



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Heloísa Vicente Garcia

**Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato
sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm
utilizando LED**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Coorientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

**Botucatu
2015**

Heloísa Vicente Garcia

Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato
sob ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm
utilizando LED

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre(a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Coorientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Garcia, Heloísa Vicente.

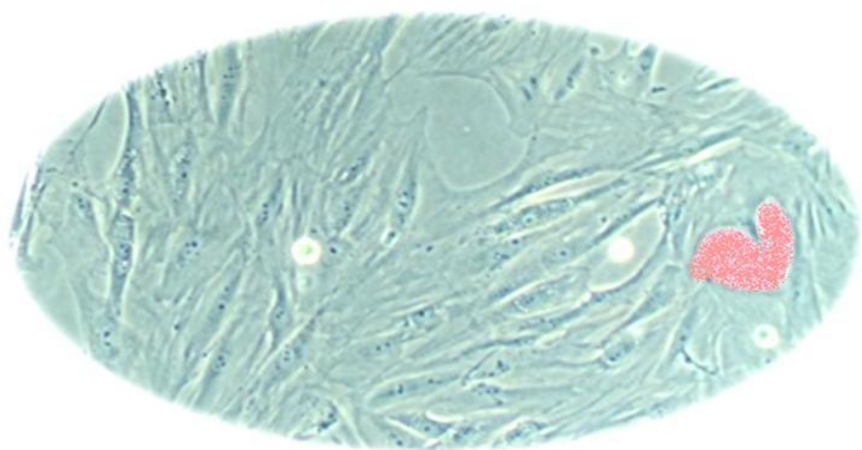
Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob
ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED /
Heloísa Vicente Garcia. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Elenice Deffune
Coorientador: Andrei Moroz
Capes: 90194000

1. Células-Tronco. 2. Biotecnologia médica. 3. Células -
Cultura e meios de cultura. 4. Lasers - Efeito fisiológico. 5.
Luz - Efeito fisiológico. 6. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Bioestimulação; Célula-tronco mesenquimal;
Cultura celular; LED; Terapia celular.

Dedicatória



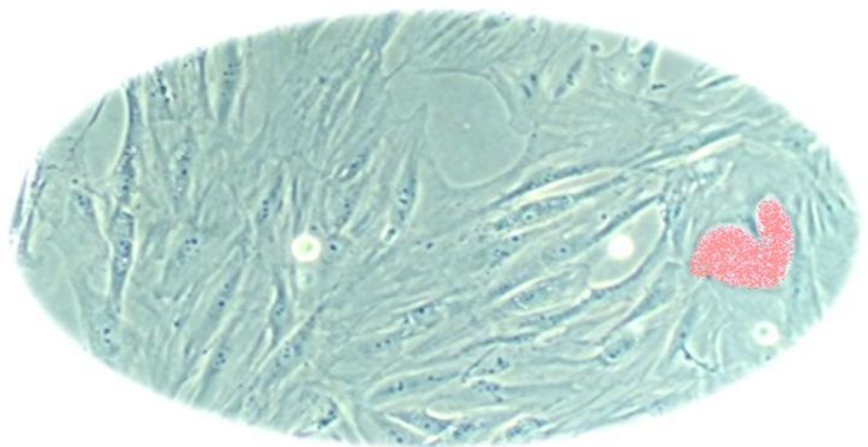
Dedico este trabalho...

Aos meus pais Sílvia e Daniel, e minha irmã Daniela, que sempre me incentivaram aos estudos e me apoiaram em todos os momentos de minha vida...

Ao meu grande amor Kleber, por todo amor, carinho, incentivo e apoio...

Aos meus queridos amigos...

Agradecimientos



À Deus e Nossa Senhora Aparecida por me guiarem e me protegerem antes e durante esta jornada de trabalho e dedicação, sempre me abençoando e escutando meus pedidos e sonhos. Obrigada por me mostrarem que cada dia era um novo dia, um novo recomeço para continuar minhas tarefas com saúde.

Aos meus pais Daniel e Sílvia, que desde que me conheço por gente, sempre me ensinaram os verdadeiros valores da vida, a honestidade, a humildade, o respeito, a amizade, a lealdade, a gentileza. Obrigada por incentivarem a mim e minha irmã aos estudos e mostrarem a nós que sempre é possível sonhar e alcançar nossos objetivos. Obrigada por cada momento de apoio, carinho, amor e conforto. Espero que a concretização deste trabalho represente parte da gratidão por tudo que sempre fizeram por mim. Amo vocês.

À minha querida irmã Daniela, que sempre esteve ao meu lado, me protegendo, me apoiando, me incentivando e sempre me dando bons exemplos. Não poderia haver irmã melhor em minha vida. Muito obrigada por todo carinho. Você também fez parte da luta para finalizar esse trabalho. Amo você.

Ao meu namorado Kleber, obrigada meu amor por todos os momentos de apoio, de paciência, de carinho, de incentivo e por acreditar em mim e no meu trabalho. Você também foi fundamental para eu conseguir concluir minhas atividades. Quando somos felizes por amar, as coisas fluem muito melhor.

Aos meus entes queridos que me protegeram e olharam por mim lá do céu (meus Avós paternos, Avô materno e tios) e aos meus parentes que ainda estão pertinho, minha Avó Wanda, Tios e Tias, primos e primas que sempre perguntavam como estavam as coisas e me incentivaram a prosseguir com persistência o meu trabalho. Sei que vocês torceram muito por mim.

Aos meus sogros e cunhada por todo carinho, apoio, amizade e preocupação que tiveram comigo. Muito obrigada.

À minha orientadora e mãe de coração, Profa. Dra. Elenice Deffune, primeiramente muito obrigada por me aceitar em seu Laboratório, confiar este trabalho a mim e acreditar em mim. Sabemos que essa caminhada não foi fácil, mas foi vencedora, pois estamos colhendo muitos frutos bons. A sua dedicação e empenho, o seu exemplo de vida me incentivaram ainda mais a sempre me esforçar mais. Obrigada por cada

abraço, carinho, atenção, apoio. Foi uma honra poder ser orientada pela senhora. Meu muito obrigada, de coração.

À Professora Dra. Rosana Ferreira, que me trouxe ao Laboratório e me deu a oportunidade de seguir meus estudos em Botucatu. A senhora também é uma mãe de coração para mim, sempre me estendeu a mão para todas as dificuldades, sempre generosa, amiga e carinhosa. Obrigada por cada momento em que pude aprender muito com a senhora e por todos os conselhos, desde minha faculdade em Bauru até hoje, em nosso Laboratório. Minha eterna gratidão por confiar em mim.

Ao meu coorientador Dr. Andrei Moroz, obrigada por me ajudar nos momentos de dificuldade nas técnicas do trabalho e por se mostrar solícito para eventuais contratemplos.

À querida Ondina, por “puxar nossa orelhas” quando precisamos e por toda ajuda e apoio nos momentos de preocupação e dificuldade. Obrigada sua colaboração fundamental em manter a organização do Laboratório e dos materiais, permitindo que nosso trabalho fosse desempenhado com sucesso. Suas histórias divertidas nos distraiam positivamente e seu abraço muitas vezes nos confortava quando a saudade de casa batia.

Aos meus queridos amigos de Laboratório (e de minha vida, agora) Thaianne, Josy, Ana Claudia, Juliana, Helga, Isabele, Henrique, Woner, Vitória, Camilla, Ana Lívia, Priscila, Ana Carolina, Natália, Rodrigo, Michele, meu muito obrigada por fazerem parte da minha vida, alguns por pouco tempo outros por mais. Com vocês formei uma nova família e acreditem, vou sentir muita saudade da convivência, dos momentos de risadas, histórias, trabalho em equipe, dos aprendizados, dos abraços, do carinho, da lealdade de vocês. Vocês moram no meu coração e nunca me esquecerei desses 3 anos em minha vida. Agradeço a Deus por terem colocado vocês no meu caminho. Obrigada por me socorrerem e estenderem a mão nos momentos difíceis, tanto de saúde, quanto de trabalho. Não poderia ter feito parte de equipe tão agradável e calorosa quanto essa. Contem sempre comigo para o que precisarem!

Aos meus novos amigos de Laboratório Pâmela, Monique, Mariane, Taís, Aline, Mateus, agradeço por cederem parte do tempo de vocês e me ajudarem nos momentos de dificuldade. Contem comigo para o que precisarem.

Às minhas amigas de apartamento Viviam Massolini, Taiane Gardizani e Helga Nunes pela amizade e convivência! Foram muitos os aprendizados! Obrigada pelo apoio e momentos de alegria!

Ao Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos da USP, por todo apoio, pela confiança em nosso trabalho, pela dedicação em nos amparar, pela prestatividade. Agradeço muito ao Professor Vanderlei Bagnato, a Natália Inada, ao LAT (Madison, Priscila) e a todos que de alguma forma colaboraram com o nosso trabalho! Vocês foram fundamentais!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo, Márjorie, Aline, Caroline por todo apoio e colaboração em nosso trabalho e por cederem tantas vezes o vosso tempo para a realização dos testes. Muito Obrigada!

Ao Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica da Profa. Daisy, que nos recebeu com generosidade e permitiu que pudéssemos acompanhar as técnicas que seriam empregadas em nosso trabalho. Obrigada ao pessoal do Laboratório, João Paulo, André, Rafael, Bruno, Fábio, Nice, por toda prestatividade e ajuda nos momentos de dificuldade. Agradeço pela paciência e colaboração.

Ao Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental por toda colaboração, generosidade e ajuda. Agradeço ao Brunno, Renata e Guilherme por estenderem a mão sempre que precisei. Vocês foram fundamentais.

Ao Ednelson Bianchi (Biotério e Unipex) que sempre me recebeu com muita disposição e colaborou bastante para o início deste trabalho. Obrigada por participar desta etapa e por me socorrer nos momentos imprevisíveis, pelos conselhos e ensinamentos. Agradeço a toda equipe do Biotério Central e da Unipex pela colaboração.

Ao Professor Dr. Carlo Roberto Padovani, por toda colaboração e generosidade e dispor de seu tempo e amplo conhecimento com as dificuldades estatísticas para o delineamento deste trabalho.

Às minhas queridas amigas de faculdade (Bauru) e Araçatuba, Taísa Katz, Ana Paula de Freitas, Ana Cláudia Ribeiro, vocês sempre preocupadas comigo e com meu bem estar. Obrigada por cada palavra de carinho, de conforto, pela amizade, pelos bons momentos de alegria e desafios. Vocês moram no meu coração há muito tempo. A

amizade é um elo que não se desfaz quando o amor é verdadeiro e quando Deus coloca essas pessoas em nosso caminho para serem eternas.

À minha orientadora de iniciação científica e professora de histologia e embriologia da graduação em Bauru, Profa. Dra. Irene Bastos Franceschini Vicentini, por toda confiança, aprendizado, generosidade, carinho, respeito e por abrir caminhos que me geraram a primeira oportunidade de contato com o mundo da pesquisa científica. A senhora foi a minha inspiração e incentivo para que eu continuasse na área acadêmica, diante dos excelentes exemplos de profissionalismo e de valores pessoais. Muito obrigada.

Aos funcionários do Hemocentro, do Hospital, do IBB e a todos aqueles que de alguma forma me estenderam a mão e colaboraram para o caminhar das etapas.

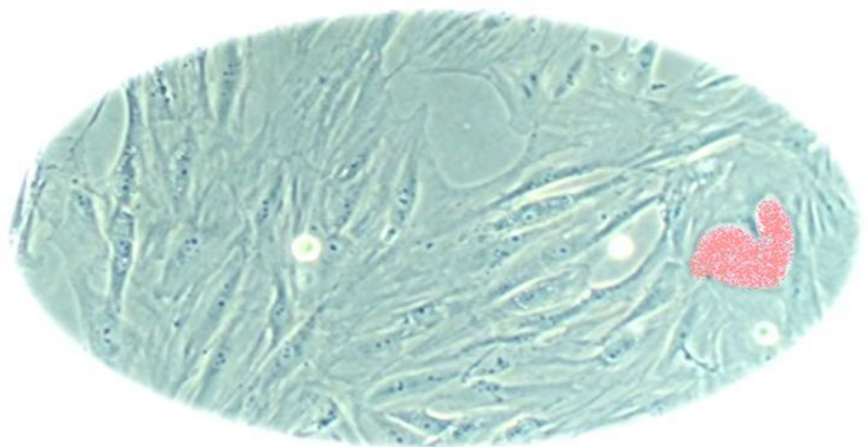
Às funcionárias da limpeza, Natália e Bruna, sempre tão educadas e generosas. Sem o trabalho de vocês o nosso não pode ser realizado. Obrigada por manterem nosso ambiente de trabalho sempre limpo e confortável.

Agradeço sinceramente aos animais (ratos) que foram fundamentais para o início deste trabalho! Espero que estes sacrifícios dentro da pesquisa gerem ótimos frutos para o bem da humanidade e da natureza.

E, por fim, agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) por todo apoio, respeito, confiança e respaldo intelectuais e financeiros depositados em mim, como iniciante da carreira acadêmica, e neste projeto científico que mereceu, assim como tantos outros, indispensável apoio desta Fundação. Acreditamos que essas parcerias e colaborações são essenciais para um caminhar progressivo e próspero da pesquisa e do ensino no país e no mundo.

Meu muito obrigada, de coração!

Επίγραφε



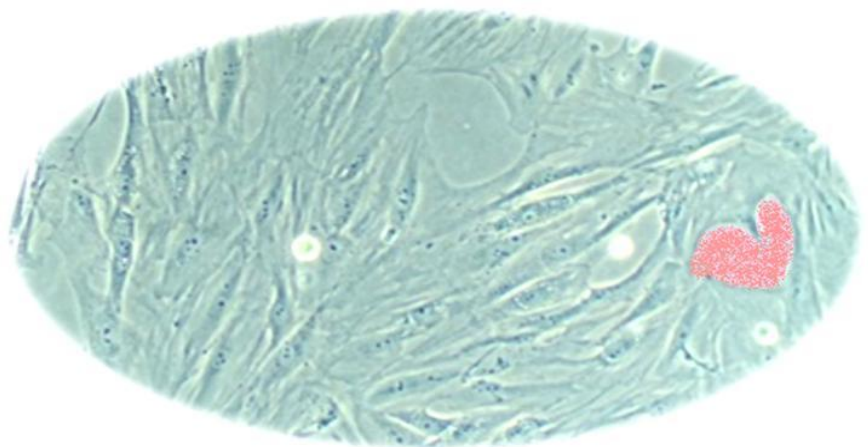
“Cabem aqui meus pensamentos e sentimentos, aprendi mais um pouco. Tudo que almejamos e sonhamos é possível se tornar realidade, mesmo quando tudo parece desabar, ou quando se perdem as forças, ou quando achamos que não estamos no caminho certo. Não importa para onde seguimos, contanto que façam parte da nossa vida e do nosso caminho as pessoas que realmente nos amam e nos protegem, nos incentivando e ensinando a não desistir e enfrentar os desafios. Sou extremamente feliz e agradecida por ter essas pessoas ao meu lado.”

(Heloisa Vicente Garcia)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Resumo e Abstract



RESUMO

A medicina regenerativa emergiu do impulso biotecnológico com uso da célula-tronco (CT), caracterizada por indiferenciação, autorrenovação e capacidade de gerar vários tipos celulares. A célula-tronco mesenquimal (CTM) pode ser isolada de várias fontes biológicas, sendo o tecido adiposo uma promissora fonte. São candidatas para aplicação em terapia celular por vários motivos e capazes de se diferenciar e produzir muitos tipos celulares para reparação do tecido danificado, no entanto, são dose dependentes necessitando de expansão pelo método de cultura celular. A aplicabilidade do diodo emissor de luz – LED – (*Light Emitting Diode*) como agente bioestimulador tem sido proposta. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da luz contínua e pulsátil, 630 nm, comparando esta ação sobre células obtidas pelos métodos de dissociação mecânica (DM) e enzimática (DE). Foram retirados blocos de tecido adiposo (TA) de ratos da linhagem Wistar com idade média de 3 meses. A concentração de células linfomononucleares (LMN) obtidas/grama de TA foi de 1×10^5 advinda de DM e $3,34 \times 10^5$ de DE. O perfil fenotípico utilizando CD90/CD44/CD71/CD31/CD11b/CD45 evidenciou que a DE remove um percentual significativo de antígenos das superfícies das CTMs. Quanto à curva de confluência à 80% entre as passagens, mostrou que as CTMs obtidas por DM sofrem melhor ação do LED, proliferando mais rapidamente. Foram determinadas citocinas TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-10. A maioria das amostras que apresentam secreção de citocinas foram obtidas pelo método de DM. Amostras controle, não irradiadas, também apresentaram secreção de citocinas, mostrando a ação dos aditivos do meio de cultura como bioestimulador dos efeitos parácrinos. Os testes de micronúcleo e cometa para análise de mutagenicidade e genotoxicidade, respectivamente, evidenciam que a luz pulsátil de $1\text{J}/\text{cm}^2$ determina o aparecimento de micronúcleos, enquanto que o dano de DNA determinado pelo cometa é reparado pela ação do LED.

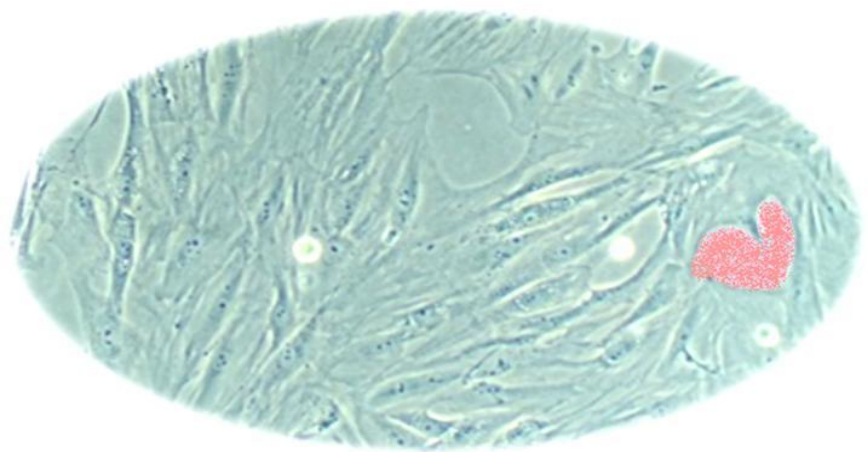
Palavras-chaves: célula-tronco mesenquimal, cultura celular, bioestimulação, LED, terapia celular.

ABSTRACT

Regenerative medicine (RM) has emerged of different sciences boost, including biology of the stem cell. The mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from adipose tissue have occupied more space in RM. They are characterized by differentiation, self-renewal and the ability to generate at least three different cell lines, being involved in the repair of damaged tissue, however they are dose-dependent requiring expansion by cell culture method. The applicability of LED (*Light Emitting Diode*) as biostimulator agent has been proposed. The aim of this study was to evaluate the effect of continuous and pulsed light, 630 nm, comparing this action in cells obtained by the methods of mechanical (MD) and enzymatic dissociation (ED). Adipose tissue were removed from rats of Wistar lineage with an average age of 3 months. The concentration of lymphomononuclear cells (LMN) obtained/gram of tissue was 1×10^5 from MD and 3.34×10^5 and from ED. The phenotypic profile using markers as CD90 / CD44 / CD71 / CD31 / CD11b / CD45 showed that ED removes a significant percentage of the surface antigens of MSCs. The curve of the confluence at 80% between passages showed that MSCs obtained by MD was benefited by the action LED and proliferating faster. Cytokines TNF, IFN- γ , IL-4 and IL-10 were determined by flow cytometry. Most of the samples showed cytokine secretion was obtained by MD method. Control samples, not-irradiated, also showed secretion of cytokines, showing the action of the additive of the culture medium as biostimulator of paracrine effects. The micronucleus and comet assays to the mutagenicity and genotoxicity analysis, respectively, show that pulsed light of 1 J/cm^2 determine the appearance of micronuclei, while DNA damage determined by the comet assay decreases by the LED action.

Keywords: mesenchymal stem cell, cell culture, bioestimulation, LED, cellular therapy

Lista de Abreviaturas

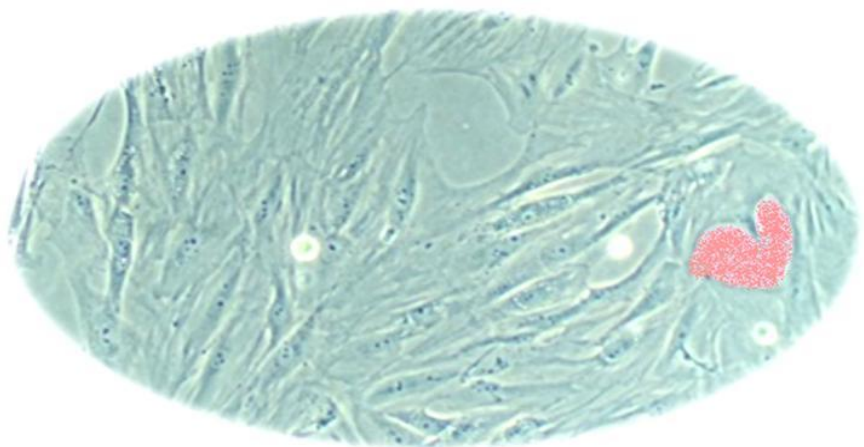


Lista de Abreviaturas

BN	Broto Nuclear
BNDES	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
CA	Contador Automático
CBA	Cytometric Bead Array
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEPOF	Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica
CEUA	Comitê de Ética em Utilização Animal
CF	Citometria de Fluxo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco Adulta
CTL	Controle
CTM	Célula-tronco Mesenquimal
DAPI	4´6-diamidino-2-phenylindole
DE	Dissociação Enzimática
DM	Dissociação Mecânica
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FC	Fatores de Crescimento
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
FNS	Fundo Nacional de Saúde
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazineethanesulfonic acid

ICE	<i>Interleukin-1β-converting Enzyme</i>
IDN	Índice de Divisão Nuclear
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IP	Iodeto de Propídeo
KCl	Cloreto de potássio
LAC	Laboratório de Atividades Complementares
LASER	<i>Light Amplified by Stimulated Emission Radiation</i>
LAT	Laboratório de Apoio Tecnológico
LBE	LASER de baixa energia
LEC	Laboratório de Engenharia Celular
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LLLT	LASER de baixo nível
LMN	Células Linfomononucleares
MN	Micronúcleo
MO	Medula Óssea
MR	Medicina Regenerativa
NASA	<i>National Aero Space Agency</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDT	Terapia Fotodinâmica
PE	Ficoeritrina
PERCP	Proteína Clorofila Peridinina
PN	Ponte Nucleoplasmática
POP	Procedimento Operacional Padrão
UNESP	Universidade Estadual Paulista
SFB	Soro Fetal Bovino
SCGE	Eletroforese em Gel de Células Individualizadas
TA	Tecido Adiposo
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental
USP	Universidade de São Paulo

Lista de Figuras

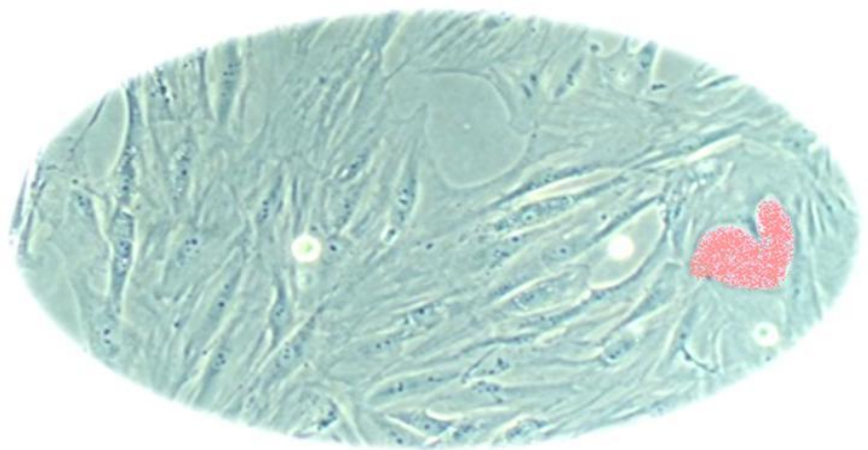


Lista de Figuras

Figura 1 - Linha do tempo do surgimento e aplicabilidades do LASER e LED nas ciências, tecnologia e comunicação.....	25
Figura 2 - Ilustração da ação da luz de 600 a 950 nm sobre a célula e seus efeitos subsequentes.....	26
Figura 3 - Imagem representando os efeitos produzidos pela CTM pelo estímulo com LED.....	27
Figura 4 - Fotos da obtenção do TA de rato em fluxo laminar.....	33
Figura 5 - Fotos do processo de dissociação mecânica com tesoura e <i>cell scrapper</i> ...34	
Figura 6 - Câmara de contagem para o contador automático e modelo ilustrativo Countess BD®.....	37
Figura 7 - Detalhe das biotables produzidas pelo CEPOF/LAT e da irradiação dentro da estufa.....	41
Figura 8 - Esquema representativo da metodologia de irradiação e controles.....	44
Figura 9 - Fluxograma do experimento proposto, contendo as etapas desde a coleta de TA até o encerramento com as análises.....	46
Figura 10 - Representação esquemática do teste de Anexina V e Iodeto de Propídeo.....	48
Figura 11 - Esquema da análise do teste de Anexina V e Iodeto de Propídeo por Citometria de Fluxo.....	49
Figura 12 - Esquema ilustrativo das vias de morte celular.....	49
Figura 13 - Esquema representativo do método de detecção por CBA, no citômetro de fluxo.....	51
Figura 14 - Fotomicrografias obtidas por microscopia invertida, contraste de fase, da cultura de CTM-TA com diferentes aspectos de confluência celular.....	57

Figura 15 - Desempenho das CTM obtidas por DM quanto à contagem celular nos diferentes momentos da pesquisa.....	60
Figura 16 - Desempenho das CTM obtidas por DE quanto à contagem celular nos diferentes momentos da pesquisa.....	61
Figura 17 - Fotos em microscopia invertida das culturas mecânicas no experimento...	65
Figura 18 - Fotos em microscopia invertida das culturas mecânicas no experimento...	66
Figura 19 - Fotos em microscopia invertida das culturas enzimáticas no experimento.....	66
Figura 20 - Fotos em microscopia invertida das culturas enzimáticas no experimento.....	67
Figura 21 - Análise do índice de apoptose e necrose em amostra obtida por DE.....	69
Figura 22 - Análise do índice apoptose e necrose em amostra obtida por DM.....	70
Figura 23 - Análise de morte celular via Caspase-3, por citometria de fluxo.....	73
Figura 24 - Visualização dos campos pelo software MetaXpress® HTS.....	74
Figura 25 - Análise combinada de campo pelo software MetaXpress®HTS com marcador DAPI e anti-caspase-3 marcado com ficoeritrina (vermelho).....	74
Figura 26 - Representação de resultado da imunofenotipagem com 6 anticorpos.....	75
Figura 27 - Curva-padrão das diferentes citocinas: TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-10.....	81
Figura 28 - Diferenciações adipogênica e osteogênica das CTMs pré-experimento.....	84
Figura 29 - Fotos com as diferenciações das culturas de CTM.....	85
Figura 30 - Fotos com as diferenciações das CTMs pós-experimento com LED.....	86
Figura 31 - Fotomicrografias de lâminas histológicas evidenciando a diferenciação condrogênica e outras formações.....	90
Figura 32 - Fotomicrografias de lâminas histológicas evidenciando a diferenciação condrogênica, formação de cartilagem e outras estruturas.....	92
Figura 33 - Imagens de nucleóides geradas pelo software Comet Assay IV.....	96
Figura 34 - Fotomicrografias mostrando CTMs após teste do micronúcleo.....	99

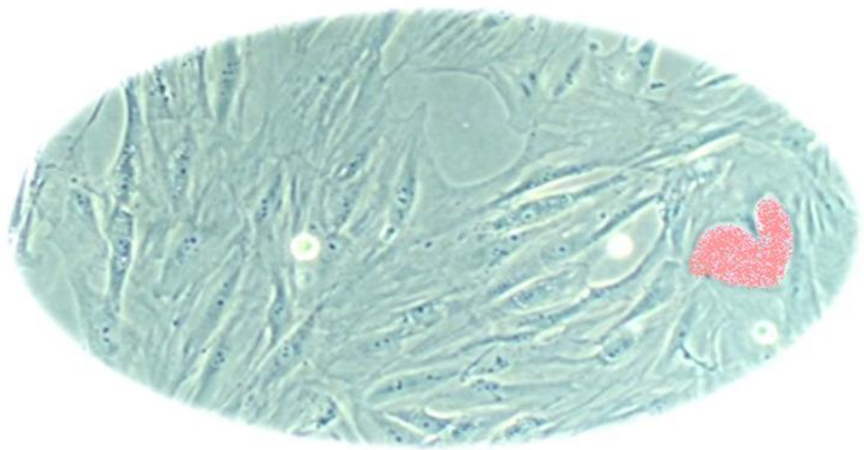
Lista de Gráficos



Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Tempo de confluência a 80% em dias, entre as passagens, segundo a dose de irradiação - dissociação enzimática.....	58
Gráfico 2 - Tempo de confluência a 80% em dias, entre as passagens, segundo a dose de irradiação - dissociação mecânica.....	59
Gráfico 3 - Valores médios da contagem celular para CTMs obtidas por DM, nas diferentes passagens e doses de irradiação.....	62
Gráfico 4 - Valores médios da contagem celular para CTM obtidas por DE, nas diferentes passagens e doses de irradiação.....	63
Gráfico 5 - Média da contagem celular (triplicata), segundo o tipo de dissociação e o tratamento realizado.....	64
Gráfico 6 - Índices de apoptose e necrose em 3 amostras de CTM-TA, pré-experimento, segundo o método de dissociação.....	68
Gráfico 7 - Índice de apoptose e necrose em CTM, segundo o método de dissociação, em 1ª passagem e nas diferentes doses de irradiação.....	71
Gráfico 8 - Valor médios de viabilidade e apoptose e necrose, pós-experimento, segundo o método de dissociação e tratamentos.....	72
Gráfico 9 - Imunofenotipagem com diferentes marcadores de superfície: CD71, CD11b, CD45, CD90, CD44 e CD31, segundo o método de dissociação, pré-experimento.....	76
Gráfico 10 - Imunofenotipagem (expressão dos marcadores de superfície) do pool de 5 amostras dos diferentes tratamentos.....	79
Gráfico 11 - Escore das diferenciações adipogênica e osteogênica advindas de Dissociação Mecânica - pós-experimento.....	88
Gráfico 12 - Escore das diferenciações adipogênica e osteogênica advindas de Dissociação Enzimática - pós-experimento.....	89
Gráfico 13 - Resultados estatísticos dos valores da intensidade da cauda pré-experimento.....	97
Gráfico 14 - Resultados estatísticos dos valores da intensidade da cauda pós-experimento.....	97

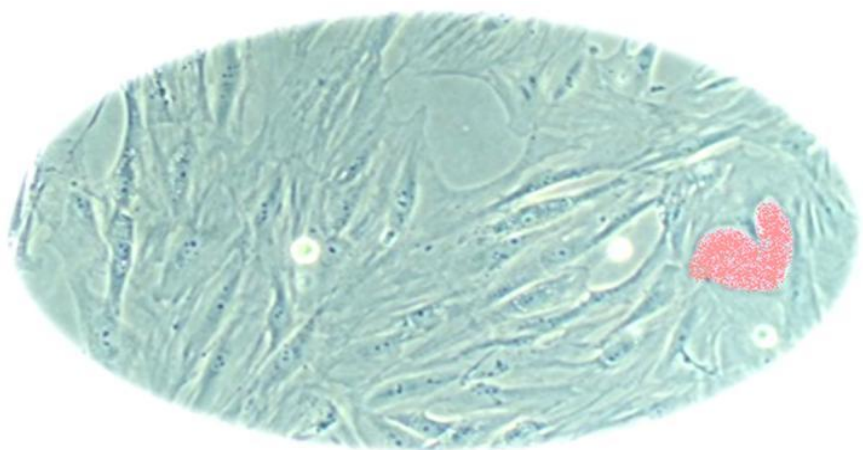
Lista de Quadros



Lista de Quadros

Quadro 1 - Obtenção dos blocos de TA, métodos de dissociação e contagem celular.....	54
Quadro 2 - Indicadores de qualidade entre os métodos de dissociação enzimática e mecânica.....	55
Quadro 3 - Função de marcador CD90, CD44 e CD71 e a média percentual de perda por ação da colagenase tipo I.....	78
Quadro 4 - Determinação de diferentes citocinas nas CTMs obtidas por DM e DE, no pré-experimento, expresso em pg/ml, pelo método CBA Flex.....	81
Quadro 5 - Determinação de diferentes citocinas em primeira e última passagem nas CTMs obtidas por DM e DE, expresso em pg/ml, pelo método CBA Flex....	83
Quadro 6 - Comparação dos potenciais de diferenciação em escore de 0 a 100.....	87
Quadro 7 - Avaliação do potencial de diferenciação por Escore (0 a 5 pontos) das amostras do pós-experimento induzidas à diferenciação condrogênica.....	93
Quadro 8 - Perfil global de todos os tratamentos do experimento (doses e regimes de luz aplicados e tipo de dissociação) correlacionados aos indicadores biológicos avaliados.....	104

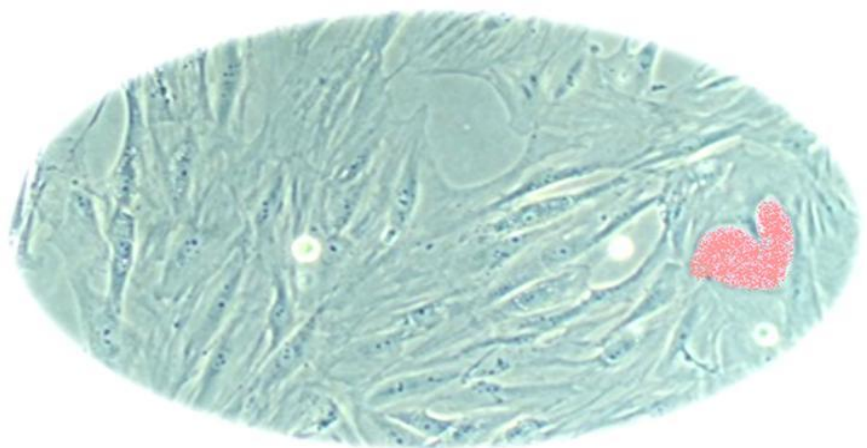
Lista de Tabelas



Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação entre os Marcadores de superfície (CDs) expressos em CTMs de Humanos e Ratos de acordo com estudos realizados recentemente.....	23
Tabela 2 - Medidas de potência (mW)/intensidade (mW/cm ²) placa de 24 poços.....	42
Tabela 3 - Cálculo do desvio em relação à 30mW/cm ²	42
Tabela 4 - Cálculo dos tempos de exposição ao LED.....	45
Tabela 5 - Resultados da análise dos tratamentos do pré-experimento - Mec e Enz.....	100
Tabela 6 - Resultado da análise dos tratamentos do pós-experimento - Mec e Enz...	101

Sumário

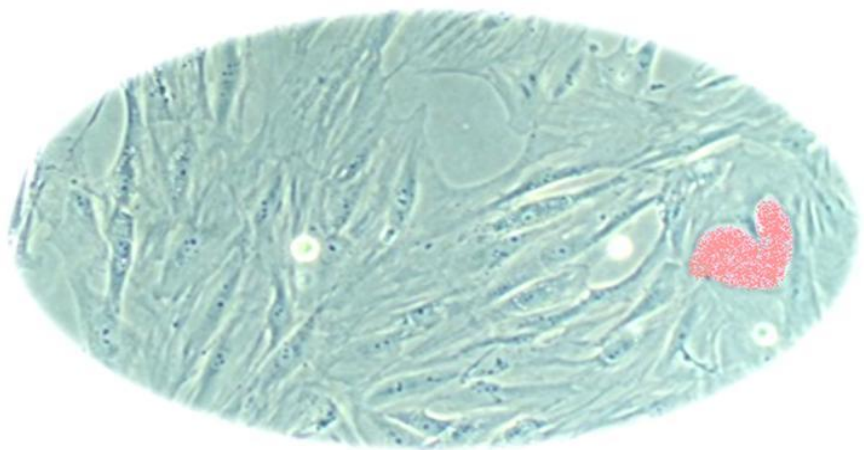


Sumário

1. Introdução.....	20
1.1 Células-tronco Mesenquimais.....	20
1.2 A Óptica do LED e LASER: Definição e Caracterização.....	24
1.3 Interação Luz-tecido Biológico: Aplicabilidades Dentro das Áreas Biológicas e Médicas.....	25
1.4 Justificativa.....	28
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. Material e Métodos.....	31
3.1 Infraestrutura e Instalações do Laboratório.....	31
3.2 Obtenção e Coleta das Amostras - Tecido Adiposo.....	32
3.3 Processamento das Amostras: Pesagem, Dissociações Mecânica, Enzimática e Plaqueamento.....	33
3.3.1 Avaliação do desempenho de indicadores de qualidade comparativos entre métodos de dissociação enzimática X mecânica.....	36
3.4 Contagem e Viabilidade Celular.....	36
3.5 Cultivo, Expansão e Criopreservação das CTMs.....	37
3.6 Caracterizações da CTM – TA.....	38
3.6.1 Caracterização por Citometria de Fluxo: Expressão de Marcadores de Superfície Celular.....	39
3.6.2 Caracterização por Diferenciação em Meios Indutores – Tri-linhagem.....	40
3.7 Bioestimulação <i>in vitro</i> : Uso do LED de Luz Contínua e Pulsátil.....	40

3.8 Testes do Experimento (Pré e Pós): Obtenção de Dados Biológicos Quantitativos e Qualitativos das Culturas de CTM.....	47
3.8.1 Tempo de Confluência a 80%.....	47
3.8.2 Determinação dos Índices de Apoptose e Necrose Celular.....	47
3.8.3 Dosagem de Citocinas.....	50
3.8.4 Índice de Genotoxicidade: Teste do Cometa.....	51
3.8.5 Índice de Genotoxicidade: Teste do Micronúcleo.....	52
3.9 Análise Estatística.....	53
4. Resultados e Discussões.....	54
4.1 Tempo de confluência a 80% - desdobramento entre passagens.....	58
4.2 Contagem e Viabilidade celular.....	59
4.2.1 Aspectos morfológicos das culturas do experimento.....	64
4.3 Índice de Apoptose e Necrose.....	67
4.3.1 Caspase-3: via alternativa de morte celular.....	72
4.4 Imunofenotipagem.....	75
4.5 Dosagem de citocinas	80
4.6 Potencial de diferenciação tri-linhagem.....	83
4.7 Teste do Cometa: índice de genotoxicidade.....	95
4.8 Teste do Micronúcleo: índice de genotoxicidade.....	99
5. Conclusões.....	105
6. Referências Bibliográficas.....	107
7. Anexos.....	113

Introdução



1. INTRODUÇÃO

O impulso biotecnológico com uso de células-tronco (CT) fez emergir nova especialidade médica: a medicina regenerativa (MR), cujas técnicas envolvem a possibilidade de substituição ou reparo de tecidos/órgãos doentes por outros desenvolvidos *in vitro*. Dentre os impasses que permeiam o uso da CT em medicina encontra-se o questionamento da genotoxicidade induzida pelo cultivo celular. Uma vez que a quantidade de células obtidas nem sempre são suficientes para se obter resposta terapêutica. Sabe-se que o sucesso da terapia celular com o uso de CT é dose dependente (RICHARDSON et al., 2013; DALTRO et al., 2015).

O aperfeiçoamento do processo de cultivo de CT que permita a obtenção de maior número de células em menor tempo, garantindo a eficiência e a qualidade do procedimento terapêutico faz-se necessário para beneficiar progressivamente maior número de pacientes, promovendo, desta forma, o tratamento adequado e eficiente de patologias crônicas consequentes do aumento da longevidade populacional.

Frente a esta questão, o presente projeto apresentou dois grandes desafios: comprovar o efeito benéfico quantitativo da fotoestimulação sobre as células-tronco mesenquimais (CTMs) em cultura associado ao tempo de exposição, bem como, comprovar seu efeito positivo proporcionado pelo aumento de secreção de citocinas e fatores de crescimento sem alterar o perfil fenotípico, o potencial de diferenciação e a integridade estrutural/ funcional do material genético das células.

Diante desta situação, as tecnologias envolvendo o LED e sua capacidade comprovada de fotoestimulação, surgiram de forma oportuna para a exploração e discussão do potencial proliferativo das CTMs cultivadas sob a influência deste equipamento emissor de luz.

1.1 Células-tronco Mesenquimais

Células-tronco são por definição células indiferenciadas. As principais características que as tornam muito interessantes são: a capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando reposição ativa e constante de sua população nos tecidos; e a capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, caracterizando dois tipos de divisão celular: a simétrica e a assimétrica (LEMISCHKA, 2005).

Segundo Vats et al. (2002), as CTs podem ser classificadas de acordo com seu potencial como: totipotentes - podem dar origem a todas as células/tecidos de formação do organismo (ex: ovo fertilizado ou zigoto); pluripotentes - originam a maior parte das células/ tecidos do organismo (ex: CT embrionárias e células germinativas embrionárias) e multipotentes - formam um número reduzido de células/tecidos que são restritos de uma camada germinativa (ex: estroma da medula óssea ou CTMs).

De acordo com Vogt (2004) as aplicações das CTs estendem-se à engenharia biotecnológica, que faz uso do rápido potencial de crescimento dessas células para obtenção de tecidos como ossos, pele e cartilagem. Estes tecidos são cultivados e então reimplantados em pacientes com lesões, constituindo a base da denominada terapia celular e medicina regenerativa.

As CTs somáticas ou adultas (CTAs) são células indiferenciadas, raras e encontram-se em tecidos responsáveis pela regeneração (GOMES; GRINFELD, 2008). As CTAs incluem as células hematopoiéticas, mesenquimais, neurais, epiteliais, do cordão umbilical, e inúmeras outras (VATS et al., 2002). Dentre os tipos de CTAs citadas, uma se destaca nos estudos pré-clínicos e clínicos: a célula-tronco mesenquimal (CTM). Esta célula pode ser isolada de várias fontes biológicas, como o cordão umbilical, medula óssea (MO), tecido adiposo, fígado fetal (BARRY, MURPHY, 2004; KERN et al., 2006), periósteo, tecido muscular e órgãos parenquimatosos, cuja localização é perivascular nos tecidos adultos e a quantidade é pequena (MAMBELLI et al., 1999; MEIRELLES et al., 2008; ZUCCONI et al., 2009).

De acordo com Barry e Murphy (2004), Kern (2006) e Pittenger (1999), as CTMs são consideradas candidatas para aplicação em terapia celular devido aos seguintes critérios: a) facilidade de coleta; b) obtenção do próprio paciente; c) alta capacidade de proliferação celular *in vitro* permitindo a adequação do número de células para transplante; d) capacidade multipotente de diferenciação celular; e) fácil manipulação; f) potencial de mediação do processo imune; g) habilidade de integração no tecido hospedeiro e interação com o tecido circunjacente; h) característica própria de aderência às superfícies plásticas adequadas para se multiplicarem, otimizando o processo em cultura. Além disso, deve-se considerar a facilidade de isolamento destas células e a potencialidade de emprego em transplantes alogênicos (BOBIS; JAROCHA; MAJKA, 2006).

Pesquisas relacionadas com as células atualmente designadas como CTMs datam dos anos 60 e 70, quando o Dr. Alexander J. Friedenstein e colaboradores iniciaram pesquisas com células fibroblásticas da medula óssea de roedores e coelhos.

A cultura de CTMs em condições adequadas de cultivo exibem morfologia fibroblastóide, adesão em substrato plástico, autorrenovação e diferenciação em tipos celulares distintos. São células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação. (MENDELOW et al., 1980; PITTINGER et al., 1999; NARDI, MEIRELLES, 2006). Elas não apenas regeneram tecidos de linhagem mesenquimal como osso (CHAMBERLAIN et al., 2004; ARINZEH et al., 2003), cardiomiócitos (GRINNEMO et al., 2004), cartilagem articular e articulação do joelho (BARRY, 2003), mas também se diferenciam em células derivadas de outras camadas embrionárias, incluindo neurônios (SUGAYA, 2003), epitélios em pele, pulmão, fígado, intestino, rim, e baço (CHAPEL et al., 2003; DENG et al., 2003; ORTIZ et al., 2003). Tais características de plasticidade sugerem que a CTM seja responsável pelo *turnover* e manutenção dos tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Elas tornaram-se foco de muitas pesquisas por gerar perspectivas clínicas promissoras à terapia celular (MONTEIRO et al., 2009).

As CTMs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, os receptores para fatores de crescimento e secretam citocinas por elas produzidas permitindo interações com demais células (HUSS, 2000; BOBIS et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (WAN et al., 2008; CAPLAN, 2009).

Os marcadores de superfície estão presentes, em conjunto, em todas as células do organismo, caracterizando a singularidade biológica e a marca das células que os contêm (COVAS, 2006). Contudo, as CTMs apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos (ALHADLAQ; MAO, 2004; MEIRELLES et al., 2006), sendo sua caracterização baseada na identificação de um perfil de marcadores específicos e não específicos.

As CTMs humanas e de rato demonstram ser CD34, e alguns trabalhos relatam variações na expressão de CD34 em murinos (PEISTER et al., 2004). É geralmente aceito que todas as CTMs são desprovidas do marcador hematopoiético CD45 e do endotelial CD31 (CHAMBERLAIN et al., 2007). A tabela 1 lista os marcadores de superfície de CTM típicos de cada espécie.

Tabela 1 - Comparação entre os Marcadores de superfície (CDs) expressos em CTMs de Humanos e Ratos de acordo com estudos realizados recentemente

Tabela comparativa de Marcadores de Superfície (CDs) de CTMs			
HUMANOS		RATOS	
Expressar	Não Expressar	Expressar	Não Expressar
CD71	CD11b	CD90	CD11b
CD73	CD14	CD44	CD31
CD90	CD18	CD71	CD45
CD105	CD31		
CD44	CD34		
Stro-1	CD40		
CD106	CD45		
CD166	CD80		
CD29	CD86		
	Antígenos leucocitários (HLA-DR)		

Fonte: Woodbury et al., 2000; Peister et al., 2004; Chamberlain et al., 2007; Bydlowski et al., 2009; Poliseti et al., 2010

Existem diversos estudos referentes à manipulação, cultivo e aplicação de CTMs de rato, Alhadlaq et al. (2004) investigaram a possibilidade de criar cõndilos articulares na forma humana usando CTMs de MO de rato. Obtiveram resultados que reforçam a possibilidade de substituir esses tecidos degenerados por CTMs adultas. Em outra pesquisa realizada, foram isoladas CTMs de ratos a partir da MO, sinóvia, periósteo, gordura e músculo e comparadas as propriedades de rendimento, expansão e multipotencialidade adipogênica, condrogênica e de calcificação e determinada a fonte de células adequada para cada característica. (YOSHIMURA et al., 2007). Woodbury et al. (2000) demonstraram o potencial de diferenciação de CTM da MO humana e de rato adultos em neurônios. Isso prova que se pode induzir tais células a superar o compromisso mesenquimal e constituir um reservatório celular abundante e acessível para tratar várias doenças neurológicas.

A necessidade crescente do uso de CTs em MR resgata a importância da terapia celular como atividade inter e transdisciplinar. Sob este prisma, destaca-se a contribuição e grande importância da biofotônica, que faz convergir atividades da física

quântica, da química e da biologia. O surgimento de diodos emissores de luz, os LEDs (*Light Emitting Diode*), é considerado como a terceira revolução da óptica que trouxe à luz o conhecimento de que moléculas e estruturas biológicas interagem com a luz modificando seu comportamento causando microalterações que fazem a célula redirecionar seu curso no ciclo vital. Este potencial tem sido utilizado em medicina, odontologia e biologia no tratamento de doenças, no controle de infecções e como bioestimulador e biofotoseleção. Fez-se necessária, portanto, uma revisão sobre diodos (BAGNATO, 2008, p. 11-12).

1.2 A Óptica do LED e LASER: Definição e Caracterização

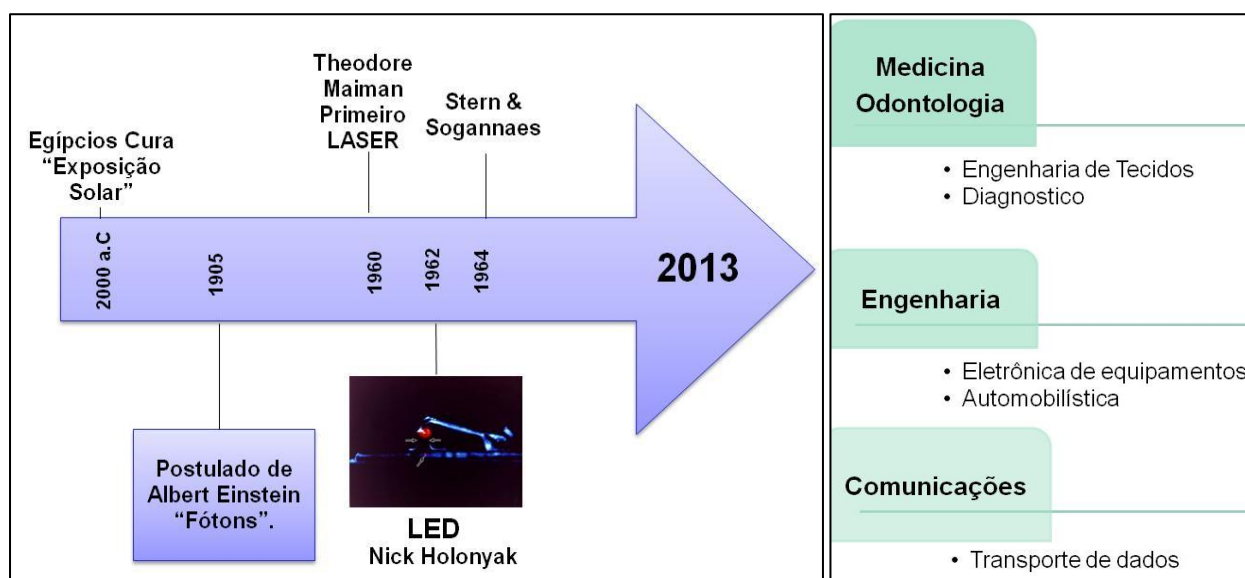
A óptica é um campo da física que lida não somente com a propagação da luz, mas também com a produção da luz e, principalmente, seus mecanismos de interação com a matéria. A grande aplicabilidade da óptica hoje em dia deve-se, bastante, à existência do raio LASER (*Light Amplified by Stimulated Emission Radiation*). Funcionando como fonte de luz de características únicas, o LASER possui propriedades especiais que o tornam um excelente instrumento de uso científico e tecnológico nas áreas ligadas à saúde (BAGNATO, 2001).

O LASER representa um dispositivo constituído por substâncias de origem sólida, líquida ou gasosa que produzem um feixe de luz, frequentemente conhecido como “raio LASER”, quando excitadas por uma fonte de energia. É considerado um instrumento de altíssima precisão geométrica, aumentando, assim, sua aplicabilidade (BAGNATO, 2008). Tal dispositivo pode ser classificado em duas categorias: LASER de alta potência ou cirúrgico, com efeito térmico, apresentando propriedade de corte, vaporização e hemostasia, e LASER de baixa potência ou terapêutico, com propriedade analgésica, anti-inflamatória e de bioestimulação (SILVA et al., 2007; BARROS et al., 2008).

Os LEDs de potência são diodos emissores de luz que funcionam diferentemente da emissão de luz comum. Isso ocorre porque a emissão de luz do LED é oriunda de uma recombinação de elétrons com defeitos (buracos) no momento da passagem de corrente elétrica em um determinado material semiconductor. Os LEDs apresentam grandes vantagens que os tornaram destaque para uso em outros campos da ciência e tecnologia, sendo elas: longa duração, facilidade e conveniência de uso, alta potência gerada e não poluentes ao ambiente (sem mercúrio), podem ser

produzidos em tamanhos muito pequenos, permitindo seu uso em equipamentos e dispositivos portáteis, além de garantirem o avanço tecnológico necessário para os campos biomédicos (BAGNATO, 2008, p.13-14). A figura 1 mostra uma linha do tempo sobre surgimento do LASER e LED dentro da ciência desde a antiguidade até os dias atuais e as aplicabilidades dos mesmos em várias áreas da ciência, tecnologia e comunicação, evidenciando a grande importância dessa evolução.

Figura 1 – Linha do tempo do surgimento e aplicabilidades do LASER e LED nas ciências, tecnologia e comunicação.



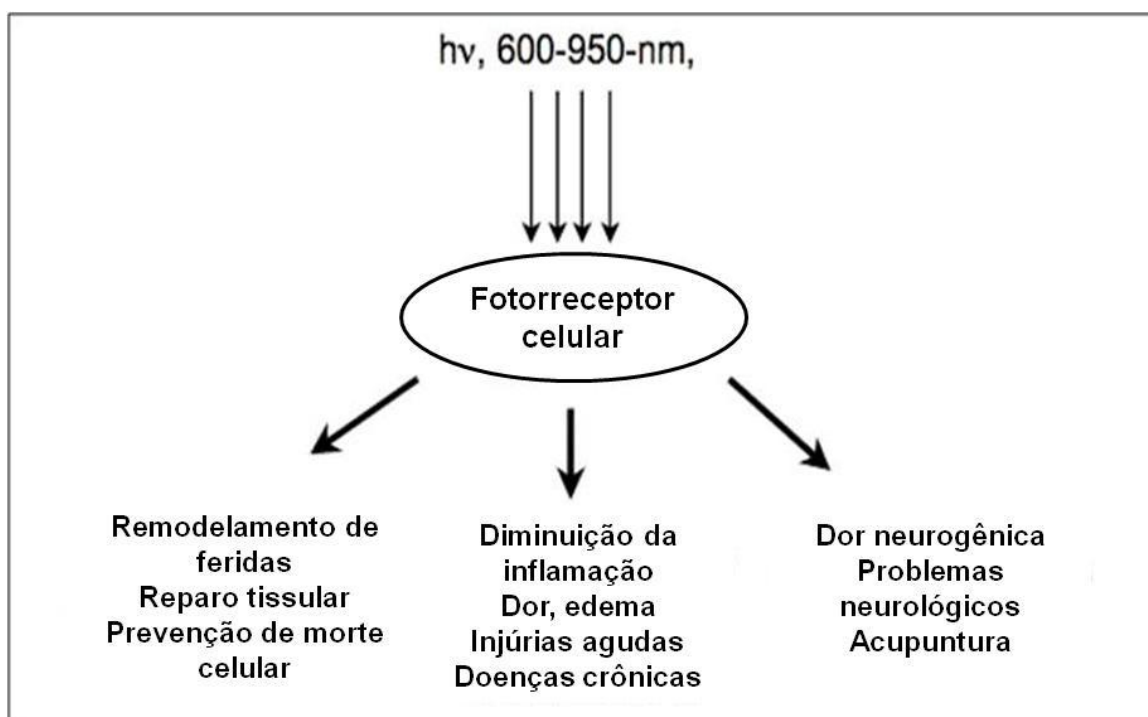
Fonte: MION, W. 2014

1.3 Interação Luz-tecido Biológico: Aplicabilidades Dentro das Áreas Biológicas e Médicas

Recentemente, a utilização do LASER de baixa energia (LBE) vem sendo pesquisada por inúmeros autores como medida adjuvante na cicatrização de feridas de partes moles. Tem sido sugerido que o LBE aumenta o metabolismo celular, estimula a fosforilação oxidativa e reduz a resposta inflamatória local, alterando positivamente as propriedades eletrofisiológicas do tecido irradiado (CAPON et al, 2001; REDDY, 2003). Estudos *in vitro* de culturas de queratinócitos revelaram que o LBE estimula a liberação de citocinas (IL-6 e IL-8) e fatores de crescimento e diferenciação (FGF – *fibroblast growth factor*) envolvidos no processo de reparo cutâneo (PEREIRA et al., 2002; MOORE et al., 2005).

Segundo Genovese (2000), os efeitos biológicos que o LBE ou terapia a LASER de baixo nível (LLLT) provoca nos tecidos consistem em energia luminosa, que se deposita sobre os mesmos e se transforma em energia vital, produzindo efeitos primários, secundários e terapêuticos gerais (natureza analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante). Na figura 2 pode-se observar uma representação desta ação da luz sobre a célula nos comprimentos de onda que variam do vermelho (600 nm) ao infravermelho (950 nm) e os respectivos efeitos gerados sobre elas.

Figura 2 - Ilustração da ação da luz de 600 a 950 nm sobre a célula e seus efeitos subsequentes



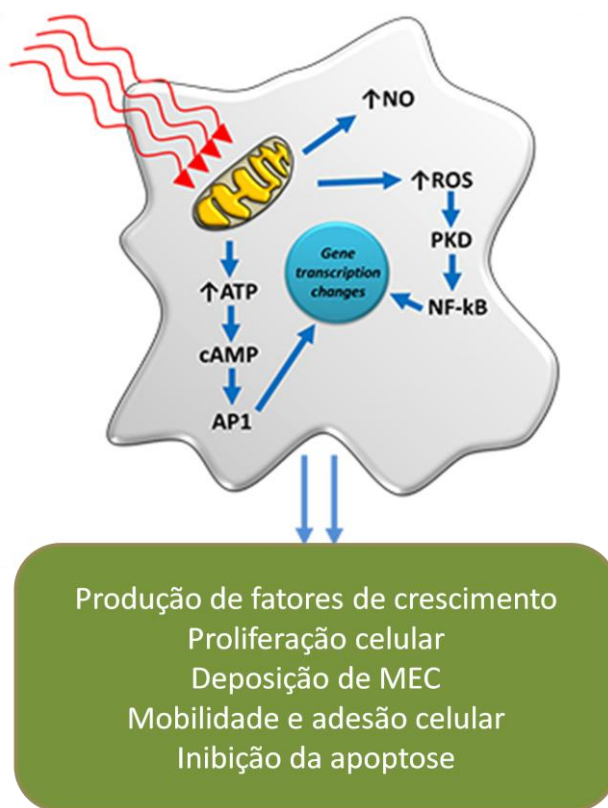
Fonte: HAMBLIN, M. R; DEMIDOVA, T. N., 2006 - <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/TermsOfUse.aspx>

O uso do LED como recurso terapêutico ampliou-se na última década. Estudos desenvolvidos pela NASA (*National Aero Space Agency*), nos Estados Unidos, demonstraram fortes evidências de que a eficiência dos LEDs em processos de fotoestimulação celular e de proliferação celular *in vitro* é semelhante à do LASER de baixa intensidade (VINCK et al., 2003). Ambos LASER e LED são utilizados para diferentes tipos de aplicações no diagnóstico e tratamento de doenças ou mesmo por bioestimulação da regeneração de tecidos. Mais recentemente, o LASER tem provado ser uma excelente ferramenta terapêutica, possuindo capacidade biostimuladora, bem

como fazendo parte de terapias modernas, como a terapia fotodinâmica (PDT) entre outros (BAGNATO et al, 2006).

O princípio da bioestimulação promovida pelo LASER terapêutico foi introduzido há mais de 20 anos, sendo aplicado, inicialmente, na dermatologia, no processo de reparo de feridas cutâneas. Logo após, sugeriu-se que a bioestimulação também poderia ser útil para acelerar a cicatrização de feridas de dentro da boca (CATÃO, 2004; CAMELO, 2007). Dos efeitos bioestimulantes mediados pelo LASER de baixa potência no reparo tecidual, destacam-se: indução da atividade mitótica das células epiteliais e fibroblastos; estímulo à produção de colágeno por estas últimas células; inibição secretória de alguns mediadores químicos; modificação da densidade capilar e estímulo à microcirculação local (SILVA et al., 2007; MALUF et al., 2006; CONLAN, RAPLEY, COBB, 1996; WALSH, 1997). A figura 3 mostra efeitos secundários desencadeados pela ação inicial do LED sobre a CTM, efeitos esses de extrema relevância e necessidade para processos de cultura celular.

Figura 3 - Imagem representando os efeitos produzidos pela CTM pelo estímulo com LED



Fonte: adaptado de University of Birmingham (2015) - <http://www.birmingham.ac.uk/research/activity/dentistry/research/photobiomodulation/index.aspx>.

Evidências recentes sugerem que a irradiação com laser de baixa energia também poderia aumentar a proliferação de células-tronco em cultura, incluindo CTMs, CTs cardíacas e da polpa dentária (GIANNELLI et al, 2012). Estudos sugerem que a aplicação de um único tratamento com LED de 660 nm aumenta a atividade de fase inicial do DNA e promove a proliferação celular de células de osteoblastos *in vitro* (CANKAYA et al., 2011). Kim et al. (2009) relataram uma diferenciação muito mais rápida em culturas de osteoblastos de fase inicial após tratamento com LED. Também observaram que o aumento da atividade da fosfatase alcalina influenciou na diferenciação precoce de células progenitoras e estimulou a proliferação celular, resultando numa alta contagem de células na fase inicial. Outro estudo importante que traduz a ação da luz do LASER foi desenvolvido por Barbosa et al. (2011). Neste trabalho, foi avaliada a função mitocondrial de fígado remanescente (princípio da regeneração) em ratos após hepatectomia à 70%, com uso do LASER em 660 nm. Observou-se que o LASER revelou efeito positivo: não induziu lesão ao fígado remanescente, além de parecer retardar a sobrecarga hepatocelular do mesmo.

Como se trata de uma pesquisa inovadora, as informações adicionais na literatura especializada surgem a cada dia. Diante disto destacam-se algumas pesquisas recentes. Ong et al. (2013), na *Biomaterials*, intitulado *The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode irradiation*, conclui que as células-tronco mesenquimais são sensíveis ao LED verde que induz a migração celular direcionada. No presente projeto, propôs-se o uso do LED vermelho (630 nm). Barboza et al. (2014) publicaram o artigo *Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells* concluindo que o laser de baixa potência bioestimula as células-tronco mesenquimais de rato, sem ocasionar dano no núcleo corroborando com os dados de Giannelli et al. (2013) no artigo *Photoactivation of bone marrow mesenchymal stromal cells with diode laser: effects and mechanisms of action*, publicado no ano passado.

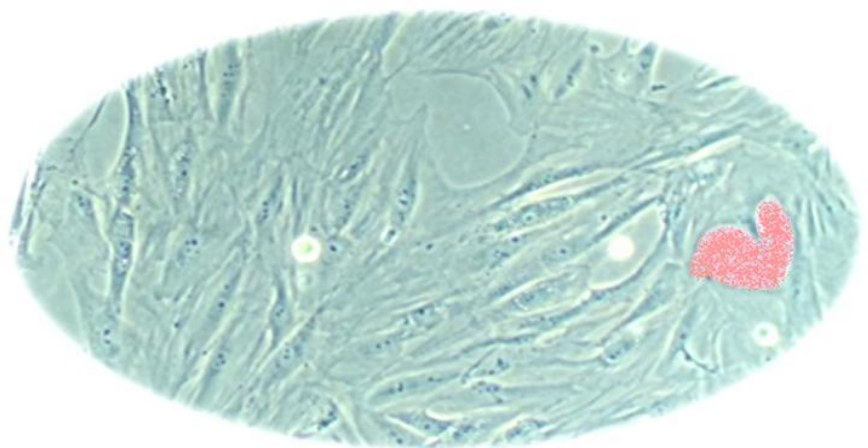
1.4 Justificativa

Tendo em vista a rápida progressão dos protocolos clínicos na pesquisa usando CTMs, cultivá-las sem provocar dano de DNA e tumorigênese, proporcionaria o uso das mesmas, em quantidades terapêuticas adequadas, em menor espaço de

tempo. A validação da bioestimulação de CTMs com uso de LEDs resultaria no uso das mesmas em doenças agudas, em especial traumas medulares, infarto agudo do miocárdio, acidentes vasculares cerebrais, feridas crônicas e agudas, etc. Uma vez indicado o uso das CTMs, para se obter em condições normais de cultura as quantidades adequadas, seriam necessários de 20 a 30 dias de cultivo, período este em que determinadas lesões já estabeleceram sequelas crônicas. As informações mais recentes corroboram a hipótese formulada para este trabalho de que a fotoestimulação seja uma grande aliada da Medicina Regenerativa contribuindo com a expansão de células-tronco mesenquimais em menor espaço de tempo.

Diante do exposto, deve-se destacar a importância da biofotônica para a área biomédica, dentre elas a associação à cultura celular, pois pode apresentar soluções de otimização de processos que determine melhor viabilidade econômica das terapêuticas envolvendo a medicina regenerativa, sejam elas a terapia celular com uso de CTs, órgãos reestruturados pela engenharia de tecidos ou imunomodulação com o uso de citocinas produzidas pelas CT.

Objetivos



2. OBJETIVOS

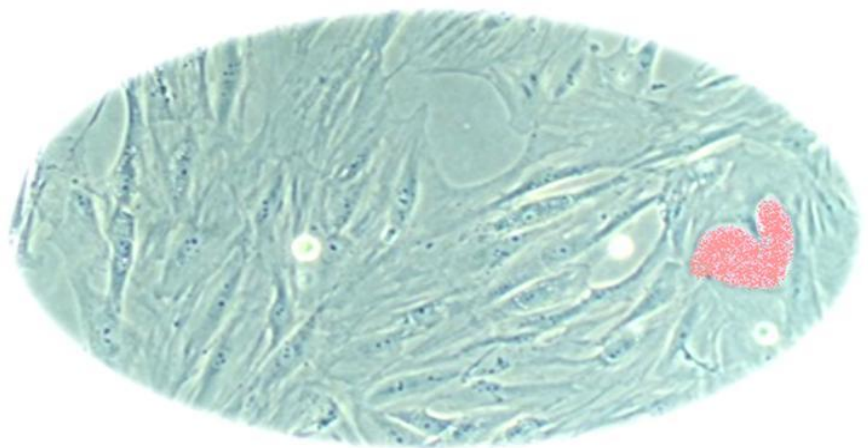
2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação do LED, emitindo luz em 630 nm, como bioestimulador de CTM em cultura em duas diferentes situações: exposição à luz contínua e à luz pulsátil.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o desempenho de indicadores de qualidade comparativos entre métodos de dissociação enzimática X mecânica.
- ✓ Estabelecer parâmetros quantitativos e qualitativos das CTMs pelo uso do LED como bioestimulador:
 - determinar a contagem, viabilidade e o tempo de confluência em cultura a 80%;
 - caracterizar a expressão de marcadores de superfície;
 - estabelecer o índice de apoptose e necrose;
 - monitorar a secreção de citocinas;
 - determinar o potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica;
 - analisar o índice de dano do DNA.

Material e Métodos



3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Celular (LEC), associado ao Programa de Pós-graduação em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Botucatu. As culturas celulares seguiram critérios estabelecidos pelo Procedimento Operacional Padrão (POP) do LEC do Hemocentro de Botucatu e este trabalho recebeu aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa no uso de animais da FMB (CEUA), cujo número de protocolo recebido foi nº 1009/2013.

3.1 Infraestrutura e Instalações do Laboratório

O Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro conta com a instalação de dois laboratórios internos de uso contínuo: LAC (Laboratório de Atividades Complementares) e Área Limpa, na qual foram realizadas todas as etapas de isolamento e cultura celular bem como o experimento com o LED.

O LAC integra a seção de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu e iniciou suas atividades em dezembro de 1992. Durante este período, fontes de financiamento de pesquisas vigentes no país, em especial FAPESP, CNPq, BNDES, FINEP e FNS deram suporte à pesquisa. As atividades tiveram um primoroso crescimento dando hoje origem a três diferentes linhas de atuação. São elas: a) cultura de células-tronco de diferentes espécies, b) obtenção de anticorpos monoclonais murinos, c) produção de curativos bioativos com foco na terapêutica humana. Essas três linhas de pesquisa ocupam uma área correspondente a 1200m² classificados nas categorias:

Laboratório convencional ou *standard* – LAC, onde são desenvolvidas as atividades: viabilidade celular, contagem celular, técnica de ELISA, preparo de tampões, eletroforese de proteínas em gel de agarose ou poliacrilamida, purificação de proteínas pela técnica de cromatografia de afinidade, *Western blotting*, imunodifusão (*Ouchterlony*), imunofenotipagem, técnicas de hemaglutinação, entre outras.

Área Limpa classificada 10.000. Laboratório de contenção de nível III de segurança, P3 ou BSL-3 dentro da classificação internacional do matiz da OMS de laboratórios segundo a periculosidade, presença ou não de medidas preventivas e de vacinação além do risco para o meio ambiente e para o homem. Esta área possui

sistema de ar filtrado sob pressão positiva com filtros HEPA, apresenta vestiário específico com ducha na entrada e colocação de equipamentos de proteção individual (EPIs) de circulação interna.

3.2 Obtenção e Coleta das Amostras - Tecido Adiposo

Os fragmentos de tecido adiposo (TA) foram obtidos de ratos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da FMB, animais saudáveis, peso variável de 250g a 350g, machos, com idade média de 3 meses. O número amostral estabelecido estatisticamente foi de 15 animais, após análise detalhada do projeto com bioestatístico, Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu. Este alto número, em razão da grandeza do experimento, trouxe consequente aumento das atividades de obtenção, dissociação e cultura das células para expansão. Nem todos os animais liberados para o experimento estavam no peso ideal (próximo aos 400 g) determinado para a coleta do tecido adiposo. Diante disso, os mesmos foram colocados em regime de engorda e receberam o tratamento com ração adequada, água e condições ambientais necessárias até atingirem o peso ideal.

O procedimento foi realizado na sala de cirurgia do Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) sob supervisão e auxílio de médico veterinário e de zootecnista responsáveis pelo setor.

Os animais foram anestesiados com os medicamentos injetáveis Dopalen® à base de Ketamina (80 mg/Kg) e Anasedan® à base de Xilazina (5 mg/Kg) e higienizados com álcool 70° iodado para assepsia e prevenção de contaminação.

Os animais foram operados com o uso de campo cirúrgico, luvas e instrumentação cirúrgica estéril (pinças de dissecação anatômica, Kelly e dente de rato, tesouras Metzenbaum, cirúrgica fina-fina e romba-romba, bisturi, cabo de bisturi e gaze) dentro de capela de fluxo laminar para garantir um procedimento estéril (Figura 2). Os blocos de tecido adiposo coletados foram provenientes da região inguinal dos animais (dos lados direito e esquerdo) e, imediatamente após a coleta, foram colocados em tubo cônico estéril de 50 mL, contendo meio HEPES, suplementado com antibiótico e antimicótico específicos (penicilina, streptomina e anfotericina), para acondicionar o material biológico (Figura 4).

Os tubos contendo a gordura foram transportados em caixas isotérmicas para o Laboratório de Engenharia Celular (LEC) onde o material biológico foi processado. Na primeira etapa do início do processamento, a amostra de gordura foi colocada em laboratório de Quarentena, sob refrigeração à +/- 4°C durante 24 horas. Este procedimento se faz necessário para se minimizar as contaminações eventuais que possam ter ocorrido durante o período de coleta. Desta forma, a amostra só foi transferida para Área limpa a fim de ser manipulada, após ser confirmada a “não contaminação”.

Figura 4 – Fotos da obtenção do TA de rato em fluxo laminar



Legenda – A imagem à esquerda representa o procedimento cirúrgico em fluxo laminar e a imagem à direita mostra o bloco de tecido adiposo recém-coletado para armazenamento em geladeira por 24 h e posterior procedimento de dissociação. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

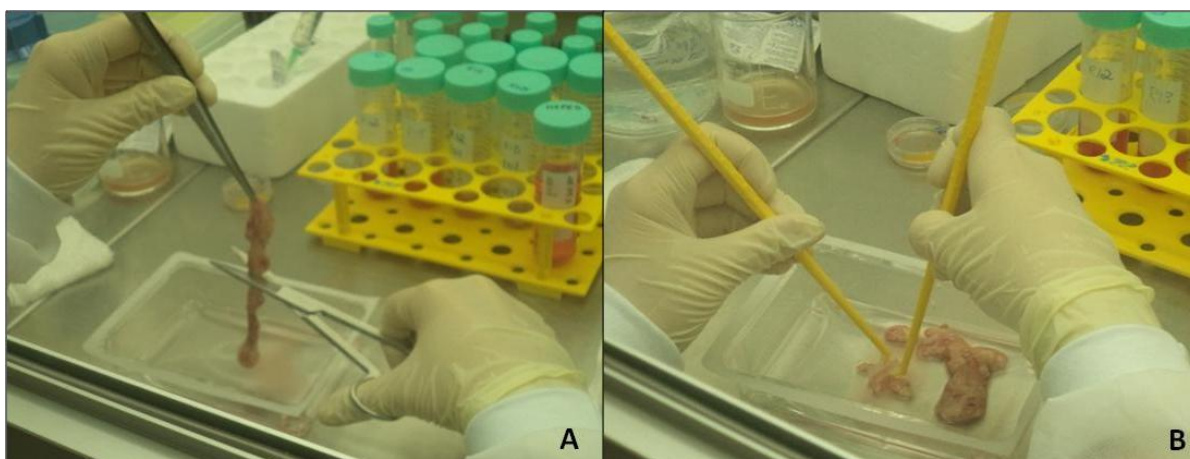
3.3 Processamento das Amostras: Pesagem, Dissociações Mecânica, Enzimática e Plaqueamento

O bloco inteiro de tecido adiposo de cada animal, após 24 horas de manutenção em geladeira, destinou-se à manipulação no equipamento Fluxo Laminar (Trox® Technik) da sala de quarentena do LEC, sob condições estéreis. Procedeu-se, então, à lavagem dos blocos de TA com cloreto de sódio 0,9% e com auxílio de uma pinça para segurar o tecido. O bloco de TA foi colocado em placa de Petri de plástico estéril com tampa e pesado em balança analítica (GR200 modelo D0001, A&D Company®). Os pesos da gordura total coletada de cada animal foram registrados. Após a pesagem, o bloco de TA foi dividido em duas partes ligeiramente diferentes com auxílio de tesoura

dentro do fluxo laminar, sendo novamente pesados e destinadas às técnicas de dissociação mecânica e enzimática, afim de se obter maior número de células-tronco mesenquimais. Todo o material utilizado nessa etapa de manipulação e processamento das amostras estava sob condição estéril.

Para a dissociação mecânica, o bloco de tecido adiposo foi colocado em berço plástico estéril com pequena quantidade de HEPES e cortado com uso de tesoura cirúrgica em pequenos fragmentos. Com o uso de um par de *cell scraper* (Nunc®), foi feita a fixação dos fragmentos de TA com a mão esquerda e com a direita foram realizados movimentos suaves, com leve pressão sobre o tecido, seguido de “raspagem” para a remoção e isolamento das células (Figura 5).

Figura 5 - Fotos do processo de dissociação mecânica com tesoura e *cell scraper*



Legenda – (A) corte do bloco de TA com tesoura; início da dissociação. (B) dissociação própria com uso do cell scraper, para raspagem do TA e desprendimento das CTMs. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

Após tal procedimento, esse conteúdo formado por células, vesículas de gordura, fragmentos celulares e HEPES foi sugado por uma seringa e permaneceu sob descanso por 15 minutos com o bisel direcionado para baixo, para que, nesse intervalo de tempo, houvesse a decantação do conteúdo celular embebido em meio e o sobrenadante repleto de restos celulares (*debris*) ficasse separado. Em seguida, o conteúdo celular (porção inferior da seringa), foi destinado aos processos de lavagens, contagem e plaqueamento.

Para a dissociação enzimática, que consiste na obtenção de células através de processamento químico (enzimático) do tecido de interesse, o bloco de tecido adiposo foi lavado abundantemente com solução fisiológica, colocado em placa de Petri estéril com pequena quantidade de HEPES e cortado em fragmentos com uso de tesoura cirúrgica. Esses fragmentos, juntos, foram pesados em balança de precisão (GR200 modelo D0001, A&D Company®), embebidos em meio HEPES e reservados em fluxo laminar. Paralelamente, procedeu-se a preparação da solução contendo a enzima colagenase tipo I. A colagenase tipo I é responsável por quebrar ligações entre aminoácidos neutros e glicina na sequência Pro-X-Gly-Pro, encontradas em alta frequência nas fibras colágenas de tecidos conjuntivos como pele tendões, vasos sanguíneos e osso, atuando de forma satisfatória sobre a digestão de gordura, adrenais, fígado e outros tecidos (Gibco®).

Uma solução de 2 mg de colagenase/mL de HEPES foi preparada em fluxo laminar de acordo com o peso do TA de cada amostra animal. Utiliza-se 2 mL de meio HEPES por grama de tecido adiposo pesado. Diluiu-se a colagenase no meio HEPES, obtendo-se a solução final de 2 mg/mL. Em seguida, procedeu-se a sua homogeneização e filtragem em filtro de 0,45 µm (BD®), com intuito de eliminação de *debris*. Depois, os fragmentos de TA reservados em fluxo laminar foram adicionados à solução enzimática. O tubo foi levado à estufa a 37°C com 5% de CO₂ permanecendo *overnight* por 15 horas. No dia seguinte, pela manhã, adicionou-se igual volume de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) para a inativação enzimática e interrupção do processo de dissociação.

No processo de lavagem, após ambas as dissociações, os tubos cônicos com o conteúdo celular foram centrifugados à 1200 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente em Centrífuga Eppendorf®, levando a formação de um botão celular (*pellet*), que representa um conjunto de células sedimentadas no fundo do tubo e que será destinado ao plaqueamento em frascos plásticos de cultura aderente (TPP®) de 25cm² na presença do meio de cultura DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Minimal Essential Medium* - Invitrogen®) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Invitrogen®) (total de 6mL) de acordo com os resultados da contagem. Os frascos com as células foram mantidos em estufa apropriada a 37°C com atmosfera úmida controlada a 5% de CO₂ e 95% de oxigênio.

3.3.1 Avaliação do desempenho de indicadores de qualidade comparativos entre métodos de dissociação enzimática X mecânica.

Foram estabelecidos indicadores de qualidade para a análise de custo X benefício, comparativos, entre os métodos de dissociação. Os indicadores foram:

- ✓ Tempo médio em horas:
 - homem/hora/trabalho;
 - obtenção;
- ✓ Número de LMN/g de tecido;
- ✓ Facilidade/Dificuldade operacional;
- ✓ Habilidade do manipulador;
- ✓ Risco de contaminação;
- ✓ Custos diretos/amostra.

3.4 Contagem e Viabilidade Celular

Esses parâmetros são essenciais na prática da cultura celular. Tal procedimento deve ser realizado primeiramente ao final do processo de isolamento celular (por meio das dissociações), a cada tripsinização ou experimento do qual se necessita saber a quantidade aproximada de células por área do frasco. Além disso, também é realizada quando se procedem as técnicas de criopreservação. A contagem celular foi realizada por contador Automático (CA), Countess™.

Na contagem automática, o equipamento Countess™ utiliza-se das propriedades da ótica e análise de imagem para automatizar a contagem celular, possibilitando ainda a quantificação em porcentagem da viabilidade da amostra (células vivas, mortas, e o número total) com rigor e precisão, utilizando a técnica de azul de tripan como corante padrão. O contador leva 30 segundos por amostra para a contagem das células e é compatível com uma grande variedade de células eucarióticas fornecendo informação sobre tamanho da célula. Uma única medição, em 30 segundos fornece: concentração de células vivas e mortas/mL concentração total de células/mL, viabilidade, porcentagem de células vivas para as células totais. A figura 6 abaixo mostra a câmara de contagem que é inserida no aparelho (à esquerda).

Figura 6 - Câmara de contagem para o contador automático e modelo ilustrativo Countess BD®.



Fonte: arquivo pessoal, 2013.

3.5 Cultivo, Expansão e Criopreservação das CTMs

O conteúdo celular total, proveniente dos 2 métodos de dissociação, foi destinado à cultura para posterior expansão das CTMs em número e passagens (repicagens), que determinam o amadurecimento cronológico ou fisiológico (envelhecimento/senescência celular). Para a manutenção e crescimento celular, as células nos frascos foram tratadas com meio de cultura DMEM-F12 contendo aditivos necessários e específicos (antibióticos, antimicóticos, aminoácidos, entre outros) para CTMs e a troca do mesmo foi realizada 2 vezes por semana, por meio da aspiração e reposição de meio novo (SOUTO, KOMMERS et al., 2006). Uma vez por semana e antes da troca do meio, cada frasco foi observado por microscopia invertida utilizando microscópio Axiovert 200-Zeiss®.

A observação microscópica semanal das células em cultura foi realizada para controle e prevenção de possíveis contaminações dos frascos por bactérias, micoplasmas e fungos diversos que podem estar presentes em nossa pele, materiais de laboratório, equipamentos de proteção individual, ar e superfícies. Durante essas observações, fotografias foram tiradas para registrar o crescimento e aspecto das células, as características da cultura, a confluência celular (percentual da área de distribuição celular na superfície aderente do frasco), a presença de debris celulares, e até mesmo de possíveis agentes contaminantes do meio.

Quando a cultura atingia confluência $\geq 80\%$, as células eram submetidas ao tratamento enzimático com uso da enzima Tripsina EDTA 0,25% (Gibco®) para

proceder à passagem (repicagem) para outro frasco com superfície a fim de expansão celular numérica. A tripsinização é realizada em fluxo laminar e tem início com a lavagem dos frascos com HEPES. Em seguida, o HEPES é aspirado e a tripsina é adicionada ao frasco, que permanece em estufa por alguns minutos, até ocorrer desprendimento das células da superfície aderente do frasco e posterior observação em microscópio para confirmar tal evento.

Realiza-se a inativação enzimática adicionando-se ao frasco meio HEPES com 10% de SFB (o dobro da quantidade de tripsina). Esse meio de cultura com células é destinado à lavagem (centrifugação à 1200 rpm por 10 minutos). Após isso, o *pellet* celular é ressuspenso em HEPES e destinado à contagem e plaqueamento em novo frasco com DMEM-F12. A partir do momento em que as células atingiram a 2ª passagem durante a expansão, elas passaram a ser plaqueadas e cultivadas em placas de 24 poços.

Como houve interesse em formar um banco de células congeladas durante a expansão e cultivo celular para preservação de todas as amostras, as células foram criopreservadas em freezer - 80°C (Thermo®) e posteriormente destinadas ao congelamento em *containers* apropriados contendo nitrogênio líquido a - 196°C. Para tanto, ao final do procedimento de tripsinização celular, o conteúdo celular destinado ao congelamento foi ressuspenso com 1,5 mL de SFB acrescido de 10% de solução criopreservante, o DMSO (dimetilsulfóxido) e colocado em tubo de congelamento e, imediatamente, armazenado em freezer - 80°C.

3.6 Caracterizações da CTM - TA

Desde o plaqueamento inicial, ou seja, após as dissociações mecânica e enzimática, as células foram cultivadas por 4 passagens consecutivas para expansão e obtenção de células-tronco mesenquimais para o início do experimento proposto com a irradiação do LED (*Light Emitting Diode*). Para tanto, houve a necessidade de se comprovar a identidade de CTMs cultivadas por meio de 2 métodos específicos e tradicionais: a imunofenotipagem e a análise do potencial de diferenciação. Tendo em vista a experiência do LEC na obtenção e caracterização das CTM, com métodos padronizados e com Procedimentos Operacionais Padrão bem estabelecidos nos laboratórios de Engenharia Celular e Citometria de Fluxo.

3.6.1 Caracterização por Citometria de Fluxo: Expressão de Marcadores de Superfície Celular

A citometria de fluxo é um sistema multiparamétrico de análise que utiliza do laser para analisar partículas suspensas em meio líquido sob fluxo contínuo. A imunofenotipagem por citometria de fluxo é uma técnica capaz de acessar e analisar populações heterogêneas de células com o propósito de identificar a presença e proporções de várias populações de interesse. Anticorpos marcados com fluorocromos identificam as células pela detecção de antígenos específicos expressos por essas células, chamados marcadores. Esses marcadores são proteínas de membrana envolvidas em comunicação celular, adesão ou metabolismo. Alguns marcadores celulares imunológicos são marcadores de superfície sendo comumente utilizados para detecção em citometria de fluxo para populações imunologicamente específicas e subpopulações. A caracterização imunofenotípica foi realizada nas CTMs após 4 passagens de cultura. A avaliação se deu a partir de um painel imunofenotípico multicolor composto pelos marcadores positivos CD90-PERCP, CD44-FITC e CD71-FITC e negativos CD11b-APC, CD31-PE e CD45-PE (WOODBURY et al., 2000; PEISTER et al., 2004; POLISETTI et al., 2010). Tais marcadores foram analisados por trios de fluorocromos distintos, sendo eles FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), APC (Aloficocianina) e PERCP (Proteína Clorofila Peridinina).

As análises FORAM processadas no equipamento FACSCalibur da BD®, constituído de 4 detectores de fluorescência, do Laboratório de Citometria de Fluxo do Hospital das Clínicas (HC) de Botucatu. Foi utilizado o software CellQuest Pro®, perfazendo avaliação multiparamétrica, incluindo tamanho celular, granulosidade e co-expressão de marcadores de superfície concomitantes. As amostras preparadas para o ensaio continham 10^5 células por tubo. Todos os anticorpos utilizados foram da marca BD® com afinidade para antígenos de rato. As células foram lavadas com solução isotônica, marcadas com o trio de anticorpos determinados (1º trio: CD90, CD44 E CD31; 2º trio: CD71, CD11b e CD45) e após 15 minutos de incubação, fixadas com paraformaldeído (BD®) e levadas para leitura em citômetro de fluxo.

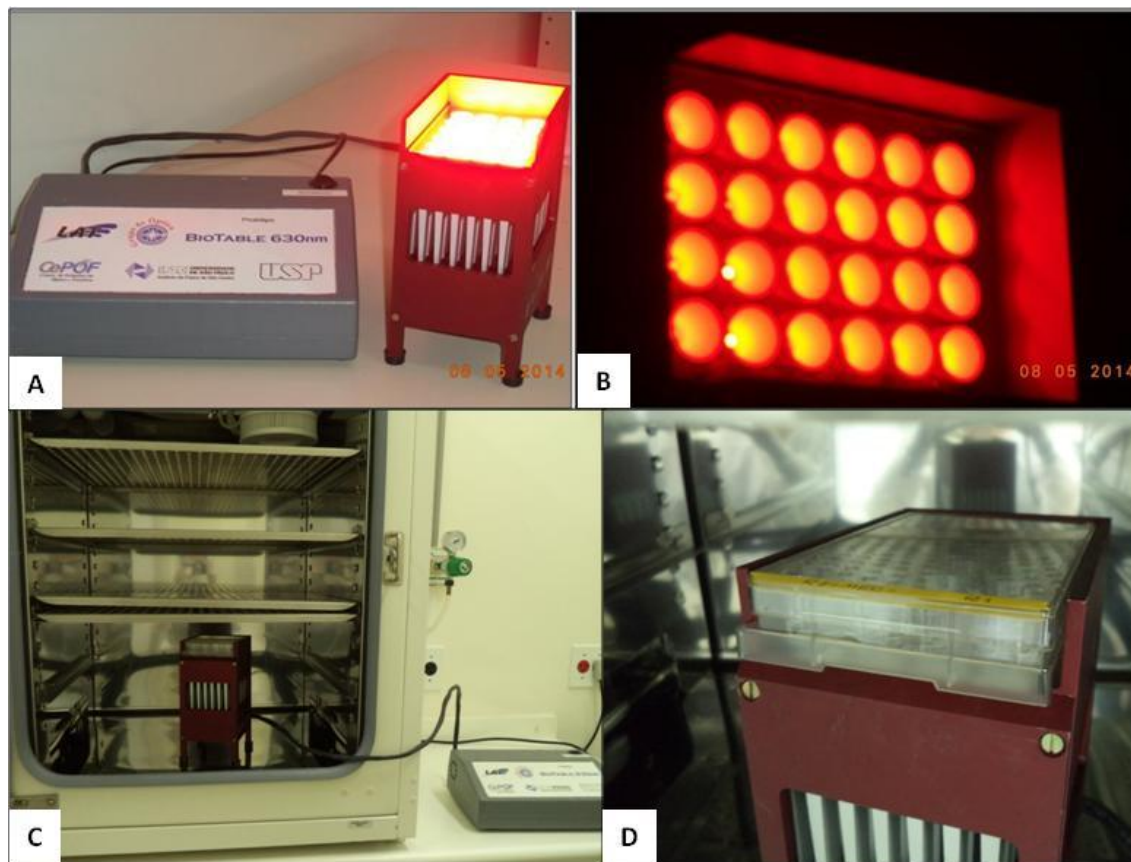
3.6.2 Caracterização por Diferenciação em Meios Indutores – Tri-linhagem

As CTMs obtidas após cultura por 4 passagens foram destinadas ao teste de comprovação do potencial de diferenciação das CTM em 3 diferentes tipos celulares: adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para tanto, foram submetidas à ação de 3 diferentes meios indutores específicos para cada diferenciação, sendo eles: Stempro® adipogen., Stempro® chondro. e Stempro® osteogen. (Life technologies™) segundo instruções do fabricante. Alíquotas de CTM foram colocadas em presença de meio indutor específico. Para a diferenciação condrogênica, após 21 dias de indução, as células foram coradas com Alcian blue®, que coram deposições de colágeno, e contra coradas com HE (Hematoxilina-Eosina); para a diferenciação adipogênica, após 14 dias de indução, foi procedida a coloração citoquímica Oil red O®, que possui afinidade com gotículas de lipídeo, enquanto que para a diferenciação osteogênica, após 14 dias de indução, utilizou-se o corante Alizarin red®, que cora fragmentos de cálcio. As trocas dos meios indutores de cada placa de 24 poços foi realizada 2 vezes na semana, além de registros fotográficos durante a evolução da diferenciação.

3.7 Bioestimulação *in vitro*: Uso do LED de Luz Contínua e Pulsátil

As culturas celulares estabelecidas até a 4ª passagem foram preparadas e destinadas ao experimento proposto. As irradiações foram realizadas com auxílio de 2 equipamentos portáteis tipo protótipo, também conhecidos como mesas difusoras “biotable” (Figura 7), com potência de 30 mW/cm², constituída por LEDs (*Light Emitting Diode*) que emitem luz em 630 nm (visível ao olho humano na cor vermelha), sendo um equipamento com emissão de luz contínua e outro de pulsátil, de propriedade do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF) do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP), com o qual foi estabelecida parceria neste projeto de pesquisa e com outros projetos do Laboratório.

Figura 7 - Detalhe das biotables produzidas pelo CEPOF/LAT e da irradiação dentro da estufa



Legenda – (A) protótipo da biotable constituída por 24 câmaras de LED, ligada à fonte. (B) biotable ligada. (C) biotable instalada dentro da estufa para irradiação. (D) placa de cultura de 24 poços pronta para irradiação. Fonte: arquivo pessoal, 2015

As biotables foram desenvolvidas e validadas pela equipe do CEPOF/LAT (Laboratório de Apoio Tecnológico) em projeto de parceria estabelecido com Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato e sua equipe. Para avaliar a variabilidade da bioestimulação das células em cultura, foram escolhidas e estabelecidas, mediante estudos da literatura, as doses 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 J/cm² (RENNO et al., 2007; TUBY et al., 2007, 2008). A metodologia de aplicação do LED nas culturas *in vitro* seguiram as normas de segurança de acordo com a resolução da ANVISA RDC nº 185/01.

Essas biotables utilizadas no experimento foram projetadas especificamente para receber placas de cultura de 24 poços. Para tanto, antes do uso do equipamento o grupo do LAT realizou uma avaliação da potência com uso do Power meter, modelo LabMax_TOP fabricado pela Coherent, e o sensor LM2-VIS, que mede até 50 mW e comprimento de onda de 400 nm até 1064 nm, com área de 0,49 cm². O erro estimado

para estas medidas foi de $\pm 10\%$. Foi necessária também a avaliação da potência e intensidade de luz para cada poço. Para avaliar se a variação de intensidade de luz entre os poços da extremidade com a região central da placa seria significativa realizou-se a medida individual para cada poço em cada posição de potência.

De acordo com as tabelas 2 e 3 de dados das biotables fornecidas pelo relatório de manutenção do LAT, foi obtido valor médio de intensidade luminosa $30,92 \text{ mW/cm}^2$ dos 24 poços e valor médio de desvio relativo da intensidade luminosa de $103,04\%$ dos 24 poços, igualmente. Tomaram-se as 2 médias como base fundamental de parâmetro para estabelecer um padrão de valores a serem considerados mediante às análises e testes do experimento.

Tabela 2 - Medidas de potência (mW)/intensidade (mW/cm^2) placa de 24 poços

24 Poços / Intensidade Luminosa (mW/cm^2)						
	1	2	3	4	5	6
A	28,92	31,73	32,42	30,87	31,28	28,61
B	28,85	31,81	31,16	31,38	30,03	29,13
C	32,08	31,34	33,31	32,75	28,53	29,70
D	32,43	31,48	33,65	33,25	29,60	27,91

Fonte: CEPOF/LAT-USP, 2015

Tabela 3 - Cálculo do desvio em relação à 30 mW/cm^2

Desvio relativo da Intensidade Luminosa						
	1	2	3	4	5	6
A	96%	106%	108%	103%	104%	95%
B	96%	106%	104%	105%	100%	97%
C	107%	104%	111%	109%	95%	99%
D	108%	105%	112%	111%	99%	93%

Fonte: CEPOF/LAT-USP, 2015

Avaliando as intensidades individuais de todos os poços para as placas, observou-se que há uma pequena variação entre as medições aferidas, o que poderia se tornar crítico para a realização de experimentos *in vitro*. Para avaliar se esta diferença é ou não significativa deve-se avaliar em um primeiro momento as diferenças encontradas entre os tratamentos nas diferentes localidades da placa. Isto é, deve-se validar primeiramente a resposta de sobrevivência frente à luz nas diferentes

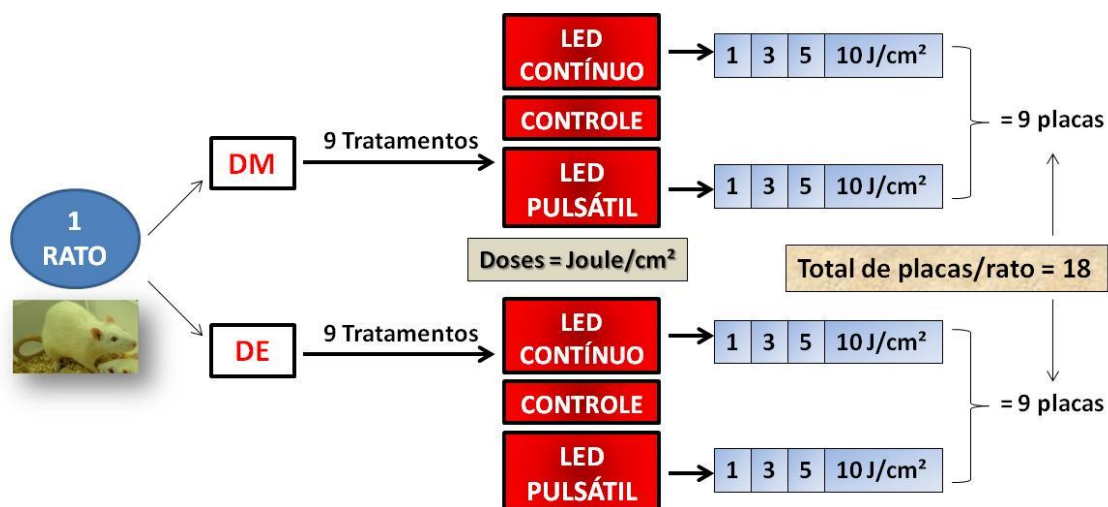
localidades da placa. Outra hipótese seria padronizar os experimentos em função da dose de luz. Isto é, nas aplicações clínicas utiliza-se uma intensidade maior em um tempo menor e em cultivo celular pode-se utilizar uma intensidade menor em um tempo maior. Deste modo os dois tratamentos seriam utilizados em uma mesma dose de iluminação.

Frente aos resultados dessas análises das biotables, decidiu-se realizar durante o experimento com irradiação a formação de *pool* dos 24 poços para todos os procedimentos, incluindo a evolução das passagens (tripsinizações), contagens celulares, congelamentos, coleta de sobrenadante de cultura e preparo para os testes (indicadores biológicos) determinados no trabalho (Apoptose e Necrose, Dano de DNA, Imunofenotipagem e Potencial de Diferenciação). Desta maneira houve uma padronização dos resultados, neutralizando as interferências que poderiam ocorrer, sem a necessidade de se estender a padronização dos testes considerando-se as diferenças encontradas nos 24 poços, no que diz respeito à potência e intensidade em cada poço

Dessa maneira, constituiu-se o perfil do experimento com 9 tratamentos (ou 3 grupos) distintos sobre as culturas de CTMs para cada animal, sendo o primeiro grupo exposto à luz contínua, o segundo grupo sob exposição à luz pulsátil e o terceiro grupo sem exposição, portanto o controle.

Para dar início ao experimento, as amostras de CTM obtidas de cada dissociação (2) de cada rato foram plaqueadas na quantidade de 1×10^4 células por poço, sendo que cada animal gerou 18 placas de cultura, sendo elas: 4 placas para o LED Contínuo (Dissociação Mecânica), 4 placas para o LED Pulsátil (Dissociação Mecânica), 4 placas para o LED Contínuo (Dissociação Enzimática), 4 placas para o LED Pulsátil (Dissociação Enzimática) e 2 placas para o Controle (Sem irradiação) (Dissociação Mecânica e Enzimática). A figura 8 mostra esse esquema de grupos e tratamentos.

Figura 8 - Esquema representativo da metodologia de irradiação e controles



Legenda – O esquema acima mostra a composição e formação dos grupos do experimento, a partir de 1 rato. Considerando as variáveis envolvidas como, tipo de dissociação, regimes de luz (LED) e controle, doses estabelecidas, totalizam-se 18 tratamentos por animal, ou seja, 18 placas experimentais. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

As irradiações com os LEDs sobre as placas de cultura de CTM foram realizadas 3 vezes por semana (segundas, quartas e sextas-feiras) e tiveram início 48 horas após o plaqueamento inicial do experimento (momento zero = M0). O meio de cultura utilizado para o experimento foi o DMEM-F12 (Gibco®) livre de fenol, substância essa responsável pela coloração em tom alaranjado do meio, em associação com 10% de SFB. Em virtude de o fenol ser uma substância refringente à irradiação, inclusive com o LED, a presença do mesmo no meio de cultura poderia interferir no resultado do experimento, portanto a necessidade de sua ausência. O meio de cultura das placas foi trocado 2 vezes por semana, acompanhado previamente de observação microscópica, por microscopia invertida utilizando microscópio Axiovert 200-Zeiss® e registros fotográficos sempre que indicados.

A monitoração microscópica das placas permitiu avaliar o aspecto celular, a morfologia, a confluência das células e eventual aparecimento de indicadores tóxicos tais como depósitos intracelulares, vacuolizações ou sinais de desdiferenciação e/ou contaminação evidenciados pela mudança de comportamento da CTM-TA, tipicamente aderente ao plástico, tornando-se células em suspensão.

A exposição à luz do LED das placas de cultura teve duração de tempo diferente para cada uma das 4 doses aplicadas. De acordo com a tabela 4, é possível conhecer

os tempos de exposição dedicados às placas a partir de doses diferentes. Esses tempos foram calculados previamente. Para a realização das irradiações, as placas eram retiradas das estufas principais, uma de cada vez, colocadas sobre a biotable específica (em outra estufa reservada para tal procedimento), e irradiadas pelo tempo correspondente a cada dose.

Tabela 4 – Cálculo dos tempos de exposição ao LED

Tempo de Exposição ao LED (em segundos)		
Doses	LED Contínuo	LED Pulsátil
1 J/cm ²	34 s	68 s
3 J/cm ²	100 s	200 s
5 J/cm ²	167 s	334 s
10 J/cm ²	334 s	668 s
Controle	668 s	668 s

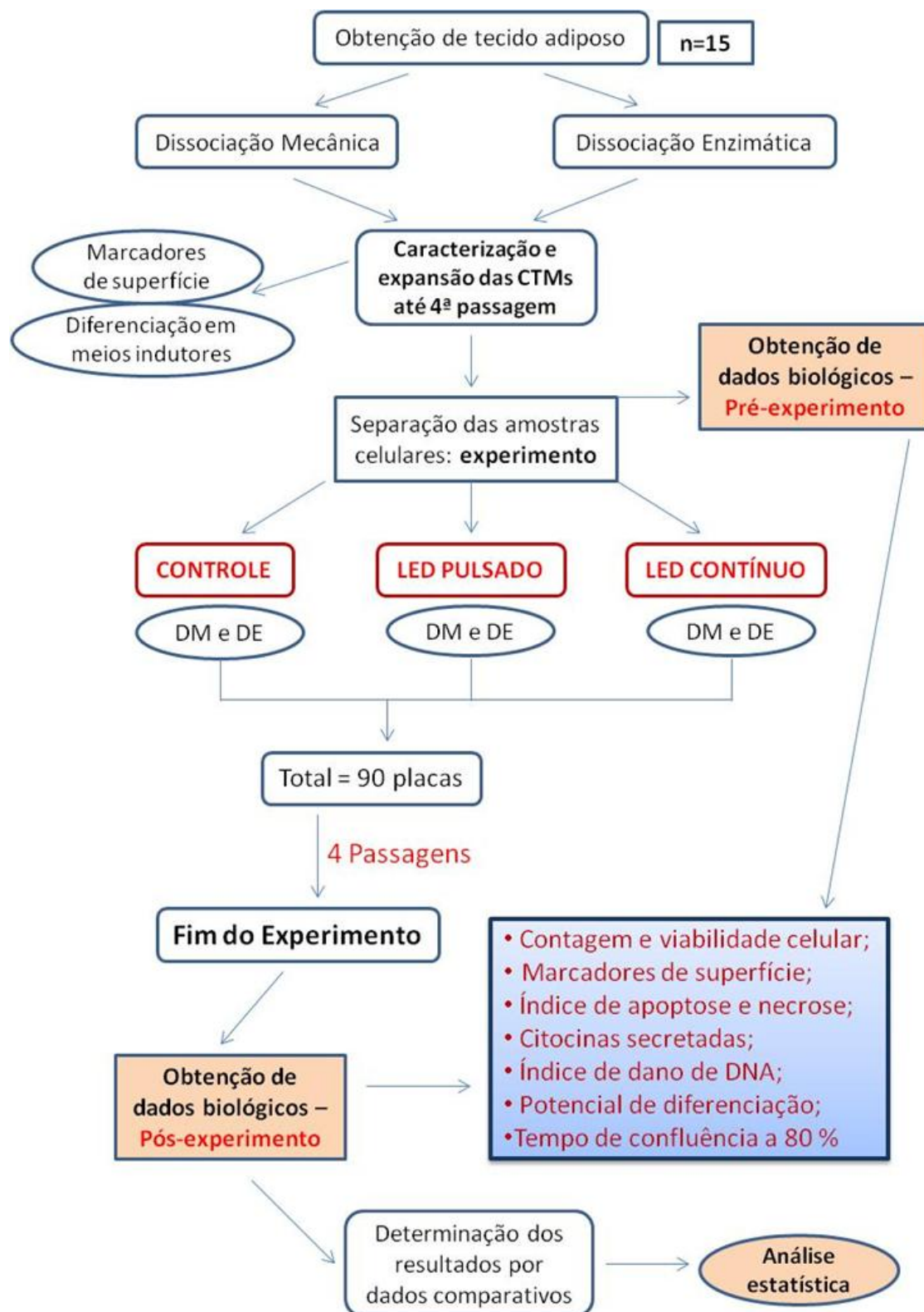
Obs: os Controles foram colocados em fluxo laminar

Fonte: arquivo pessoal, 2015.

As placas que não receberam irradiação pelo LED (controles) foram retiradas das estufas e colocadas dentro da capela de fluxo laminar e permaneceram assim expostas pelo tempo máximo de todas as doses, sendo ela a de 10 J/cm² (668 segundos). Ao final das irradiações, as placas eram retornadas com para as estufas.

O experimento se estendeu por 4 passagens, a contar da 4^a passagem (momento zero = M0) obtida após prévia expansão da cultura. Em todas as passagens as células foram tratadas com tripsina para remoção da placa e evolução de passagem, desde M0 até P4. A cada passagem, parte das células eram replaqueadas e outra parte era destinada à criopreservação. Diante disso, foi possível estabelecer algumas relações, como por exemplo, o tempo transcorrido entre cada passagem das diferentes placas de CTMs e as características qualitativas e quantitativas apresentadas por cada uma delas. A sequência de etapas do experimento recebeu a denominação subsequente: M0 → P1, P1 → P2, P2 → P3, P3 → P4. A figura 9 explicita as etapas e os procedimentos totais do experimento proposto, de forma mais clara e abrangente.

Figura 9 - Fluxograma do experimento proposto, contendo as etapas desde a coleta de TA até o encerramento com as análises.



Imediatamente antes do plaqueamento para o experimento (→ M0) e ao final do experimento com fotoestimulação, as CTMs foram destinadas aos testes e análises estabelecidas para o conhecimento dos parâmetros biológicos quantitativos e qualitativos de interesse, sendo eles: contagem, viabilidade, índice de necrose e apoptose (teste de anexina V e iodeto de propídeo; teste da caspase 3), índice de dano do DNA (teste do cometa e do micronúcleo), marcadores de superfície (imunofenotipagem) e potencial de diferenciação. Além disso, o sobrenadante de cultura coletado também foi destinado à dosagem de citocinas.

3.8 Testes do Experimento (Pré e Pós): Obtenção de Dados Biológicos Quantitativos e Qualitativos das Culturas de CTM

3.8.1 Tempo de Confluência a 80%

Foram analisados e comparados os tempos transcorridos entre as passagens do experimento (M0 até P4), referentes às placas de cultura de cada tratamento (em todas as amostras) até que tivessem atingido confluência de 80% (acompanhamento microscópico) procedendo-se o registro fotográfico.

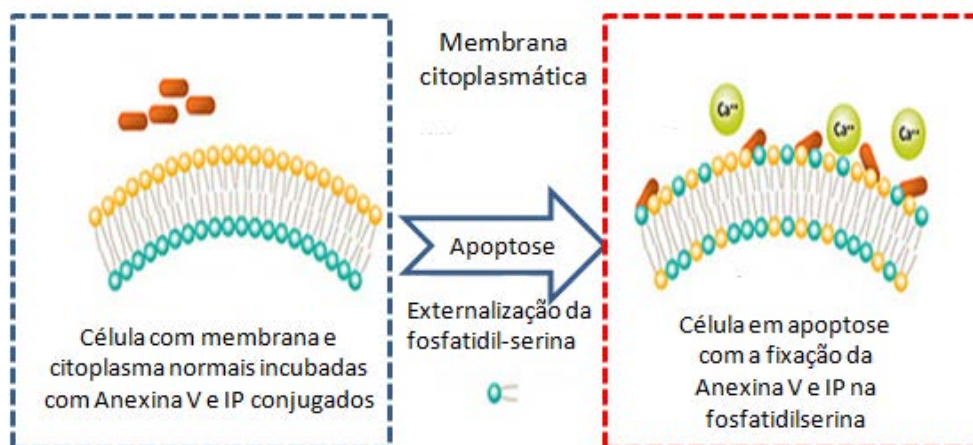
3.8.2 Determinação dos Índices de Apoptose e Necrose Celular

O fenômeno da morte celular pode ser desencadeado por uma série de fatores ou injúrias como: danos de DNA, hipóxia tissular, agressão imunológica, infecciosa e tóxica. A morte celular pode ser dividida em duas categorias: a programada ou fisiopatológica (apoptótica), e a patológica (necrótica).

Foram utilizados três reagentes para determinar a morte celular por apoptose e necrose pela metodologia de CF: Anexina V FITC, Iodeto de Propídeo e Caspase-3 FITC, todos do mesmo fabricante (Kit BD Pharmingen®). A marcação das células seguiu especificações do fabricante, com leitura no equipamento citômetro de fluxo FACS Calibur BD® e análise em software PAINT-A-GATE da BD®. A Anexina V é uma proteína Ca^{2+} dependente que tem elevada afinidade por fosfatidilserinas, que são fosfolípidos internos da membrana e só são expressos nos casos de apoptose. O Iodeto de Propídeo (IP) é utilizado para diferenciar células intactas das não intactas. As

células intactas excluem o IP enquanto as células mortas são permeáveis ao produto. A ativação da via das caspases (proteínas efetoras) é observada na forma clássica, podendo a apoptose ser independente ou dependente dessa via. A apoptose pela via independente é determinada pela externalização das fosfatidilserinas pela membrana celular, como exemplificado na figura 10 abaixo.

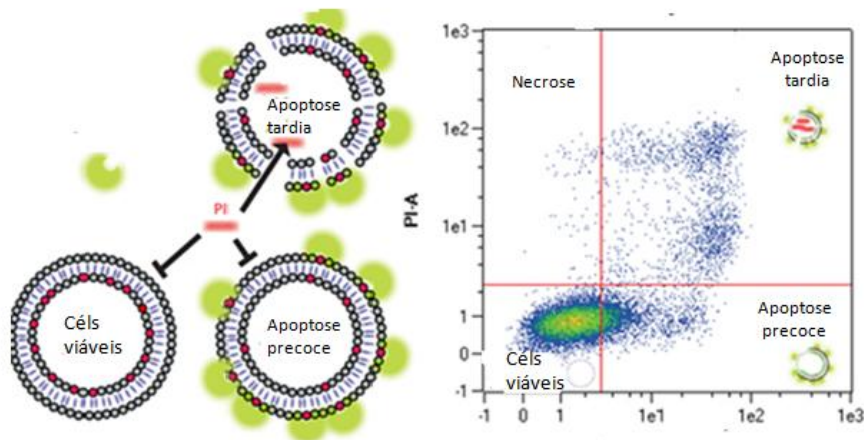
Figura 10 - Representação esquemática do teste de Anexina V e Iodeto de Propídeo



Fonte: Esquema adaptado de www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/apoptosis

A leitura dos resultados pelo software CellQuest da BD™, foi gerada em dot plot, cuja distribuição das células analisadas é feita por quadrante. No esquema abaixo estão representadas as células viáveis, não expressando a marcação por Anexina V nem Iodeto de Propídeo, cuja concentração é a maior e pode ser identificada no quadrante inferior esquerdo. A população de células em apoptose precoce expressa a Anexina V, mas não marca com o IP (quadrante inferior direito), já as células em apoptose tardia, começam a coexpressar com o IP, e são identificadas no quadrante superior direito enquanto que as células em necrose encontram-se no quadrante superior esquerdo (figura 11).

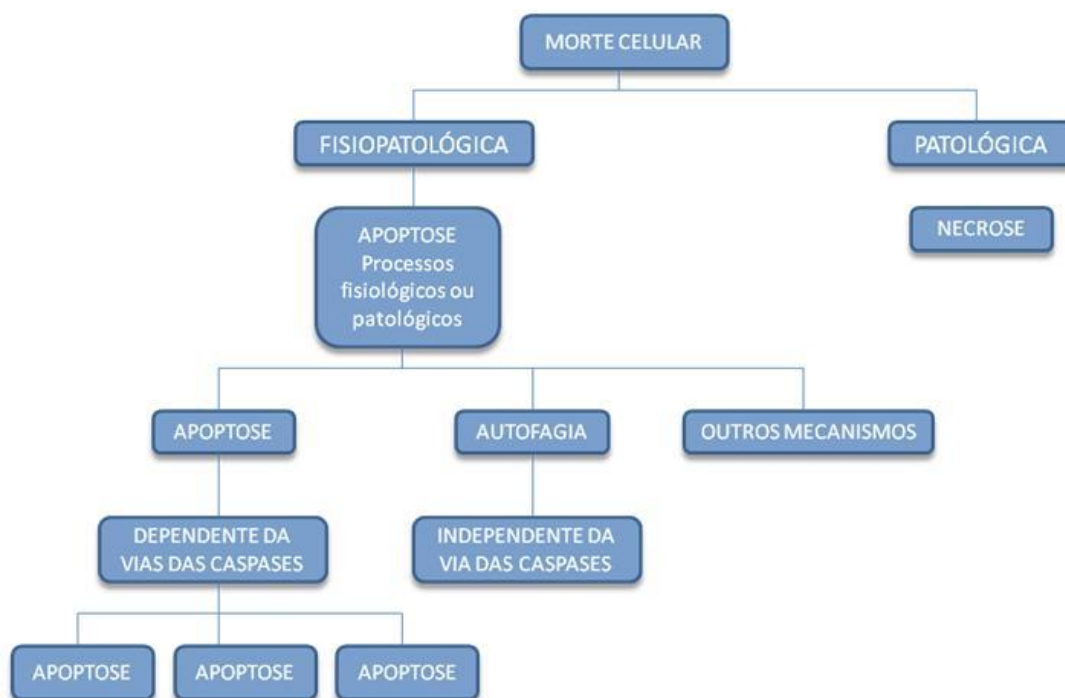
Figura 11 - Esquema da análise do teste de Anexina V e Iodeto de Propídeo por Citometria de Fluxo



Legenda - A imagem acima representa célula viável e células sofrendo morte por apoptose e necrose. Na necrose, ocorre abertura dos poros a membrana celular (desintegração), que permite a entrada do marcador intracelular de necrose. Enquanto que na apoptose precoce, ocorre externalização da fosfatidilserina. À direita, um *plot* mostrando a marcação reduzida nos quadrantes superiores e inferior direito, de células que estão morrendo ou mortas. Fonte: Esquema adaptado de www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/apoptosis

A apoptose dependente das caspases pode ser identificada pela quantidade de uma protease chave ativada na fase inicial da apoptose, a Caspase-3 (Figura 12).

Figura 12 - Esquema ilustrativo das vias de morte celular



Fonte: Adaptado de Bertanha, 2011.

3.8.3 Dosagem de Citocinas

As citocinas compõem um grupo heterogêneo de polipeptídios que podem ser denominados de peptídeos regulatórios, pois modulam as funções de diferentes tipos celulares. As citocinas são produzidas por várias células e tem função imediata, regulando resposta imune e inflamatória e controlando a proliferação e diferenciação celular. Para efetuar a dosagem, será utilizado Kit de Citocinas e Reagentes Complementares da BD® *Cytometric Bead Array* (CBA). Os ensaios de CBA proporcionam um método de captura de analitos solúveis com carreadores conhecidos e de fluorescência. Quando estes são incubados junto a amostra desconhecida com analitos conhecidos, complexos de sanduíche são formados e podem ser medidos por CF para identificar partículas com características de fluorescência de ambos carreador e detector.

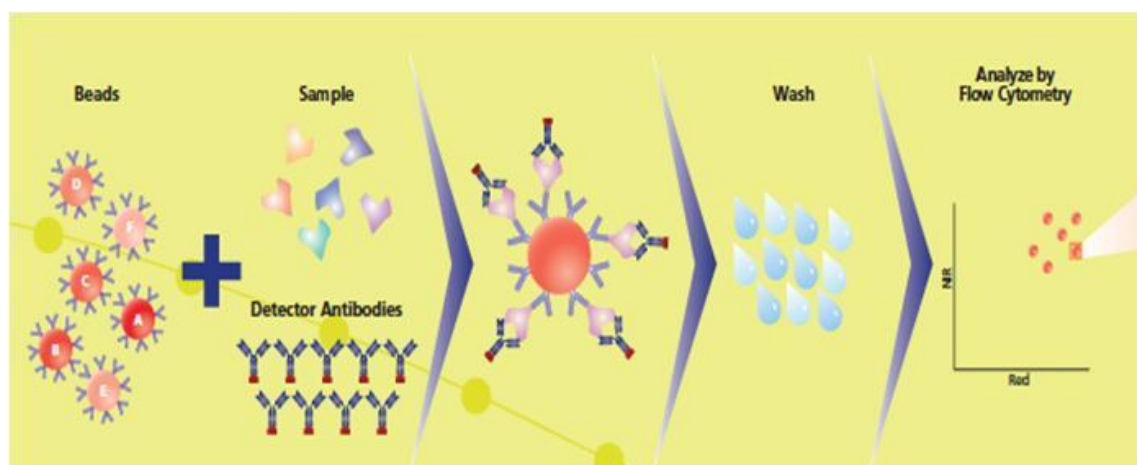
Após análise de trabalhos publicados foram escolhidas as seguintes citocinas de rato: TNF, IFN- γ (pró-inflamatórias) e IL-4, IL-10, (anti-inflamatórias) (LEDEBOER et al., 2000; JIA et al., 2012; ZINOCKER; VAAGE, 2012; SEIFERT et al., 2012). Tal procedimento, com uso do Kit, foi realizado no equipamento citômetro de fluxo FACS Calibur BD® do Laboratório de Citometria de Fluxo do HC de Botucatu.

Antes de cada momento de tripsinização (evolução das passagens do experimento), o sobrenadante de cultura (1 mL) foi aliquoteado e criopreservado a -30°C para posterior dosagem de citocinas. A constituição deste painel foi importante, pois evitou distorções nas análises repetidas em grande número de manipulações, já que cada manipulação em CF implica em fazer controles positivos e negativos.

A proposta do banco de sobrenadantes se deu pela demora na importação dos Kits para determinação das citocinas e da projeção de que manipulações organizadas em bateladas gastam menor quantidade (proporcionalmente) de controles utilizados. Quanto mais fracionada é esta análise, maior é o gasto com análises controle. Diante disto, e do alto custo dos insumos, optou-se por realizar o banco de sobrenadantes de cultura para análise posterior ao final do experimento.

Na figura 13 é possível visualizar um esquema representativo do método de detecção por CBA, no citômetro de fluxo.

Figura 13 - esquema representativo do método de detecção por CBA, no citômetro de fluxo



Legenda – A imagem inicial mostra o preparo do teste com a mistura dos componentes: beads carreadoras específicas, amostra selecionada e anticorpos de detecção da amostra (fluorescentes). Se houver reconhecimento pelo anticorpo, a amostra será marcada e visualizada no software, após lavagens. Fonte: Data Sheet BD® 2015.

3.8.4 Índice de Genotoxicidade: Teste do Cometa

Esta técnica foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Carcinogênese Química e Experimental, do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, sob responsabilidade do Prof. Dr. Luis Fernando Barbisan para determinar o dano de DNA das CTMs pré e pós-experimento.

O teste do cometa ou eletroforese em gel de células individualizadas (SCGE) é bastante empregado para detectar danos genotóxicos devido à sua sensibilidade, eficácia, facilidade e baixo custo. É um teste quantitativo observacional. Singh et al. (1988), aprimoraram-no com o uso de condições alcalinas (pH >13) de eletroforese, permitindo a detecção de quebras de fita simples, dupla e sítios álcali-lábeis do DNA de células que sofreram rompimento nuclear e deixaram um rastro escuro na corrida do gel.

Após preparação do material celular, 1×10^4 por amostra/lâmina, as células foram ressuspensas em 100 μ L de agarose (baixo ponto de fusão). Este conteúdo foi colocado sobre lâminas previamente preparadas com agarose (ponto de fusão normal) e sobre elas, uma lamínula para proteção. As lâminas foram incubadas em geladeira por 10 minutos e, em seguida, retiradas as lamínulas. As lâminas foram acondicionadas em cubetas com solução de lise (Triton-X, DMSO, M-NaCl, EDTA, Tris

e N-Lauroyl–Sarcosine) e mantidas em geladeira por no mínimo 24 horas. Após incubação, as lâminas foram lavadas com PBS e colocadas na cuba de eletroforese (300 mA por 20 min) para corrida em solução com pH 13 (Singh et al, 1988, com modificações). Foi utilizado como controle positivo para as amostras o Peróxido de Hidrogênio (200 micromols ou 1 $\mu\text{L}/1 \times 10^4$ células/1 mL) induzido na amostra por 30 minutos. As lâminas foram analisadas com uso do intercalante de DNA SYBR GOLG (Life Technologies[®]) (diluição 1 : 10000) em microscópio de fluorescência (Olympus BX60) (aumento de 10X), para visualizar as seguintes imagens microscópicas: com contorno circular (sem danos no DNA) ou em forma de “cometa” (com danos no DNA). A extensão de cada imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada. Os resultados foram obtidos através do cálculo de porcentagem de dano da categoria de análise *tail intensity*. A contagem das lâminas foi feita em duplica, totalizando 100 nucleóides do teste e 100 nucleóides do controle positivo para cada amostra.

3.8.5 Índice de Mutagenicidade: Teste do Micronúcleo

Esta etapa foi realizada em parceria com o laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica da Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori, utilizando a técnica do micronúcleo para determinar o dano de DNA das CTMs pré e pós-experimento. A necessidade de células é próxima a 1×10^5 de cada tratamento estabelecido.

O teste do micronúcleo (MN) foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos da MO de camundongos por Schmid (1976), tornou-se viável, confiável e é, atualmente, um dos métodos utilizados para avaliar danos citogenéticos causados por substâncias xenobióticas nos organismos. Os micronúcleos (núcleos secundários) formam-se a partir de pequenas quantidades de DNA (cromatina) não incorporadas dentro do núcleo da célula-filha, durante a divisão celular, e recebem esse nome por serem menores que o núcleo principal. Há, geralmente, um micronúcleo por célula, o suficiente para indicar perda irreversível de DNA e até associação à carcinogenicidade (DIETZ et al., 2000).

Após preparação do material celular em placas de 6 poços, foi adicionada a citocalasina B (SigmaAldrich[®]) (composto que bloqueia a citocinese) (4,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de meio) e mantida na cultura por 24 horas, em estufa. Após esse tempo, as células receberam tratamento específico com etapa de hipotonização (solução hipotônica gelada de KCl 0,075M) e fixação (Ácido Acético P.A., Metanol P.A. e Formoldeído 37%)

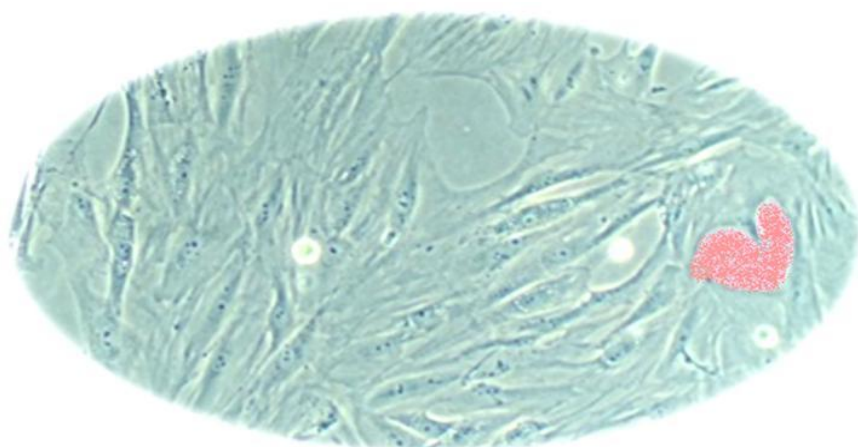
intercaladas por centrifugações à 1200 rpm por 10 min. A sequência do procedimento se deu por: hipotonizar as CTMs, adicionando (pingando) 5 mL de KCL, centrifugar, colocar 5 mL de 2 soluções fixadoras em sequência (metanol/ácido acético 3:4) e (metanol/ácido acético 5:1). Para auxiliar na preservação do citoplasma, 3 gotas de formoldeído foram acrescidas entre as 2 fixações anteriores. Terminada a fixação, o conteúdo foi centrifugado e o sobrenadante descartado, restando 0,5 mL, que foi agitado e gotejado sobre lâminas limpas e pré-aquecidas. Como controle positivo, utilizou-se a substância cloridrato de doxorubicina (4 µg/mL de meio) após plaqueamento para o teste, mantido por 24 horas em cultura. Após esse tempo, retirou-se esse meio e foi adicionado meio de cultura contendo a citocalasina B. As células foram coradas em solução de Giemsa 5% (Merck®), por 7 min e analisadas em microscópio óptico (aumento de 20x) segundo critérios propostos por Fenech (2000) (FENECH; MORLEY, 1985; DAISY, 2003, com modificações). O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado com base em Eastmond e Tucker (1989), por meio da seguinte equação: $IDN = M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)/N$; M1 - M4: número de células com, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 núcleos; N: número total de células analisadas.

Foram incluídas na análise das lâminas, células binucleadas, células binucleadas com 1, 2, 3 ou mais micronúcleos, binucleadas com ponte nuclear e broto nuclear, dentro de uma contagem de 1000 células binucleadas/lâmina e 1000 células binucleadas/lâmina do controle positivo. A contagem foi realizada pelo método do duplo-cego.

3.9 Análise Estatística

Quanto aos procedimentos descritivos foram estabelecidas distribuições de frequências (absoluta e percentual) das variáveis envolvidas, complementadas com gráficos e tabelas frequenciais. As discussões seguiram o nível de 5% de significância. Os dados obtidos pelo micronúcleo foram analisados por binomial e Poisson, pelo software SAS, v9.2. O teste do cometa recebeu análise por Anova Ranks (Tukey/Kruskal-Wallis). Os outros testes receberam análise pelo Software GraphPad InStatTM com a realização do teste *T Student*.

Resultados e Discussão



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho foram descritos de acordo com os testes realizados, em sequência lógica, abrangendo para cada um as relevâncias resultantes dos tempos pré-experimento e pós-experimento, ou seja, pré-irradiação e pós-irradiação com LED, o que facilitou a organização dos dados para análise e discussão. Respeitando a padronização inicial realizada por estaticista foram obtidas amostras de tecido adiposo de 15 animais. As amostras de TA foram transferidas para o LEC e processadas. Frente a resultados anteriores obtidos por Cleto et al, (2011) evidenciando que amostras obtidas pelo método de DM tem rendimento inicial inferior ao de DE, optou-se por fazer uma partição do bloco de TA em partes desiguais, sendo que o bloco contendo maior peso de TA foi processado mecanicamente enquanto que o menor, por colagenase.

O quadro 1 abaixo mostra os dados relativos ao peso médio do TA coletado de 15 ratos, tipo de dissociação (DM e DE) e número médio de células obtidas/grama de tecido adiposo.

Quadro 1 – Obtenção dos blocos de TA, métodos de dissociação e contagem celular

Número amostral	Tipo de dissociação	Peso médio (g) do TA	Nº médio total de células obtidas	Nº médio de células/g de TA
N=15	Mecânica	2,95	$2,93 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$
	Enzimática	2,01	$6,73 \times 10^5$	$3,34 \times 10^5$

Fonte: arquivo pessoal, 2015

As médias de células linfomononucleares (LMN) obtidas por dissociação mecânica foi de $1,0 \times 10^5$ células/grama de TA. Denomina-se esta população de células obtidas como LMN, pois os métodos de dissociação extraem linfócitos e monócitos dos tecidos, conjuntamente com as células-tronco mesenquimais. Estas células aderentes do sangue foram purificadas pelo método de plaqueamento, pois foram eliminadas na expansão *in vitro*. Para o método enzimático, a média foi de $3,34 \times 10^5$ células/grama de tecido. O resultado inicial da obtenção das LMN evidencia a supremacia do método enzimático sobre o mecânico. Frente às diferenças entre os métodos e levando em consideração o custo da aquisição da colagenase para o experimento, de U\$ 875.00/frasco de 2 g, com balança comercial desfavorável para o

país, no momento, estabeleceu-se indicadores comparativos entre os métodos. Os indicadores avaliados incluem o tempo sob dois aspectos: homem/hora-trabalho, que corresponde ao tempo efetivo que o pesquisador manipula a amostra, e o tempo de obtenção correspondente ao número, em horas, desde a chegada do bloco de TA no LEC até a obtenção das LMN contadas, prontas para plaqueamento, o número de LMN/grama de TA, a maior ou menor facilidade operacional, o requerimento de treinamento e habilidade do manipulador, o risco de exposição a contaminantes biológicos e os custos diretos (considerados apenas os insumos) – (Quadro 2).

Quadro 2 – Indicadores de qualidade entre os métodos de dissociação enzimática e mecânica

Método	Tempo Médio (horas)		Nº de LMN/g de tecido	Facilidade/ Dificuldade Operacional	Habilidade do manipulador	Risco de Contaminação	Custos diretos/ amostra
	Homem/hora Trabalho	Obtenção /h/proc.					
DE	2,3	17,3	3,3 x 10⁵	+ fácil >comodidade Técnica	+ atenção - mão de obra	menor	Maior (U\$25.00)
DM	5,2	6	1 x 10 ⁵	+ laboriosa Manipulador dependente	+ mão de obra + atenção	maior	Menor (U\$2.00)

Fonte: arquivo pessoal, 2015

Os indicadores da técnica de DE envolvem o menor tempo de homem/hora-trabalho inicialmente. Isto se deve ao fato de que o bloco de TA recebido é microfragmentado e colocado em contato com a solução de enzima pesada e preparada extemporaneamente, isto envolve um tempo de 2 horas. Posteriormente, este bloco fica *overnight* em estufa de CO₂, a 37⁰ C, para então ser novamente reprocessada. O tempo final de obtenção das LMN é de 17 horas. A DM envolve em média 5 horas do manipulador como homem-hora trabalho, e seu tempo final de obtenção das LMN é de 6 horas (2,83 vezes menor que o da DE). Quanto ao número de células, a DE obtém 3 vezes mais células/grama de TA do que a DM. Analisando o indicador “facilidade/dificuldade operacional, a técnica enzimática é mais fácil e simples, quando comparada com a mecânica, que envolve o manipulador durante 5 horas trabalhando em ambiente de cabine de segurança biológica com grande número de equipamentos de proteção individual para evitar a contaminação bacteriológica. Quanto ao item habilidade à técnica enzimática requer mais atenção e monitoramento

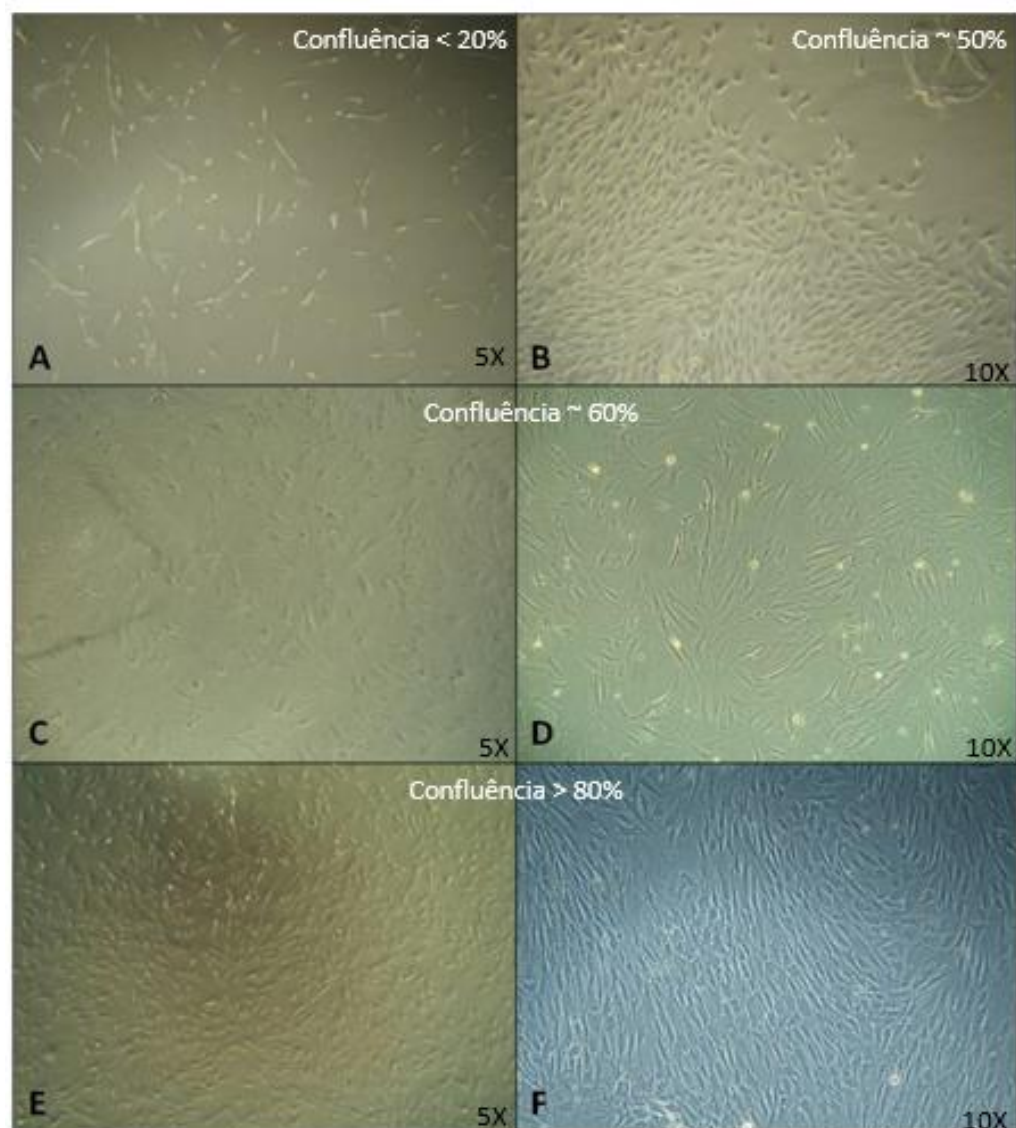
para se evitar o tratamento excessivo (maior tempo) e a DM requer a atenção e mão de obras contínuas, tornando a obtenção extremamente cansativa e dependente do operador. Tendo em vista de que a técnica mecânica permanece em condições de temperatura ambiente por mais tempo, sob contínua manipulação, o risco de contaminação bacteriana é muito maior.

Analisa-se após a interpretação dos dados dos quadros acima, de que há oportunidades de melhorias de processo que podem ser implementadas associando outras tecnologias como o da irradiação do bloco de TA com luz no sentido de minimizar as contaminações bacterianas e fúngicas, e ainda, de se associar outras técnicas como o do uso de ultrassom pré-DM, no sentido de se diminuir o tempo homem-hora trabalho, otimizando desta forma a técnica. Outra possibilidade emergente seria a de irradiar o bloco de TA, no sentido da bioestimulação tecidual pré-dissociação. Estas hipóteses foram levantadas durante a execução do presente projeto, sendo que temporalmente e cientificamente não se poderia mudar o design do trabalho já em andamento, mas estas propostas devem ser analisadas futuramente.

Tendo em vista de que a terapia com CTM é dose-dependente como descrevem Richardson *et al* (2013) e Daltro *et al* (2015), houve a necessidade de amplificar as células LMN obtidas, pelo método de cultura *in vitro*, com o objetivo de obter maior número de células e de purificar a população de células, eliminando por método seletivo os linfócitos e monócitos contaminantes da amostra inicial. Para tanto foi realizado o plaqueamento inicial das células e sua expansão pré-experimento (início da irradiação). Desta forma estabeleceu-se um banco de CTM após *purging* da cultura, para o experimento em si. A criopreservação se deu para eventual necessidade no presente trabalho e para trabalhos futuros. Amostras de 5 animais foram utilizadas para os testes pilotos e padronização das técnicas a serem utilizadas. O padrão de avaliação microscópica, por microscopia invertida e as fotomicrografias das culturas celulares, quer seja da etapa piloto (n = 5), quer do experimento final (n = 10) foram os mesmos, evidenciando a maturidade dos processos em execução no Laboratório de Engenharia Celular.

A Figura 14 mostra as diferentes fases de confluência das células em cultura. O objetivo das imagens é mostrar a fase inicial das culturas e o seu padrão morfológico em cada fase.

Figura 14 – Fotomicrografias obtidas por microscopia invertida, contraste de fase, da cultura de CTM-TA com diferentes aspectos de confluência celular



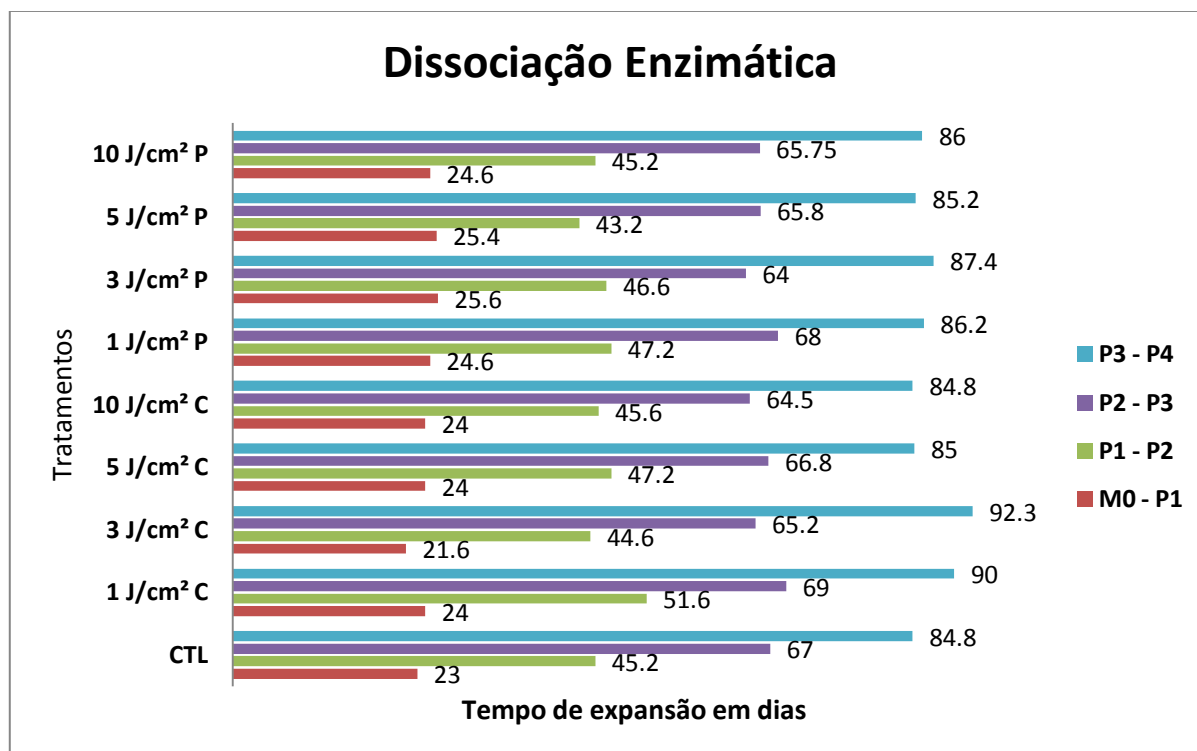
Legenda – Imagens de microscopia invertida das culturas celulares pré-experimento. A, C e E = aumento de 5X; B, D e F = aumento 10 X. Imagens C/ D e E/F são da mesma cultura em aumentos diferentes. Arquivo pessoal, 2015.

Foi observado que as células obtidas por DE têm aderência ao plástico 2 X mais rápido do que as obtidas por DM. Estas células mantêm o padrão fibroblastóide clássico descrito na literatura, com maior alongamento (prolongamentos mais exuberantes).

4.1 Tempo de confluência a 80% - desdobramento entre passagens

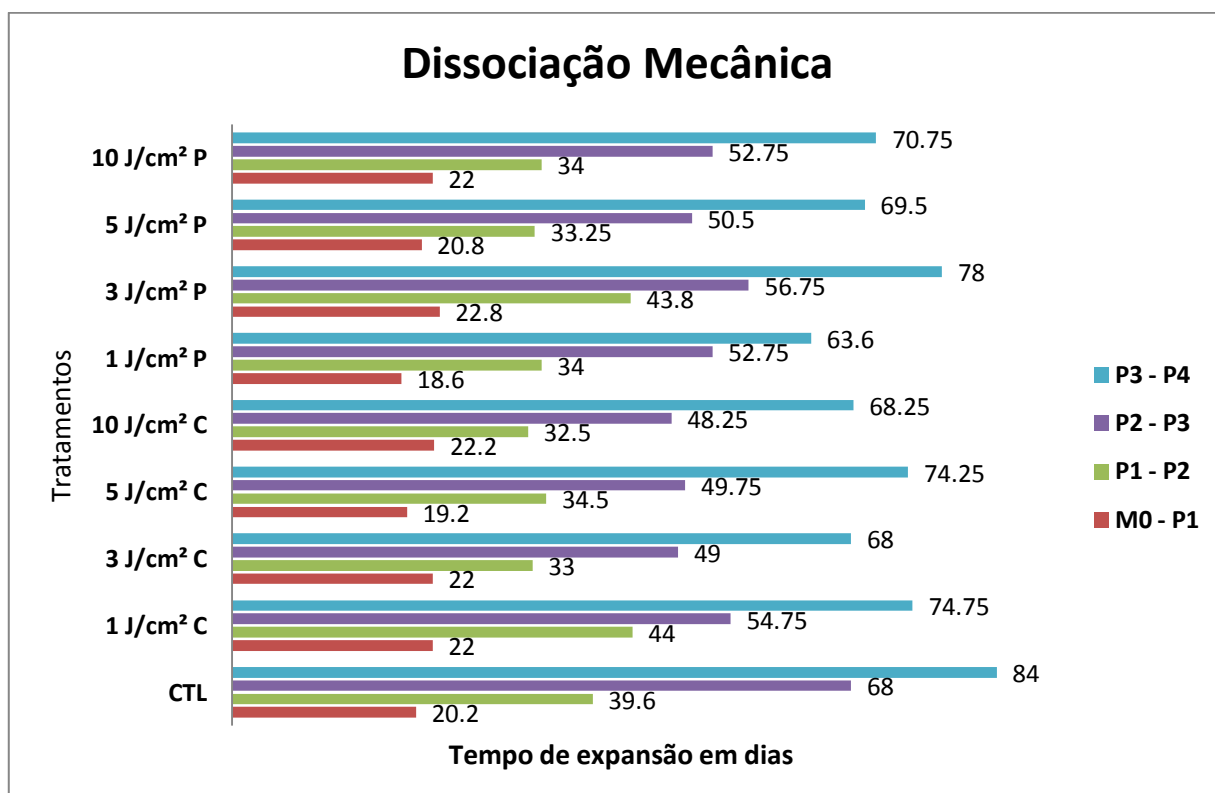
Durante o experimento foram registrados os tempos de desdobramento entre as passagens, desde M0 até P4. Nos gráficos 1 e 2 apresentados abaixo, é possível observar as diferenças temporais em dias de cada tratamento, considerando as dissociações mecânica e enzimática. As culturas provenientes de dissociação mecânica mostraram grande diferença entre os tratamentos e o controle negativo (não irradiado) e, além disso, também apresenta diferença significativa com relação às culturas provenientes de dissociação enzimática. Esta por sua vez não mostrou diferenças significantes entre os tratamentos, permitindo destacar que as doses de 1 e 3 J/cm² Pulsátil tiveram tempos superiores ao controle negativo, ou seja, o tratamento com irradiação tornou o desdobramento celular mais lento. O contrário foi registrado na irradiação das CTM com 1 J/cm² Pulsátil, para células oriundas da DM.

Gráfico 1 – Tempo de confluência a 80% em dias, entre as passagens, segundo a dose de irradiação - dissociação enzimática



Legenda – Gráfico do crescimento celular em dias nas culturas de CTM, advindas de DE, do experimento (considerando todos os tratamentos). As 4 cores das colunas equivalem às passagens das culturas. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Gráfico 2 – Tempo de confluência a 80% em dias, entre as passagens, segundo a dose de irradiação - dissociação mecânica



Legenda – Gráfico do crescimento celular em dias nas culturas de CTM, advindas de DM, do experimento (considerando todos os tratamentos). As 4 cores das colunas equivalem às passagens das culturas. Fonte: arquivo pessoal, 2015

De acordo com Cleto (2011) com achados na literatura de cultura de CTM, as células oriundas de DE superam as de DM em tempo e expansão numérica. Este resultado é relevante e mostra a intervenção positiva do LED de 630 nm sobre tais culturas, estimulando o crescimento celular em menor tempo do que o esperado, se comparado com a DE.

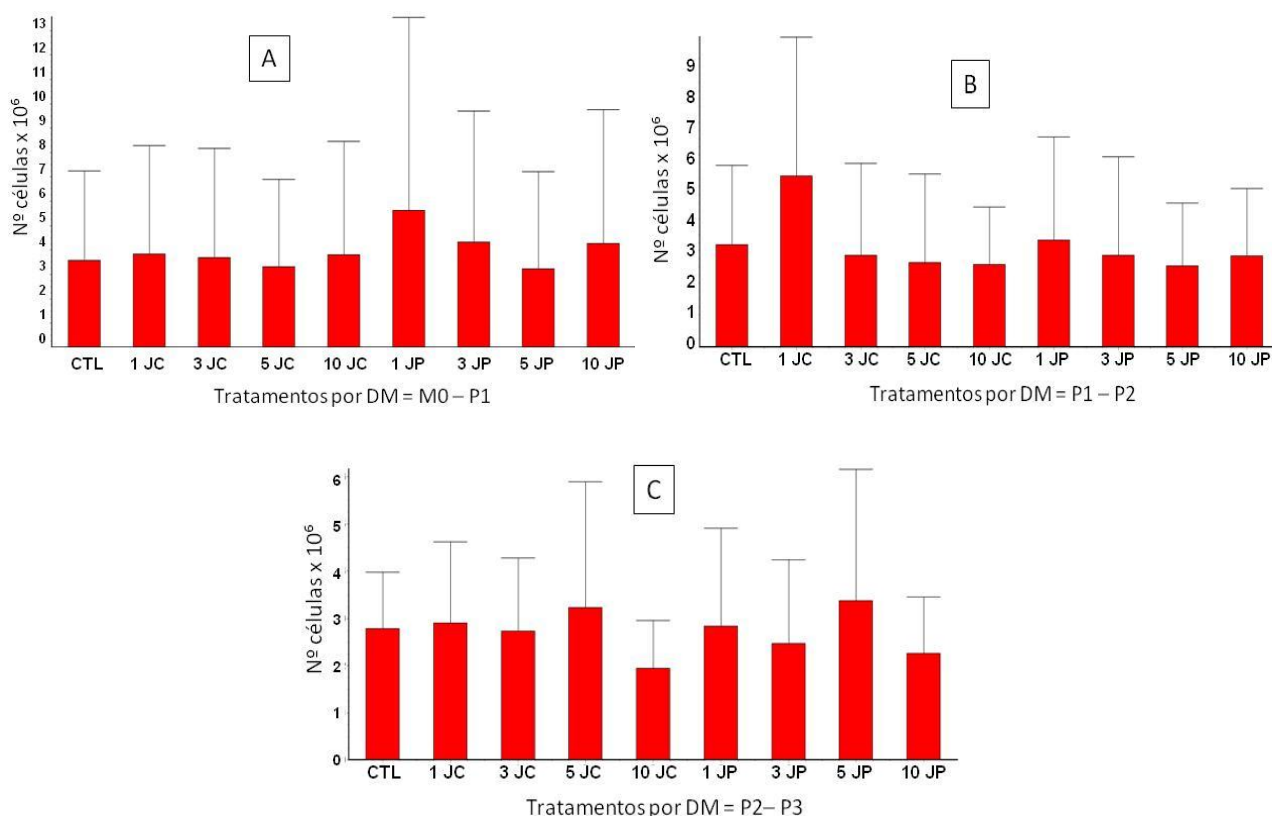
4.2 Contagem e Viabilidade celular

Os gráficos 3 e 4 de contagem e viabilidade celular para as amostras mecânicas mostram diferença mais significativa para P3 – P4 nas doses pulsáteis (1 e 5 J/cm², destacando-se a dose 1). De todos os tratamentos, os que não corresponderam ao esperado foram 10 J/cm² contínuo e 3 e 10 J/cm² pulsáteis. A partir dessa análise podemos atribuir ao LED pulsátil maior contribuição para o aumento da proliferação

celular comparado ao contínuo, em determinadas doses. Com relação à viabilidade das amostras para P3 – P4, ela se manteve alta em 7 tratamentos e arbitrariamente inferior nas doses 1 J/cm² contínuo e 3 J/cm² pulsátil. A análise efetuada foi o teste estatístico *t student* utilizando do *Software utilizado: GraphPad Instat™*.

Nas análises pré-experimento foram comparados os resultados obtidos de contagem celular e viabilidade e aplicados o teste estatístico comparando os dois métodos de obtenção das células (DM X DE), buscando responder ao questionamento se há interferência do método de dissociação e o desempenho da cultura em P1. Os testes foram pareados, ou seja, todas as amostras avaliadas por um método também o foram para o outro método. O valor de $p < 0,0001$, considerado extremamente significativo, evidenciando no início da cultura a supremacia da DE sobre a DM.

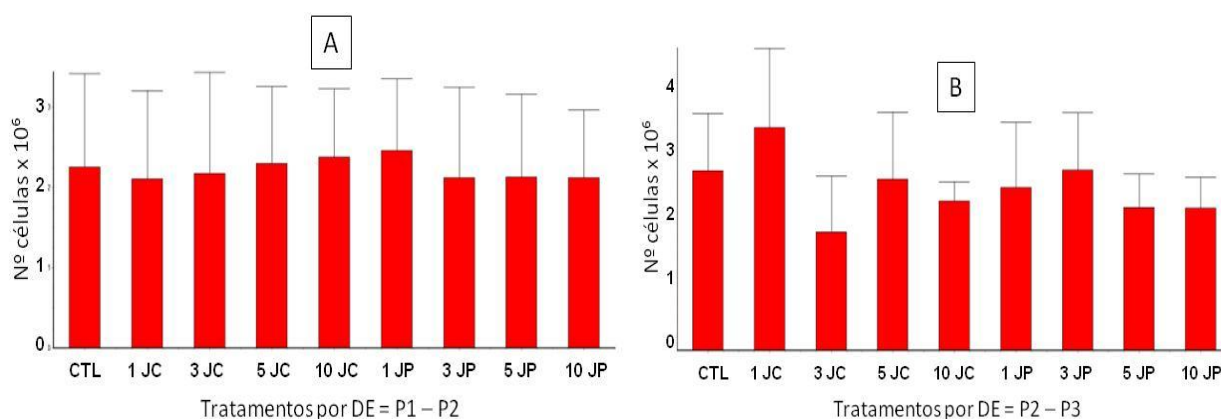
Figura 15 – Desempenho das CTMs obtidas por DM quanto à contagem celular nos diferentes momentos do experimento



Legenda – Médias e desvios padrões das contagens celulares de todos os tratamentos do experimento advindos de DM, em diferentes passagens (gráfico A, B e C). Fonte: arquivo pessoal, 2015

Os dados da contagem celular das células obtidas por DE evidenciam um maior número o que confere à cultura celular, em especial, de M0-P1, melhor desempenho. Outro dado relevante é que as contagens celulares nestas amostras são mais homogêneas, com menor desvio padrão.

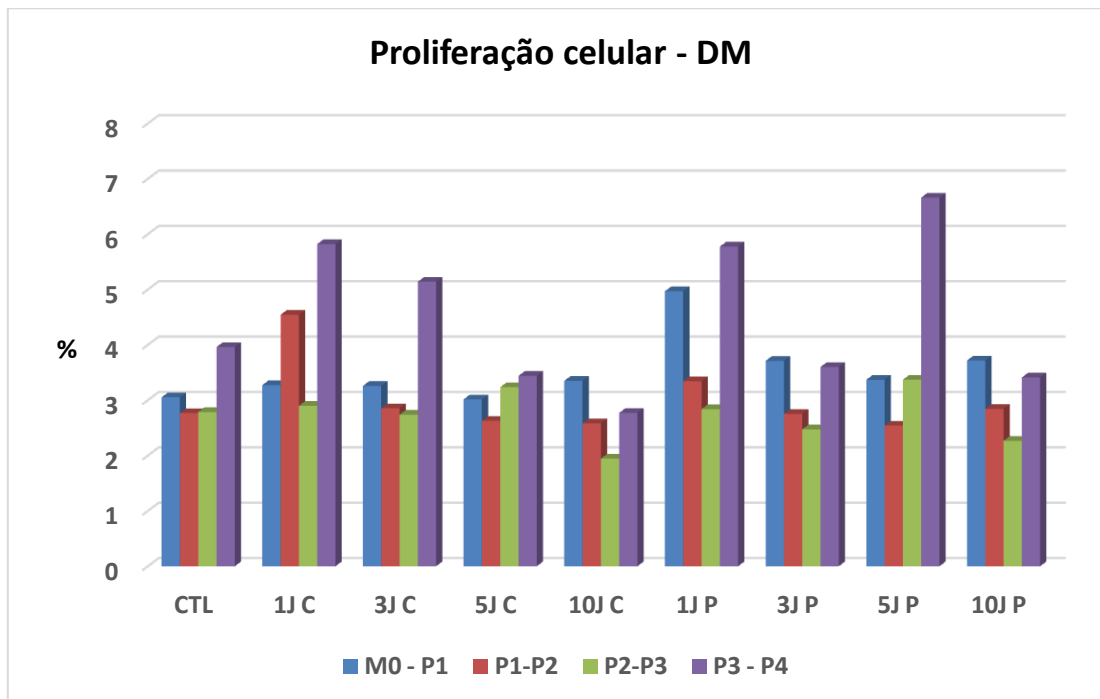
Figura 16 – Desempenho das CTM obtidas por DE quanto à contagem celular nos diferentes momentos do experimento



Legenda – Médias e desvios padrões das contagens celulares de todos os tratamentos do experimento advindos de DE, em diferentes passagens (gráfico A e B). Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Como pode ser observado, os gráficos de contagem celular no final do experimento com as células obtidas por DE não diferem daquelas no mesmo momento, obtidas pela DM. A diferença estatística fica restrita à passagem P1. Quanto à viabilidade celular, pela técnica de azul de tripano, não houve diferenças estatísticas entre os métodos, pré-experimentação. Os dados do experimento de irradiação comparados com o grupo controle (CTL), mostram diferenças importantes na contagem celular, mas não há evidente influência na viabilidade das células.

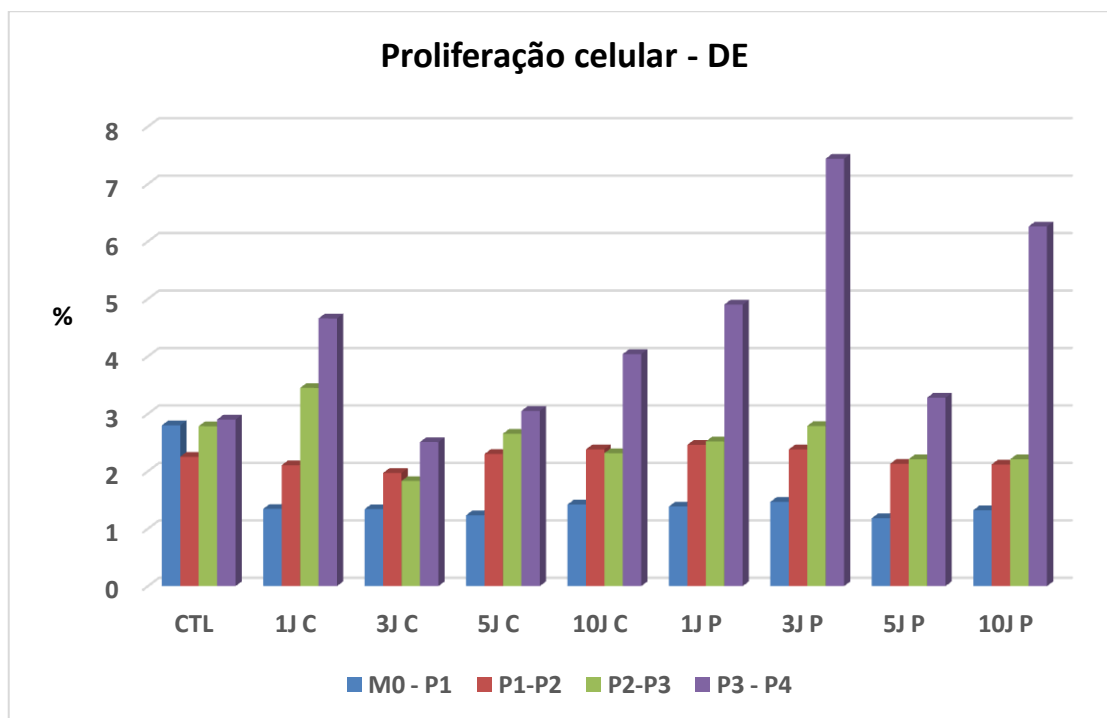
Gráfico 3 – Valores médios da contagem celular para CTMs obtidas por DM, nas diferentes passagens e doses de irradiação



Legenda – Proliferação/crescimento celular das CTMs de origem mecânica no pós-experimento, de acordo com as passagens das culturas, em todos os tratamentos realizados. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

As doses de irradiação pulsátil 1 J/cm^2 e de 5 J/cm^2 , e 1 J/cm^2 luz contínua foram as que tiveram o melhor desempenho quanto à proliferação celular, para as amostras obtidas por DM.

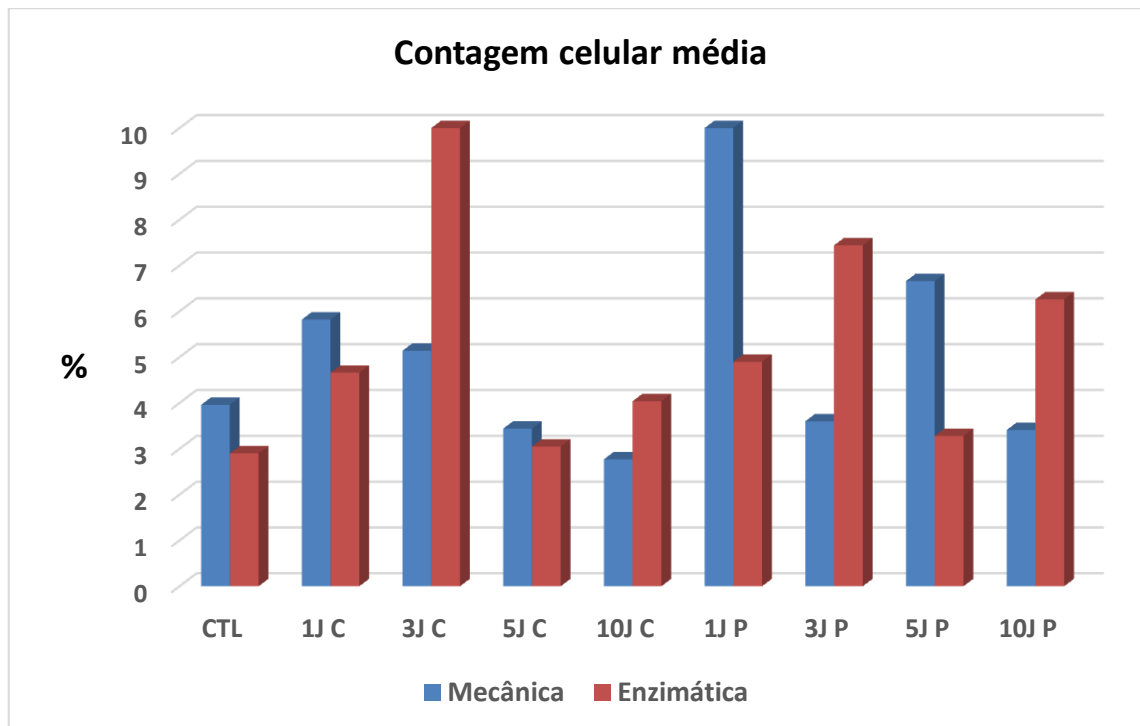
Gráfico 4 – Valores médios da contagem celular para CTM obtidas por DE, nas diferentes passagens e doses de irradiação



Legenda – Proliferação/crescimento celular das CTMs de origem enzimática no pós-experimento, de acordo com as passagens das culturas, em todos os tratamentos realizados. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Para as células obtidas por DE, o efeito da luz sobre as mesmas foi mais evidente ($p < 0,001$) nas doses de 3 e 10 J/cm^2 , luz pulsátil, sendo menos evidente o resultado para 1 e 5 J/cm^2 . No final do experimento a luz pulsátil tem evidente influência na contagem celular, havendo aqui o mesmo fenômeno daquele encontrado nas células obtidas por DM, a dose de 5 J/cm^2 luz pulsátil apresenta efeito inibitório em relação à dose anterior, mas mesmo assim, ligeiramente superior que o controle (P3→P4 – histograma roxo).

Gráfico 5 – Média da contagem celular (triplicata), segundo o tipo de dissociação e o tratamento realizado



Fonte: arquivo pessoal, 2015

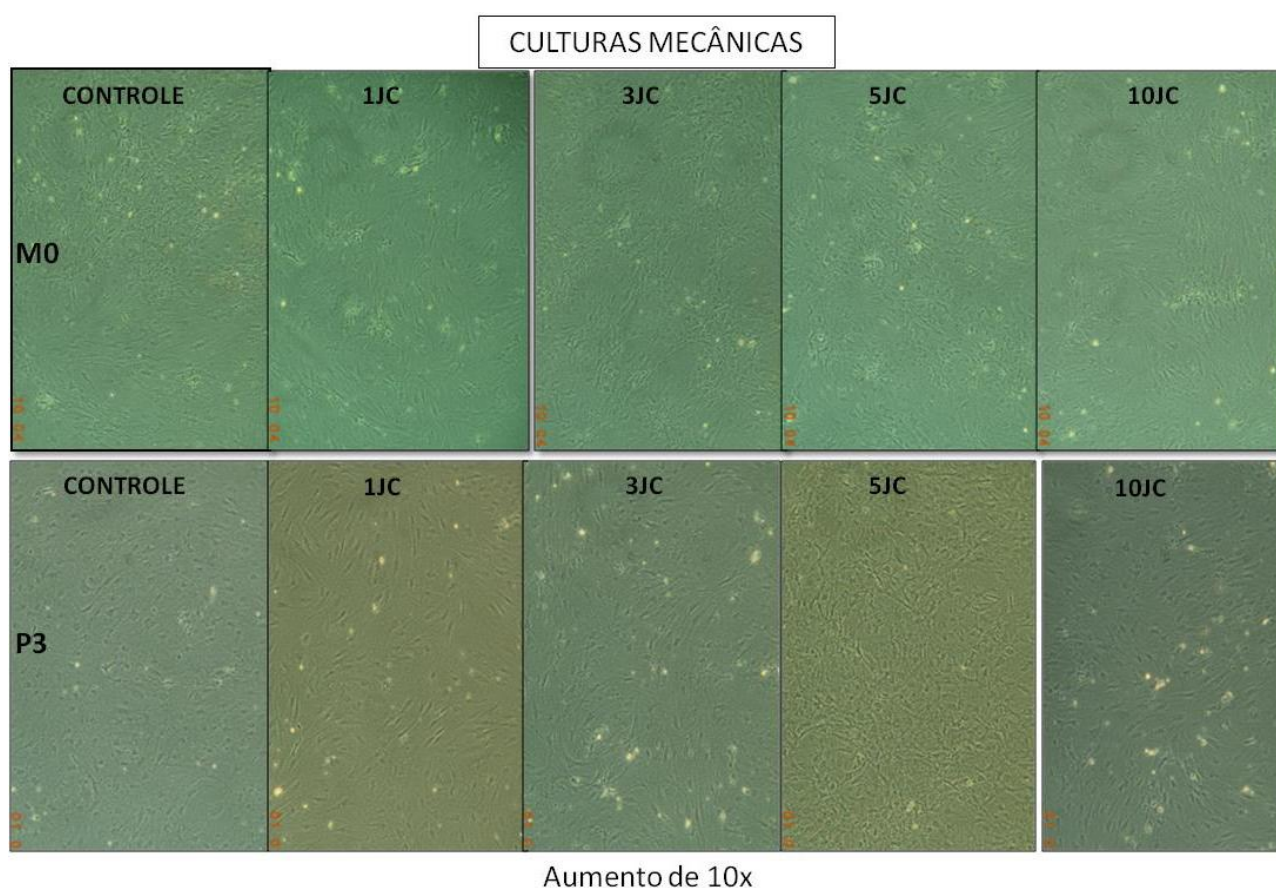
Analisando-se as médias das triplicatas biológicas realizadas de cada uma das 5 amostras, e posteriormente calculando-se a média das médias dos tratamentos, por tipo de dissociação, destacase que, para a DE, a luz que exerceu a maior influência foi a contínua, na dose de 3 J/cm^2 seguida da pulsátil, também na dose de 3 J/cm^2 com uma diminuição na dose de 5 J/cm^2 e nova bioestimulação na dose de 10 J/cm^2 pulsáteis. Para as CTMs obtidas por DM a bioestimulação ocorreu de forma inequívoca com ação da luz pulsátil nas doses de 1 e 5 J/cm^2 .

4.2.1 Aspectos morfológicos das culturas do experimento

Este item faz uma breve apresentação, por meio de imagens que foram fotodocumentadas e processadas durante a realização de todo o experimento, sempre acompanhadas de observações das placas no que diz respeito ao aspecto morfológico, confluência, presença ou não de indícios de contaminação, distribuição das CTMs na

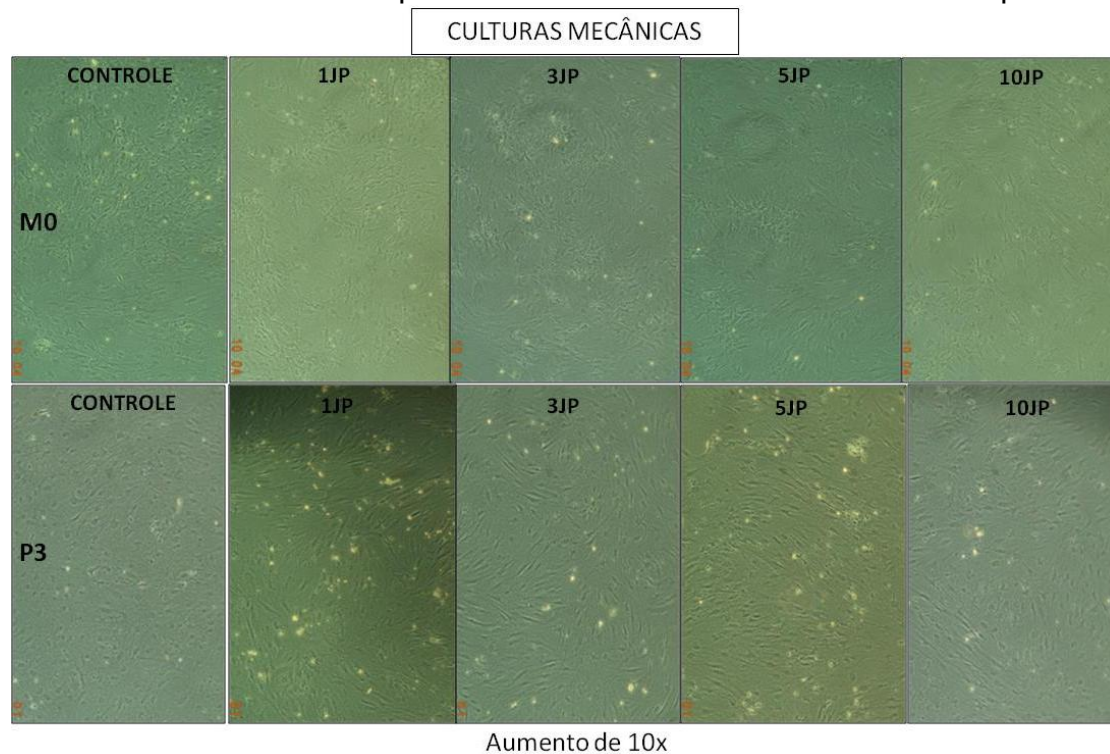
superfície das placas, considerando se houve ou não agregações/formações de colônia ou distribuição mais homogênea. A seguir, há imagens comparativas entre as amostras mecânicas e enzimáticas (M0 e P3 – última passagem), considerando cada um dos 9 tratamentos estabelecidos e realizados no experimento. As figuras 17 e 18 são relativas às culturas mecânicas, comparando M0 com P3 e as figuras 19 e 20 são relativas às culturas enzimáticas, mantendo-se a mesma comparação das culturas.

Figura 17 – Fotos em microscopia invertida das culturas mecânicas no experimento



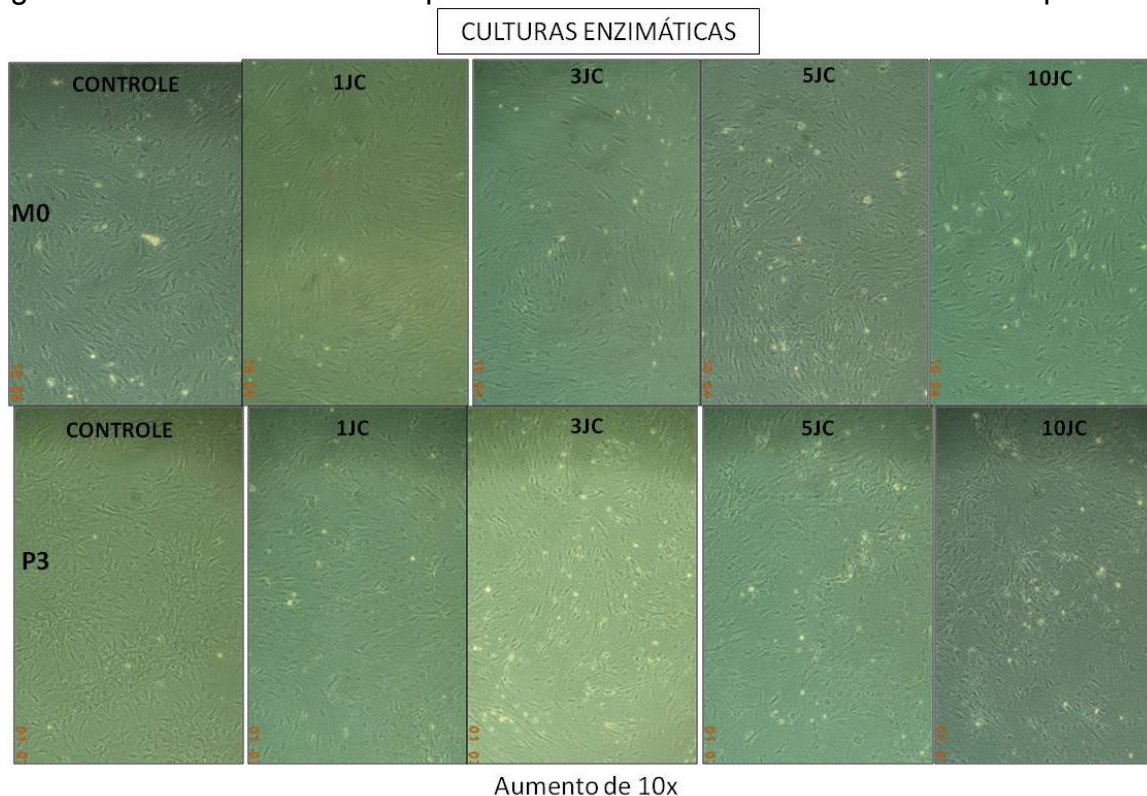
Legenda – Imagens superiores, com diferente aspectos morfológicos, correspondem às culturas de dissociação mecânica no momento inicial (M0) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm^2 luz contínua; Imagens inferiores correspondem às culturas no momento final (P3-P4) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm^2 luz contínua. 1 JC = 1 J/cm^2 luz contínua. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Figura 18 – Fotos em microscopia invertida das culturas mecânicas no experimento



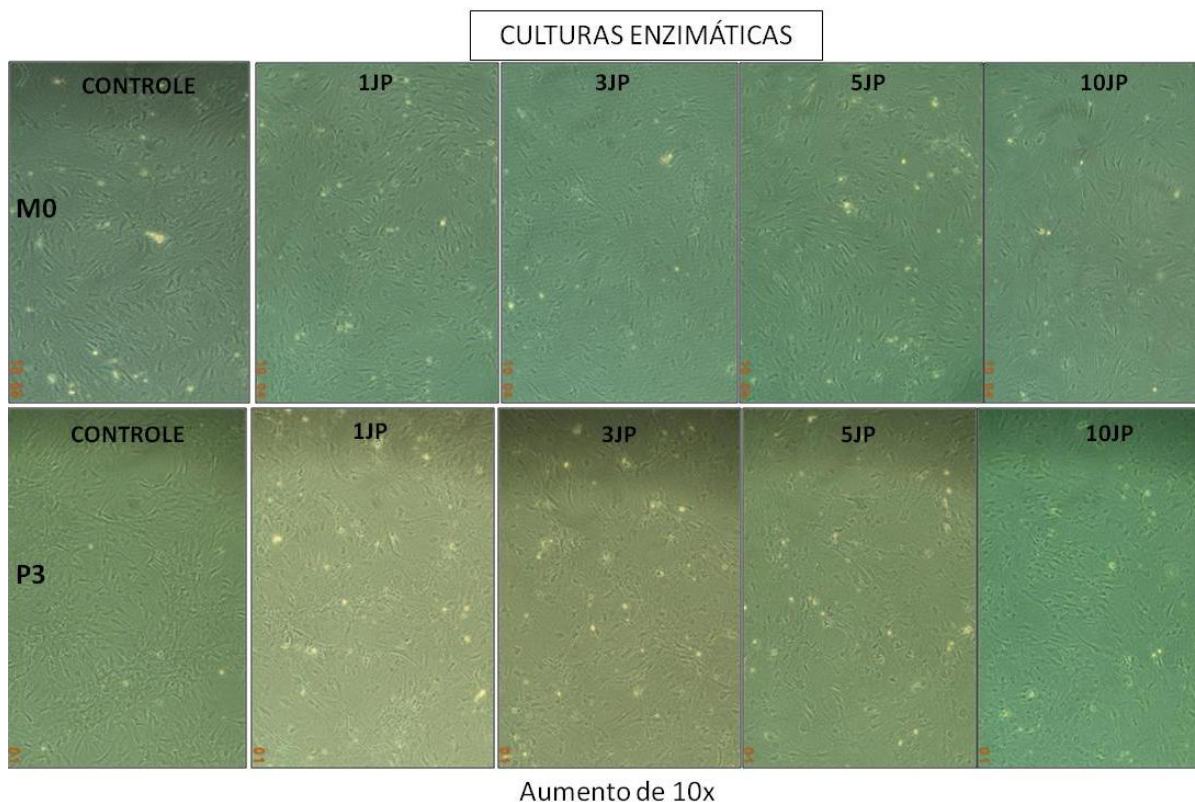
Legenda – Imagens superiores, com diferentes aspectos morfológicos, correspondem às culturas de dissociação mecânica no momento inicial (M0) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz pulsátil; Imagens inferiores correspondem às culturas no momento final (P3-P4) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz pulsátil. 1 JP = 1 J/cm² luz pulsátil. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Figura 19 – Fotos em microscopia invertida das culturas enzimáticas no experimento



Legenda – Imagens superiores, com diferente aspectos morfológicos, correspondem às culturas de dissociação enzimática no momento inicial (M0) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz contínua; Imagens inferiores correspondem às culturas no momento final (P3-P4) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz contínua. 1 JC = 1 J/cm² luz contínua. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Figura 20 – Fotos em microscopia invertida das culturas enzimáticas no experimento



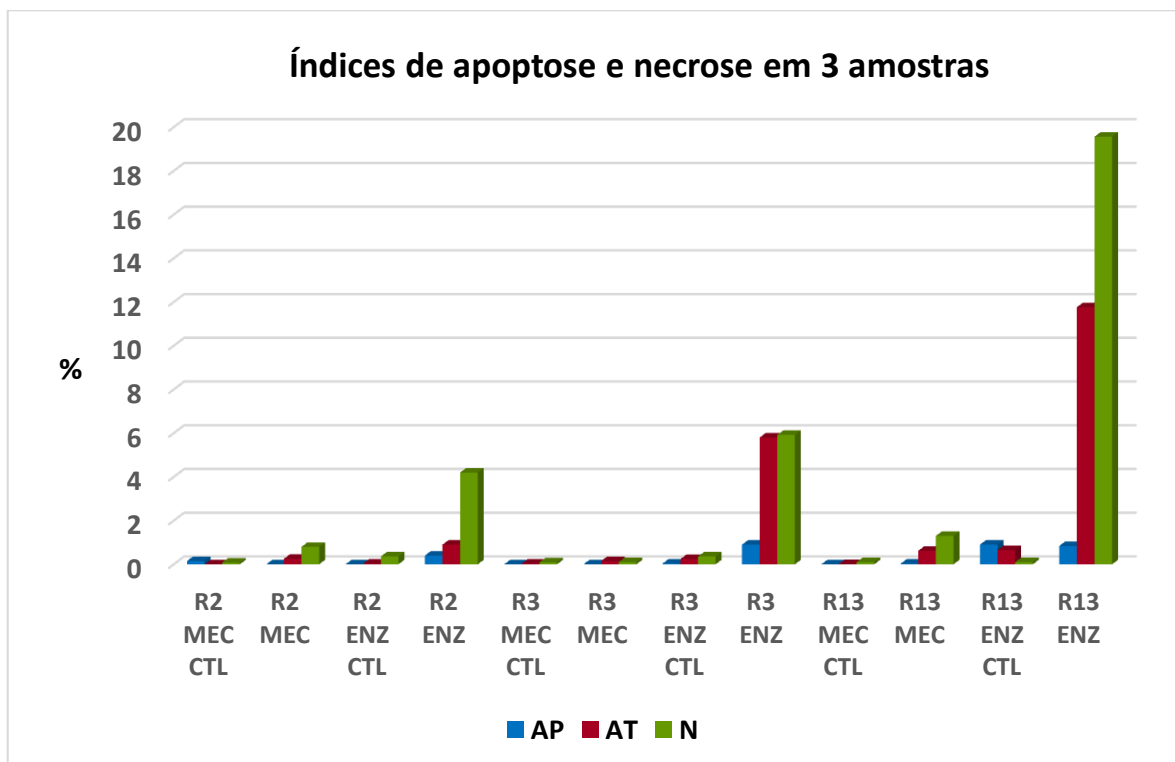
Legenda – Imagens superiores, com diferente aspectos morfológicos, correspondem às culturas de dissociação enzimática no momento inicial (M0) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz pulsátil; Imagens inferiores correspondem às culturas no momento final (P3-P4) do experimento, contendo 5 imagens: desde o controle até 10 J/cm² luz pulsátil. 1 JC = 1 J/cm² luz pulsátil. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

4.3 Índice de Apoptose e Necrose

As análises de morte celular e a determinação dos índices de apoptose e necrose foram realizadas pelo método de citometria de fluxo utilizando os conjuntos diagnósticos de Anexina V e Iodeto de Propídeo e Caspase-3. As análises foram divididas em: padronização, pré-experimento e após última dose de irradiação. As 3 primeiras amostras analisadas, pareadas, em triplicata biológica mostram que os índices de apoptose precoce (células marcadas exclusivamente com Anexina V e negativas com IP) tardia (Anexina V e IP positivas) e necrose (Anexina V negativa e IP

positiva) são maiores nas amostras obtidas por DE, com elevada significância estatística ($p < 0,0001$). O gráfico abaixo 6 mostra a média dos resultados das triplicatas biológicas em cada uma das condições, considerando apoptose precoce (AP), apoptose tardia (AT) e necrose (N).

Gráfico 6 – Índices de apoptose e necrose em 3 amostras de CTM-TA, pré-experimento, segundo o método de dissociação

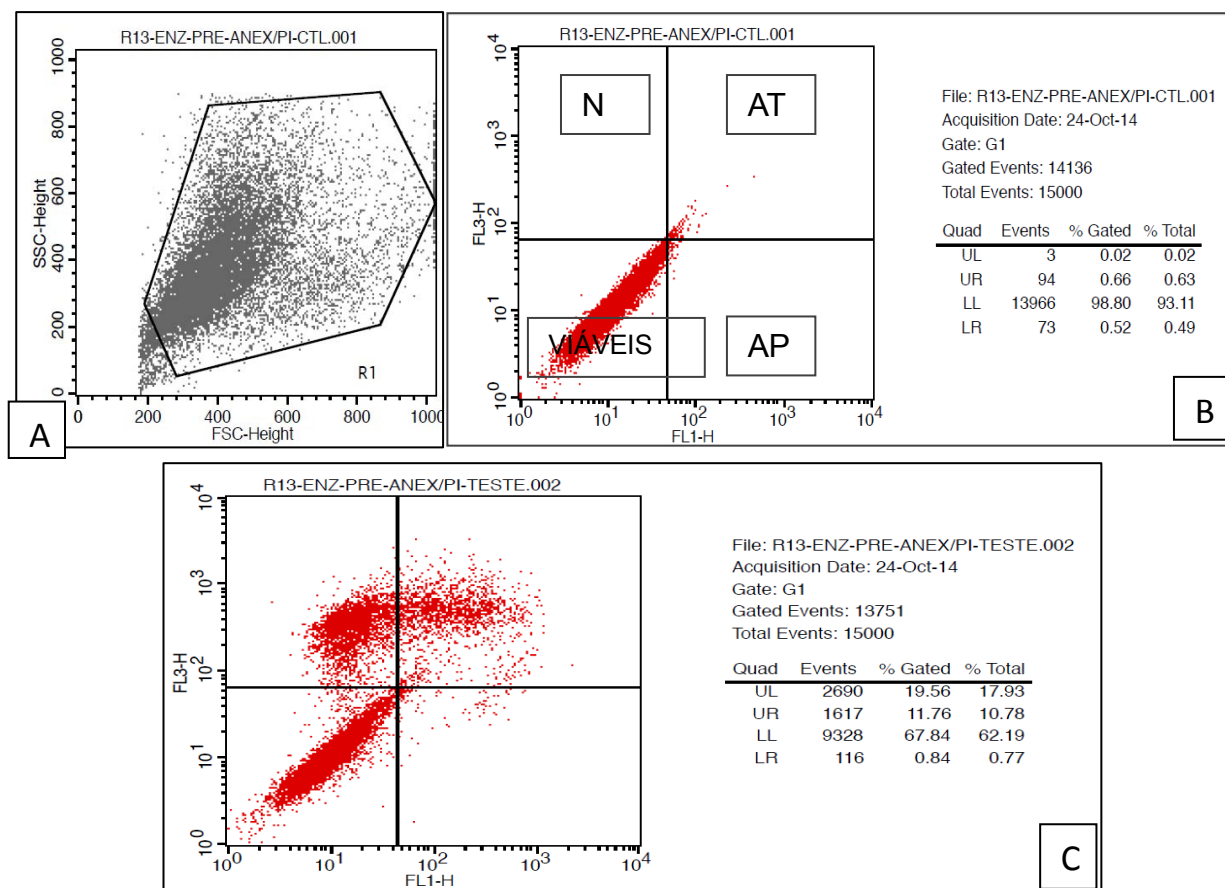


Legenda – 3 amostras de CTM pré-experimento, mecânicas e enzimáticas, destinadas à análise de apoptose e necrose. Observa-se valores consistentes e persistentes de morte celular para amostras enzimáticas. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Estes resultados são indicativos da ação devastadora que as enzimas podem determinar nas células, além de outros tipos de estresse determinado pelos procedimentos de congelamento/descongelamento, tripsinização e repicagens além dos eventuais choques bioquímicos por trocas de insumos/fornecedores de meios de cultura, soro fetal, aditivos e físicos como o choque térmico, mecânico e luminoso. A experiência ao longo dos tempos mostra que observar menos as células é melhor para elas. Isto é uma afirmativa baseada na minimização dos choques acima listados.

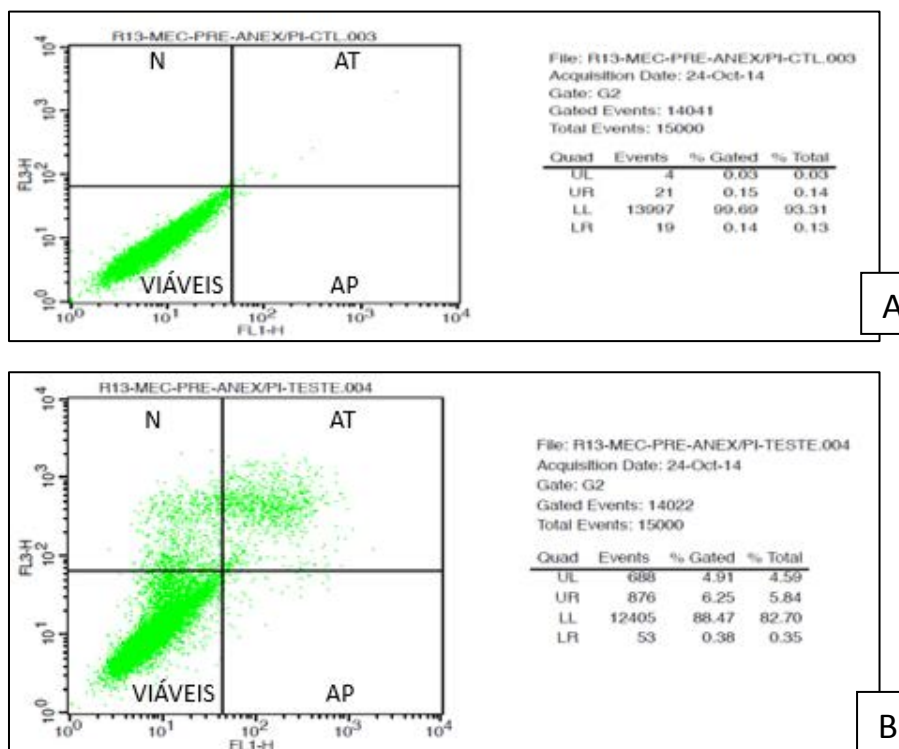
As figuras abaixo (21 e 22) representam a análise por citometria de fluxo onde pode se observar que foram analisadas 15.000 células. A imagem A corresponde à delimitação do *gate*, seguido da análise do controle negativo B (0.52% das células marcadas) e abaixo, a distribuição das células viáveis (67,84%), apoptose precoce 0,84%, apoptose tardia 10,78% e necrose 19,56% em C. Estes resultados são de amostra obtida por DE.

Figura 21 – Análise do índice de apoptose e necrose em amostra obtida por DE



Legenda – Imagens geradas pelo software do citômetro de fluxo em análise de amostras enzimáticas. A- plot constituindo a população de CTM analisada. B- área de plotagem com os quadrantes mostrando a marcação em vermelho de células viáveis (vivas) no quadrante inferior e esquerdo. C- marcação em vermelho de células viáveis no quadrante inferior e esquerdo, células em apoptose tardia no quadrante superior à direita e células em necrose no quadrante superior à esquerda. Fonte: arquivo pessoal, 2015

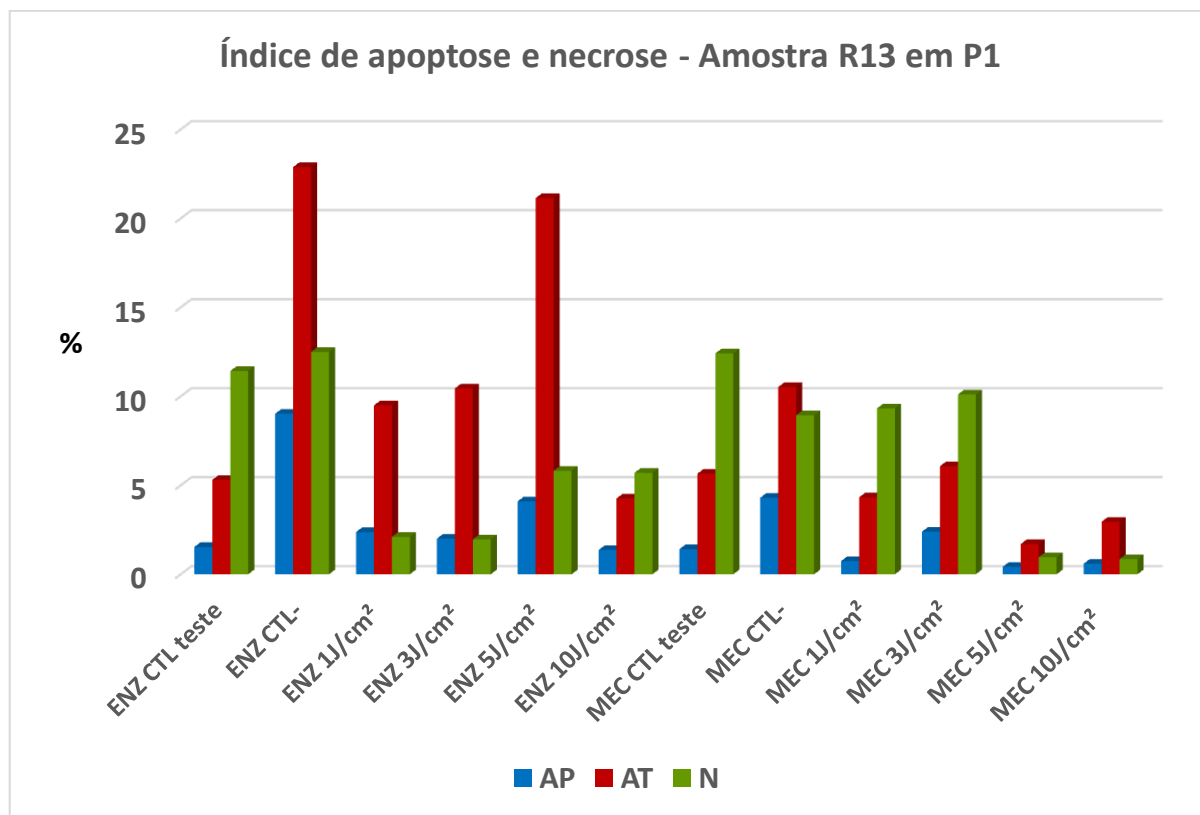
Figura 22 – Análise do índice apoptose e necrose em amostra obtida por DM



Legenda – Imagens geradas pelo software do citômetro de fluxo em análise de amostras mecânicas. A- área de plotagem com os quadrantes mostrando a marcação em verde de células viáveis (vivas) no quadrante inferior e esquerdo. B- marcação em verde de células viáveis no quadrante inferior e esquerdo, células em apoptose tardia no quadrante superior à direita e células em necrose no quadrante superior à esquerda. Percebe-se menor população de CTMs sofrendo morte celular no painel B, se comparado ao painel C da figura anterior (21). Fonte: arquivo pessoal, 2015

No Gráfico 7 pode ser observado que as doses de 1 e 3 J/cm², na luz contínua, oriundas de DE apresentam os menores índices de apoptose e necrose. Este gráfico exhibe valores correspondentes à amostra R13 (DM e DE) em primeira passagem do experimento (P1), em todos os tratamentos, ou seja, irradiados e não irradiados.

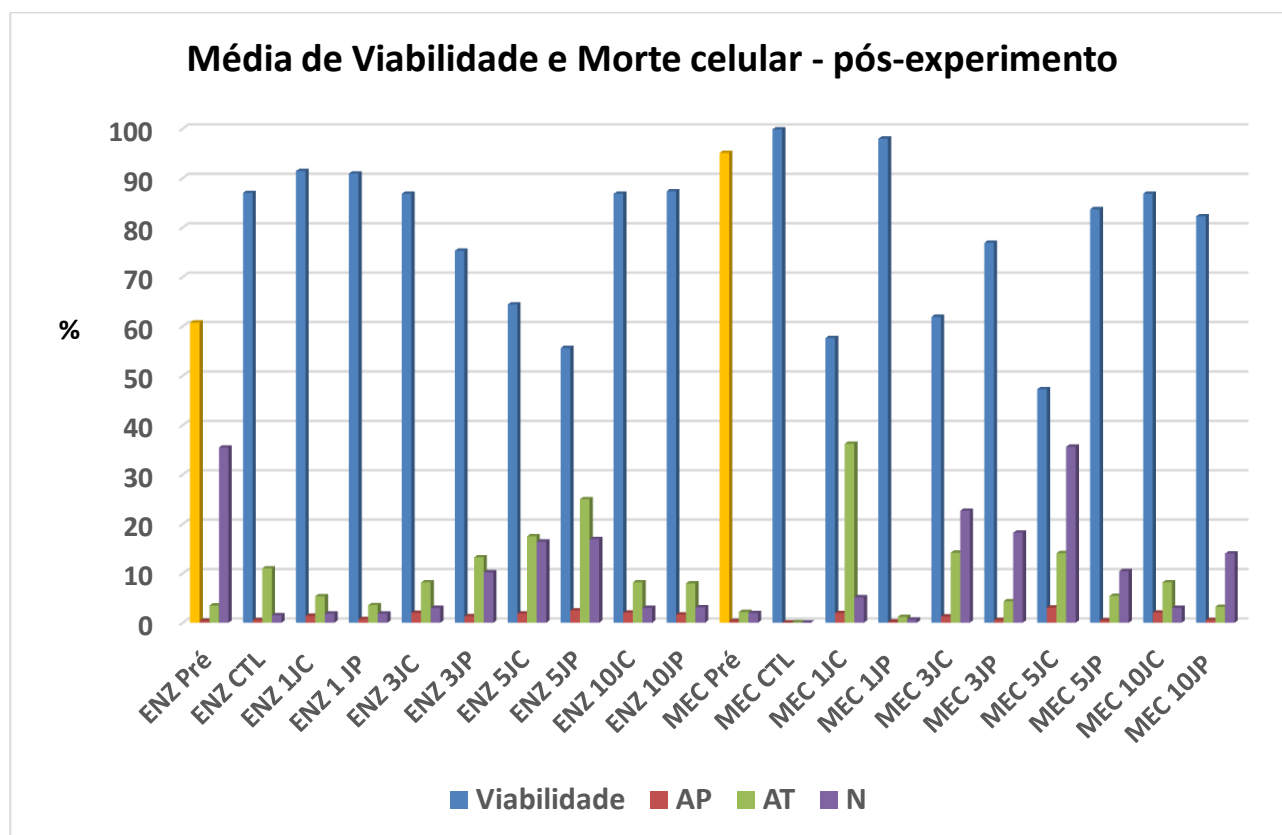
Gráfico 7 - Índice de apoptose e necrose em CTM, segundo o método de dissociação, em 1ª passagem e nas diferentes doses de irradiação



Legenda – Todos os tratamentos da amostra R13 em primeira passagem (P1) do experimento, considerando também a origem (DM e DE), avaliados pelo índice de morte celular. Observa-se inibição de morte por apoptose precoce e necrose em alguns tratamentos e aumento da morte em outros. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Após a irradiação, no final da quarta passagem, as células foram novamente analisadas para a determinação tanto da viabilidade, como dos índices de apoptose e necrose por citometria de fluxo. O gráfico 8 abaixo registra todas as análises realizadas. A viabilidade nas amostras de DE apresentam melhor desempenho com a irradiação, sendo que a dose de 1 J/cm² pulsátil e contínuo determinam o maior índice de viabilidade. Para as células obtidas por DM, a interpretação é diferente. A irradiação melhora a viabilidade quando comparada com a amostra pré-experimento, no entanto, com a amostra já expandida em P1, este efeito é menos evidente.

Gráfico 8 – Valore médios de viabilidade e apoptose e necrose, pós-experimento, segundo o método de dissociação e tratamentos



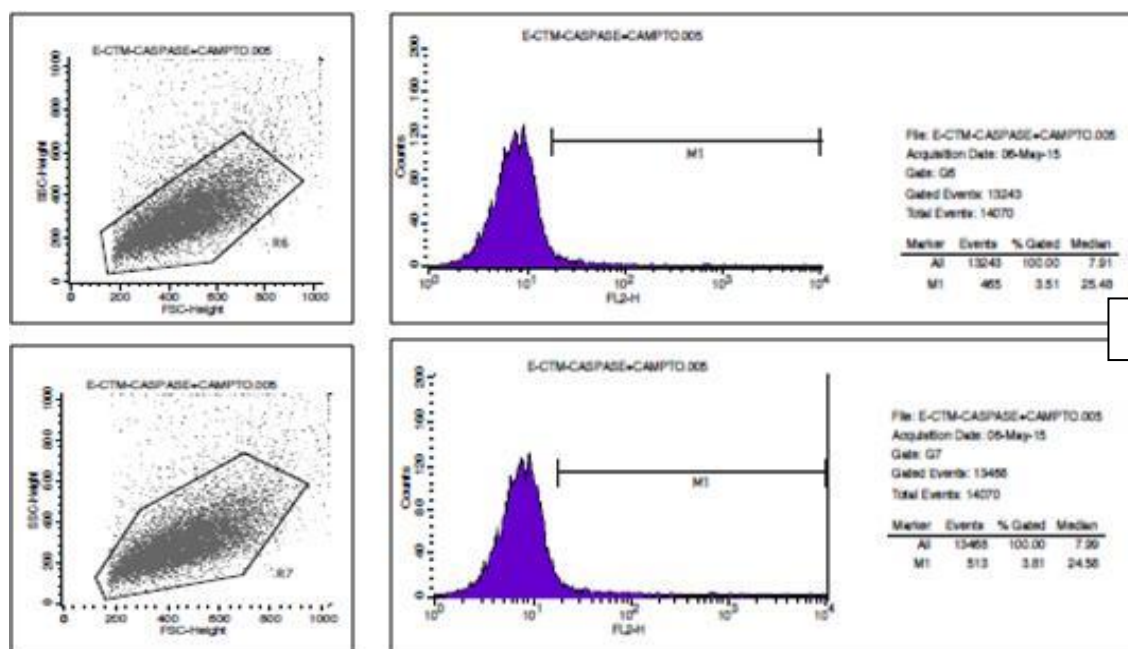
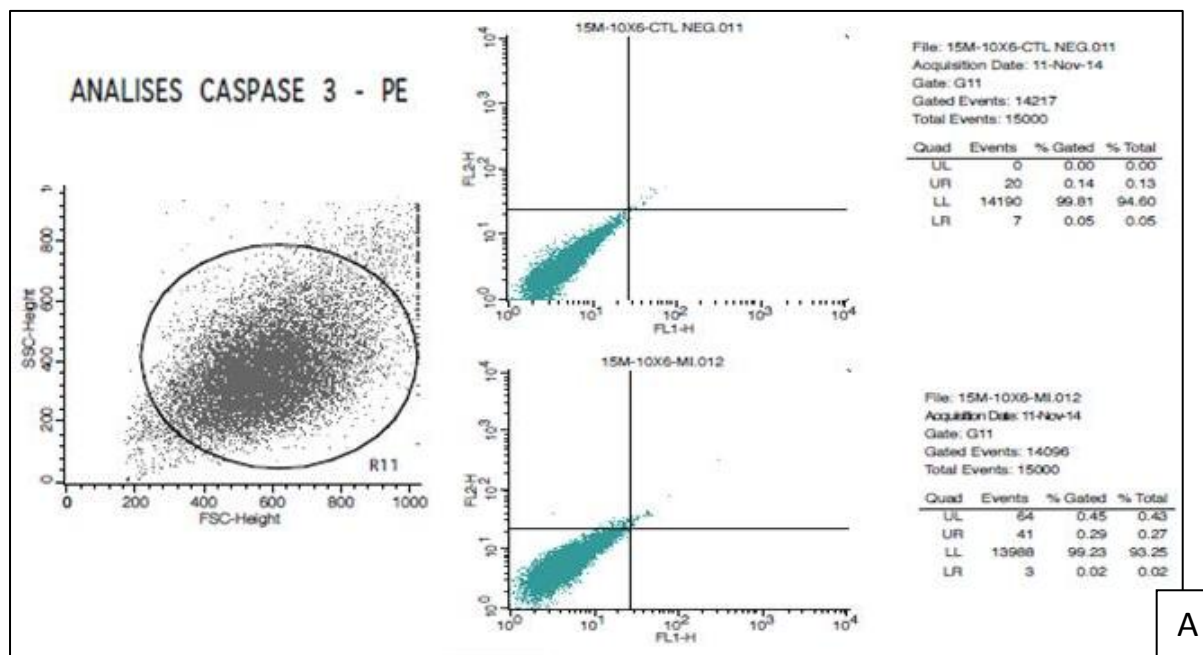
Legenda – Média de viabilidade e índices de morte celular no pós-experimento, considerando todos os tratamentos estabelecidos. Observa-se uma oscilação desses valores nos diferentes tratamentos, reforçando-se a inibição da morte para alguns e persistência para outros. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

4.3.1 Caspase-3: via alternativa de morte celular

A determinação de morte celular pela via das caspases, em especial a caspase-3 foi estabelecida no projeto original, no entanto, apesar de inúmeros esforços e inclusão de técnicas suplementares como as análises por *High Content Screening*, identificou-se que a CTM-TA de rato é resistente aos indutores de morte, impedindo desta forma a existência de controle positivo que confirmasse o funcionamento do teste (Figura 23). Inicialmente foi utilizado extrato de *Córdia ecalyculata* da fração etérea do método de purificação por cromatografia líquida, já utilizada em CTMs humanas por Vieira et al (2015), no qual este extrato induzia a morte das CTMs pela via das caspases, no entanto, este resultado não foi reproduzível nas CTMs de rato. Diante da dificuldade de se produzir um controle positivo foi adquirido a camptotecina (SigmaAldrich®), sabidamente indutora de morte celular pela via das caspases. No

entanto, apesar do uso das doses recomendadas de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, não houve morte celular. Optou-se então por aumentar progressivamente, chegando a se analisar até 5X a dose recomendada, e mesmo assim, a morte pela via das caspases não ocorreu.

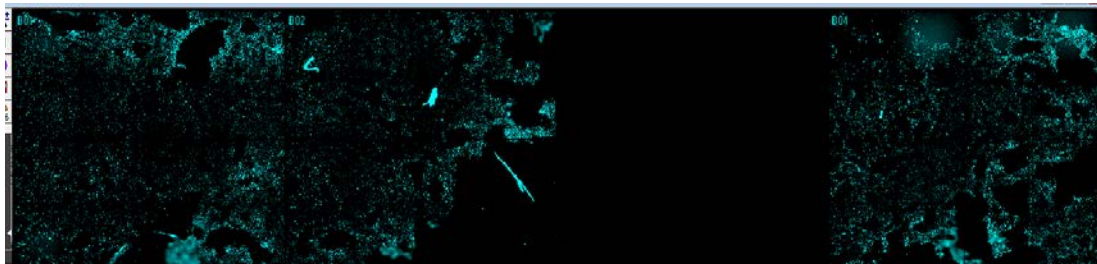
Figura 23 – Análise de morte celular via Caspase-3, por citometria de fluxo



Legenda – Imagens geradas pelo citômetro de fluxo das análises de CTM de morte celular pela via das caspases-3. Nota-se que em ambos os painéis A e B, que apresentam a população celular marcada em verde petróleo no plot e nos histogramas em roxo, não há positividade de marcação para morte celular. Apenas alta viabilidade da amostra. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Diante destes resultados, foi utilizado equipamento *High Content Analysis* with MetaXpress™ Software tendo como objetivo a análise da apoptose induzida pela camptotecina pela via da caspase-3. Foram utilizados como marcadores fluorescentes o DAPI (para núcleo) e PE Rabbit Anti-Active Caspase-3 (Figura 24).

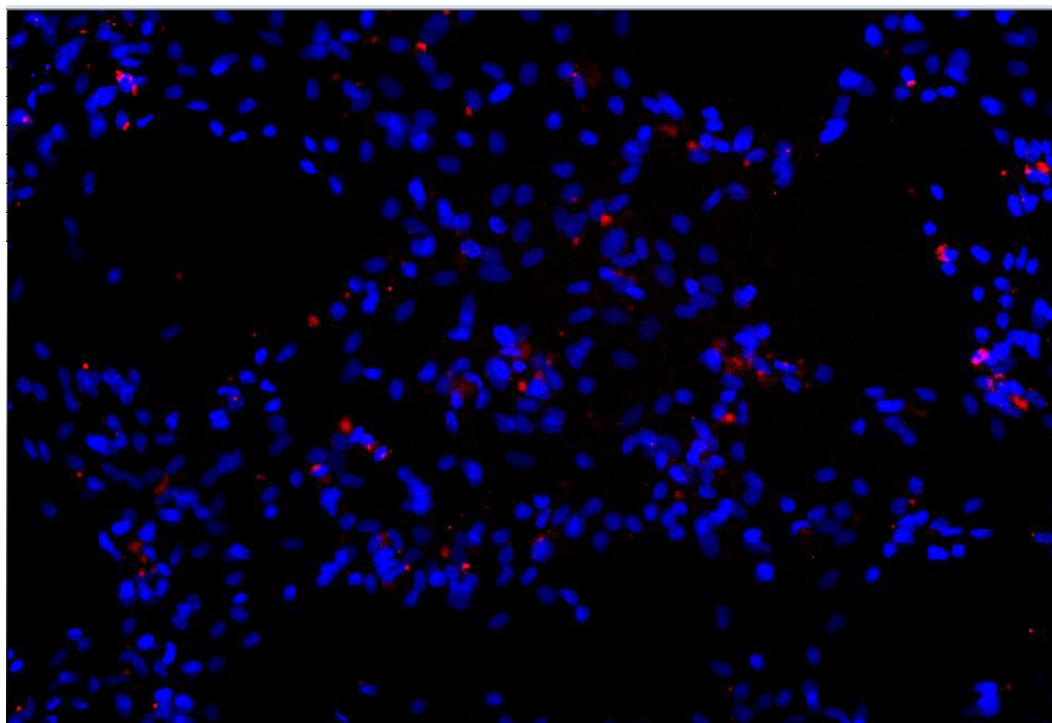
Figura 24 - Visualização dos campos pelo software MetaXpress® HTS



Fonte: arquivo pessoal, 2015

Trata-se de uma visualização que identifica a distribuição da população de células no canal de leitura de fluorescência do DAPI (Figura 25).

Figura 25 – Análise combinada de campo pelo software MetaXpress®HTS com marcador DAPI e anti-caspase-3 marcado com ficoeritrina (vermelho)



Fonte: arquivo pessoal, 2015

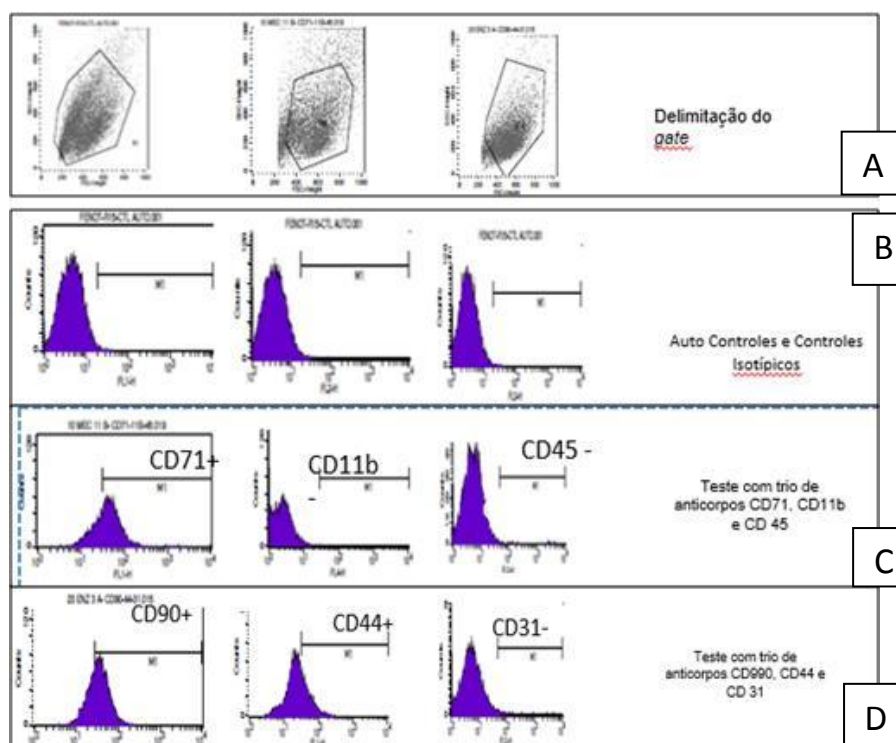
Foram analisadas 24.590 células em todos os poços da placa, sendo que a positividade foi de 6%, com a utilização de dose indutora de morte com a

camptotecina, em que o resultado esperado era de 70-80% de morte. Os achados dos ensaios com caspase-3 corroboram àqueles publicados por Hosseini et al (2015) em que os autores mostram, em estudo de isquemia cerebral, que a administração endovenosa de CTM-TA em rato reduz a atividade da caspase-3 e conseqüentemente as células não morrem por essa via apoptótica. A ativação da família de *interleukin-1 β -converting enzyme* (ICE) inicia uma apoptose em mamífero por ação de proteases ou caspases. Algumas CT são capazes de reduzir a apoptose pelo mecanismo de *down regulation* de genes apoptóticos como o gene da caspase-3.

4.4 Imunofenotipagem

Para os testes de imunofenotipagem processados por citometria de fluxo, o *Software Cell Quest BD*[®] após o processamento da amostra delimita o *gate*, processa os controles isotópicos e auto-controle, e posteriormente os testes. A Figura 26 representa uma de delimitação do *gate*, histogramas dos controles isotópicos dos três marcadores utilizados e a análise com a realização dos histogramas.

Figura 26 - Representação de resultado da imunofenotipagem com 6 anticorpos

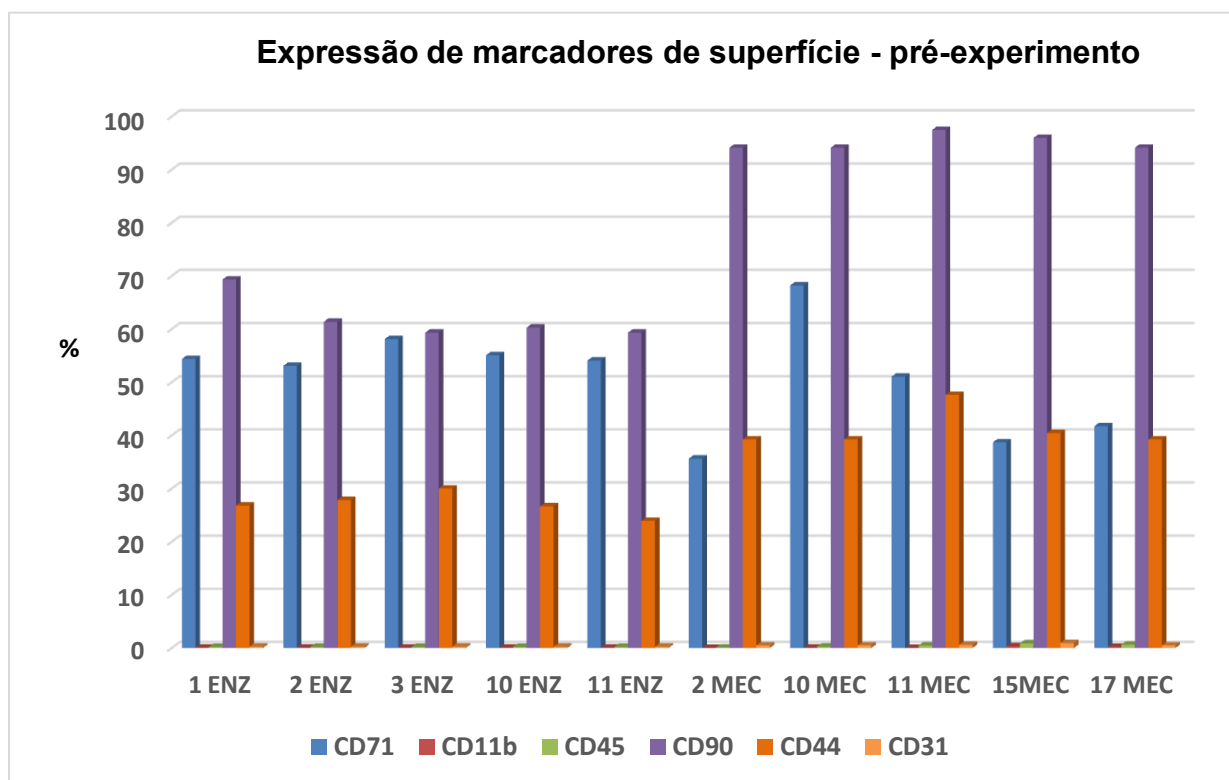


Legenda – Imagens do teste de imunofenotipagem geradas pelo software do citômetro de fluxo. A- população de CTM selecionada para análise. B- histogramas em roxo mostrando marcação negativa dos controles isotópicos e autocontroles (deslocado à esquerda). C- histogramas em roxo mostrando positividade de marcação para o CD71 (deslocado à direita) e negatividade de

marcação para os CD11b e CD45. D- histogramas em roxo deslocados à direita no CD90 e CD44, e à esquerda para o CD31. Fonte: arquivo pessoal, 2015

O *software* gera a tabela de dados que foram computados em planilha Excel para análise estatística. Os resultados da imunofenotipagem pelo método de Citometria de Fluxo apresentados em gráfico de barras mostra que a dissociação enzimática compromete a expressão de alguns marcadores importantes para as CTMs como CD90 e CD44, que se expressam em índices menores. Este fato deve ser explicado pela ação da colagenase sobre os antígenos de superfície (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Imunofenotipagem com diferentes marcadores de superfície: CD71, CD11b, CD45, CD90, CD44 e CD31, segundo o método de dissociação, pré-experimento



Legenda – Imunofenotipagem realizada em todas as amostras pré-experimento, mecânicas e enzimáticas. Observa-se a expressão dos marcadores positivos e esperados em todos. Há maior expressividade nas CTMs de origem mecânica. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Bradley et al (2013) e Shen et al (2015) registram dados semelhantes. O primeiro autor identificou a ação nefasta da enzima sobre os antígenos de CTM com relação ao CD90, lembrando que este antígeno é uma proteína glicosilada de 25-37 kDa ancorada na glicofasfatidilinositol que é uma proteína conservada na superfície da

membrana celular. A enzima pode atuar na glicosilação removendo a parte externa do antígeno. Este dado não está descrito na literatura de forma contundente. Encontrou-se apenas um artigo que aborda o fato, mas sabendo-se que este antígeno está relacionado com a resposta Thy-1 e o processo de imunoregulação da CTM, esta ação pode comprometer a terapia celular. O segundo autor identificou o mesmo fato, com relação ao marcador CD27, em amostras de intestino digeridas por colagenase. Nos protocolos de digestão enzimática, o fornecedor da enzima é o mesmo utilizado neste protocolo. O autor ressalta ainda que, apesar da enzima determinar perda de expressão do CD27, observou-se que o percentual de expressão do mesmo aumenta após 24 horas de passagem em cultura.

Conforme observado nos resultados da citometria de fluxo, foram consideradas amostras individuais (n=5), submetidas à imunofenotipagem logo após expansão em cultura, para se obter o número adequado de células para o experimento. Este como um todo envolveu um número de animais maior (n=15). No entanto, tendo em vista o alto custo dos insumos para a técnica em questão e as necessidades de expansão de grande número de amostras, optou-se pela imunofenotipagem com n de 5.

Estes dados com amostras de rato apresentam resultados que corroboram os de Cleto et al (2011) que fez a dissociação pelo duplo método com CTMs humanas e observou também a menor expressão de CD90 em CTM-TA humanas obtidas pela DE. Gedye et al (2013) analisaram dados semelhantes afirmando que a citometria de fluxo é uma técnica amplamente utilizada para analisar antígenos da superfície celular em células que tenham sido submetidas a várias manipulações experimentais em laboratório. Estas incluem o uso de enzimas, tais como a tripsinização de células cultivadas ou digestão por colagenase, para tecidos sólidos, e criopreservação. Além disso, é comum se fixar as células em paraformaldeído antes da análise, para reservar as células até o momento conveniente da análise, além de eliminar riscos biológicos potenciais presentes nas amostras biológicas, em especial as humanas. Os antígenos de superfície celular, proteicos, são potencialmente vulneráveis a tais tratamentos e podem ser afetados negativamente pela denominada digestão enzimática não específica e/ou alterados por condições estressantes, como congelamento e descongelamento. O quadro 3 representa os três marcadores afetados pelo método de dissociação enzimática com uso de colagenase tipo I. (*Sigma Aldrich*®).

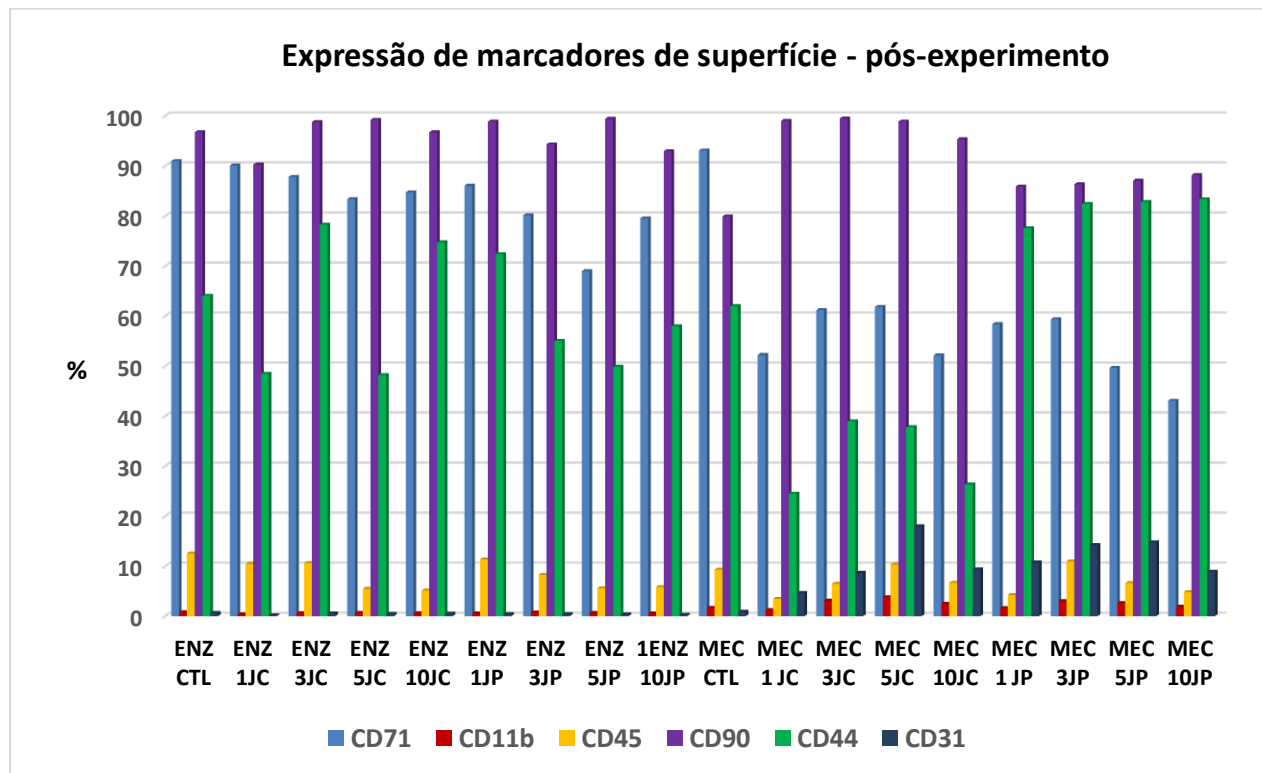
Quadro 3 – Função de marcador CD90, CD44 e CD71 e a média percentual de perda por ação da colagenase tipo I

MARCADOR	OBSERVAÇÃO
CD90 Imunomodulação	41,69% mais expresso em amostras obtidas por DM
CD44 Fenômenos intracelulares e atividade antitumoral	25% mais expresso em amostras obtidas por DM
CD71	5-18% mais expresso em CTM obtidas por DE

Os dados encontrados neste trabalho corroboram os de Gedye et al (2013) em que o percentual de perda de expressão do antígeno CD90 foi de 30%. Corotchi et al (2013) relataram em seus estudos que o uso de DE por colagenase em seu experimento de avaliação da capacidade do potencial de CTMs preservou apenas um marcador de superfície celular, o CD44, dentre 4 avaliados, após teste com citometria de fluxo. Além disso, observaram que a capacidade de diferenciação também é dependente do método de isolamento. O presente resultado identificou maior estabilidade antigênica no marcador CD71, visto que o CD44 teve uma perda média de 25% da expressão em relação ao método mecânico.

Os procedimentos de expansão celular e cultura envolveram grande parte de todo o experimento, e algumas amostras foram contaminadas. Frente a isto, optou-se por levar o experimento de irradiação com 5 amostras pareadas, no entanto as análises finais foram processadas muito próximo da data final de entrega da tese, por problemas inerentes à cultura celular. Para que os dados fossem analisados decidiu-se por realizar um *pool* das 5 amostras do mesmo tratamento. O Gráfico 10 representa a imunofenotipagem final do *pool* de 5 amostras de cada um dos diferentes tratamentos.

Gráfico 10 – Imunofenotipagem (expressão dos marcadores de superfície) do pool de 5 amostras dos diferentes tratamentos



Legenda – Imunofenotipagem realizada em todas as amostras do pós-experimento, considerando-se todos os tratamentos estabelecidos. Nota-se a persistência dos marcadores positivos com alguma diferença percentual na expressão, de acordo com o tipo de dissociação e regime de luz. É evidente a presença dos marcadores negativos à CTM, com destaque para todas as amostras de origem mecânica. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Observa-se que nas amostras controle que foram submetidas às passagens, mas não receberam irradiação, houve recuperação dos índices da média de intensidade de fluorescência dos marcadores CD90 e CD44, que na avaliação pré-experimento apresentam-se com valores inferiores (comparar com o gráfico anterior). Este efeito pode ser pelo método de cultura em si, portanto isto pode ser um efeito reparador não ligado ao tratamento com LED.

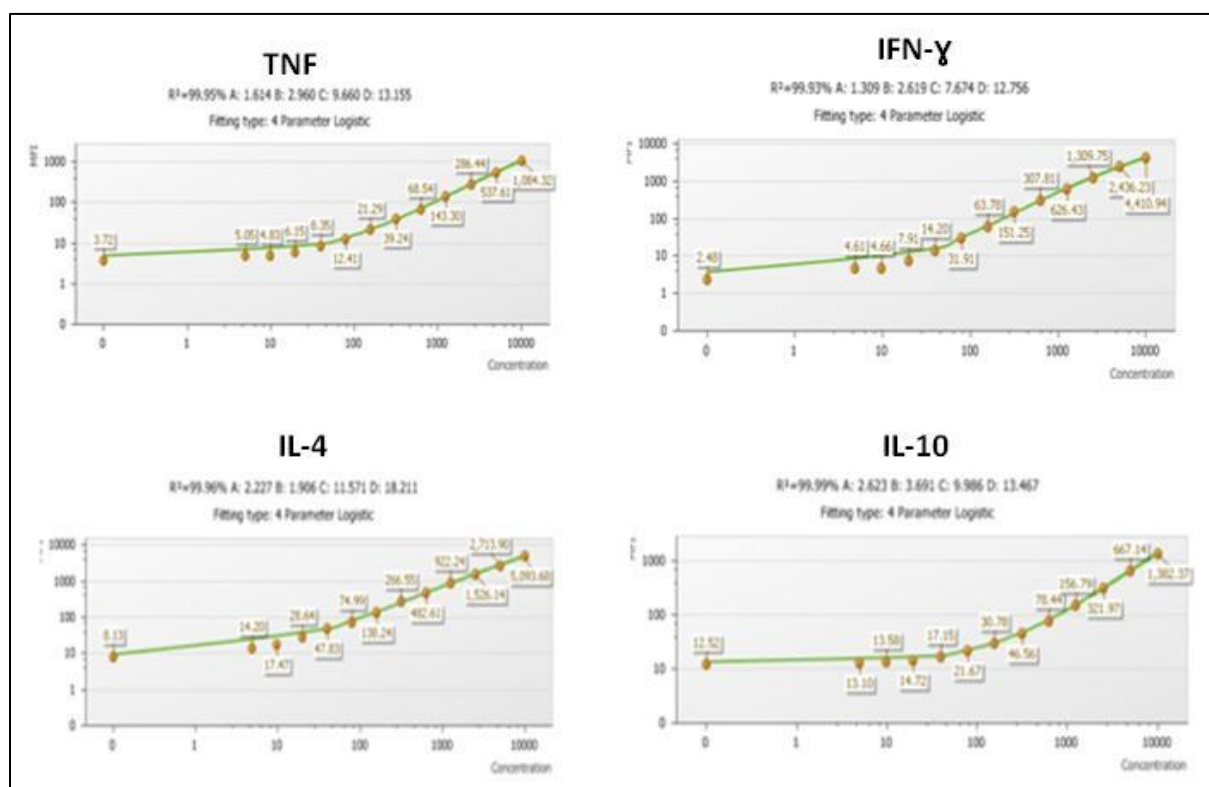
É importante destacar que este teste revelou, o surgimento de características imunofenotípicas que não eram presentes nas CTM pré-fenotipadas. O meio de cultura em que as mesmas foram mantidas, neste caso, não era meio de diferenciação, mas sim, meio de amplificação de CTM. A identificação de marcadores específicos para vasos (aumento da expressão de CD31) e para células dendríticas (CD11b) mostra que luz induziu à diferenciação, em meio não específico. Isto levanta a possibilidade de usar os princípios da biofotônica em substituição às moléculas e meios de cultura,

tornando os procedimentos de expansão celular mais controláveis e menos onerosos. De acordo com os resultados por citometria de fluxo das amostras do pós-experimento (última passagem) todas as culturas de CTMs tratadas com o LED (luz contínua e pulsátil), além do controle negativo, advindas da dissociação mecânica, exibiram positividade considerável para os 3 marcadores negativos: CD31 CD11b e CD45 (Gráfico 8). Sabe-se que o marcador CD31 está associado à angiogênese, o CD11b está associado ao sistema imune e com a produção de células dendríticas e o CD45 é característico marcador pan-leucocitário. Estes resultados apontam o uso do LED como potencial ferramenta de indução de células-tronco comissionadas. Considerando-se essas afirmações, destaca-se a importância da contribuição da luz, pelo uso do LED, como bioestimulador da expressão de marcadores de superfície de CTMs, que embora não sejam típicos delas, são fundamentais para uso em tratamentos como regeneração de tecidos e terapia celular diversos.

É possível observar ainda no gráfico 8 que a única amostra advinda de DM que conservou uma marcação negativa para o CD31 foi o controle negativo, que não recebeu irradiação pelo LED. Esse achado corrobora o resultado encontrado na citoquímica realizada para avaliação da diferenciação condrogênica, assim como nas demais amostras. Além disso, percebe-se que todas as amostras tratadas com LED e o controle negativo oriundos de dissociação enzimática mantêm o perfil negativo de expressão de 2 marcadores, o CD31 e o CD11b. Acredita-se que a enzima colagenase exerceu papel danoso sobre as CTMs, descaracterizando seu perfil fenotípico de marcadores positivos e impedindo que o LED pudesse atuar como bioestimulador sobre as mesmas.

4.5 Dosagem de citocinas

Optou-se por dosar um conjunto de citocinas, pelo método CBA, por citometria de fluxo: 2 marcadores pró-inflamatórios TNF, IFN γ e outros 2 anti-inflamatórios IL-10 e IL-4. Para a interpretação dos dados obtidos, inicialmente foi realizada a curva de calibração padrão mediante 13 amostras bem determinadas. Abaixo na figura 27 estão representadas as curvas de cada um dos marcadores avaliados. As determinações foram realizadas pré-plaqueamento (Quadro 4), primeira passagem (M0-P1) e na última passagem (P3-P4), ambos visualizados no quadro 5. Foram analisadas as 5 amostras dos dois métodos de dissociação.

Figura 27 - Curva-padrão das diferentes citocinas: TNF, IFN γ , IL-4 e IL-10

Legenda – Cada uma das 4 imagens representa a curva- padrão de cada citocina analisada por CBA (TNF, IFN- γ , IL-4 e IL-10). As curvas mostram a padronização do kit e validação para análise.
Fonte: arquivo pessoal, 2015.

A técnica funcionou adequadamente, e as curvas-padrão tiveram o desempenho esperado com doses expressas em pg/ml. As 10 análises do momento pré-experimento (5 enzimáticas e 5 mecânicas) foram analisadas, sendo que apenas 4 mostraram positividade de secreção e somente para a IL-4 (anti-inflamatória). Não houve dúvidas sobre essas determinações levando em consideração de que as curvas-padrão tiveram o resultado esperado.

Quadro 4 – Determinação de diferentes citocinas nas CTMs obtidas por DM e DE, no pré-experimento, expresso em pg/ml, pelo método CBA Flex

Amostra	TNF	IL-10	IL-4	IFN γ
11 MEC Pré	0	0	0,64	0
17 MEC Pré	0	0	0,44	0
3 ENZ Pré	0	0	0,92	0
11 ENZ Pré	0	0	1,01	0

No total foram processadas 10 amostras pré-experimento e outras 160 amostras de sobrenadantes de cultura, dos poços da placa de cultura. Destas 170 análises realizadas, de acordo com o quadro 5, foi identificada a presença de citocinas em 19 (11,17%) após a primeira passagem (P1) o experimento (com o LED), e na última passagem (P4). Das 19 amostras reagentes, 4 (21%) foram em amostras controle (não irradiadas), o que leva a crer que o método de cultura promove, em meio apropriado, algum grau de estímulo secretor. Em 2 amostras controle, obtidas por DM, a expressão de IL-4 foi detectada em P1, mas não na P4. Em 1 amostra deste grupo de DM, a detecção foi apenas em P4. Apenas 1 amostra controle obtida por DE secretou IL-4 em P1 (vide quadro 5). Das 15 amostras que sofreram irradiação e houve a detecção de citocinas secretadas no meio de cultura, 2 foram obtidas por DE. Estes dados podem levantar a hipótese de que não somente ocorre a ação devastadora da enzima sobre os antígenos de superfície da membrana celular, mas que de alguma forma estas enzimas alteram o metabolismo celular.

O quadro 5 mostra que o TNF foi identificado em dois sobrenadantes de cultura, na amostra R10 Mec submetida à irradiação pulsátil na dose de 3 J/cm^2 , mas não foi detectada no final do experimento. Outra amostra em cujo sobrenadante foi identificado o TNF foi a R11 Mec 1 J/cm^2 , também luz pulsátil. Deve-se lembrar que esta citocina age como pró-inflamatória. O IFN- γ não foi identificado em nenhum sobrenadante de cultura. Das citocinas anti-inflamatórias, 3 amostras revelaram concentrações mais elevadas de IL-10 (duas mecânicas e uma enzimática) em P1 e P4. A IL-4 foi identificada em 7 amostras após P1 e em outras 10 no final do experimento (P4). Este marcador pode indicar o efeito positivo da irradiação sobre as CTMs cultivadas. Os resultados obtidos podem ser justificados pelo patrimônio genético de cada amostra, e eventualmente com lesões determinadas pela cultura celular, que impedem o mecanismo secretório das células. As doses de irradiação que melhor sugerem efeito bioestimulador da secreção de citocinas são: 1 e 3 J/cm^2 luz pulsátil. Contudo, algumas amostras foram sensíveis e mostraram relevante expressividade, sendo correspondentes às doses 5 e 10 J/cm^2 luz pulsátil.

Quadro 5 – Determinação de diferentes citocinas em primeira e última passagem nas CTMs obtidas por DM e DE, expresso em pg/ml, pelo método CBA Flex

Amostras	Primeira Passagem (N = 72)				Última Passagem (N = 72)			
	TNF	IL-10	IL-4	IFN γ -	TNF	IL-10	IL-4	IFN γ
10 MEC CTL	0	0	0,92	0	0	0	0	0
10 MEC 1J C	0	0	0,44	0	0	0	0,64	0
10 MEC 5J C	0	0	0	0	0	0	0,44	0
10 MEC 1J P	0	0	0	0	0	0	0,92	0
10 MEC 3J P	6,64	11,34	3,38	0	0	0	0	0
11 MEC CTL	0	0	0	0	0	0	0,92	0
11 MEC 1J C	0	0	0	0	0	0	0,44	0
11 MEC 10JC	0	2,04	0	0	0	0	0	0
11 MEC 1J P	0	0	0	0	6,64	11,34	3,38	0
11 MEC 3J P	0	0	0,92	0	0	0	1,01	0
11 MEC 5J P	0	0	0,54	0	0	0	0	0
15 MEC 5J C	0	0	0	0	0	2,04	0	0
15 MEC 1J P	0	0	0	0	0	0	0,92	0
15 MEC 3J P	0	0	0	0	0	0	0,54	0
17 MEC CTL	0	0	0,44	0	0	0	0	0
17 MEC 10J P	0	0	0	0	0	0	0,31	0
3 ENZ CTL	0	0	0,92	0	0	0	0	0
3 ENZ 10J P	0	13,62	0	0	0	0	0	0
10 ENZ 5J P	0	0	0	0	0	13,62	0	0
TOTAL	1	3	7	0	1	3	10	0

Legenda – Resultados das amostras analisadas para detecção de citocinas secretadas. Nota-se supremacia das amostras de origem mecânica e maior secreção de citocinas no regime de luz pulsátil. Fonte: arquivo pessoal, 2015

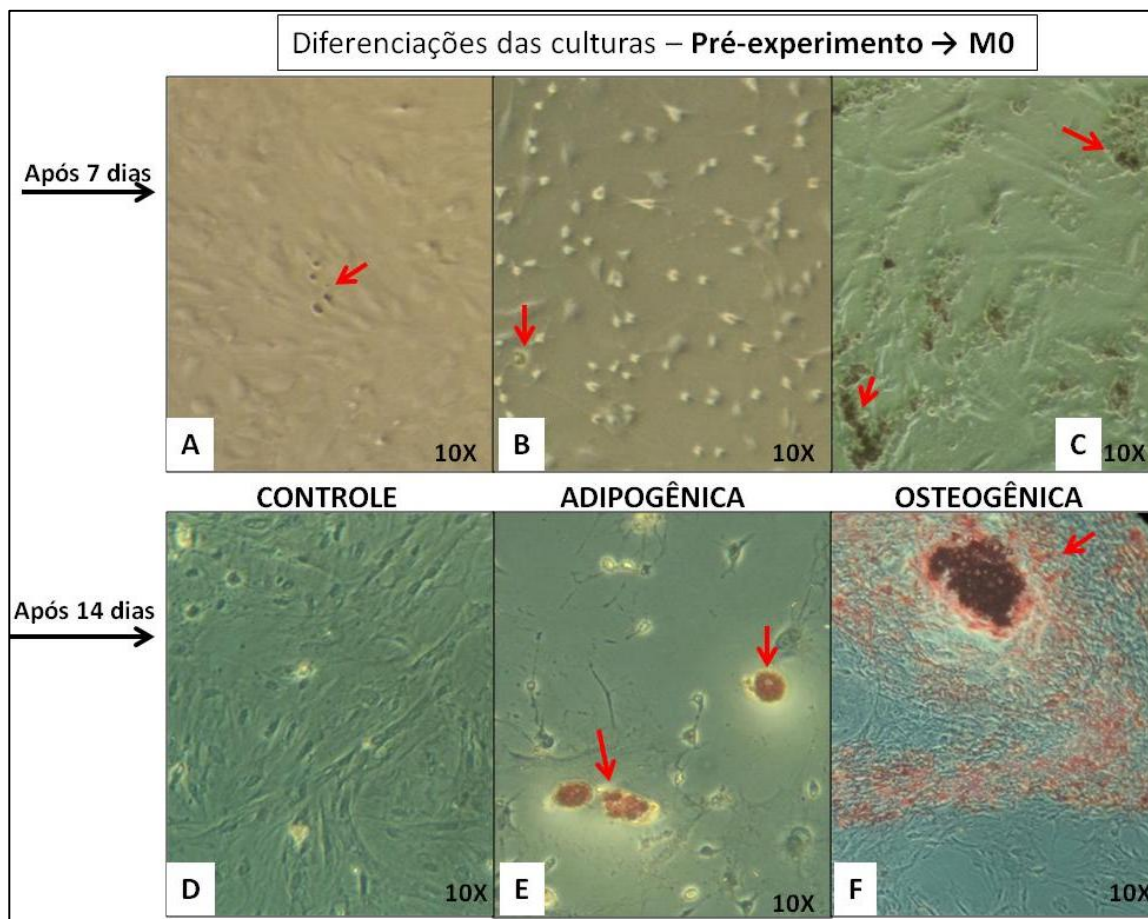
Segundo Linero e Chaparro (2014) a secreção de fatores bioativos pelas CTM desempenha um papel crítico na modulação de processos inflamatórios, na imunorregulação e na diferenciação das células. Esses fatores, dentre eles as citocinas, podem ser coletados no que tem sido chamado de meio condicionado que, quando infundidos em protocolos clínicos de modelos animais, tem resposta terapêutica em diferentes doenças, efeitos estes semelhantes aos exercidos pelas células, aumentando o processo de reparação tecidual em infarto agudo do miocárdio, por exemplo, além de fator neuroprotetor bem estabelecido e dos efeitos de remodelamento tecidual no caso de feridas crônicas.

4.6 Potencial de diferenciação: trilingagem

As culturas de CTM destinadas ao experimento, foram submetidas às 3 diferenciações preconizadas no trabalho: adipogênica, osteogênica e condrogênica. A

partir desses resultados positivos e esperados para as 3 diferenciações, conforme observa-se nas figuras 28 e 29, comprovou-se mais uma característica típica das CTMs, assim como comprovado na imunofenotipagem.

Figura 28 – Diferenciações adipogênica e osteogênica das CTMs pré-experimento

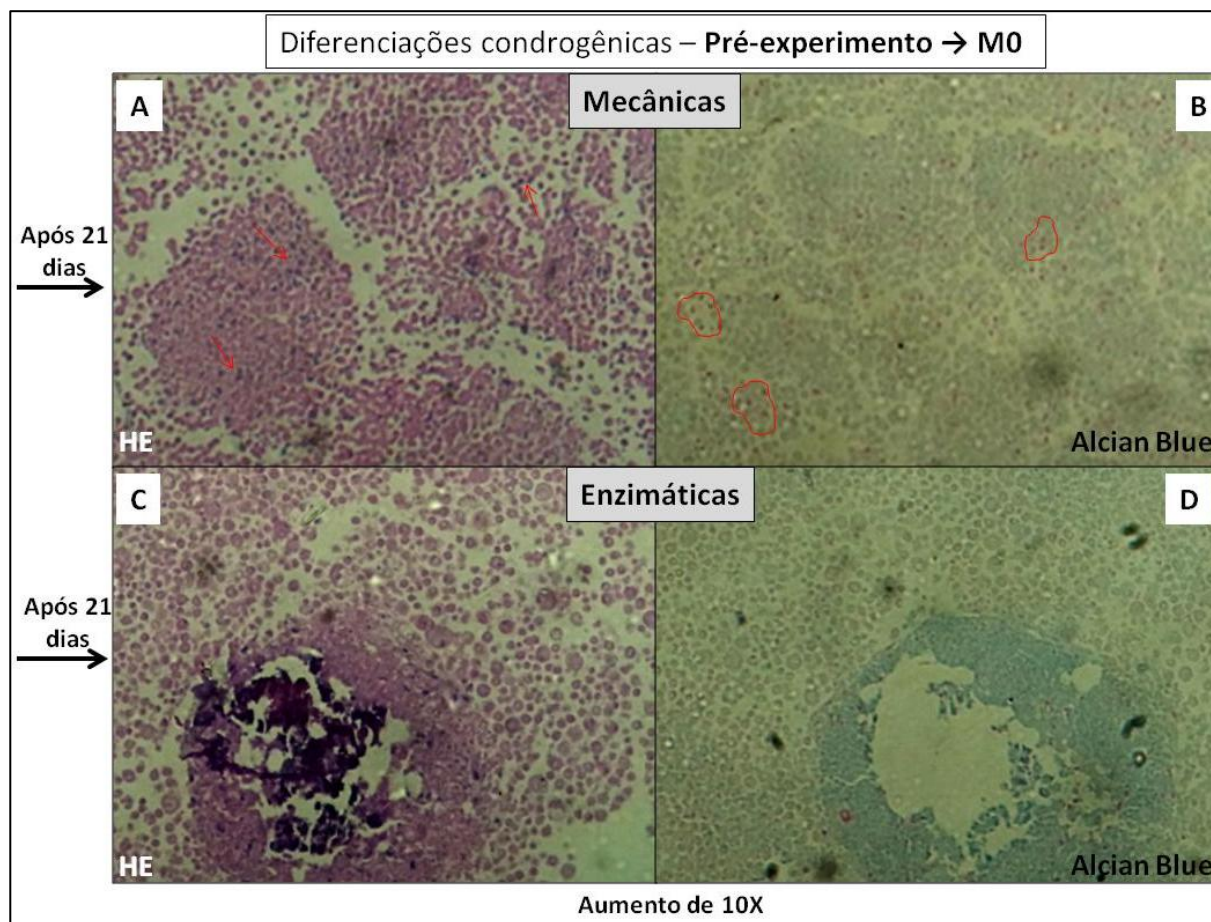


Legenda – A e D- cultura controle (não induzida à diferenciação) com pequenas gotículas de lipídeo. B- cultura induzida à adipogênese com algumas formações lipídicas. E- cultura já induzida à adipogênese com formação nítida de cápsulas de vesículas de lipídeos corados em vermelho. C- cultura induzida à osteogênese com deposições iniciais de cálcio. F- cultura já diferenciada em osteócitos, com grande volume de deposição de cálcio (trabécula óssea) corada em vermelho. Todas as formações encontradas estão apontadas pela seta em vermelho. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Todas as amostras que foram submetidas à diferenciação, responderam positivamente à indução sem grandes diferenças entre as amostras no momento pré-experimento. Após 7 dias de cultura, no poço controle são observados os aspectos da aderência e dos prolongamentos fibroblastóides além de raras gotículas de lipídeos (ponta da seta). Na diferenciação osteogênica, em meio de cultura específico, já são observados os pequenos depósitos de cálcio e uma discreta formação trabecular. Com 14 dias, estas evidências são nítidas e intensificadas, sendo que no poço controle,

mantido com meio de cultura DMEM-F12 aditivado, os depósitos de gotículas de lipídeos não são tão evidentes. Em contrapartida, no poço que recebeu meio de cultura específico são observados adipócitos com grande quantidade de lipídeos empacotados no citoplasma (ponta da seta). Enquanto que na diferenciação osteogênica houve deposição de cálcio e na condrogênica houve produção de colágeno tipo I. Na diferenciação condrogênica pré-experimento, foi realizada técnica por citoquímica.

Figura 29 – Fotos com as diferenciações das culturas de CTM



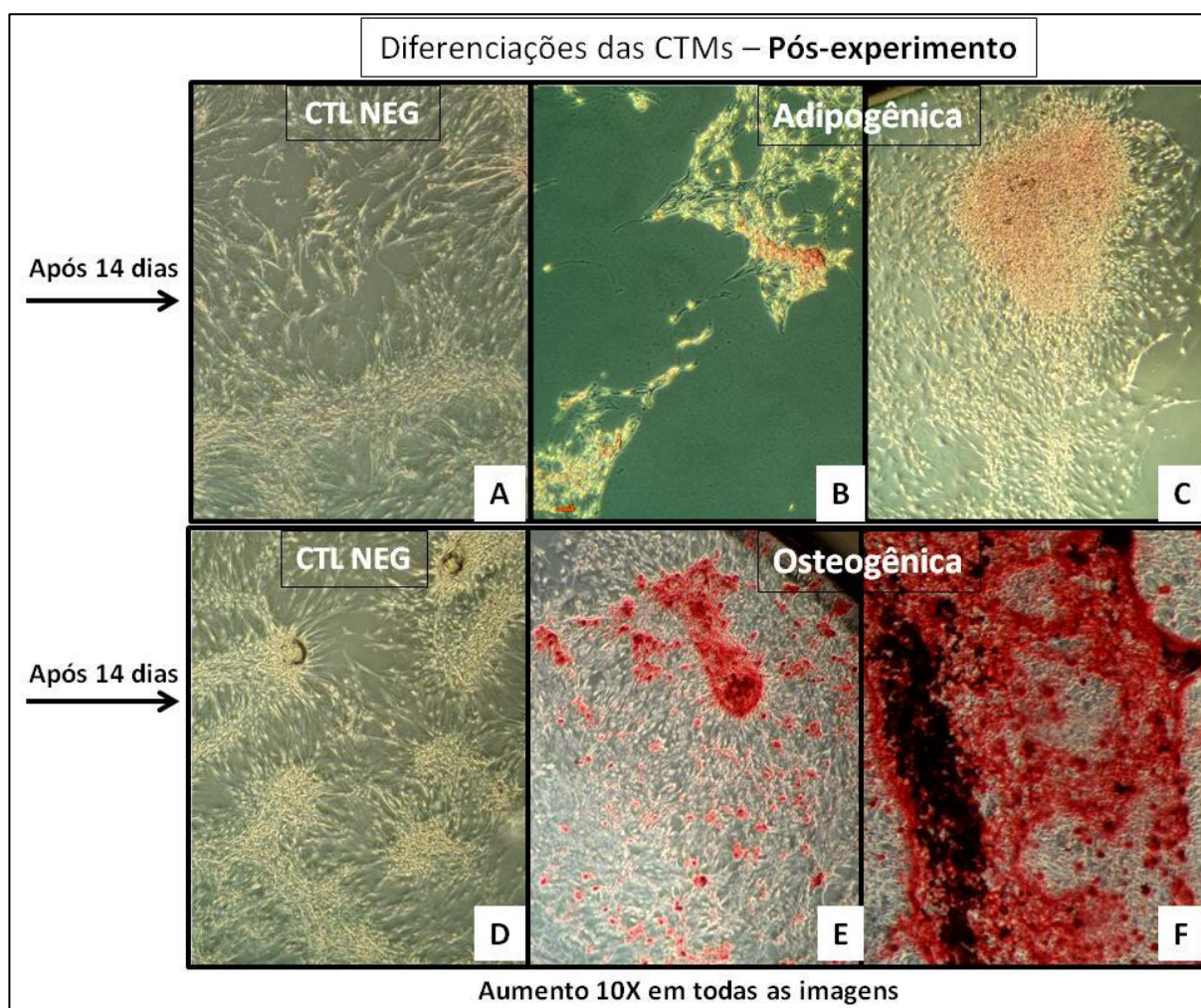
Legenda – A- cultura de CTMs de DM diferenciada em condrócitos, com marcação do núcleo celular corado por HE (seta vermelha). B- marcação de núcleos isogênicos de CTMs de DM corados por Alcian Blue delimitados pelo contorno em vermelho. C e D- CTMs de DE não mostram coloração por HE e Alcian Blue dos núcleos de condrócitos e núcleos isogênicos, além de formação de área de necrose em roxo. Fonte: arquivo pessoal, 2015

Conforme visualizado na Figura 29, observa-se amostra obtida por DM em que os núcleos (ponta da seta) são visíveis e inúmeros, corados por HE. Na coloração por Alcian Blue®, podem-se identificar a formação de núcleos isogênicos roseo-avermelhados típicos (grupos isogênicos) da cartilagem, com halo claro perinuclear (contorno circular vermelho). Nas lâminas das células obtidas pelo método enzimático,

são observadas raras células com núcleo e poucos agrupamentos isogênicos. Nas diferenciações condrogênicas com CTM obtidas por DE outro fato persistente foi identificado: algumas áreas contendo lise/necrose celular (ponta da seta). Esse dado pode estar relacionado com aqueles encontrados na citometria de fluxo com índice de apoptose superior nas células por DE, comprometendo, portanto, essa diferenciação.

No pós-experimento, foi realizada nova indução às diferenciações adipogênica e osteogênica (figura 30) com intuito de se comprovar a permanência desta característica importante das CTMs e, além disso, estabelecer comparações entre os tratamentos do experimento, considerando LED luz contínua, LED luz pulsátil e controle, todos provenientes de DM e DE.

Figura 30 – Fotos com as diferenciações das CTMs pós-experimento com LED



Legenda – A e D- culturas de controles (não induzidas à diferenciação adipogênica e osteogênica). B e C- culturas de CTMs com marcação em vermelho da adipogênese, evidenciando as vesículas de lipídeo encapsuladas. E e F- culturas de CTMs diferenciadas em osteócitos, marcados em vermelho, pela deposição do cálcio (imagem F mostra a formação da trabécula ósea). Fonte: arquivo pessoal, 2015

A figura 30 mostra imagens das culturas destinadas às 2 diferenciações mencionadas acima, além do próprio controle do teste. É possível visualizar a diferenciação adipogênica confirmada pela formação de vesículas de lipídeo e osteogênica pela deposição de cálcio em cultura.

Desse modo, criou-se um perfil descritivo comparativo entre os tratamentos e foram estabelecidos padrões distintos da potencialidade de diferenciação das CTMs, ou seja, se houve aumento ou redução desse potencial perante a ação dos LEDs (Quadro 6). Deste modo, fez-se uso de uma avaliação dos tratamentos baseada em escores pontuados de 0 a 100, dependendo da presença/ausência de características consistentes de diferenciação e da quantidade em área das mesmas. O quadro 6 mostra as pontuações em escore de cada tratamento advindo de cada dissociação: mecânica e enzimática.

Quadro 6 – Comparação dos potenciais de diferenciação em escore de 0 a 100

Análise Descritiva das Diferenciações Adipo/Osteogênica Pós-experimento					
Tratamento	Adipogênica	Osteogênica	Tratamento	Adipogênica	Osteogênica
Mec CTL -	10	80	Enz CTL -	25	80
Mec 1J C	35	37,5	Enz 1J C	10	30
Mec 3J C	40	30	Enz 3J C	35	55
Mec 5J C	45	27,5	Enz 5J C	40	50
Mec 10J C	65	50	Enz 10J C	25	90
Mec 1J P	20	65	Enz 1J P	25	85
Mec 3J P	37,5	80	Enz 3J P	20	85
Mec 5J P	37,5	75	Enz 5J P	30	35
Mec 10J P	35	80	Enz 10J P	30	85
Média	35,7	65,7	Média	26,6	66,1

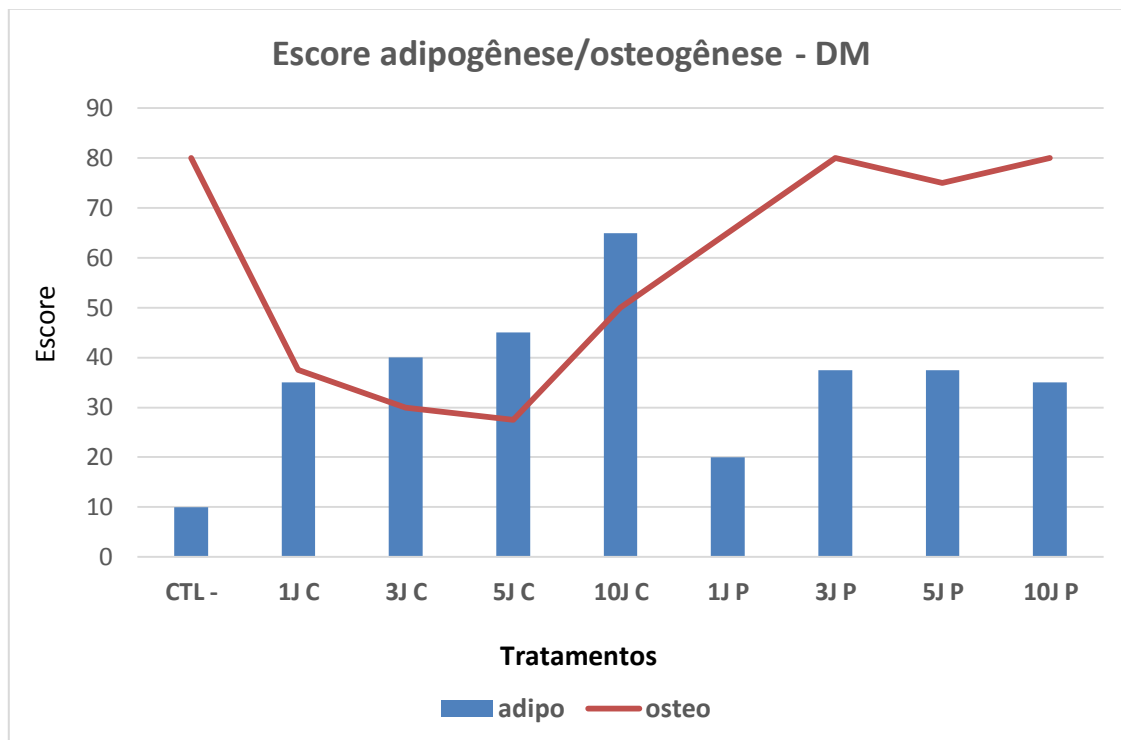
Legenda – Pontuação por escore (0 a 100) do nível percentual de CTMs que se diferenciaram em adipócitos e osteócitos no pré-experimento, considerando todas as amostras enzimáticas e mecânicas. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

De acordo com o quadro 6, nota-se que houve inibição da adipogênese tanto nos tratamentos de DM quanto nos de DE. Os melhores tratamentos para essa diferenciação foram nas doses de 10 J/m² (DM) e 5 J/cm² (DE), ambas luz contínua. Já para a osteogênese, o resultado foi contrário, mostrando clara indução da deposição de cálcio pelas CTMs na maioria dos tratamentos de ambas as origens: DM e DE. O

controle negativo (não irradiado) teve diferenciação osteogênica considerável e o regime de luz pulsátil se sobressaiu com relação à luz contínua, tanto para culturas de origem mecânica quanto de origem enzimática. Os números destacados em vermelho representam os tratamentos que mais mostraram diferenciação em cultura.

A seguir, os gráficos 11 e 12 mostram os diferentes escores de potencialidade de diferenciação adipogênica e osteogênica das CTMs advindas dos tratamentos com LED, considerando a DM e DE. É possível observar de acordo com o gráfico 11 que o tratamento com a dose de 10 J/cm^2 , sob luz contínua apresentou maior escore (índice) de diferenciação adipogênica e que para a osteogênica, foram os tratamentos controle 3, 5 e 10 J/cm^2 , sob luz pulsátil, no entanto ressalta-se que há um efeito da luz contínua, que em baixa dose parece ser bioinibitória da diferenciação osteogênica, com tendência a crescimento a partir de 10 J/cm^2 luz contínua. Experimentos adicionais com doses mais elevadas podem comprovar que há correlação direta entre a dose mais alta e a diferenciação óssea.

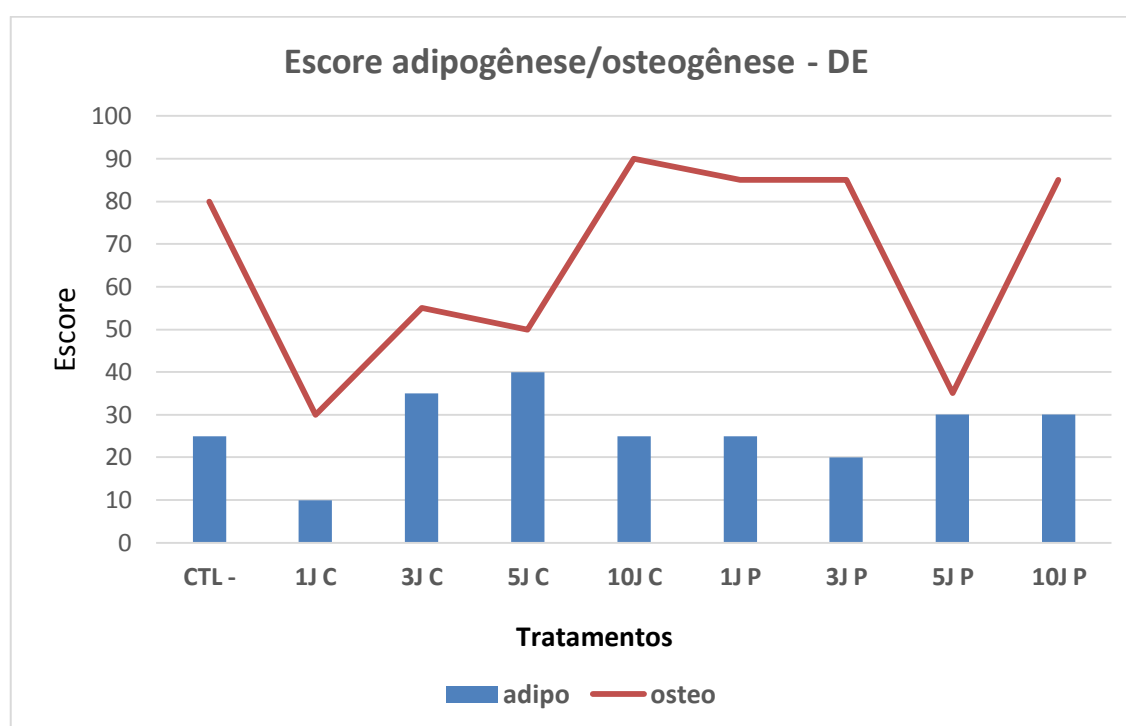
Gráfico 11 – Escore das diferenciações adipogênica e osteogênica advindas de Dissociação Mecânica - pós-experimento



Legenda – Índice em escore (0 a 100) da quantidade de CTM que mostrou resultado positivo para a diferenciação adipogênica (coluna em azul) e osteogênica (linha em vermelho) no pós-experimento. Essas amostras são de origem mecânica. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Já no gráfico 12, que mostra as amostras advindas de DE, nota-se aumento da potencialidade adipogênica em 3 e 5 J/cm² luz contínua, enquanto que na osteogênica mais tratamentos tiveram bom desempenho nesta diferenciação, sendo eles: controle negativo, 10 J/cm² luz contínua (o melhor deles), 1, 3, 5 e 10 J/cm² luz pulsátil. Pode-se inferir que o LED, teve participação benéfica significativa para os tratamentos irradiados, gerando aumento da capacidade de diferenciação. Em contrapartida, dois controles negativos também mostraram bons desempenhos para este teste.

Gráfico 12 – Escore das diferenciações adipogênica e osteogênica advindas de Dissociação Enzimática - pós-experimento



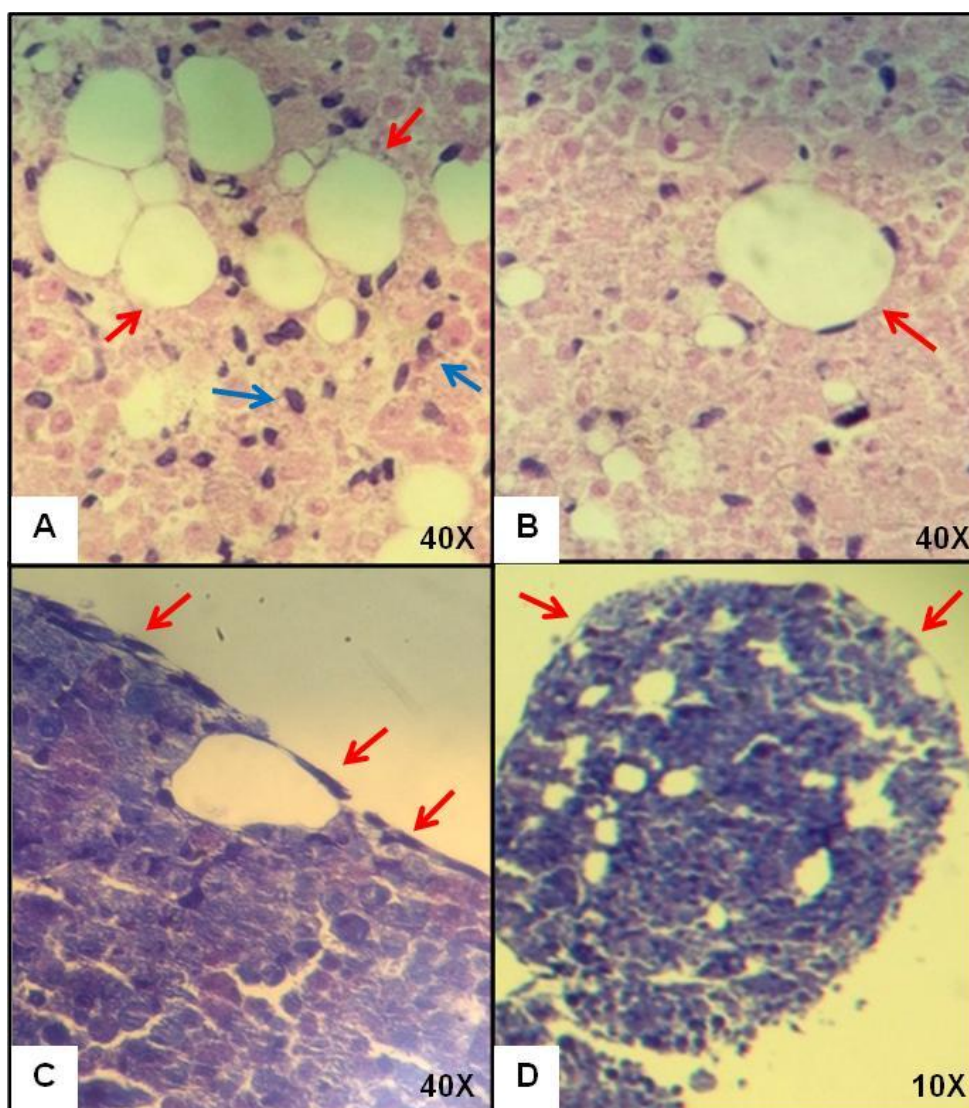
Legenda – Índice em escore (0 a 100) da quantidade de CTM que mostrou resultado positivo para a diferenciação adipogênica (coluna em azul) e osteogênica (linha em vermelho) no pós-experimento. Essas amostras são de origem enzimática. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Froelich et al (2013) mostraram em seu estudo a preservação da capacidade das CTs no potencial de diferenciação trilingagem adipo, osteo e condrogênica, desde o início até o fim de expansão *in vitro* prolongada. Esses dados corroboram os achados, no entanto, ação do LED favoreceu esse potencial, mostrando diferenças significantes entre os tratamentos, assim como do controle, que não deixou de exibir as diferenciações típicas da CTM. As amostras do pós-experimento destinadas à diferenciação condrogênica foram finalizadas em cultura com meio indutor específico e

processadas por citoquímica (corantes HE e Alcian Blue). Nas figuras a seguir, 23 e 24, é possível observar a confirmação da diferenciação das CTMs em condrócitos e núcleos isogênicos, que correspondem a uma fase intermediária/antecessora para a formação dos condrócitos.

De acordo com a figura 31, pode-se observar a marcação dos inúmeros núcleos de condrócitos corados em HE, além da formação células de tecido adiposo e vasos sanguíneos (capilares), que podem ou não ser esperados para esta diferenciação específica e que provavelmente estão associados ao efeito da luz (LED).

Figura 31 – Fotomicrografias de lâminas histológicas evidenciando a diferenciação condrogênica e outras formações



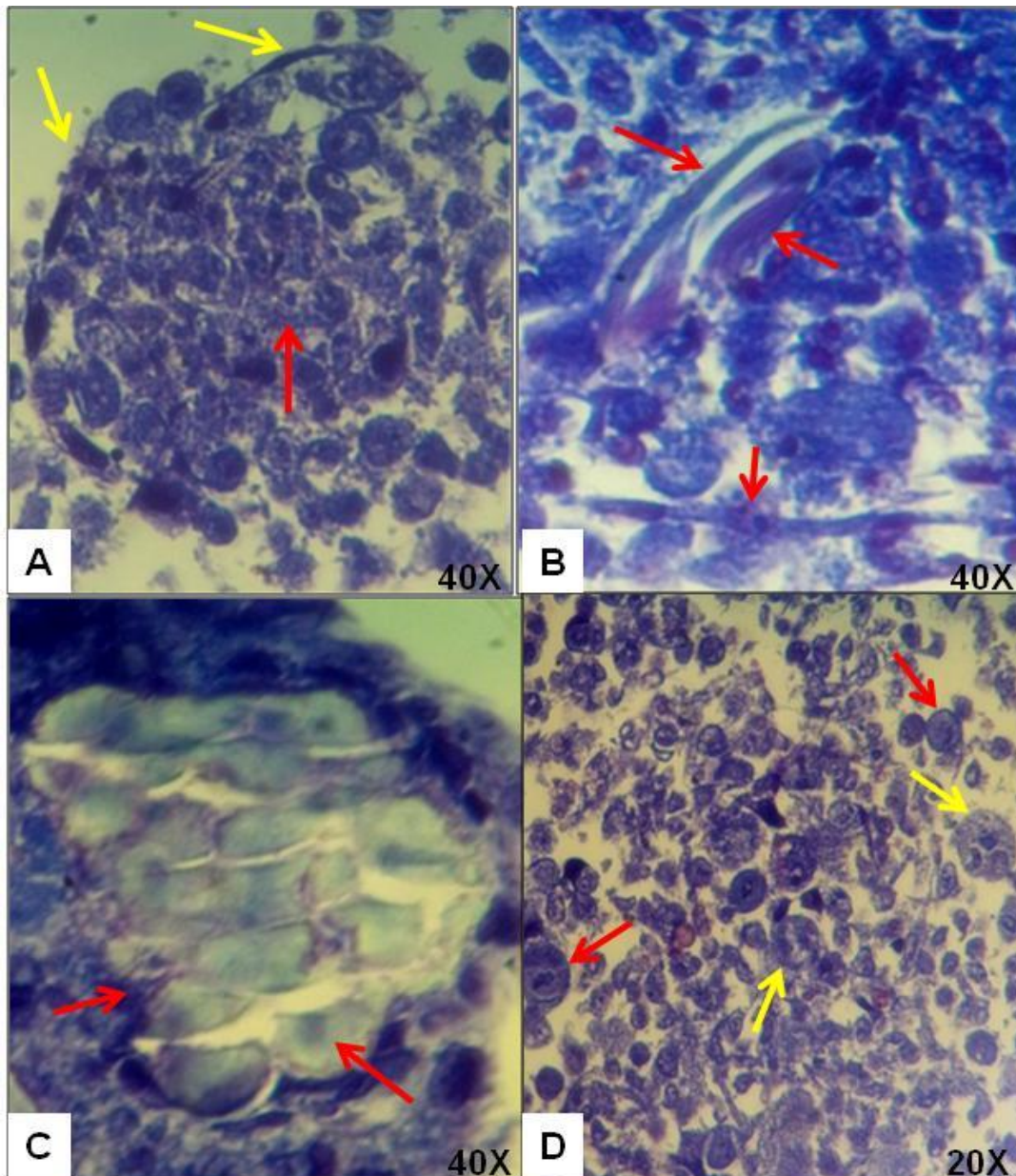
Legenda – (A) formação de adipócitos aglomerados (seta vermelha) e presença de muitos núcleos de condrócitos marcados por HE (seta azul); (B) formação de vaso sanguíneo bem representado pelos típicos núcleos de endotélio achatados e alongados na periferia do vaso; (C) visualização de núcleos epiteliais (seta vermelha) constituindo a formação de uma epitelação endotelial periférica do corte histológico. (D) visualização da epitelação endotelial periférica em menor aumento.

Ainda na figura 31, observa-se que houve em alguns tratamentos, com e sem exposição ao LED, a formação de uma epitelização endotelial periférica dos cortes histológicos, que também podem estar associados à ação do LED. Houve evidente produção e secreção pelos condrócitos de matriz extracelular constituída por colágeno tipo II, além de equilíbrio em número de estruturas como núcleos isogênicos e condrócitos, que assim asseguram a boa qualidade e resistência da cartilagem a ser formada.

Já na figura 32, pode-se observar que houve formação concomitante à do tecido cartilaginoso, de fibras musculares e tecido nervoso encapsulado ou não. É evidente, conforme as estruturas observadas na imagem A da figura 32, que existe indícios consistentes da presença do perineuro, estrutura que envolve o nervo, e células do tecido nervoso internas à ele, constituindo uma massa celular densa e envolvida em matriz, para a confirmação inequívoca desta hipótese, há a necessidade de aquisição de anticorpo específico para imunohistouímica (S100). Em outros cortes histológicos foi observada a presença de tecido adiposo. Todas essas estruturas e formações foram encontradas nos experimentos da diferenciação condrogênica induzida por meio específico. A formação de estruturas não previstas deve se relacionar com a ação da luz, que fez com que a CTM fosse bioestimuladas por outra via, que não a condrogênica. A luz, neste momento, apresentou efeito inédito e de extrema importância para os estudos relativos às células-tronco mesenquimais com foco em terapia celular. Uma vez que a luz emitida em 630 nm foi capaz de induzir a formação de diferentes tecidos do organismo, pode contribuir positivamente para a medicina regenerativa e abrir caminho para outras linhas de pesquisa que associam a biofotônica à medicina regenerativa, eventualmente sem a adição de meio indutor.

O quadro 7 foi elaborado para que se pudesse quantificar a presença de todas as estruturas (esperadas ou não) encontradas na análise cortes histológicos realizados. Essa quantificação se deu pela pontuação de cada tratamento do experimento (considerando os 2 regimes luz, as 4 doses aplicadas, o controle negativo e o método de dissociação empregado) por score. Deste modo, pode-se avaliar o tipo de tratamento relacionando com o resultado encontrado. Foram avaliadas, portanto, a presença de condrócitos, núcleos isogênicos, vasos sanguíneos, adipócitos, núcleos de condrócitos corados em HE, necrose celular, epitelização endotelial periférica e outras formações.

Figura 32 - Fotomicrografias de lâminas histológicas evidenciando a diferenciação condrogênica, formação de cartilagem e outras estruturas



Legenda – (A) formação de tecido nervoso (nervo) com características típicas representadas pela membrana externa ou perinervo (seta amarela) e endoneuro/fibras nervosas (seta vermelha); (B) formação de fibras músculo liso entremeadas aos condrócitos (seta vermelha), podendo ser observado seus núcelos periféricos; (C) constituição de cartilagem hialina delimitada (seta vermelha) bem definida pela imagem; (D) visualização do corte histológico evidenciando a presença de muitos condrócitos maduros com núcleo bem corado e citoplasma grande (seta vermelha), núcelos isogênicos (seta amarela) precursores dos condrócitos com 2 ou mais núcelos (seta amarela) e presença de matriz extracelular secretada pelo condrócito.

Quadro 7 – Avaliação do potencial de diferenciação por Escore (0 a 5 pontos) das amostras do pós-experimento induzidas à diferenciação condrogênica

Avaliação por Escore das amostras pós-experimento induzidas à condrogênese							
Tratamento	Condrócito/ núcleos isogênicos	Vaso sanguíneo	Adipócito	Núcleos (HE)	Necrose	Epitélio endotelial periférico	Outra formação
Mec CTL-	4	0	2	3	Não	Sim	C. hialina
Mec 1J C	2	0	2	3	Não	Não	-
Mec 3J C	3	0	1	2	Sim	Não	-
Mec 5J C	2	1	2	2	Não	Não	C. hialina
Mec 10J C	5	2	3	3	Não	Não	-
Mec 1J P	2	2	3	3	Sim	Não	C. hialina F. nervo
Mec 3J P	4	2	4	3	Não	Não	C. hialina
Mec 5J P	2	2	1	3	Não	Sim	M. liso
Mec 10J P	4	2	3	3	Sim	Não	C. hialina e elástica
Total	27	11	21	25	-	-	-
Enz CTL-	3	2	5	1	Não	Não	C. hialina
Enz 1J C	1	1	2	2	Não	Não	F. nervo
Enz 3J C	1	2	4	1	Não	Não	F. nervo
Enz 5J C	3	0	1	1	Sim	Não	C. hialina F. nervo
Enz 10J C	5	0	1	1	Não	Não	C. hialina F. nervo
Enz 1J P	1	1	2	1	Sim	Não	F. nervo
Enz 3J P	2	1	2	3	Não	Não	F. nervo
Enz 5J P	3	0	1	1	Sim	Não	F. nervo
Enz 10J P	1	1	3	2	Sim	Não	C. hialina F. nervo
Total	20	8	21	11	-	-	-
CTL- teste Enz LC	5	0	0	2	Não	Não	C. hialina F. nervo
CTL- teste Enz LP	2	0	1	3	Não	Não	C. hialina F. nervo
CTL- teste Mec LC	3	0	0	3	Não	Sim	F. nervo
CTL- teste Mec LP	2	1	2	3	Não	Sim	F. nervo

Legenda – Índices em escore (0 a 5) para determinar a quantidade de CTMs que se diferenciaram positivamente em condrocitos e núcleos isogênicos, considerando todos os tratamentos do experimento. Além, disso, pontuou-se a presença de formações celulares/teciduais extras, como vaso sanguíneo, adipócitos, miócitos e células dendríticas e de Schwann. HE: hematoxilina e eosina; LC: luz contínua; LP: luz pulsátil; C. hialina: cartilagem hialina; F. nervo: formação de nervo; M. liso: músculo liso.

Com base nos resultados de avaliação apresentados no quadro 7, todos os tratamentos do experimento exibiram resposta positiva para a diferenciação condrogênica das CTMs, assim como o controle negativo do teste, sendo esta última categoria a que menos apresentou formações teciduais e celulares extras. Ressalta-se que a diferenciação condrogênica foi, de certa forma, inibida, embora presente, por haver formação de outros tecidos e estruturas que não eram esperados para esta situação.

De fato, as CTMs oriundas de DM mostraram melhor desempenho (pontudos em score) para as características deste teste, que incluem formação de condrócitos e núcleos isogênicos. Ademais, as formações de vaso sanguíneo, adipócitos e presença de núcleos marcados em HE também se mostraram mais elevadas em número nas CTMs de DM, se comparadas as de DE. As formações de cartilagem hialina e elástica foram exibidas nas CTMs de ambas as dissociações. No entanto, as CTMs de DM na dose 5 J/cm^2 , apresentou formação de fibras musculares. A formação de tecido nervoso foi mais visualizada nas amostras de CTM provenientes de DE do que na de DM.

Estudos recentes relacionados à ação da luz do LED na formação e/ou regeneração de tecido nervoso tem sido crescentes e trouxeram resultados importantes. Foi descrito que LEDs entre o 600 nm (luz vermelha) e próximo ao infravermelho mostraram a promoção do metabolismo oxidativo mitocondrial. Além disso, a irradiação com LED foi propícia e melhorou a regeneração nervosa e aumentou os níveis de antioxidação na câmara fluida formada (ISHIGURO; IKEDA; TOMITA, 2010).

Pode-se concluir que o tratamento com luz, independentemente do regime, na presença de meio condrogênico, na técnica de biomassa tipo *pellet*, houve a inibição da condrogênese, de forma mais expressiva nas amostras obtidas por DE, e por outro lado, houve a indução da formação de tecidos não esperados, em especial a formação de feixe nervoso. O aparecimento de adipócitos na cultura, também não era esperado, mas é um tipo celular que ocorre sempre que as condições de cultura não estão satisfatórias.

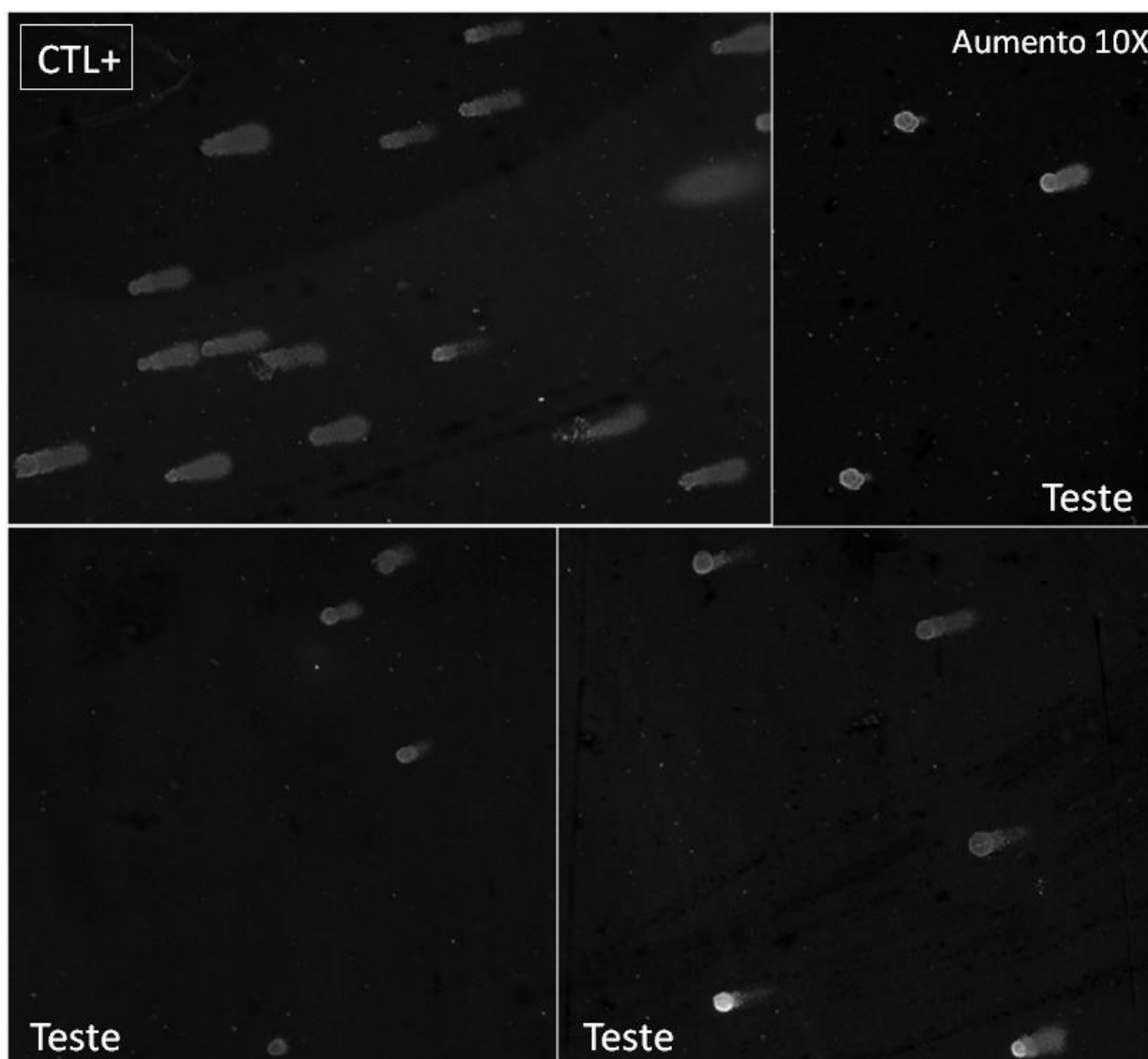
4.7 Teste do Cometa: índice de genotoxicidade

Este teste possibilitou encontrar resultados que designaram ocorrência de genotoxicidade (danos no DNA) nas células investigadas, em determinados tratamentos, sendo, possivelmente, modificações como quebra de fita simples de DNA, fita dupla e de sítios álcali lábeis, (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003, p. 201-223). Em contrapartida, foram identificados resultados positivos no que diz respeito ao reparo de dano contra o dano em estudo pela ação do LED em alguns tratamentos.

A análise dos cometas (nucleóides) foi conduzida de acordo com o manual técnico “In vivo and In vitro mammalian alkaline comet assay”, elaborado pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2014). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, sendo todos os tratamentos e grupos feitos em duplicata. O parâmetro principal utilizado foi: intensidade da cauda (*tail intensity*). Foram analisadas 4 amostras de CTM-TA obtidas por DM e outras 5 por DE provenientes do pré-experimento. Já do momento pós-experimento, foram analisadas 17 amostras, provenientes de 17 tratamentos diferentes de acordo com o experimento (Controle negativo, exposição à luz contínua e à luz pulsátil). Reforça-se ainda a análise concomitante dos controles positivos de cada amostra (tratamento) com peróxido de hidrogênio. A figura 33 abaixo representa as imagens de nucleóides geradas pelo Software *Comet Assay IV*. Os dados obtidos foram comparados entre si utilizando o teste de ANOVA Ranks ou Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância adotado foi o de $p < 0,05$.

Em virtude da realização do teste de apoptose e necrose celular por citometria de fluxo com os kits de anexina V e iodeto de propídeo, não foi considerada dentro da contagem de nucleóides nas lâminas do teste do cometa a presença de “hedgehogs”, que indicam morte celular, embora tenham sido visualizadas.

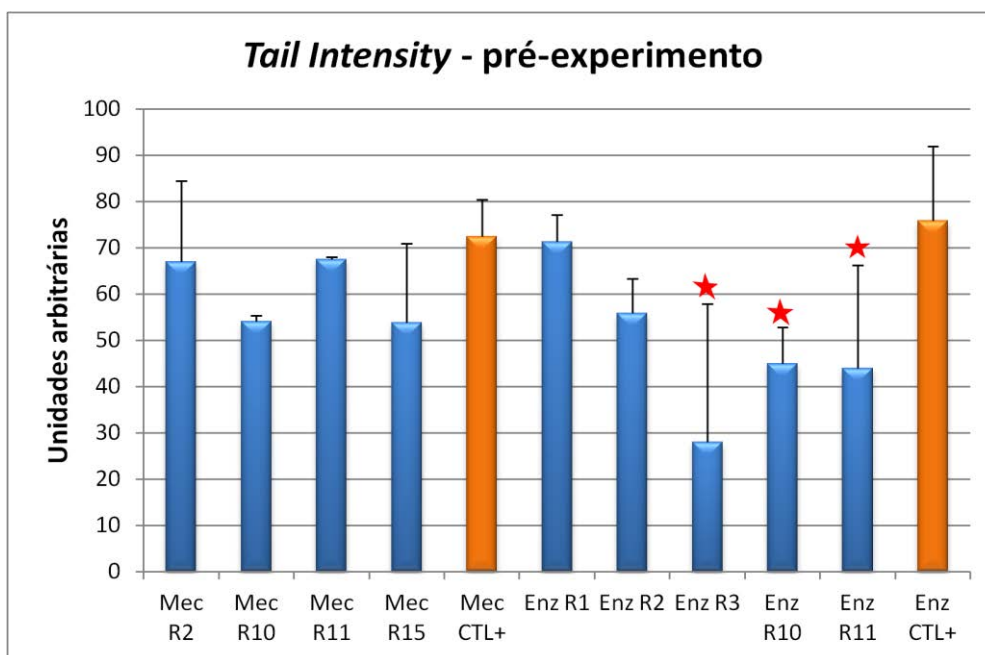
Figura 33 – Imagens de nucleóides geradas pelo software *Comet Assay IV*



Legenda – Imagens de nucleóides visualizadas em microscópio com fluorescências. Nota-se que há diferenças de comprimento de cauda e fluorescência/concentração de fragmentos de DNA. Os nucleóides presentes são de amostras variadas (DM e DE) e serviram apenas como exemplo de ilustração. Fonte: arquivo pessoal, 2015

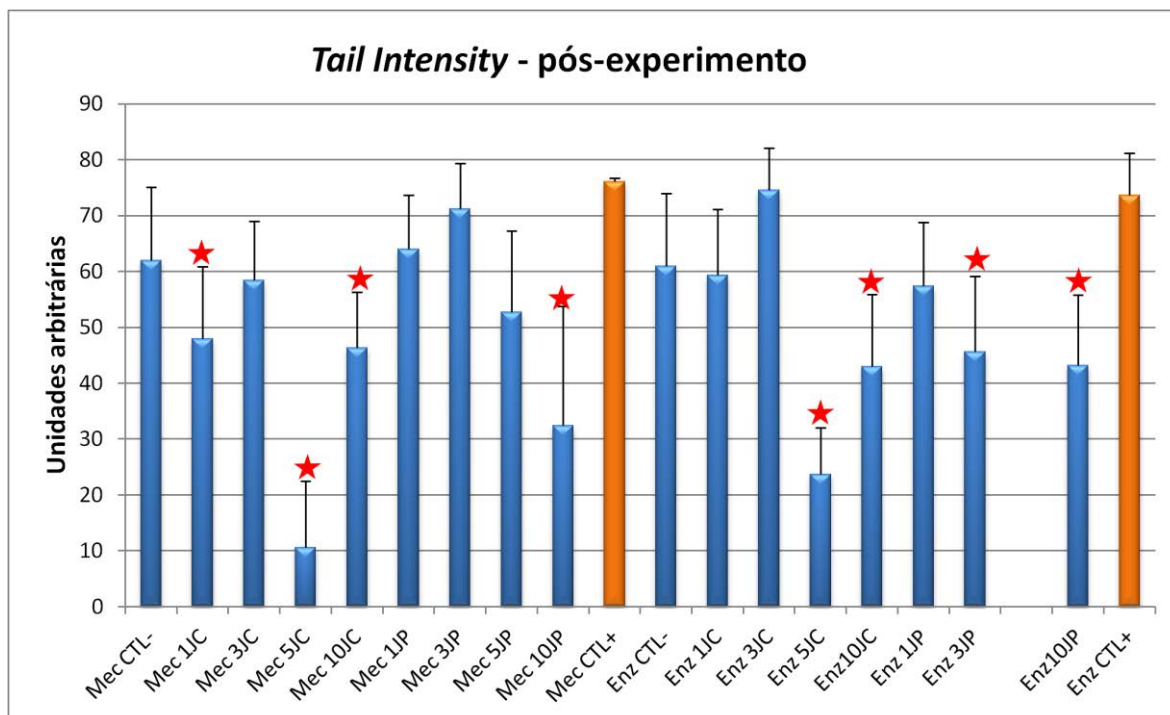
O *tail intensity* é um parâmetro que mensura a quantidade de fragmentos de DNA presentes na cauda dos cometas. É um dos parâmetros mais utilizados, pois apresenta maior amplitude na detecção do que o comprimento da cauda, aumentando mesmo que o comprimento da cauda atinja seu valor máximo (Olive et al, 1990). Os Gráficos 13 e 14, mostram os resultados encontrados do pós-experimento após análise das lâminas de cada tratamento (9 de DM e 9 de DE), considerando-se $p < 0,05$.

Gráfico 13 – Resultados estatísticos dos valores da intensidade da cauda pré-experimento



Legenda – Valores percentuais da intensidade da cauda (*tail intensity*) de todas amostras de CTM do pré-experimento. O dano de DNA, segundo o teste do cometa, revelou menores danos nas amostras de origem enzimática. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Gráfico 14 – Resultados estatísticos dos valores da intensidade da cauda pós-experimento



Legenda – Valores percentuais da intensidade da cauda (*tail intensity*) de todos os tratamentos do pós-experimento. O dano de DNA, segundo o teste do cometa, revelou menores danos, ou reparo de danos, nas amostras submetidas às doses de 5 J/cm² luz contínua, de DM e DE.. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

De acordo com os resultados do gráfico 12 (A), de todas as amostras pré-experimento analisadas, apenas 3 (destacadas pela estrela vermelha) apresentaram valor reduzido de *tail intensity* (mais acentuado em R3 Enz), portanto, menor genotoxicidade, destacando-se que as 3 são oriundas de DE. É possível notar que as outras 6 amostras obtiveram valores acima de 50 e identificados, portanto com considerável genotoxicidade quanto a *tail intensity*. Reforça-se mais uma vez a interferência de agentes químicos e físicos do processo de cultura celular e obtenção de tecido adiposo que influenciam na estabilidade e preservação do conteúdo nuclear. Em contrapartida, as amostras R2 e R11 Mec mostraram valor de *tail intensity* elevado, maior que o controle positivo, indicando maior genotoxicidade.

No pós-experimento, as CTMs que receberam as doses de 5 J/cm² de luz contínua, ambos de DM e DE, os valores de *tail intensity* mostraram-se significativamente mais reduzidos do que qualquer outro tratamento (foram marcados com estrela vermelha). O tratamento de 10 J/cm² de DM revelou danos mais reduzidos. Isso sugere que essa dose de irradiação proporcionada pelo LED atuou na bioestimulação levando a célula ao reparo de danos.

Já as CTMs tratadas com as doses de 3 J/cm² luz pulsátil de DM e 3 J/cm² luz contínua de DE revelaram os valores mais altos de *tail intensity*, sendo considerados com mais danos ao DNA revelando o potencial genotóxico desta dose. Além disso, é interessante ressaltar que o tratamento de 3 J/cm² luz contínua de DE mostrou danos significativamente superiores ao controle positivo. Os outros 5 tratamentos que receberam marcação com estrela vermelha, sendo eles 1 e 10 J/cm² luz contínua de DM, 10 J/cm² luz contínua, 3 e 10 J/cm² luz pulsátil de DE também mostraram valores relativamente menos danosos, abaixo de 50. É importante destacar novamente que os 2 controles negativos não irradiados (DM e DE) tiveram resultados superiores à maioria dos tratamentos do experimento, levando a hipótese de que a luz foi capaz de bioestimular a células levando-a ao reparo de danos reversíveis de DNA.

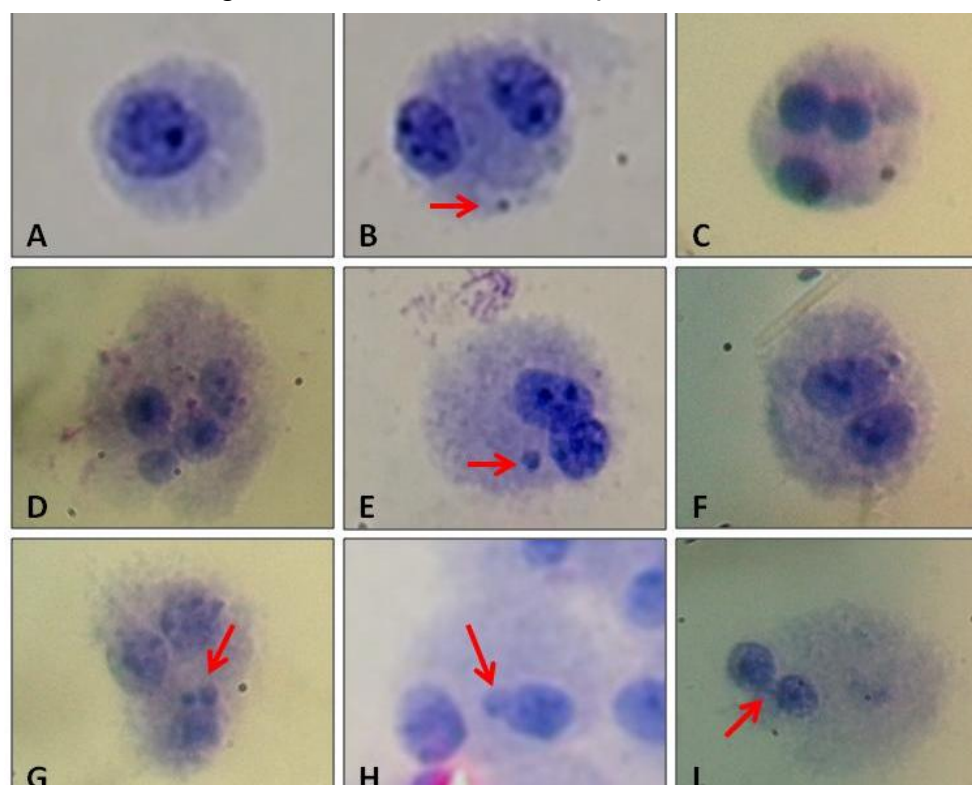
Estudo recente mostra a importância do teste do cometa como base de segurança para culturas de CTs com foco em terapias, com a necessidade da avaliação de danos de DNA (quebra de fita simples) cumulativos ou não. Neste estudo não houve aumento significativo destes danos após longo tempo de expansão *in vitro*. Soma-se a isso, a irrelevância de outros fatores químicos e físicos associados à cultura como não interferentes na causa de danos de DNA. Reforça-se a necessidade de implementar este teste em estudos de CTs, como as CTMs (FROELICH et al, 2013).

Como há poucos estudos na literatura tratando de CTMs de rato em cultura sob ação do LED, os resultados deste trabalho evidenciam a importância da ação da luz como indutora de reparo celular após cultura prolongada. Por se considerar um estudo de caráter inédito, toma-se como base para estudos futuros com danos de DNA em culturas de CTMs de espécies diferentes para terapias específicas. A detecção de danos é importante para se estabelecer a proposta de implementação deste teste como indicador da viabilidade e qualidade destas células dentro da medicina regenerativa. Além disso, evidencia-se a importância da ação do LED sobre as culturas de CTM.

4.8 Teste do Micronúcleo: índice de mutagenicidade

Com base no teste do MN com citocalasina B para este estudo realizado *in vitro*, pode-se avaliar o potencial mutagênico (nível cromossômicos) do LED de 630 nm e seus possíveis mecanismos de ação/efeitos sobre as CTMs de rato (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003, p.201-223). Na figura 34, imagens microscópicas das CTMs após o teste e variedades com relação ao número de núcleos e danos avaliados.

Figura 34 – Fotomicrografias mostrando CTMs após teste do micronúcleo



Legenda – Imagens de microscópio de luz das CTMs: (A) mononucleada; (B) binucleada com 1 MN; (C) trinucleada; (D) multinucleada; (E e F) binucleada com 1MN; (G) sobreposição de 2 células (uma binucleada); (H) binucleada com BN; (I) binucleada com PN. As setas vermelhas indicam formações e correspondem aos danos de DNA, como MN, PN e BN. Aumento de 40X. Fonte: arquivo pessoal, 2015

De acordo com a análise da tabela 5 (pré-experimento) observa-se que o número de células binucleadas com 1 micronúcleo se manteve significativamente indiferente (entre os tratamentos MEC e ENZ) após a amplificação das culturas até 4ª passagem. Considerou-se que fatores como a tripsinização, a exposição à luz e os momentos de retiradas das placas para manipulações são suficientes para causar danos mutagênicos irreversíveis. Além disso, é possível observar a boa qualidade dos controles positivos, que causaram maior presença de 1 ou mais micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas (PN) (rearranjos cromossômicos que envolvem centrômeros ou cromátides migrantes para os polos opostos) e brotos nucleares (BN) (representativos de amplificação gênica) nas células binucleadas.

Tabela 5 – Resultados da análise dos tratamentos do pré-experimento – Mec e Enz

Análise das Lâminas de Micronúcleo - Pré-experimento								
Amostra	1MN	2MN	3MN	4MN	PN	BN	Binucleadas	Total de células
MEC - R2	9	2	0	0	8	1	980	1000
MEC - R10	6	1	0	0	5	1	987	1000
MEC - R11	11	3	1	0	2	1	982	1000
MEC - R15	13	1	0	0	8	2	976	1000
MEC - R17	9	0	0	0	3	1	987	1000
Média MEC	9.6	1.4	0.2	0	5.2	1.2	982.4	1000
Média CTL+	30	2	0	0	13	1	954	1000
ENZ - R1	10	2	0	0	10	3	975	1000
ENZ - R2	14	1	0	0	5	7	973	1000
ENZ - R3	7	0	0	0	5	0	988	1000
ENZ - R10	3	0	0	0	5	1	991	1000
ENZ - R11	14	0	0	0	13	2	971	1000
Média ENZ	9.6	0.6	0	0	7.6	2.6	979.6	1000
Média CTL+	37	3	0	0	15	0	945	1000

Legenda – Amostras pré-experimento avaliadas pelo teste do MN, para caracterização e quantificação de dano de DNA. Avaliou-se presença de micronúcleo, ponte nucleoplasmática e broto nuclear, não havendo diferença significativa entre as CTMs de DM e DE. Fonte: arquivo pessoal, 2015.

Levando em consideração os resultados encontrados para ponte nuclear, observa-se que amostras R2 Mec, R15 Mec, R1 Enz e R11 Enz apresentam números mais elevados das mesmas. SALVADORI et al. (2003, p.201-223) descrevem as pontes nucleoplasmáticas como biomarcadores de instabilidade genômica e que parecem ser resultantes de rearranjos cromossômicos, envolvendo cromossomos dicêntricos, que possuem mais de um centrômero

Considerando-se a tabela 6, correspondente ao pós-experimento, é interessante notar que as CTMs que receberam as doses de 1 J/cm² contínuo e pulsátil de DM e 1 J/cm² pulsátil de DE apresentaram danos elevados, em relação ao controle, no que diz respeito à maior presença de células binucleadas com 1 MN, levando à hipótese de que a ação da luz nestas doses induziu a mutagênese. Além delas, a dose de 3 J/cm² de DE, também mostrou aumento dessa mesma característica de dano (1 MN/binucleada) se comparados aos outros tratamentos. Outra observação importante revelada após as análises foi a presença elevada de pontes nucleoplasmáticas (13) no tratamento controle negativo (que não recebeu irradiação pelo LED) oriundo de DE, quando comparada aos outros tratamentos de DE pós-experimento, evidenciando o dano causado pelo método de DE.

Tabela 6 – Resultados da análise dos tratamentos pós-experimento – Mec e Enz

Análise das Lâminas de Micronúcleo - Pós-experimento								
Amostra	1MN	2MN	3MN	4MN	PN	BN	Binucleadas	Total de células
MEC - CTL -	5	1	0	0	6	1	987	1000
MEC - 1J C	15	3	0	0	5	5	971	1000
MEC - 3J C	5	2	0	0	8	2	983	1000
MEC - 5J C	4	0	0	0	6	3	987	1000
MEC - 10J C	6	2	0	0	7	4	981	1000
MEC - 1J P	15	0	0	0	3	1	981	1000
MEC - 3J P	6	1	0	0	2	0	991	1000
MEC - 5J P	7	1	0	0	2	1	988	1000
MEC - 10J P	4	0	0	0	3	0	993	1000
MEC - CTL+	26	13	1	0	13	2	952	1000
ENZ - CTL -	5	1	0	0	13	3	978	1000
ENZ - 1J C	3	0	0	0	4	3	987	1000
ENZ - 3J C	9	1	0	0	2	0	988	1000
ENZ - 5J C	2	0	0	0	2	0	996	1000
ENZ - 10J C	6	1	0	0	2	4	987	1000
ENZ - 1J P	12	1	0	0	4	4	978	1000
ENZ - 3J P	6	1	0	0	5	1	985	1000
ENZ - 5J P	4	0	0	0	5	0	991	1000
ENZ - 10J P	5	0	0	0	6	2	987	1000
ENZ - CTL +	30	11	2	0	14	5	935	1000

Legenda – Tratamentos pós-experimento avaliados pelo teste do MN, para caracterizar e quantificar dano de DNA. Avaliou-se presença de micronúcleo, ponte nucleoplasmática e broto nuclear, havendo ausência de proteção celular pelo LED nas CTMs submetidas às doses de 1 J/cm² luz contínua e pulsátil. Nota-se aumento das PNs na amostra CTL (não irradiada). Fonte: arquivo pessoal, 2015.

A análise da técnica de MN mostrou que na dose 5 J/cm² luz contínua e pulsátil ocorreu a diminuição da presença de MN, levando a hipótese de que neste caso a luz poderia ter uma ação preventiva de danos irreversíveis, ou seja, ela poderia induzir um efeito protetor nas células impedindo que outras agressões pudessem determinar a mutagênese. Contraditoriamente, na dose de 1 J/cm² luz contínua (DM) e pulsátil (DM e DE), determinaram lesões irreversíveis do DNA (mutagênese). Essas lesões podem estar relacionadas à tumorigênese. Para comprovar este efeito há que ser realizado o experimento de injeção destas células em animal *nude* (sem imunidade).

Ressalta-se que os resultados deste trabalho, quando englobadas as análises do pré e do pós-experimento, evidenciam, de forma consistente, maior ocorrência de pontes nucleoplasmáticas, que estão associadas à translocação gênica, em relação à brotos nucleares, que estão associados a um aumento da expressão gênica. Tais achados, para experimentação *in vitro* com ratos são inéditos diante da literatura, uma vez que este trabalho englobou muitos indicadores biológicos para cultura associada ao uso do LED. Os trabalhos encontrados não abordam conteúdo relacionado à cultura de células-tronco de rato, mas sim o uso da técnica do MN como ferramenta auxiliadora na investigação e avaliação da instabilidade gênica em prol de terapias e para pesquisa em medicina regenerativa.

O estudo de Uno et al (2015) aborda o uso da técnica do MN em tecidos de roedores (fígado, epitélio do cólon e intestino, pele, baço, pulmão, estômago, bexiga, mucosa bucal, vagina, e tecido fetal e neonatal) como ferramenta de detecção viável e confiável de aberrações cromossômicas, além de clastogênese e aneugênese, que podem surgir por ocasião de cânceres em tecidos mais comuns, tecidos estes analisados e comparados neste estudo.

Froelich et al (2013) avaliaram o perfil de células-tronco de tecido adiposo mediante a identificação aberrações cromossômicas e quebras de fita simples de DNA em culturas prolongadas (estudo *in vitro* das CTs). O trabalho relata a cultura de células-tronco processadas enzimaticamente (colagenase P) e que foram analisadas por imunofenotipagem, viabilidade, diferenciação trilineagem e com relação aos possíveis danos de DNA pelo teste do cometa e teste de detecção de aberrações cromossômicas (que pode ser considerado semelhante ao do MN, no sentido de encontrar alterações do tipo). O estudo mostra que não houve detecção de fragmentação de DNA pelo teste do cometa durante as passagens, no entanto, foi encontrado um aumento significativo de aberrações cromossômicas. Isso evidencia que

a segurança das CTs adultas não pode ser garantida quanto à estabilidade dos cromossomos durante a expansão *in vitro*. E portanto, a confiabilidade do procedimento de cultura (expansão) para fins terapêuticos (partindo de CTs) seria alavancada e assegurada pela implementação destas técnicas de análise de aberrações cromossômicas ou transformações malignas.

A ocorrência de todos esses eventos biológicos de cunho genético, por meio da análise do teste do micronúcleo, sugere associação consistente com a carcinogênese, uma vez que os resultados com relação à presença de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares mostraram indícios de mutações cromossômicas (FENECH, 2000).

Nikitina e Chausheva (2014) estudaram riscos de transformações genéticas de CTMs multipotentes *in vitro*. Para tanto, fizeram uso das técnicas do cometa e do micronúcleo conjuntamente para analisar a estabilidade genética das culturas de CTMs derivadas de 2 diferentes tecidos: adiposo (com uso de enzima colagenase para isolamento) e medula óssea (MO). A avaliação dos danos se deu por comparação de culturas prolongadas dos 2 tipos de tecido (início e final).

Segundo os dados encontrados, nas culturas de CTMs de medula óssea não houve diferença significativa de danos de DNA e frequência de micronúcleos (pelos 2 testes) tanto no início quanto no fim da cultura. Já nas culturas provenientes de TA, a presença de maior dano (pelo tamanho/intensidade da cauda) se revelou nas últimas passagens. Com relação ao micronúcleo, não houve diferença significativa. Quando se comparam as 2 fontes de tecido, os danos de DNA são menores nas culturas inicial e final de MO. No entanto, os danos de DNA e/ou frequência de micronúcleos são elevados nas culturas provenientes de TA. Culturas identificadas com anormalidades genéticas estão relacionadas com uma típica variabilidade para todos os sistemas vivos e com a ausência elevada de mecanismos regulatórios de um organismo durante o cultivo *in vitro* (NIKITINA; CHAUSHEV, 2014).

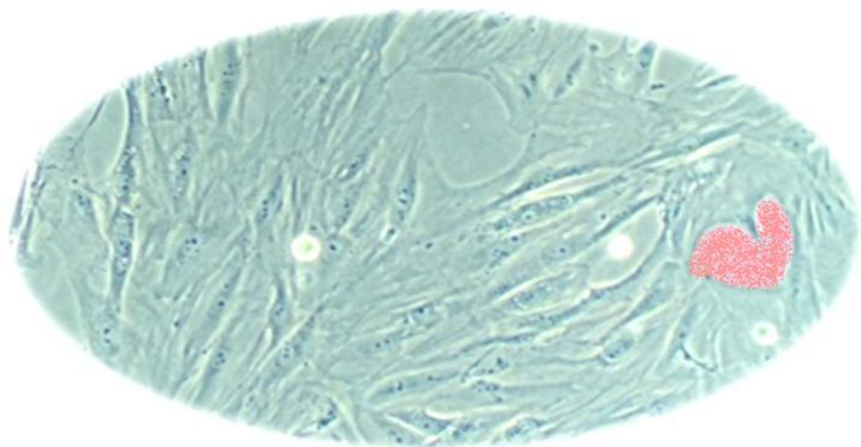
Esses dados corroboram os achados neste estudo com o LED, uma vez que os danos encontrados pelo cometa e micronúcleos se mostraram diferentes e elevados de acordo com os tratamentos experimentados. No entanto, ressalta-se mais uma vez a evidente e importante ação do LED sobre as culturas tratadas, de modo a se confirmar um benefício bioestimulador levando a ativação de mecanismos de regulação/reparo naturais das células.

Quadro 8 – Perfil global de todos os tratamentos do experimento (doses, regimes de luz e tipo de dissociação) correlacionados aos indicadores biológicos avaliados

Parâmetro	Dissociação Enzimática (doses em J/cm ² C e P)										Dissociação Mecânica (doses em J/cm ² C e P)									
	Pré	1	3	5	10	CTL	1	3	5	10	Pré	1	3	5	10	CTL	1	3	5	10
Contagem	+5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viabilidade	+1	+5	+4	+5	+5	+5	+5	+4	+5	+4	+4	+4	+5	+5	+5	+5	+4	+5	+5	+5
TD/proliferação	0	-1	-1	+1	+2	+2	+1	+1	+1	+1	0	+3	+5	+3	+5	+2	+5	+3	+4	+4
Anexina V/IP	0	-1	-1	-3	-1	-2	0	-2	-4	-1	0	-5	-2	-2	-1	+2	+1	0	-1	0
Imunofenotipagem																				
CD90	+3	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+4	+5	+5	+5	+5
CD44	+1	+2	+4	+2	+4	+3	+4	+3	+2	+3	+3	+1	+1	+1	+1	+3	+4	+5	+5	+5
CD71	+3	+5	+5	+5	+5	+5	+5	+4	+4	+5	+2	+2	+3	+3	+2	+5	+3	+3	+2	+1
CD11b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
CD31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+1	+1	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1
CD45	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
Cometa	-3	-3	-4	-1	-2	-3	-3	-2		-2	-3	-2	-2	0	-2	-3	-3	-4	-3	-2
MN	-1	-1	-2	0	-1	-3	-3	-1	-1	-1	-1	-3	-1	-1	-1	-1	-3	-1	-1	-1
Adipogênese	-1	-3	0	+2	-1	-1	-1	0	+1	+1	0	+1	+2	+2	+3	+1	+2	+2	0	0
Condrogênese	-3	+1	+1	+3	+5	+3	+1	+2	+3	+1	+1	+2	+3	+2	+5	+4	+2	+4	+2	+4
Osteogênese	+5	+2	+3	+3	+5	+5	+5	+5	+2	+5	+5	+2	+2	+1	+3	+5	+4	+5	+4	+5
TOTAL	10	12	13	23	26	23	19	20	20	18	19	13	25	22	28	29	28	30	25	29

Legenda – Planilha que engloba todos os tratamentos e testes (indicadores biológicos) do experimento descritos e pontuados por escore de -5 a +5. Essa pontuação reflete os resultados encontrados de cada tratamento, mostrando quais de destacam e apresentam melhor indicação de uso e estudo futuro. TD = tempo de desdobraimento; IP = Iodeto de propídeo; CD = *cluster of differentiated* (marcador de superfície celular); MN = Micronúcleo.

Conclusões



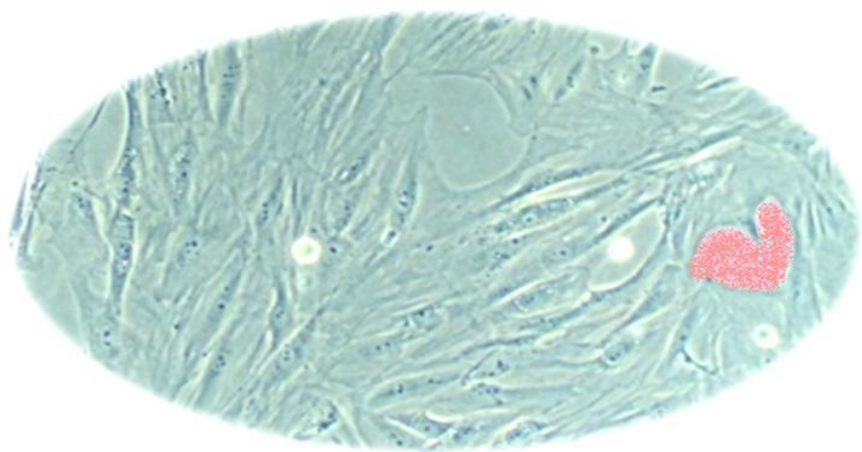
5. CONCLUSÕES

- ✓ O método de dissociação mecânico mostrou um melhor custo X benefício.
- ✓ A técnica de DM obteve uma concentração de 1×10^5 células LMN/g de TA e as obtidas por DE, uma concentração de $3,34 \times 10^5$ células LMN/g de TA.
- ✓ O LED, emitindo luz em 630 nm, nas 4 doses aplicadas (1, 3, 5 e 10 J/cm^2), sob luz contínua e pulsátil, determinam uma bioestimulação das CTMs cultivadas *in vitro* com evidente estímulo à proliferação celular.
- ✓ A análise do tempo de confluência a 80% (desdobramento) entre as passagens teve efetiva bioestimulação por influência do LED, em especial nas amostras de DM. Esta ação foi menos evidente nas amostras enzimáticas.
- ✓ Quanto à expressão de marcadores de superfície, o desempenho do marcador CD90 é consistentemente melhor e a média de expressão do CD44 é maior nas amostras obtidas por DM. O marcador CD71 tem maior expressão nas CTMs obtidas por DE.
- ✓ Os índices de apoptose e necrose evidenciam o dano causado pelo método de dissociação enzimática, com uso da colagenase tipo I, sendo estes índices estatisticamente significantes e maiores.
- ✓ Os resultados de apoptose obtidos pelo teste da capase-3, por citometria de fluxo e plana, mostram que este marcador não deve ser utilizado para o monitoramento de morte celular induzida por caspase.
- ✓ Outro parâmetro quantitativo identificado foi a diminuição da morte celular nas doses 1 e 3 J/cm^2 de DE e 5 e 10 J/cm^2 de DM, todas sob regime de luz contínua e em primeira passagem do experimento.
- ✓ 4 amostras apresentaram secreção de citocinas no pré-experimento. Nas amostras tratadas com irradiação, o melhor desempenho foi nas CTMs obtidas por DM e irradiadas com luz pulsátil nas doses de 1 e 3 J/cm^2 . As citocinas mais identificadas no pós-experimento foram IL-4 e IL-10 que possuem atividade anti-inflamatória.
- ✓ Quanto ao potencial de diferenciação em trilingagem, a diferenciação condrogênica apresenta melhores parâmetros de diferenciação nos tratamentos provenientes de DM nos momentos pré e pós-experimento, no entanto havendo discreta inibição da condrogênese. Além disso, é evidente a ação bioestimulante pelo LED sobre as culturas para formação de outros tipos celulares concomitantemente. As

diferenciações adipogênicas e osteogênicas mostraram resultados esperados e satisfatórios com positividade, sendo a osteogênica a melhor delas.

- ✓ A análise de dano do DNA por genotoxicidade, realizada pelo teste cometa, evidencia a ação benéfica da luz no reparo de danos do DNA. A irradiação de CTM de rato com a dose de 3 J/cm^2 nos dois regimes de luz induziu ao dano de DNA no pós-experimento.
- ✓ O dano de DNA (mutagenicidade) avaliado pelo teste do micronúcleo mostrou que as doses de irradiação de 1 J/cm^2 contínuo e/ou pulsátil e 3 J/cm^2 luz contínua induziram ao dano irreversível de DNA.

Referências Bibliográficas



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res*, Alexandria, v.82, n.12, p. 951-956, 2004.

ALHADLAQ, A.; MAO, J. J. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Development*, v.13, p.436-448, 2004. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2004.13.436?cookieSet=1&journalCode=scd>>. Acesso em: 23 set. 2012.

ARINZEH, T.L. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical sized canine segmental defect, *J. Bone Joint Surg. Am.*, v. 85-A: p. 1927-1935, 2003.

BAGNATO, V. S. et al. New photonic technologies for the treatment and diagnosis of hepatic diseases. An overview of the experimental work performed in collaboration, between Physics Institute of São Carlos and Ribeirão Preto Faculty of Medicine of the University of São Paulo. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 21, Suplemento 1, 2006 – 3.

BAGNATO, V. S. *Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde*. Editora Livraria da Física. São Paulo, ed. 1, 2008.

BAGNATO, V. S. *Os Fundamentos da Luz Laser*. Física na Escola, v. 2, n. 2, 2001.

BARBOSA, A. J. et al. Effect of laser on the remnant liver after the first 24 hours following 70% hepatectomy in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 26, n. 6, 2011.

BARBOZA et al. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein*, v. 12, n 1, p. 75-81, jan-mar 2014.

BARROS, F. C. et al. Laser de baixa intensidade na cicatrização periodontal. *R Ci Med Biol.*; v. 7, p. 85-9, 2008.

BARRY, F. P. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease, *Novartis Found. Sym.*, v. 249, p. 86-96, 2003.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, v. 36, p. 568-8417, 2004.

BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.* v. 44, n. 4, p. 215-230, 2006.

BRADLEY, J. E.; CHAN, J. M.; HAGOOD, J. S.. Effect of the GPI anchor of human Thy-1 on antibody recognition and function. *Laboratory Investigation*, v. 93, p. 365–374, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº. 185/01 de 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2001/185_01rdc.htm>. Acesso em: 22 Ago. 2012.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, Supl. 1, p. 25-35, 2009.

CAMELO, F. P. *Avaliação clínica do efeito da irradiação pós-operatória do laser de baixa intensidade na cicatrização de gengivoplastias em humanos* [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

CANKAYA et al. Evaluation of Light-Emitting Diode (LED-660 Nm) Application over Primary Osteoblast-Like Cells on Titanium Surfaces: An *In Vitro* Study. *Int J Med Sci.*; v. 8, n.7, p. 584–593, 2011.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *Journal of Pathology*, v. 217, p. 318-324, 2009. Disponível em: <http://www.ugr.es/~inmuno/Novedades/parolini/Caplan_2009.pdf>. Acesso em: 23 Ago. 2012.

CAPON, A. et al. Laser assisted skin closure (LASC) by using a 815-nm diode-laser system accelerates and improves wound healing. *Lasers Surg Med.*, v. 28, n. 2, p. 168-75, 2001.

CATÃO, M. H. C. V. Os benefícios do laser de baixa intensidade na clinica odontológica na estomatologia. *Rev Bras Patol Oral.*; v. 3, p. 214-8, 2004.

CHAMBERLAIN, G. et al. Mesenchymal Stem Cells: their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features and Potential for Homing. *Stem Cells® Tissue-specific Stem Cells*, United Kingdom, p. 22, 2007.

CHAMBERLAIN, J.R. et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta, *Science*, v. 303, p. 1198-1201, 2004.

CHAPEL, A. et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome, *J. Gene Med.*, v. 5, p. 1028-1038, 2003.

CLETO, N. G. et al. Cell Therapy in the Healing of Chronic Wounds. In: P.R. Fernandes; P.J. Bártolo; J. Folgado; F.H. Rodrigues; R.B.Ruben; H. Almeida;M.R.Dias. (Org.). Proceedings of II International Conference on Tissue Engineering. ed. 1, Lisboa: IST Press, v.1, p.275-278, 2011.

CONLAN, M. J.; RAPLEY, J. W.; COBB, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. *J Clin Periodontol.*; v. 23, p. 492-6, 1996.

COROTCHI, M. C. et al. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* v. 4, n. 4, p. 81, 11 de Jul 2013.

COVAS, D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu, p. 35-48, 2006.

DALTRO, G. C. et al. Efficacy of autologous stem cell-based therapy for osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: a five-year follow-up study. *Stem Cell Res Ther*, v. 29, n. 6, p. 110, Maio-2015.

DENG, Y. et al. Efficiency of adenoviral vector mediated CTLA4Ig gene delivery into mesenchymal stem cells, *Chin Med. J. (Engl.)*, 116: 1649- 1654, 2003

DIETZ, J. et al. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. *Rev. Ass. Med.*, Brasil, v. 46, n.3, p. 207-11, 2000.

EASTMOND, D.A.;TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 13, p. 34-43, 1989.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M.; MORLEY, A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. *Cytobios*, v. 43, p. 233-246, 1985a.

- FROELICH, K. et al. Chromosomal aberrations and deoxyribonucleic acid single-strand breaks in adipose-derived stem cells during long-term expansion *in vitro*. *Cytotherapy*, v. 15, p. 767-781, 2013.
- GEDYE et al. Cell surface profiling using High –throughput flow cytometry: a platform for biomarker discovery and analyses f cellular heterogeneity. *Plos One* , v. 29, n.9, p.8, 2014.
- GENOVESE, J. W. Laser de baixa intensidade: aplicações terapêuticas em Odontologia. São Paulo, *Lovise Ltda.*, p. 175, 2000.
- GIANNELLI, M. et al. Photoactivation of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells With Diode Laser: Effects and Mechanisms of Action. *Journal of Cellular Physiology*, v. 228, p. 172–181, 2013.
- GOMES, R. G. C.; GRINFELD, S. Células-tronco: um breve estudo. *Odontologia. Clin.-Cientif.* Recife, v. 7, n. 1, p. 29-33, jan/mar. 2008.
- GRINNEMO, K. H. et al. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium, *J. Thorac. Cardio. Surg.*, v.127, p.1293-1300, 2004.
- HAMBLIN, M. R; DEMIDOVA, T. N. “Mechanisms for Low-Light Therapy”, *Proc. of SPIE*, v. 6140, 2006. Disponível em: < <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/> on Terms of Use: <http://spiedigitallibrary.org/ss/TermsOfUse.aspx> >. Acesso em: 02 de Jul. 2015
- HARRY et al. NASA Light emitting diode medical aplicaitons from deep space to deep sea, American Insitut of Phisics, 2001.
- HOSSEINI, S. M. et al. 12 hours after cerebral ischemia is the optimal time for bone marrow mesenchymal stem cell transplantation , n. 6, p. 904-8, 10 de Jun 2015.
- HUSS, R. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34– hematopoietic and mesenchymal stem. *Stem Cells*, v.18, n.1, p.1-9, 2000. Disponível em: <<http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/reprint/18/1/1.pdf>>. Acesso em: 08 set. 2012.
- ISHIGURO, M.; IKEDA,K; TOMITA K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. *Journal of Orthopedic Science*, v. 15, n. 2, p. 233-239, Mar. 2010.
- JIA, Z. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat corneal allograft rejection model. *Experimental Eye Research* , v. 102, p. 44-49, 2012.
- KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, v. 24, p. 1294-301, 2006.
- KIM, H.K. et al. Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci.*, v. 24, n. 2, p. 214–22, 2009.
- LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann NY Acad Sci.*, v. 1044, p. 32-8, 2005.
- LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine efectt of mesenchymal stem cell derived from human adipose tissue in boné regeneration. *Plos One*, v. 8, n. 9, p. 9, 2014.
- LEDEBOER, A. et al. Interleukin-10, interleukin-4, and transforming growth factor- β differentially regulate lipopolysaccharide-induced production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide in co-cultures of rat astroglial and microglial cells. *Glia*, v. 30, n. 2, p. 134-142, Mar. 2000.
- MALUF, A. P. et al. Utilização de laser terapêutico em exodontia de terceiros molares inferiores. *RGO*, v. 54, p. 182-4, 2006.

- MAMBELLI, L. I. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Engineering*, v. 15, n. 1, p. 87-94, 1999.
- MEIRELLES, L. S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, p. 2287-2299, 2008. Disponível em: <<http://stemcells.alphaamedpress.org/cgi/content/abstract/2007-1122v1>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- MEIRELLES, L. S. et al. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, v. 119, p. 2204-2213, 2006. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/cgi/reprint/119/11/2204.pdf>>. Acesso em: 03 out. 2015.
- MENDELOW, B. D. et al. Characterization of bone marrow stromal cells in suspension and monolayer cultures. *British Journal of Hematology*, v. 46, p. 15-22, 1980. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/120729704>>. Acesso em: 05 set. 2015.
- MION, W. Foto seleção de mielomas e hibridomas murinos na produção de anticorpos monoclonais [Dissertação]. Botucatu (SP) (Unesp FMB; 2014)
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N. M. A.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online, 2009.
- MOORE, P. et al. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.*, v. 36, n. 1, p. 8-12, 2005.
- NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v. 174, p. 249-282, 2006.
- NIKITINA, V. A.; CHAUSHEVA, A. I. Risk of Genetic Transformation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells In Vitro. *Russian Journal of Genetics (Genetika)*, v. 50, n. 1, p. 91-95, 2014.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development, 2014. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/oecd-test-guidelines-for-the-testing-of-chemicals26-september-2014.htm>> Acesso em 15 de maio de 2015.
- OLIVE, P. L. ; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumour and normal cells using the 'comet' assay. *Radiat Res.*, v. 122, p. 86-94, 1990.
- ONG, et al. The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode irradiation. *Biomaterials*, 2013
- ORTIZ, L. A. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 100, p. 8407-8411, 2003.
- PEISTER, A. et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, v. 103, n. 5, p. 1662-1668, 2004.
- PEREIRA, A. N. et al. Effect of low power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*; v. 31, n. 4, p. 263-7, 2002.
- PITTINGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, p. 143-7, 1999.
- POLISSETTI, N. et al. Isolation, characterization and differentiation potential of rat bone marrow stromal cells. *V.* 58, n. 2, p. 201-208, 2010.

- REDDY, G. K. Comparison of the photostimulatory effects of visible He-Ne and infrared Ga-As lasers on healing impaired diabetic rat wounds. *Lasers Surg. Med.*, v. 33, n. 5, p. 344-51, 2003.
- RENNO, A. C. M. et al. The Effects of Laser Irradiation on Osteoblast and Osteosarcoma Cell Proliferation and Differentiation *in Vitro*. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 25, n. 4, p. 275–280, 2007.
- RIBEIRO L.R., SALVADORI, D.M.F., MARQUES, E.K. Mutagênese ambiental. Editora Ulbra p. 201-213, 2003.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Editora da Ulbra, 2003, p. 201-223.
- RICHARDSON, J. D. et al. Impact of timing and dose of mesenchymal stromal cell therapy in a preclinical model of acute myocardial infarction. *J Card Fail*, v. 19, n. 5, p. 342-53. Nov. 2013.
- SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender, A.). *Plenum Pres.*, New York, v. 4, p.31-53, 1976.
- SEIFERT, M. et al. Crosstalk between immune cells and mesenchymal stromal cells in a 3D bioreactor system. *Int J Artif Organs.*, v. 35, n. 11, p.986-95, Nov. 2012. Disponível em : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/opac.acc.msmc.edu/pubmed/23065892>. Acesso em: 12 Dez. 2014.
- SHEN, C. et al. Reduced expression of CD27 by collagenase treatment: implications for interpreting b cell data in tissues. *PLoS One.*, v. 10, n.3, e0116667, 10 de Mar 2015.
- SILVA, E. M. et al. Avaliação histológica da laser-terapia de baixa intensidade na cicatrização de tecidos epitelial, conjuntivo e ósseo: estudo experimental em ratos. *Rev. Sul-Bras. Odontol.*; v. 4, p. 29-35, 2007.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, n. 1, p.184-191, 1988.
- SUGAYA K. Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases, *Int. Rev. Cytol.*, v. 228, p. 1-30, 2003.
- TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Low-Level Laser Irradiation (LLLI) Promotes Proliferation of Mesenchymal and Cardiac Stem Cells in Culture. *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 39, p. 373–378, 2007.
- TUBY, H.; MALTZ, L.; ORON, U. Implantation of Low-Level Laser Irradiated Mesenchymal Stem Cells into the Infarcted Rat Heart Is Associated with Reduction In Infarct Size and Enhanced Angiogenesis. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 27, n. 2, 2008.
- UNIVERSITY OF BIRMINGHAM, Photobiomodulation and low level light therapy (LLLT) research. Disponível em: <<http://www.birmingham.ac.uk/research/activity/dentistry/research/photobiomodulation/index.aspx>>. Acesso em: 14 de Jun. 2015.
- UNO, Y. et al. Micronucleus test in rodent tissues other than liver or erythrocytes: Report of the IWGT working group. *Mutation Research*, v. 783, p. 19–22, 2015.
- VATS, A. et al. Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaringol.*, v. 27, p. 227-234, 2002.

VIEIRA, H. S. Estudo comparativo de citocinas anti-inflamatórias em células-tronco mesenquimais cultivadas com *Cordia ecalyculata* e biocurativo. 2015. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

VINCK, E. M. et al. Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. *Lasers in Medical Science*, London, v. 18, n. 2, p. 95-99, 2003.

VOGT, C. A esperança celular. *Rev. Ciência e cultura*,; v. 19, 2004. Disponível em URL: <<http://www.comciencia.br/reportagens/células/01.shtml>> Acesso em: 19 Set. 2105.

WALSH, L. J. The current status of low level laser therapy in dentistry. Part 1. Soft tissue applications. *Austr. Dental J.*, v. 42, p. 247-54, 1997.

WAN, C. D. et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, v. 7, p. 29-33, 2008. Disponível em: <<http://www.hbpdint.com/upload/PDF/200813193933152316.pdf>>. Acesso em: 11 Nov. 2015.

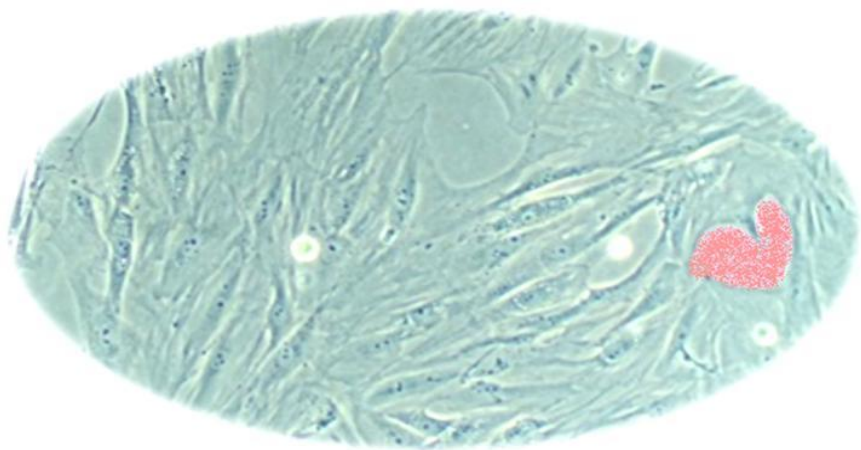
WOODBURY, D. et al. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, v. 61, p. 364–370, 2000. www.birmingham.ac.uk, acesso em 21 de junho de 2015.

YOSHIMURA, H. et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*, v. 327, p. 449–462, 2007.

ZINÖCKER, S.; VAAGE, J.T. Rat mesenchymal stromal cells inhibit T cell proliferation but not cytokine production through inducible nitric oxide synthase. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 1-13, Abr. 2012.

ZUCCONI, E. et al. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*, *in proof*, p. 1-33, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2008.0314>>. Acesso em: 22 set. 2014.

Anexos



ANEXOS



UNESP



FACULDADE DE MEDICINA
FMB
BOTUCATU



CEUA
Ética

Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

Certificado

CERTIFICAMOS que o **(Protocolo CEUA 1009/2013)** Bioestimulação de célula-tronco mesenquimal de rato sob a ação da luz contínua e pulsátil de 630 nm utilizando LED, a ser conduzido por Heloísa Vicente Garcia, com a orientação da Prof.ª. Dr.ª. Elenice Deffune, com a colaboração de Woner Mion, com o apoio técnico de Ednelson Henrique Bianchi e Ondina Silvia Cotrim Ferrari, está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - **CONCEA**, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.



Prof. Dr. Katashi Okoshi
Presidente da CEUA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEUA

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 04/04/2013

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Este projeto foi contemplado com 2 financiamentos da FAPESP, sendo eles:

- **Auxílio Regular Fapesp – Processo N° 2013/19998-1;**
- **Bolsa de Mestrado Fapesp – Processo N° 2013/01942-0.**