.** 18(6): 827-42, 2004.

BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A. J.; MARCH, K. L.; REDL, H.; RUBIN, J. P.; YOSHINURA, K.; GIMBLE, J. M. 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**. v. 15, p. 641-8, 2003.

BURHANS, W. C.; WEINBERGER, M. Yeast Endonuclease G: Complex Matters of Death, and of Life. **Molecular Cell**. DOI 10.1016/j. mol cel.01.030, 2007.

BUSCHER, D.; DELGADO, M.; GONZALEZ-REY, E. **Uses of mesenchymal stem cells**. U.S. Patent Application 13/057, 467, 3 ago. 2009.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res**. v. 9, n. 5, p. 641 - 50, 1991.

CASAGRANDE, L.; CORDEIRO, M. M.; NOR, S. A.; NOR, J. E. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. **Odontology**, [S.l.], v. 99, p.1-7, Jan. 2011.

CATALINA, P. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: A concise review. **Cell Biology International**. v. 31, n. 9, p. 861-869, 2007.

CHENG, M.; CHEN, P.; LAN, C.; SUN, Y. Structure, Mechanical Properties and Degradation Behaviors of the Electrospun Fibrous Blends of PHBHHx/ **PLGA**. **Polymer**. v. 52, p. 1391-1401, 2011.

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**. n. 4, p. 315 - 7, 2006.

DUESBERG, P.; RAUSCH, C.; RASNICK, D.; HEHLMANN, R. Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. v. 95, p. 13692 - 13697, 1998.

ELABD, C.; CHIELLINI, C.; MASSOUDI, A.; COCHET, O.; ZARAGOSI, L. E.; TROJANI, C.; MICHIELS, J. F.; WEISS, P.; CARLE, G.; ROCHET, N.; DECHESNE, C. A.; AILHAUD, G.; DANIEL, C.; AMRI, E. Z. Human adipose tissue- derived multipotent stem cell differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 361. p. 342-348, 2007.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **Br J Haematol**. n. 109, n. 1, p. 235-42, 2000.

ERIDANI S. Types of Human Stem Cells and Their Therapeutic Applications. **Scientific Research**. Stem cell Discovery, 4, 13-26, 2014.

ESCOBEDO-LUCEA, C.; BELLVER, C.; GANDIA, C.; SANZ-GARCIA, A.; ESTEBAN, F. J.; MIRABET, V.; FORTE, G.; MORENO, I.; LEZAMETA, M.; AYUSO-SACIDO, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M. A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses. **PloS One**. v. 8, n. 7, p. 1 - 12, 2013.

EVANS, MJ.; KAUFMAN, MH. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos. **Nature**. 292(9): 154-6, 1981.

FAUST, F.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; BOEDECKER, RH. Mann M. Mersch-Sundermann V The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. **Mutat Res**. 566:209-29, 2004.

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**. v. 8, p. 1236-44, 2012.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal Stem Cell Aging. **Experimental Gerontology**. v. 40, p. 926-930, 2005.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, M. H. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnol**. v. 24, p. 150-4, 2006.

FRASER, J. K.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO Z. Adipose-derived stem cells. **Methods Mol Biol**. v. 449, p. 59-67, 2008.

FRIEDENSTEIN, AJ.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.; PETRAKOVA, KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J Embryol Exp Morph**. v. 16, p. 381 - 90, 1966.

FRIEDENSTEIN, AJ.; GORSKAJA, JF.; KULAGINA, NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**. v. 4, n. 5, p. 267-74, 1976.

GALDERISI, U.; HELMBOLD, H.; SQUILLARO, T.; ALESSIO, N.; KOMM, N.; KHADANG, B.; CIPOLLARO, M.; BOHN, W.; GIORDANO, A. In vitro senescence of rat mesenchymal stem cells is accompanied by down regulation of stemness regulated and DNA damage repair genes. **Stem Cells Dev**. v. 18, n. 7, p.1033-1042, 2009.

GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J.; BUNNELL, B. A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ Res**. v. 100, p. 1249-1260, 2007.

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**. v. 17, n. 1, p. 65-70, 2013.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. p.173-200, 2003.

HASS, S.; WEIDNER, N.; WINKLER, J. Adult stem cell therapy in stroke. **Curr Opin Neurol**. v. 18, p. 59-64, 2005.

HINKAL, G. W. Altered senescence, apoptosis and DNA damage response in a mutant P53 model of accelerated aging. **Mech Ageing Dev.** v. 130, n. 4, p. 262-271, 2009.

HOLLAND, N., BOLOGNESI, C., KIRSCH-VOLDERS, M., BONASSI, S., ZEIGER, E., KNASMUELLER, S., FENECH, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mut Res.** v. 659, p. 93-108, 2008.

HORWITZ, EM. Stem cell plasticity: a new image of de the bone marrow stem cell. **Curr Opin Pediatr.** v. 15, n. 1, p. 32-7, 2003.

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.** v. 7, p. 393 - 5, 2005.

IGURA, K.; ZHANG, X.; TAKAHASHI, K.; MITSURU, A.; YAMAGUCHI, S.; TAKASHI, T. A. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. **Cytotherapy.** v. 6, n. 6, p. 543-553, 2004.

JUNG, S.; PANCHALINGAM, K.M.; WUERTH, R. D.; ROSENBERG, L.; BEHIE, L. A. Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. **Biotechnol Appl Bioc.** v. 59, n. 2, p. 106 - 120, 2012.

KAKUDO, N.; MORIMOTO, N.; OGAWA, T. Potential of adipose-derived stem cells for Regeneration medicine: clinical application and usefulness of fat grafting. **Stem Cell Res Ther.** v. 4, p. 5, 2014.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells.** v. 24, p. 1294-301, 2006.

LAMBERT, A. P. F.; MOURA, D.; ZANDONAI, A. F.; LEMOS, M. A.; LUBIANCA, J.; VIEZZER, C.; SILVA, J. A. S.; BONATTO, D.; MACHADO, D. C.; HENRIQUES, J. A. P. The role of damage and repair proteins in adipose-derived adult stem cell differentiation in neural-like cells. **J Tissue Sci Eng.** v. 2, p. 4, 2011.

LESLIE, SK.; COHEN, DJ.; SEDLACZEK, J.; PINSKER, EJ.; BOYAN, BD.; SCHWARTZ, Z. Controlled release of rat adipose-derived stem cells from alginate microbeads. **Biomaterials.** v. 30, p. 1-13. 2013.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Rev Rep.** v. 7, p. 269-91, 2011.

LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, P. R.; Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. **ANZ J Surg.** v. 79, p. 235-244, 2009.

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.** v. 2, p. 210-8, 2013.

LUIZI, S. B.; BARBACHAN, J. J. D.; CHIES, J. A. B.; SANT'ANA FILHO, M. A cultura de células como ferramenta para estudos de comportamento da polpa. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 45, n. 1, p.3-8, jul. 2004.

LV, F. J.; TUAN, R. S.; CHEUNG, K. M. C. Concise Review: The surface markers and Identity of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells.** v. 32, p. 1408-19, 2014.

MAITRA, A.; ARKING, D. E.; SHIVAPURKAR, N.; IKEDA, M.; STASTNY, V.; KASSAUER, K. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells in defined conditions. **Nat. Genet.** 37: 1099-1103, 2005.

MARCELINO, M. Y.; FUOCO, N. L.; QUAGLIO, A. E. V.; BITTENCOURT, R. A. C.; GARMS, B. C.; CONCEIÇÃO, T. H. M.; DI STASI, L. C.; RIBEIRO-PAES, J. T. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. **J Coloproctol.** 2015.

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.** 78(12): 7634-8, 1981.

MEIRELES, J. R. C.; CERQUEIRA, E. M. M.; Use of the Micronucleus Test on Tradescantia (Trad-MCN) to Evaluate the Genotoxic Effects of Air Pollution, **Air Pollution.** 2011. – New Developments. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/air-pollution-new-developments/use-of-the-micronucleus-test-ontradescantia-trad-mcn-to-evaluate-the-genotoxic-effects-of-air-pollu>. Acesso em 06 de Março de 2014.

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

MERCIER, FE.; RAGU, C.; SCADDEN, DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. **Nat Rev Immunol.** v. 12, n. 1, p.49-60, 2012.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **J. Nippon Med Sch.** v. 76, n. 2, p. 56-66, 2009.

MITALIPOVA, M. M. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.** v. 23, n.1, p. 19-20, 2005.

MITRANO, T.I.; GROB, M.S.; CARRION, F.; NOVA- LAMPERTI, E.; LUZ, P.A.; FIERRO, F.S.; QUINTERO, A.; CHAPARRO, A.; SANZ, A. Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. **Journal of Periodontology**, [S.l.], v. 81, n. 6, p.917-925, jun. 2010.

MOORE, M. A. Cytokine and chemokine networks influencing stem cell proliferation, differentiation, and marrow homing. **J Cell Biochem.** v. 38, p. 29–38, 2002.

MORRISON, S. J, WEISSMAN IL. The long term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**. v. 1, p. 661–73, 1994.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Stem cells: **scientific progress and future research directions**. Bethesda, cap. 1 - 4, 2001.

OKAMOTO, K. O.; SAMIRA, Y. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 5, p. 647-56, 2010.

OLIVEIRA, V. A. B. Emprego de células mononucleares da medula óssea em terapia experimental do enfisema pulmonar. Dissertação – Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2013.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells. **J Cell Sci Suppl**. v. 10, p. 63 - 76, 1988.

PASSOS, J. F.; ZGLINICKI, T. Oxigen free radical in cell senescence: are they signal transducers? **Free radical research**. v. 40, n. 12, p. 1277-83, 2006.

PETERSON, C. L.; AND COTE, J. Cellular machineries for chromossomal DNA repair. **Genes Dev**. v. 18, p. 602-616, 2014.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**. v. n. 276, p. 71-4, 1997.

PIERSMA, A. H.; BROCKBANK, K. G.; PLOEMACHER, R. E.; VAN-VLIET, E.; PEER, K. M. B.; VISSER, P. J. Characterization of fibroblastic stromal cells from murine bone marrow. **Exp Hematol**. 13: 237–43, 1985.

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**. v. 20, n. 2, p. 84-91, 2014.

RIBEIRO, V. L.; SALVATORI, M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003.

ROCHA, AS.; MAIA, L.; GUASTALI, MD.; VOLPATO, R.; ALVARENGA, FCL. Considerações sobre células-tronco embrionárias. **Vet Zootec**. v. 19, n. 3, p. 303-13, 2012.

ROMANOV, Y. A.; DAREVSKAYA, A. N.; MERZLIKINA, N. V.; BURAVKOVA, L. B. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. **Bull Exp Biol Med**. v. 140, p. 138-43, 2005.

SCHALLMOSER, K.; BARTMANN, C.; WAGNER, W. “Replicative Senescence-Associated Gene Expression Changes in Mesenchymal Stromal Cells Are Similar under Different Culture Conditions.” **Haematologica**. v. 95.6 (2010), p. 867–874. PMC. Web. 16 Feb. 2016.

SILVA, F. C.; BARROS, M. A. B.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N.; OLIVEIRA, M. S.; MENEGUETTI, D. U. O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**. v. 2, n. 1, p. 13 - 22, 2011.

SINGARAJU, M.; SINGARAJU, S.; PARWANI, R.; WANJARI, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: A micronucleus study. **J Cytol**. v. 29, n. 1, p. 1-5, 2012.

SINGH, N.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. **Experimental Cell**. 175: 184 - 191, 1988.

SHI, Y.; NIEDZINSKI, J. R.; SAMANIEGO, A.; BOGDANSKY, S.; ATKINSON, B. L. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration. *Tissue Eng*. v.18, n.13-14, p. 1313-21, 2012.

TAVARES, R. L. C. Células-tronco embrionárias: o que falta para utilizá-las no tratamento clínico. **Femina**. v. 39, n. 10, p. 467-70, 2011.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 35, p. 206 - 221, 2000.

TILL, J. E.; McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res**. v. 14, p. 213-22, 1961.

ZAGO, MA.; COVAS, DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina. São Paulo: **Ed. Atheneu**; 2006.

ZAHER, W.; HARKNESS, L.; JAFARI, A. An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. **Arch Toxicol**. v. 88, p. 1069-82, 2014.

ZUK, P. A. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. **Molecular Biology of the Cell** Vol. 21, 1783–1787, June 1, 2010.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**. v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ZUTTON, M. S. S. R.; WENCESLAU, C. V.; LEMOS, P. A.; TAKIMURA, C.; KERKIS, I. Adipose Tissue-Derived Stem Cells and Importance of Animal Model Standardization for Pre-Clinical Trials **Rev Bras Cardiol Invasiva**. v. 21, n. 3, p. 281-7, 2013.

ZHANG, J.; CHEN, S.; LIU, Z.; TIAN, N.; YEI, F.; DUAN, B.; ZHU, Z.; LIN, S.; KWAN, T. W. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. **J Invasive Cardiol**. 18: 552–556, 2006.

ZHENG, P. W.; CHIANG, L. C.; LIN, C. C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sciences**. v. 76, p. 1367- 1379, 2005.

WAGNER, W.; HORN, P.; CASTOLDI, M. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. Zwaka T, ed. **PLoS ONE**. v. 3, n. 5, p. 2213, 2008.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow hematopoietic stem-cell niches. **Nat Rev Immunol**. n. 2, p. 93 - 106, 2006.

WILSON, D. M.; BOHR, V. A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. **DNA Repair (Amst)**. n. 6, p. 544 - 559, 2007.

WOZOWICS, S. B.; WARD, S. M.; ZAWISZ, A. An improved protocol for adipose tissue derived stem cell isolation: implications for treatments of bone disorders. **European Journal of Medical Technologies**. v. 1, n. 2, p. 6-21, 2014.

YANG, H. J.; KIM, K. J.; KIM, M. K. The Stem Cell Potential and Multipotency of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Vary by Cell Donor and Are Different from Those of Other Types of Stem Cells. **Cells Tissues Organs**. v. 199, p. 5 - 6, 2015.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. v. 85, n. 5, p. 647 - 56, 2010.

Capítulo Único

Mutation Research

Análise da integridade genômica em células- tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano.

Maria José MALAGUTTI-FERREIRA^a, João Tadeu RIBEIRO-PAES^a

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Departamento de Ciências Biológicas - Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CT-TA) são uma fonte promissora em aplicações terapêuticas, com grande potencial no reparo e regeneração de órgãos e tecidos lesados em seres humanos. Para obter uma quantidade adequada de células, em abordagens clínicas, é necessário proliferação celular *ex vivo*. Desta forma, é imprescindível estabelecer critérios rigorosos de análise de genotoxicidade e mutagenicidade, a fim de manter a estabilidade genética de células tronco mesenquimais (CTM) cultivadas *in vitro*. Este trabalho teve por objetivo analisar, por meio do Ensaio Cometa (EC) e Teste de micronúcleo (MCN), a integridade genômica de CT-TA mantidas em cultura até a décima primeira passagem, buscando avaliar o possível efeito genotóxico e mutagênico sobre cultivo celular prolongado. Para isso, foi realizado EC e MCN em CT-TA provenientes de oito pacientes, nas passagens 1, 3, 5, 7, 9, e 11^a. Os resultados mostraram que no EC, não houve diferença estatística entre os controles em células mantidas em cultivo por diferentes passagens. Os testes de MCN, no entanto, mostraram aumento de micronúcleos, efeitos mutagênicos, a partir da terceira passagem de cultivo celular, com aumento significativo a partir da sétima passagem, em relação à primeira passagem. Os resultados mostram efeitos genotóxicos e mutagênicos sobre células-tronco mantidas em cultura para proliferação celular e indicam a necessidade de estudos adicionais, bem como diferentes abordagens de análise, a fim de se avaliar com maior segurança o emprego, de terapia celular com células-tronco resultantes de culturas celulares “*in vitro*” provenientes de diferentes passagens.

Palavras-chave: células-tronco, tecido adiposo, genotoxicidade, mutagenicidade, terapia celular.

1. Introdução

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas que apresentam como principais características a autorrenovação e a capacidade de dar origem à células diferenciadas [1, 2]. As células-tronco têm sido classificadas em dois grupos gerais: células-tronco embrionárias (CTE) e células-tronco adultas (CTA) [3, 4, 5, 6, 7].

O emprego de células-tronco adultas (CTA), em especial as células-tronco mesenquimais (CTM), vem se consolidando progressivamente como uma abordagem terapêutica promissora para regeneração morfológica e funcional de tecidos e órgãos acometidos por diferentes patologias [7, 8, 9, 10, 11].

Embora a medula óssea tenha sido o primeiro órgão identificado como fonte de CTM outros órgãos e tecidos tem sido apontados como fontes potenciais dessas células, em especial o tecido adiposo (TA). Várias características fazem do tecido adiposo uma fonte atraente para isolamento de células-tronco adultas. Vale citar: obtenção relativamente fácil, procedimentos poucos evasivos, baixa incidência de morbi-mortalidade e grande disponibilidade de material para pesquisas básicas em modelos animais e aplicação terapêutica em pacientes humanos [12, 13, 14].

Para se obter uma quantidade adequada de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo (CT-TA), com finalidade de aplicações terapêuticas, é necessário a expansão celular *ex vivo* [15,16,17]. Com o propósito de otimizar a eficácia em emprego terapêutico, uma pequena quantidade de (10 a 20 g) tecido adiposo pode ser processada e, por meio de técnicas de cultivo celular *in vitro*, é possível expandir o número de células, até que se alcance uma quantidade de células suficiente, a fim de se obter um número mínimo adequado que resulte, teoricamente, em eficácia terapêutica. A cultura e expansão celular *in vitro*, podem resultar em danos ao DNA [18, 19]. Desta forma, a expansão e cultura a longo prazo tornam imprescindível o controle de qualidade das células e análise de genotoxicidade e mutagenicidade, a fim de avaliar a estabilidade genética de CTM cultivadas *in vitro* para que se possa conferir segurança aos procedimentos de terapia celular [20, 21, 22].

Há um grande número de estudos, em diferentes tipos de células humanas, animais e vegetais, correlacionando de forma muito consistente os efeitos clastogênicos e aneugênicos decorrentes e inerentes às condições de cultivo celular *in vitro* [23, 24, 25, 26]. Há, no entanto, escassez de pesquisas referentes aos possíveis efeitos genotóxicos sobre as CTM mantidas em cultura e expansão celular por períodos prolongados [22, 23, 27, 28, 29, 30].

Esses trabalhos se referem basicamente aos processo de senescência e alterações

teloméricas. As alterações incluem o decréscimo do potencial de proliferação, a acumulação de SA- β -gal (β -galactosidase associada à senescência, encurtamento dos telômeros, danos ao DNA e contínuas mudanças na expressão gênica [27, 28, 29, 30, 31, 32]. De maneira geral, células eucarióticas costumam sofrer efeitos genotóxicos provocados por agentes endógenos e exógenos e, conseqüentemente, alterações no material genético [33]. Entretanto, as células devem ser avaliadas por meio de técnicas citogenéticas para que os métodos de cultivo e propagação sejam otimizados para cada linhagem celular, de modo a eliminar a possibilidade de utilização de células portadoras de alterações cromossômicas. A identificação de anormalidades cromossômicas em células-tronco com potencial emprego terapêutico é de fundamental importância, uma vez que, *in vivo*, os danos cromossômicos poderiam resultar em diferentes processos patológicos e carcinogênese [34]. Portanto, um dos aspectos mais importantes relacionados à cultura de células-tronco, que tenham por finalidade o emprego em procedimentos de terapia celular, consiste na manutenção da integridade e estabilidade genômica durante o processo de cultivo e expansão celular [29, 30].

Para se obter uma quantidade adequada de CT-TA, em abordagens clínicas, faz-se necessário a expansão celular *ex vivo* [34], a fim de se obter um número mínimo adequado (em torno de 10^7 a 10^8 células por paciente), que resulte, teoricamente, em eficácia terapêutica. A cultura e expansão celular *in vitro*, podem resultar em danos ao DNA [18, 19]. Desta forma, a expansão e cultura a longo prazo tornam imprescindível o controle de qualidade das células e análise de genotoxicidade e mutagenicidade, a fim de avaliar a estabilidade genética de CTM cultivadas *in vitro* para que se possa conferir segurança aos procedimentos de terapia celular.

Em função destes aspectos, este trabalho teve como objetivo analisar a integridade genômica de CT-TA mantidas em cultura até a décima primeira passagem, buscando avaliar o possível efeito genotóxico e mutagênico sobre o cultivo celular prolongado.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção do tecido adiposo humano

O tecido adiposo humano foi obtido de oito indivíduos (n=8) em bom estado geral de saúde, do sexo feminino, com idade entre 35 a 48 anos, conforme Tabela 1. O material biológico foi proveniente de dermolipectomia abdominal, sendo considerado como material de descarte. O material foi cedido pela Clínica Fontana Della Gioventú Hospital de Cirurgia Plástica, (Assis, São Paulo, Brasil), que está devidamente autorizado para realização do

procedimento. O material biológico foi acondicionado em frasco estéril e imediatamente transportado a temperatura ambiente para o Laboratório de Genética e Terapia Celular da Unesp – Campus Assis, para procedimento.

Tabela 1. Pacientes submetidos à dermolipectomia abdominal quanto ao gênero e idade.

Paciente	Gênero	Idade
1	Feminino	35 anos
2	Feminino	42 anos
3	Feminino	46 anos
4	Feminino	36 anos
5	Feminino	40 anos
6	Feminino	44 anos
7	Feminino	46 anos
8	Feminino	48 anos

2.2 Isolamento e cultivo das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CT-TA)

Imediatamente, após o procedimento cirúrgico, as amostras teciduais foram submetidas a digestão enzimática. Para isso, foram fracionados cerca de 20 g de tecido adiposo, acondicionados em tubo Falcon 50 mL (BD, Nova Jersey, EUA), contendo Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2 (LCG[®], São Paulo, Brasil), suplementado com 2% penicilina, estreptomicina e fungizona (Gibco[®], Nova York, EUA), permanecendo em repouso por 2 horas para desinfecção. Posteriormente o tecido foi fragmentado e submetido a digestão enzimática com colagenase tipo I a 0,075% (Sigma-Aldrich[®], Missouri, EUA).

O tubo foi mantido em banho-maria a 37°C por 30 minutos, em constante agitação. Após a digestão enzimática, a colagenase foi neutralizada com adição de meio de cultura Mem/Alpha, (LCG[®], São Paulo, Brasil), suplementado com 15% de Soro Fetal Bovino (SBF) (LCG[®], São Paulo, Brasil) e 2% de penicilina, streptomomicina e fungizona (Gibco[®], Nova York, USA). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 400g por 10 minutos.

Após esse período, foi retirado o sobrenadante preservando o “*pellet*” contido no tubo. O “*pellet*” foi ressuspenso em 2ml de meio de cultura Mem/Alpha (LCG[®], São Paulo, Brasil) suplementado com SBF. Para o plaqueamento foi utilizado a proporção proposta por Bunnell e colaboradores (2008) [31]. Uma alíquota de 10 uL foi retirada para contagem e determinação da viabilidade celular, em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas

em frascos de cultura T25 (BD, Nova Jersey, EUA) e incubadas em estufa a 37⁰ C e 5% de CO₂ por 48 horas até a primeira troca do meio de cultura. As trocas posteriores foram realizadas a cada 72 horas.

A proliferação celular foi monitorada diariamente com uso de microscópio invertido (TCM 400, Labomed, Fremont, EUA) até a cultura atingir 80% de confluência para realização da subcultura (passagem celular). As células foram incubadas a 37⁰ C a 5% de CO₂, por 5 minutos, em solução de tripsina (Gibco[®], Nova York, EUA). A neutralização da tripsina foi realizada com igual volume de meio de cultura Mem Alpha (LGC[®], São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de SFB (LGC[®], São Paulo, Brasil) e 2% de penicilina, estreptomicina e fungizona; (Gibco[®], Nova York, EUA). As células desprendidas foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o “*pellet*” celular, homogeneizado em 2mL de meio Mem Alpha (LGC[®], São Paulo, Brasil) suplementado com 15% de SFB (LGC[®], São Paulo, Brasil) e 2% de penicilina, estreptomicina e fungizona; (Gibco[®], Nova York, EUA). As células foram semeadas com área três vezes maior que a da passagem anterior. As células foram cultivadas até a 11^a passagem, aproximadamente 40 dias, para a realização dos ensaios de genotoxicidade. Os testes foram realizados nas passagens 1, 3, 5, 7, 9 e 11, definidas aleatoriamente.

2.3 Viabilidade Celular

Antes da realização dos ensaios genéticos, foi realizado teste de viabilidade celular, por meio do método de exclusão por azul de tripan (Gibco[®], Nova York, EUA). As CT-TA foram contadas em câmara de Neubauer. A porcentagem de células vivas foram acima de 70% para continuidade da análise. Os testes de viabilidade celular, foram realizados nas passagens 1, 3, 5, 7, 9, e 11.

2.4 Diferenciações das células-tronco derivadas do tecido adiposo

2.4.1 Diferenciação Adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, as CT-TA cultivadas até a 11^a passagem foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 80%. Após, as células foram cultivada durante 7 dias na presença do kit de diferenciação adipogênica StemPro[®] (Gibco[®], Nova York, USA), utilizando a metodologia

proposta pelo fabricante. A diferenciação adipogênica foi confirmada pela análise da coloração com Oil Red O (Sigma-Aldrich[®], Missouri, EUA).

2.4.2 Diferenciação Condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, as CT-TA cultivadas até a 11^a passagem foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 80%. Em seguida, as células foram cultivadas durante 14 dias na presença do kit de diferenciação condrogênica StemPro[®] (Gibco[®], Nova York, USA), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação condrogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich[®], Missouri, EUA).

2.4.3 Diferenciação Osteogênica

Para induzir a diferenciação osteogênica, as CT-TA cultivadas até a 11^a passagem foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas até atingirem uma confluência de 80%. Em seguida, as células foram cultivadas durante 21 dias na presença do kit de diferenciação osteogênica StemPro[®] (Gibco[®], Nova York, USA), seguindo a metodologia proposta pelo fabricante. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela análise da coloração com Alzarin Red S (Sigma-Aldrich[®], Missouri, EUA).

2.5 Ensaio Cometa

Para realização do Ensaio do Cometa (EC) foi utilizada metodologia adaptada da proposta por Singh e colaboradores (1988) [35]. Para o preparo da suspensão, foram homogenizados 100 µL de suspensão celular de cada cultura, nas passagens 1, 3, 5, 7, 9, e 11, com 75 µL de agarose LMP (*Low Melting Point*) 0,5% (Gibco[®], Invitrogen, Nova York, EUA) a 37°C e foram dispostas sobre as lâminas pré-gelatinizadas com agarose. Foram confeccionadas duas lâminas para cada cultura. As lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas em geladeira, por 15 minutos, para solidificação. Em seguida, as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100mM EDTA, 10 mM Tris-HCL), à 4°C, por cerca de 2h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em solução tampão (NaOH, 0,3 mol L⁻¹; EDTA 0,001 mol L⁻¹) (pH>13) por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 30 minutos.

Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 15 minutos, por três vezes e as mesmas foram fixadas em etanol por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹).

Um total de 100 nucleóides foi analisado, sendo 50 para cada lâmina, em

microscópio de fluorescência Carl Zeiss Axion Scope A1, Cam ICc3 (Zeiss, Germany), na objetiva de 400x. Os danos no DNA foram quantificados e classificados de acordo com o tamanho da cauda do cometa; classe 0 (células sem dano), classe 1 (células ligeiramente danificado), classe 2 (dano intermediário), classe 3 (células apresentam cauda com tamanho equivalente a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça), classe 4 (não pode-se observar a cabeça do cometa, altamente danificado).

Para o cálculo da Unidade Arbitrária admite-se a seguinte fórmula: $UA = [(N^0 \text{ de cometas classe } 0 \times 0) + (N^1 \text{ de cometas classe } 1 \times 1) + (N^2 \text{ de cometas classe } 2 \times 2) + (N^3 \text{ de cometas classe } 3 \times 3) + (N^4 \text{ de cometas classe } 4 \times 4)]$. Assim, o Índice de dano variou entre a pontuação 0 (sem dano) a 400 (dano máximo).

$$UA = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S}$$

S

Onde, UA = Unidade Arbitrária; N1 – N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4; S = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe 0.

2.6 Teste de Micronúcleo

Para realização do Teste de Micronúcleo (MCN) foi utilizado metodologia adaptada da proposta por Fenech (2007) [32]. O teste do MCN foi realizado após o cultivo celular atingir 8×10^4 células em frasco de cultura T25 (BD, Nova Jersey, EUA). As células foram expostas a citocalasina B (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) por 24 horas.

As CT-TA foram retiradas com o auxílio de tripsina (Gibco®, Nova York, EUA) e transferidas para tubo Falcon de 15 mL (BD, Nova Jersey, EUA). Posteriormente foi realizado o tratamento hipotônico das células por 3 minutos utilizando KCl 0,075M, adicionado gradativamente ao meio. A hipotonização foi interrompida com adição de fixador metanol/ácido acético, na proporção de 9:1. A centrifugação foi realizada por 6 minutos a 400g. A solução hipotônica foi descartada e o fixador adicionado. Um total de 20 μ L do precipitado celular foi colocado sobre as lâminas. Após as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C, por 30 minutos e, a seguir, procedeu-se a coloração com Giemsa, por 10 minutos.

As células foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX 31, no aumento de 400 x. Para cada passagem foram analisadas duas lâminas, onde foram contadas 500 células binucleadas por lâmina, perfazendo um total de 1000 células.

2.7 Análise estatística

As características de Micronúcleo (MCN) e os dados do Ensaio do Cometa (EC), foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos resíduos e de Bartlett, para homogeneidade entre as variâncias. A análise estatística foi efetuada com auxílio do pacote computacional R. Como as características não atenderam as pressuposições (normalidade e homogeneidade), foram submetidas à análise não paramétrica comparando as médias pelo teste de Friedman a 5% de probabilidade de erro.

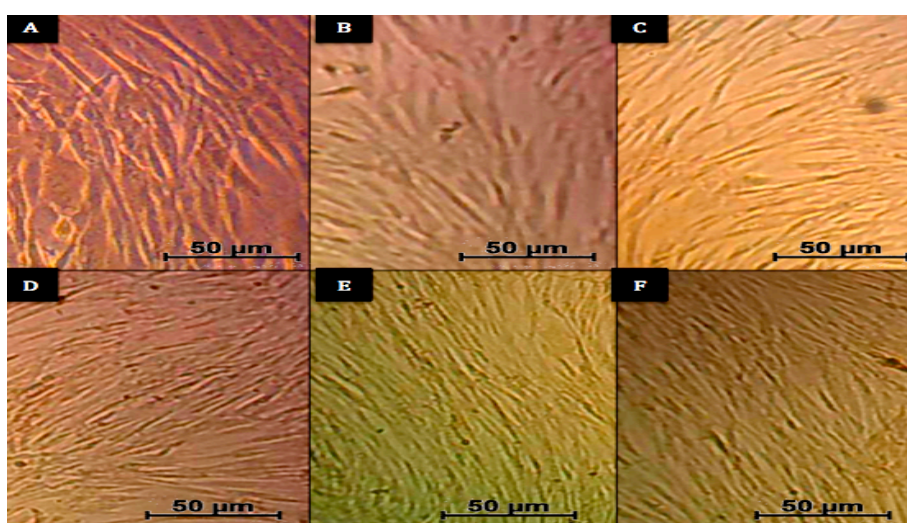
2.8 Aspectos éticos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Estadual Paulista- UNESP- Campus de Assis (Assis, São Paulo) sob o número de registro CAAE: 35669914.7.0000.5401.

3. Resultados

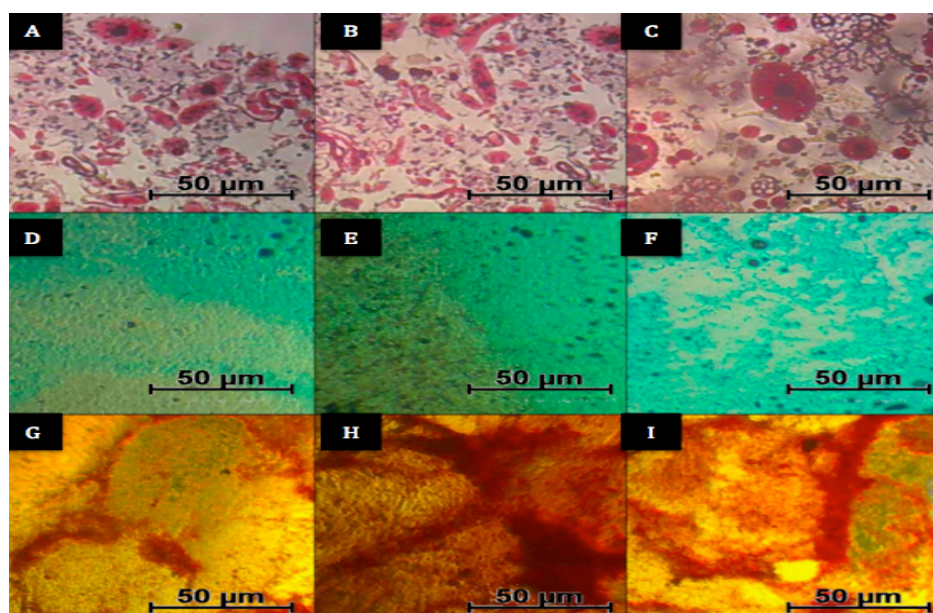
A partir do isolamento e cultivo das CT-TA, obteve-se a formação de células aderentes a superfície plástica e de aspecto fibroblastóide após dois dias de semeadura. Durante a cultura primária foram observadas quantidades mínimas de adipócitos maduros no meio da cultura. Deste modo, após quatro dias de cultura primária, foi possível observar uma população de células fibroblastóides, com aproximadamente 80% de confluência em relação à área de cultivo celular. As demais passagens foram realizadas a cada três dias e as células mantiveram o formato fibroblastóide, conforme apresenta-se na Figura 1.

Figura 1. Cultivo de CT-TA. A) primeira passagem; B) terceira passagem; C) quinta passagem; D) sétima passagem; E) nona passagem; F) décima primeira passagem, aumento de 400x.



A caracterização e diferenciação das células-tronco mesenquimais, apresentaram os requisitos básicos descritos na metodologia, quanto ao potencial de diferenciação em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Conforme resultados ilustrados na Figura 2, a diferenciação adipogênica foi confirmada por presença de vacúolos lipídicos indicados pela coloração Oil Red O. A diferenciação condrogênica com coloração Alcian Blue, onde o azul indica a síntese de proteoglicanos e a diferenciação osteogênica foi verificada mediante a coloração da matriz óssea com Alzarin Red S.

Figura 2. Diferenciação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano A), B) e C) Diferenciação adipogênica corada com Oil Red O, aumento de 400 x; D), E) e F) Diferenciação condrogênica, corada com Alcian Blue, aumento de 400x; G), H) e I) Diferenciação osteogênica, corada com Alzarin Red S, aumento de 400 x.



Malagutti-Ferreira, 2016.

Para a obtenção de conclusão sólida sobre a integridade genômica das CT-TA durante o cultivo *in vitro*, visto que os danos podem ocorrer durante as passagens, os testes de genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados em em oito pacientes do sexo feminino, com idade entre 35 a 48 anos, até a décima primeira passagem. Nas passagens: 1, 3, 5, 7, 9, e 11, foram realizados o EC e teste do MCN, buscando avaliar os possíveis efeitos sobre o material genético da CT-TA mantidas em cultura, os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados referente ao número de Micronúcleo (MCN) e Unidade Arbitrária do teste do cometa (UA) em todas as passagens analisadas por paciente

P	Número de Micronúcleos						Unidade Arbitrária					
	P1	P3	P5	P7	P9	P11	P1	P3	P5	P7	P9	P11
1	0	0	5	30	10	15	12	6	22	16	11	12
2	0	11	10	10	11	15	45	14	18	17	13	17
3	0	15	10	12	8	16	10	18	18	18	12	17
4	0	0	6	12	0	11	13	15	38	61	65	127
5	0	9	12	15	13	10	115	0	74	66	45	70
6	0	8	14	12	13	12	25	40	48	61	90	118
7	0	0	9	10	7	7	30	38	21	121	66	69
8	0	12	11	16	14	10	24	37	97	71	74	39
Médias	0b	6,87ab	9,62ab	14,62a	9,5a	12 ^a	34,25	21	42	53,87	47	58,62
DP	0,00	6,06	2,97	6,57	4,57	3,12	34,60	15,43	29,51	36,11	31,50	45,45

P - Paciente;

P1, P3, P5, P7, P9, P11 – Passagens 1, 3, 5, 7, 9, 11.

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente ($p \leq 0,05$).

A partir da análise dos dados da Tabela 2, decorrentes dos testes de EC e MCN verifica-se danos genotóxicos nas células desde a primeira passagem. Os resultados mostraram que no teste EC, não houve diferença estatística entre as células mantidas em cultivo por diferentes passagens, no entanto é possível evidenciar que a partir da quinta passagem houve um aumento na média de danos encontrados. Os resultados do teste de MCN, apresentaram diferença significativa entre as passagens analisadas, onde a partir da sétima passagem, houve um aumento significativo de micronúcleo quando comparado com a primeira passagem. As Figura 3 e 4 ilustram as alterações encontradas nas diferentes passagens.

Figura 3. Ensaio Cometa das CT-TA, corados com brometo de etídeo, cultivadas *in vitro* até a décima primeira passagem. A) Primeira passagem, classificação como dano 0; B) terceira passagem, classificação como dano 1; C) quinta passagem, classificação como dano 3; D) e E) décima primeira passagem, classificado como dano 1 e 4, respectivamente, aumento de 400x.

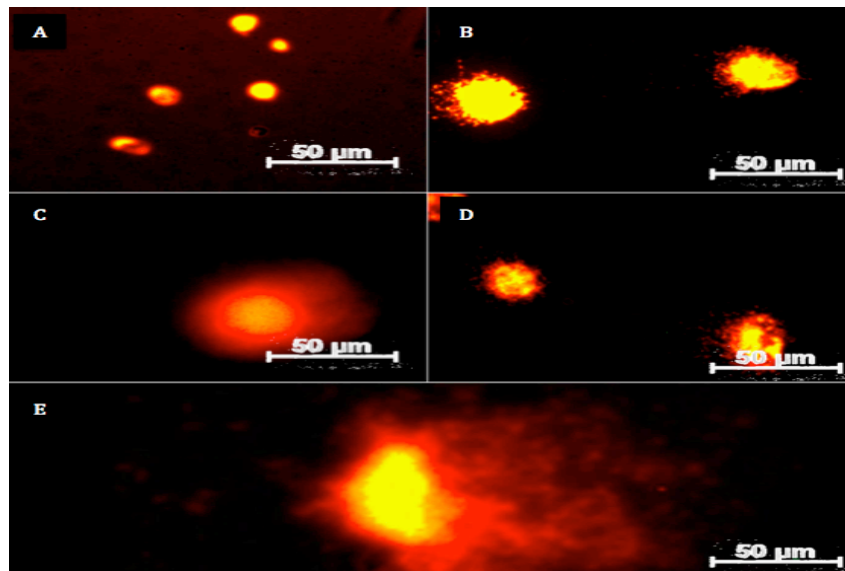
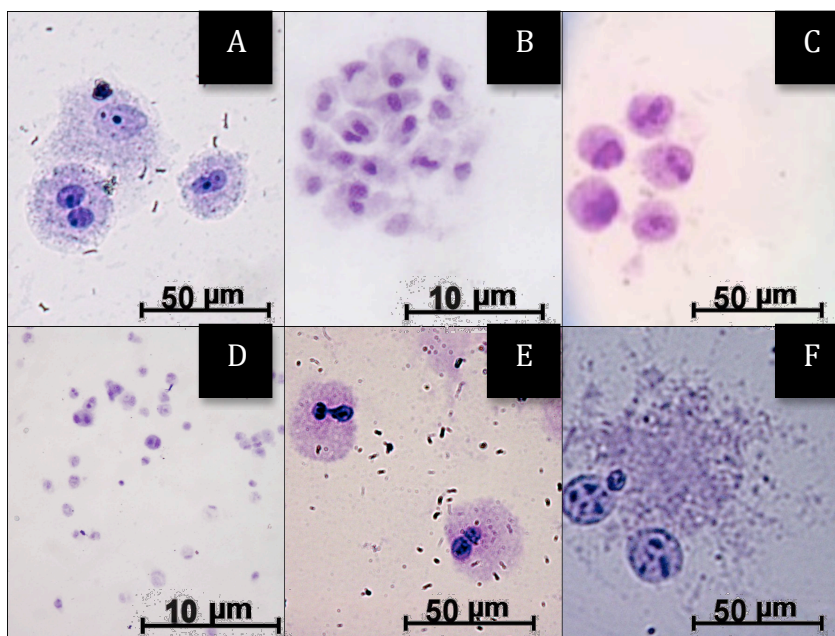


Figura 4. Teste de MCN das CT-TA, coradas com Giemsa, cultivadas *in vitro* até a décima primeira passagem. A) e B) células binucleadas na terceira passagem, com aumento de 400x e 100x; C) e D) células binucleadas da quinta passagem, com aumento de 400x e 100x; E) célula com micronúcleo na sétima passagem, aumento de 400x; F) células com micronúcleo na décima primeira passagem, com aumento de 400x.



Malagutti-Ferreira, 2016.

4. Discussão

As CT-TA obtidas de oito pacientes em bom estado geral de saúde, do sexo feminino, foram mantidas em cultura até a 11ª passagem. As células apresentaram as características fenotípicas para que uma célula seja considerada mesenquimal, como adesão à superfície do frasco de cultura, aspecto fibroblastóide, com capacidade de diferenciação, sob condições de indução *in vitro*, em osteócitos, condrócitos e adipócitos, conforme evidenciado na Figura 2. Estes resultados estão de acordo com os critérios propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT, para que uma célula seja definida como CTM [36]. Portanto, os resultados obtidos, conforme apresentados nas Figuras 1 e 2, representam validações consistentes, que as células analisadas neste estudo, obtidas do tecido adiposo são de origem mesenquimal.

Vários estudos anteriores mostraram que a cultura e proliferação celular *in vitro*, podem resultar em danos ao DNA [18, 19]. Desta forma, é imprescindível que as células mantidas em cultura por longos períodos sejam submetidas a um rigoroso controle de qualidade e análise de genotoxicidade, a fim de avaliar a estabilidade genética de CTM

cultivadas *in vitro* para que se possa conferir segurança aos procedimentos de terapia celular. O Ensaio cometa (EC) e Teste do Micronúcleo (MCN) são técnicas amplamente empregadas em estudos de mutagênese a fim de avaliar a instabilidade genética [30, 31, 37, 38, 39, 40].

Os resultados do EC não apresentaram diferença estatística significativa entre as passagens analisadas, conforme se verifica na Tabela 2. Esses resultados estão em acordo com aqueles obtidos por Froelich e colaboradores (2013) [41] que, em estudo realizado com células do tecido adiposo até a décima passagem, não encontraram danos ao DNA. Em outro estudo, Nikita e colaboradores [42] avaliaram danos ao DNA, em células estromais mesenquimais multipotentes da medula óssea e tecido adiposo humano, utilizando o EC e observaram que 74% de células apresentaram danos nas passagens iniciais (3 e 4 passagem) e 69% nas passagens tardias (10 e 12 passagem). Em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas entre a primeira e quinta passagem. A partir, no entanto, da sétima passagem houve aumento significativo de danos ao DNA. Esses resultados podem estar relacionados ao baixo número de amostras (n=8) analisado, bem como às condições de cultura. Vários estudos anteriores permitiram estabelecer uma correlação entre as condições de cultivo com alteração na viabilidade celular, além de uma relação diretamente proporcional entre o número de passagens com o aumento de alterações cromossômicas nas CTM. Dessa forma, é extremamente necessário minimizar o tempo de expansão [26, 43].

Os resultados do teste de MCN, conforme apresentados na Tabela 2, mostraram que ao longo das passagens há um aumento de danos, verificando-se diferença estatística significativa comparativamente entre a 1^a e a 7^a, 9^a e 11^a passagens. Os resultados obtidos neste trabalho mostram, portanto, a ocorrência de instabilidade genômica ao longo das passagens, que se apresentam estatisticamente significativas a partir da sétima passagem. Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por Nikita e colaboradores (2011) [44], em trabalho com cultivos celulares por longos períodos. Os autores encontraram associação entre à instabilidade genética com o aumento do número de passagens. Em um outro estudo realizado por Silva (2009) [45], mostrou que os padrões genômicos de CTM submetidas a diferentes passagens em cultura é capaz de uniformizar a população, pelo menos no que diz respeito a seu perfil molecular. Apesar de manter o potencial imunomodulatório, as células adquiriram, depois da 5^a passagem, alterações no cariótipo, indicando que apresentam instabilidade genética.

Os resultados descritos acima, relativos ao nosso trabalho, bem como aqueles descritos por outros autores, estão em total desacordo com estudos realizados por Fondah e colaboradores (2009) [46], em trabalho realizado com CTM derivadas da medula óssea de ratos, mantidas em cultura até a 48^a passagem [45, 44]. Os autores mostraram instabilidade genômica a partir da primeira passagem, bem como relataram uma tendência de redução de MCN ao longo das passagens e o aumento de células aneuplóides, com pelo menos uma aberração cromossômica, no decorrer da proliferação celular *in vitro* [46]. Espera-se, como evidenciado em inúmeros trabalhos da literatura que o cultivo celular prolongado, ou aumento do número de passagens *in vitro*, concorram para o aumento de alterações no material genético das células em cultivo [26, 47, 48, 49, 50]. A discrepância de resultados pode estar relacionada com diferenças na metodologia de cultivo, bem como no material empregado. Fondah e colaboradores (2009) [46], empregaram em seus estudos, células da medula óssea, enquanto em nosso trabalho foram utilizadas células estromais do tecido adiposo. Diante desses resultados, é necessário que novos estudos sejam conduzidos a fim avaliar e confrontar diferenças tão expressivas dos dados apresentados.

Como decorrência dessas análises, impõem-se a necessidade de estudos adicionais e novas abordagens metodológicas, como análises com técnicas moleculares. Busca-se, dessa forma, avaliar com maior consistência e segurança no emprego, de células-tronco mantidas em cultura *in vitro* por períodos prolongados, em procedimentos de terapia celular em pacientes humanos.

5. CONCLUSÃO

Os resultados relativos às análises de integridade genômica mostraram que, no EC não houve diferença estatística significativa no decorrer das passagens, ou seja não foram detectados efeitos genotóxicos significativos entre a 1^a até a 11^a passagem. Os resultados com os testes de MCN mostraram, no entanto, um aumento estatístico significativo no número de micronúcleos a partir da 7^a passagem, quando comparada com a 1^a passagem. Estes resultados sinalizam o aumento do risco de ocorrência de efeitos genotóxicos com o aumento do tempo de cultivo das CT-TA, que se evidenciaram estatisticamente significativos a partir da 7^a passagem de cultivo celular. Esses resultados indicam a necessidade de avaliação criteriosa e análises genéticas acuradas das CTM que tenham por finalidade o emprego dessas células em

protocolos de terapia celular pacientes humanos. Desta forma, o comprometimento da integridade genética, representa um risco a ser considerado nos procedimentos de terapia celular. Estudos adicionais, bem como novas abordagens de análise são necessárias a fim de se avaliar com maior segurança o emprego de células-tronco resultantes de culturas celulares proliferadas “*in vitro*” durante diferentes passagens.

6. REFERÊNCIAS

- [1] D. A. Melton, C. Cowan, “Stemness”: definitions, criteria, and standards. In: Lanza R (editor). Handbook of Stem Cells. New York: Elsevier/Academi Press, (2004) 1, 25-31.
- [2] National Institute of Health (NHI), Stem cells: scientific progress and future research directions. Bethesda, (2001) 1-4.
- [3] T. Maron-Gutierrez, I. Araujo, M. M. Morales, C. S. N. B. Garcia, P. R. M. Rocco, Stem cell therapy in acute respiratory distress syndrome. Rev Bras Ter Intensiva, (2009) 21(1): 51-7.
- [4] S. Yarak, O. K. Okamoto, Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. An Bras Dermatol, (2010) 85(5), 647-56.
- [5] M. O. Silva, L. C. T. Leoi, Banco de sangue de cordão umbilical e placentário no Brasil. Ensaaios, (2010) 14(2): 125-42.
- [6] A. S. Rocha, L. Maia, M. D. Guastali, R. Volpato, F. C. L. Alvarenga, Considerações sobre células- tronco embrionárias. Vet Zootec. (2012) 19(3): 303-13.
- [7] B. Amorin, V. S. Valim, N. E. Lemos, L. M. Júnior, A. M. P. Silva, Mesenchymal stem cells– characterization, cultivation, immunological properties and clinical applications. Revista HCPA, (2012) 32(1):71-81.
- [8] S. Hass, N. Weidner, J. Winkler, Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol.*; (2005) 18: 59-64.
- [9] C. A. Faria, R. H. Kozma, T. Stessuk, J. T. Ribeiro-Paes, Experimental basis and new insights for cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. Stem Cell Rev Rep. (2012) 8:1236–44.
- [10] L. B. Alves-de-Moraes, J. T. Ribeiro-Paes, B.M. Longo, E. G. Ferrazoli, T.G.A.C.S. Andrade, 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.
- [11] J. T. Ribeiro-Paes, T. Stessuk, M.Y. Marcelino, C. A.Faria, T. Marinelli, M. J. A. Ribeiro-Paes, Protocol proposition of cell therapy for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Rev Port Pneumol. (2014) 20(2): 84-91.

- [12] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* (2001) 7(2): 211-228.
- [13] L. Baptista, K. da Silva, C. da Pedrosa, C. Claudio-da-Silva, J. Carneiro, M. Aniceto, R. Borojevic. "Adipose tissue of control and ex-obese patients exhibit differences in blood vessel content and resident mesenchymal stem cell population". *Obesity Surgery.* (2009) 19, 1304-1312..
- [14] L. S. Meirelles, N.B. Nardi, Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci.* (2009) 14: 4281-4298.
- [15] K. Bieback, S. Kern, A. Kocaomer, K. Ferlik, P. Bugert, Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissue: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Bio-Medicals Materials and Engineering.* (2008) 18-.S71-S76.
- [16] K. Bieback, A. Hecker, T. Schlechter, Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytherapy.* (2012) 14(5): 570-83.A.
- [17] C. Escobedo-Lucea, C. Bellver, C. Gandia, A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses. *PloS One.* (2013) 8(7): 1-12.
- [18] J. O. Andresso, J. H. Hoeijmakers, J. R. Mitchell. Nucleotide excision repair disorders and the balance between cancer and aging. *Cell Cycle.* (2006) v. 5, p. 2886 – 2888.
- [19] D. M. Bohr, V. A. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* (2007) n. 6, p. 544 – 559.
- [20] S. Jung, K. M. Panchalingam, R. D. Wuerthm, L. Rosenberg, L. A. Behie, Large-scale production of human mesenchymal stem cells for clinical applications. *Biotechnol Appl Bioc.* (2012) 59(2): 106-20.
- [21] S. Yang, L. Pilgaard, L. G. Chase, S. Boucher, M. C. Vemuri, T. Fink, V. Zachar, 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.
- [22] C. Fehrer, G. Lepperdinger, Mesenchymal Stem Cell Aging. *Experimental Gerontology,* 40, (2005) 926-930.
- [23] M. M. Bonab, K. Alimoghaddam, F. Talebian, S. H. Ghaffari, A. Ghavamzadeh, A. B. Nikbin, Aging of mesenchymal stem cell in vitro. (2006) 7:14.
- [24] M. Miura, Y. Miura, HM. Padilla-Nash, AA Molinolo, B. Fu, V. Patel, BM. Seo, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* (2006) 24: 1095-1103.
- [25] J. Tolar, AJ. Nauta, MJ. Osborn, A. Panoskaltsis Mortari, RT. McElmurry, S. Bell, L. Xia, N. Zhou, M. Riddle, TM. Schroeder, JJ. Westendorf, RS. McIvor, PC. Hogendoorn, K.

Szuhai, L. Oseth, B. Hirsch, SR. Yant, MA. Kay, A. Peister, DJ. Prockop, WE. Fibbe, BR. Blazar . Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25: (2007) 371-379.

[26] A. Maitra, DE. Arking, N. Shivapurkar, M. Ikeda, V. Stastny, K. Kassaei, Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Genet.* 37: (2005) 1099-1103.

[27] K. Schallmoser, C. Bartmann, E. Rohde, Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. (2010) 95(6): 867–874.

[28] W. Wagner, P. Horn, M. Castoldi, Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. (2008) 3(5): 2213.

[29] U. Galderise, From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* (2007) 211(1): 27-35.

[30] A. P. F. Lambert, D. Moura, A. Zandonai. The role of damage and repair proteins in adipose-derived adult stem cell differentiation in neural-like cells. *J Tissue Sci Eng.* (2011) 2: 2-9.

[31] B. A. Bunnell, M. Flaat, C. Gagliardi, B. Patel, C. Ripoll. Adipose- derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation. *Methods*, (2008) v.45, p.115- 120.

[32] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. 2 (2007) (5): 1084-1104.

[33] C. L. Peterson, And J. Cote. Cellular machineries for chromosomal DNA repair. *Genes Dev.* v. 18, (2014) p. 602-616.

[34] P. Catalina. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: A concise review. *Cell Biology International.* v. 31, (2007) n. 9, p. 861-869.

[35] N. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell.* (1988) 175: 184 – 191.

[36] H. J. Yang, K. J. Kim, M. K. Kim, The Stem Cell Potential and Multipotency of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells Vary by Cell Donor and Are Different from Those of Other Types of Stem Cells. 199 (2015) 5-6.

[37] R. R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* (2000) v. 35, p. 206 – 221.

[38] V. L. Ribeiro, M. F. Salvatori, E. K. Marques. *Mutagênese ambiental.* 1. ed. Canoas: (2003) ULBRA.

- [39] C. Betti T. D. L.G. Loprieno, R. Barale. Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* (1994) v. 307, p. 323-333.
- [40] K. Boller, W. Schmid. Chemical mutagenesis in mammals. *Humangenetik.* (1970) v. 11, n. 1, p. 35-54.
- [41] K. Froelich, J. Mickler, G. Steusloff, Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion in vitro. (2013) 15: 767-781.
- [42] V. A. Nikitina, A. I. Chausheva, Risk of genetic transformation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. 50 (2014) (1): 100-105.
- [43] C. Baum, U. Modlich, G. Göhring, B. Schlegelberger. Concise review: managing genotoxicity in the therapeutic modification of stem cells, *Stem Cells* 29 (2011) 1479-84.
- [44] V. A. Nikitina, A. I. Chausheva, A. K Zhanataev, E. Y. Osipova, A. D. Durnev, N. P. Bochkov, Assessment of DNA damage in human bone marrow cells and multipotent mesenchymal stromal cells, 151 (2011) (4):550-2.
- [45] C. L. Silva, Estudos Moleculares de Células-tronco Mesenquimais cultivadas in vitro. (2009) Instituto Nacional do Câncer.
- [46] D. Foudah, S. Redaelli, E. Donzelli, Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. (2009) 17:1025 – 1039.
- [47] U. Ben-David, Y. Mayshar, N. Benvenisty. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell* 9(2): (2011) 97-102.
- [48] K. Tarte, J. Gaillard, JJ. Lataillade, L. Fouillard, M. Becker, H. Mossafa, A. Tchirkov, H. Rouard, C. Henry, M. Splingard, J. Dulong, D. Monnier, P. Gourmelon, NC. Gorin, L. Sensebé. Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* (2010) 115:1549–53.
- [49] PB. Campos, RC. Sartore, SN. Abdalla, SK. Rehen. Chromosomal spread preparation of human embryonic stem cells for karyotyping. *J Vis Exp. Sep* 4;(31) (2009). pii: 1512.
- [50] OA. Buyanovskaya, NP. Kuleshov, VA. Nikitina, ES. Voronina, LD. Katosova, NP. Bochkov. Spontaneous aneuploidy and clone formation in adipose tissue stem cells during different periods of culturing. *Bull Exp Biol Med* 148(1):109- 112, 2009.

ANEXO A – Normas para publicação Mutation Research

MUTATION RESEARCH – GENETIC TOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL



ELSEVIER

MUTAGENESIS

A section of Mutation Research

TABLE OF CONTENTS ..

- **Description p.1**
- **Audience p.1**
- **Impact Factor p.2**
- **Abstracting and Indexing p.2**
- **Editorial Board p.2**
- **Guide for Authors p.4 DESCRIPTION .**

AUTHOR INFORMATION PACK

ISSN: 1383-5718



Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied

by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

.Environmental Scientists, Occupational Health Researchers, Mutageneticists, Toxicologists

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

IMPACT FACTOR

.2014: 2.415 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

.BIOSIS Chemical Abstracts Current Contents/Life Sciences
MEDLINE® EMBASE PASCAL M Reference Update Scopus EMBiology

EDITORIAL BOARD

.*Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **EDITORS:**

G. Jenkins, Swansea University, Singleton Park, SA2 8PP, Swansea, Wales, UK **P.D. Josephy**, Dept. of Molecular & Cellular Biology, College of Biological Science, University of Guelph, 50 Stone Road East, Guelph, ON N1G 2W1, Canada, Fax: +1 519 837 1802 **S. Knasmueller**, Inst. of Cancer Research; Environmental Toxicology Group; Medical University Vienna, Inner Medicine I, Borschkegasse 8a, A-1090, Vienna, Austria

SPECIAL ISSUE EDITOR:

D.J. Kirkland, Genetic Toxicology Consulting, Kirkland Consulting, P.O. Box 79, Tadcaster, North Yorkshire, LS24 0AS, England, UK

FOUNDING EDITOR:**F.H. Sobels****EDITORIAL BOARD**

D. Averbeck, Orsay Cedex, France **A.B. Britt**, Davis, California, USA **T.A. Cebula**, College Park, Maryland, USA **W.N. Choy**, Lafayette, New Jersey, USA **M.C. Cimino**, Washington, District of Columbia, USA **A.R. Collins**, Oslo, Norway **M.L. Cunningham**, Research Triangle Park, North Carolina, USA **A.K. Dhawan**, Ahmedabad, Gujarat, India **S.H. Doak**, Swansea, Wales, UK **A. Doherty**, Cambridge, UK **Y.E. Dubrova**, Leicester, UK **M. Dusinska**, Norway **D.A. Eastmond**, Riverside, California, USA **G.L. Erexson**, North Chicago, Illinois, USA **S. de Flora**, Genova, Italy **K. Fujikawa**, Higashi-Osaka, Japan **J. Gallagher**, Research Triangle Park, North Carolina, USA **J.B. Guttenplan**, New York, New York, USA **S. Hamada**, Kamisu-shi, Ibaraki-ken, Japan **A. Hartmann**, Basel, Switzerland **J. He**, Hangzhou, China **Y. Ibuki**, Suruga-ku, Shizuoka-Shi, Japan **A.N. Jha**, Plymouth, UK **K. Kawai**, Kitakyushu-shi, Fukuoka, Japan **S. Kyoizumi**, Hiroshima, Japan **M.G. Manjanatha**, Jefferson, Arkansas, USA **F. Marchetti**, Health Canada, Canada **H.J. Martus** **K. Matsumoto**

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox

T. Morita, Tokyo, Japan **K. Mortelmans**, Menlo Park, California, USA **L. Mueller**, Basel, Switzerland **A. Noda**, Hiroshima, Japan **T. Nohmi**, Minato-ku, Tokyo, Japan **S. Oikawa** **F. Palitti**, Viterbo, Italy **C. Pueyo de la Cuesta**, Córdoba, Spain **A.M. Richard**, Research Triangle Park, North Carolina, USA **E. Rojas del Castillo**, Mexico DF, Mexico **A. Rothfuss**, Berlin, Germany **D. Shaughnessy**, Raleigh, North Carolina, USA **L.M. Sierra Zapico**, Oviedo, Spain **N.P. Singh**, Seattle, Washington, USA **G. Speit**, Ulm, Germany **S. Sutou**, Okayama, Japan **T. Takamura-Enya**, Kanagawa, Japan **D. Tavares**, Franca, São Paulo, Brazil **V. Thybaud**, Vitry sur Seine Cedex, France **J. Topinka**, Prague, Czech Republic **M.Z. Vasquez**, Morrisville, North Carolina, USA **L. Verschaeve**, Brussels, Belgium **K.K. Vijayalaxmi**, San Antonio, Texas, USA **K.L. Witt**, Research Triangle Park, North Carolina, USA **L.J. Wu**, Hefei, Anhui, China **M. Yamada** **E. Zeiger**, Chapel Hill, North Carolina, USA

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox
GUIDE FOR AUTHORS**INTRODUCTION**

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes papers advancing knowledge in the field of genetic toxicology. Papers are welcomed in the following areas:

New developments in genotoxicity testing of chemical agents (e.g. improvements in methodology of assay systems and interpretation of results). Alternatives to and refinement of the use of animals in genotoxicity testing. Nano-genotoxicology, the study of genotoxicity hazards and risks related to novel man-made nanomaterials. Studies of epigenetic changes in relation to genotoxic effects. The use of structure-activity relationships in predicting genotoxic effects. The isolation and chemical characterization of novel environmental mutagens. The measurement of genotoxic effects in human populations, when accompanied by quantitative measurements of environmental or occupational exposures. The application of novel technologies for assessing the hazard and risks associated with genotoxic substances (e.g. OMICS or other high-throughput approaches to genotoxicity testing).

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Types of Paper

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis publishes the following types of article: (I) Research papers- papers reporting results of original, fundamental research. (II) Short communications of up to 5 printed pages. (III) Rapids - are accelerated publications - research papers identified by the Editor as being of significant quality and thereby qualifying for rapid reviewing, and publication within 8-10 weeks of acceptance. (IV) Current issues are generally short, 1-2 page comments on a topical theme, and are published within 10 weeks of acceptance. (V) Volunteered and invited Mini-reviews of less than 10 printed pages, using references generally no later than 2 years old. The journal accepts Letters to the Editor.

Please note that Full-length reviews comprehensively covering and critically analysing a topic are published in *Mutation Research Reviews*. Also published in the Reviews section are invited papers in the series *Reflections in Mutation Research*, in which research and techniques that have played an important part in the development of the field of mutation research are revisited and their significance discussed. Special issues, comprising multiple original and/or review articles written from a particular viewpoint, on a central theme, are published on a regular basis in the appropriate section of *Mutation Research* by topic or article type.

Current Topics in Genotoxicity Testing

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis is now accepting submissions for a new section of the journal that will be dedicated to the discussion of current issues relating to design, interpretation and strategic use of genotoxicity tests (**Current Topics in Genotoxicity Testing**). This section is envisaged to include discussions relating to the development of new international testing guidelines, but also to wider topics in the field. The evaluation of contrasting or opposing viewpoints is welcomed as long as the presentation is in accordance with the journal's aims, scope, and policies.

Any submissions that report the results of studies on extracts or complex mixtures (e.g.,

solvent extracts of herbal preparations; soil, air, or water samples) will receive preliminary review by an Editor. Unless such manuscripts offer significant new insight, such as the chemical identification of previously unknown mutagens or anti-mutagens, they will be returned to the authors without being sent for further review. For further clarification of this journal policy please refer to the [Editorial](#) published in *Mutation Research* 391 (1997) 1.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

It is the policy of the Editors to conduct a preliminary review of each submitted manuscript that reports the results of molecular epidemiology studies. (i) As with any studies involving human subjects, approval by an appropriately constituted ethics review board and informed consent by participants are required.

(ii) Authors are advised to collaborate with qualified epidemiologists with respect to study design and interpretation. (iii) In studies of the potential genotoxic effects of exposure to environmental agents, it is strongly recommended that quantitative evidence of exposure (such as analysis of personal monitoring devices or measurement of urinary biomarkers, for example) be obtained.

Manuscripts which do not conform to these requirements will be returned to the authors without being sent for further review.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

The Journal requires full disclosure of all potential conflicts of interest. Please declare any financial or personal interests that might be viewed to inappropriately influence the work presented. Interests could include employment, consultancies, stock ownership and honoraria. If there are no conflicts of interest, the authors should state, "The authors declare that there are no conflicts of interest". If there are any financial or personal interests please state so here and include this statement as an Acknowledgement in your submitting manuscript. Signed copies of the *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* Conflict of Interest policy form are required upon submission. The Conflict of Interest policy form can be downloaded [here](#). In order to minimize delays, we strongly advise that the signed copies of these statements are prepared before you submit your manuscript.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

A Chinese version of the submission instructions for MUTGEN can be found [here](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see

<https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution
- **Subscription** • Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors welcome submissions by the authors of the names and addresses of up to four individuals who could expertly review the paper, and who are not from the same institutions as the authors. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

Free access to scientific publications for public institutions in developing countries:

The Health InterNetwork Access to Research Initiative (HINARI) is an initiative to provide free or nearly free access to the major journals in biomedical and related social sciences, to

public institutions in developing countries. Starting in January 2002 with over 2000 journals from Elsevier and other leading biomedical publishers, HINARI is part of the Health InterNetwork, which was introduced by the United Nations' Secretary General Kofi Annan at the UN Millennium Summit in the year 2000.

For further information and registration, please check the HINARI site: <http://www.who.int/hinari/en/> **PREPARATION**

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The abstract should be up to 300 words of size.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical

abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox

of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide between 3 to 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

e-CRC

General points: Elsevier can only accept MS Word, LaTeX, or postscript/PDF documents as electronic camera-ready copy (e-CRC). Electronic files can be stored on CD or may be transferred to Elsevier via FTP (details available from Customer support: <http://support.elsevier.com>). Please note: always send the source file (Word or LaTeX) together with any PDF files as this can contribute to better quality final PDF files and help in the conversion to XML.

MS Word file: Please ensure that you use normal fonts as much as possible in your documents, such as Times New Roman, Arial, Symbol, Helvetica, or Times (TrueType or Type 1 fonts). Special fonts, such as those used in the Far East (Japanese, Chinese, Korean, etc.) may cause problems during processing. If you use a lot of special fonts, please convert the document to PDF with Adobe Acrobat (see below, and also Elsevier's Quickguide: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Please place figures in a logical place within the document (see also the section on *Preparation of electronic illustrations* at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>). To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-checker' function of your wordprocessor.

LaTeX documents: Please use a LaTeX setup that uses Type 1 fonts instead of the sometimes default bitmap fonts (Type 3, or pk fonts). For instance, using the LaTeX Times package may be enough to enable this adjustment. For information on LaTeX see <https://www.elsevier.com/latex>. Please provide all document-related and temporary files on submission, as well as the resulting postscript or PDF file.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016

www.elsevier.com/locate/gentox

Postscript/PDF files: Please create postscript files, making sure all fonts are embedded. When creating PDF files with Adobe Acrobat, please use version 4.05 or higher, and use the standard "Press Optimized" settings, as provided by Adobe.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel)

then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts. TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi. **Please do not:** • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors; • Supply files that are too low in resolution; • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) and in the printed version (unless you specify otherwise). Please indicate your preference for color: in print and on the Web, or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with

either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/mutation-research-genetic-toxicology-and-environmental-muta> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-

ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume and issue/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following

examples:

Reference style Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given. Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result' *List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text. *Examples:* Reference to a journal publication: [1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. Reference to a book:

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000. Reference to a chapter in an edited book: [3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304. Reference to a website: [4] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal

will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found at <http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. **Ensure that the following items are present:** One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
 - Full postal address
 - Phone numbers
- All necessary files have been

uploaded, and contain: • Keywords • All figure captions • All tables (including title, description, footnotes) Further considerations • Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked' • References are in the correct format for this journal • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web) • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web and in print, or to be reproduced in color on the Web and in black-and-white in print. There are no color charges for Web and/or print reproduction • If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Feb 2016 www.elsevier.com/locate/gentox

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints

can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

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 “Análise da Integridade Genômica por meio de Ensaio Cometa em Células-Tronco Mesenquimais derivadas de tecido adiposo”, 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.

A pesquisa será realizada com células-tronco retiradas do tecido adiposo (gordura). Será utilizado apenas uma parte do material retirado da região abdominal. 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 e depois serão analisadas para que se possa avaliar se estas células, depois de retiradas e cultivadas em laboratório, não apresentam nenhum problema. Estas informações são importantes para que, a partir deste estudo, seja possível ou não utilizar essas células depois de mantidas em laboratório.

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:

Pesquisador responsável: 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 “Análise da Integridade Genômica por meio de Ensaio Cometa em Células-Tronco Mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Fui devidamente informado(a) e esclarecido 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