



UNESP – Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina – Botucatu

Departamento de Clínica Médica – Laboratório Biologia Molecular

IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA PARA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA A PARTIR
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO

Regiane Marques Castro Olimpio

Botucatu

2012

Regiane Marques Castro Olimpio

**IMPLANTAÇÃO DA TÉCNICA PARA DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA A PARTIR
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DERIVADAS DO TECIDO
ADIPOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação “Fisiopatologia em Clínica Médica – Área de Concentração –Ciências da Saúde” da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Nogueira

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E
TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Olimpio, Regiane Marques Castro.

Implantação da técnica para diferenciação osteoblástica a partir de células tronco mesenquimais humanas derivado do tecido adiposo / Regiane Marques Castro Olimpio. Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 20202008

1. Células-tronco – Cultura e meios de cultura. 2. Tecido adiposo. 3. Matriz extracelular. 4. Ossos – Crescimento.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Osteoindução; Tecido adiposo.

Nessa etapa, aprendi que...

*Aquele que começou boa obra há de completá-la Filipenses 1.6
porque a palavra do Senhor é reta e todas as suas obras são
fiéis. Salmo 33.4.*

Dedico

*Á toda minha família que faz parte da minha vida e que sempre esteve comigo nesse
aprendizado.*

*Com carinho: Gabriel e Samuel que fazem
parte da minha força de viver!*

Agradecimentos

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

Ao meu marido Juliano pelo apoio e incentivo.

À minha mãe Maria José pelo esforço, investimento e dedicação e por acreditar em mim para que eu chegasse até aqui.

À minha sogra pelas constantes orações.

À toda família Olimpio e Castro que diretamente ou indiretamente fizeram parte desse trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, pela oportunidade, compreensão e ensinamentos em todos os momentos que foram necessários.

À minha co-Orientadora, Dra. Patrícia Pinto Saraiva pelos ensinamentos, atenção e suporte para execução desse trabalho.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Fernanda da Silva Mazeto pelas orientações dadas nesse estudo.

À Profa. Dra. Elenice Deffune pela disponibilidade e por me recepcionar no laboratório de engenharia celular, para que eu pudesse aprimorar a metodologia.

Ao Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto e ao Dr. Mattioli e sua equipe que gentilmente forneceu grande suporte para a realização desse trabalho.

À Maria Teresa Sívio e Miriane de Oliveira minhas irmãs queridas. Não tenho palavras para agradecer as constantes ajudas pessoais e profissionais. Sem dúvidas são pessoas que Deus colocou em minha vida para abençoar a mim e minha família. Nessa

caminhada aprendi muito com vocês. Somente Deus para retribuir á altura o que fazem por mim.

À Tamara que chegou para acrescentar e nos ajudou muito no tempo que ficou. Mesmo estando longe permanece perto em nossos pensamentos.

Ao amigo Keise que sempre foi prestativo, ajudando sem mesmo pedir, participou das nossas alegrias e se preocupou conosco sem mesmo ter a obrigação. Realmente sentimos muito sua falta!!

À Fernanda pela atenção, ajuda e companherismo.

À Renata Luvizotto, amiga querida que sempre nos ajudou nos momentos em que precisamos.

Ao Dr. Sandro José Conde e Dra. Vânia dos Santos Nunes pela ajuda para os aprimoramentos desta dissertação.

À Thaiane Evaristo que foi o ponto de partida para que eu aprendesse parte desse trabalho, além do seu carinho, atenção e amizade.

À toda a equipe do laboratório de cultura de células do Hemocentro de Botucatu que me receberam muito bem e que sempre tiveram dispostos a me ajudar.

Marcos do Laboratório Clínico e a chefe Regina pela ajuda na realização dos exames das pacientes.

À Heloiza Helena Diburcio da Enfermaria de Ortopedia e Cirurgia Plástica pela atenção e simpatia pelas informações que necessitei.

À Sueli Clara pela amizade e colaboração.

Aos amigos do Laboratório Experimental: Regina, Vânia, Denise, Patrícia, Silmere, André, Dijon, Loreta, Danielle, Marcelo, Ricardo, Morango, Zé, Mário, Luana, Camila Corrêa, Cora, Fernanda, Rogerinho, Boca, Elenize, Carlos, Renata, Paulinha, Adriana, Camila Bonomo, Daniele, Damiana Camila Rosa, Sueli Garcia, Ângelo, Vitor, De Lalla, Bruna, Priscila, Igor. Obrigada pela amizade de todos pelos momentos de descontração no dia a dia.

À Miriane, Maria Teresa, Dani, Tâmara, Damiana, Camila Correa, Paula T4, Denise Perone, Sueli Garcia, Luana, Camila Rosa, Dijon, Sueli Clara, Dani Tomaz, Georgete, Mário Bruno, André e Renata, Keize, Priscila, Ricardo, Morango e Dra. Célia. Obrigada pelo grande carinho de todos e alegria que proporcionaram para mim e minha família. Que Deus possa retribuir e abençoá-los hoje e sempre!!

Aos funcionários do Departamento e do Laboratório Experimental da Clínica Médica: Ana Mengue, Elizangela, Bruno, Renato e Alexandre pelos auxílios na pós graduação que foram necessários.

Aos funcionários e amigos da seção de Pós-graduação (Regina, Nathanael, Andréa e Lílian) pela simpatia e disposição em ajudar.

À bibliotecária Luciana Pizzani pela correção das referências desse trabalho.

Ao Departamento e ao Laboratório Experimental de Clínica Médica, Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu, pela oportunidade de realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e por viabilizar a realização desse estudo.

***“O Senhor é bom, ele serve de
fortaleza no dia da angústia, e
conhece os que confiam nele”.***

Naum 1.7

Introdução: As Células Tronco Mesenquimais (CTMs) são capazes de diferenciar em várias linhagens de células. As CTMs, quando em cultura, e na presença de citocinas ativadoras de osso, sofrem osteoindução e diferenciam em osteoblastos. Entretanto, pouco se conhece sobre a função e a proliferação dos progenitores osteoblásticos, que pode ser essencial para a integridade do tecido ósseo. **Objetivo:** Implantar a técnica para diferenciação osteoblástica a partir de células tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo. **Metodologia:** O tecido adiposo foi obtido de três pacientes do sexo feminino submetidas à abdominoplastia. As CTMs foram mantidas em meio D-MEM completo contendo 10% de SFB, mantidas a 37° C em uma atmosfera umidificada com 95% O₂/5% CO₂. Após a confluência alíquotas de células foram separadas para o processo de caracterização celular. Após esse período, foi realizada osteoindução utilizando meio DMEN completo com acréscimo de dexametasona, ácido ascórbico e β glicerofosfato. As células foram mantidas nesse meio por até 16 dias. Como controle negativo da indução, culturas de células foram mantidas em meio convencional pelo mesmo período de tempo. Ao término de 16 dias as células foram separadas para a caracterização celular e o RNA foi coletado para análise da expressão de RANKL. **Resultados:** As células após seis dias de cultura apresentaram aderidas com 40% de confluência e após dezessete dias com 75% de confluência. As CTMs expressaram anticorpo CD 44 e 90. Foi encontrado médio nível (20%- 40%) de dano de DNA em 40% das CTMs analisadas. A imunofluorescência confirmou a homogeneidade e positividade para expressão de anti-vimentina. A diferenciação química foi conseguida pela adição de dexametasona, ácido ascórbico e β glicerofosfato ao meio DMEN completo. Houve a expressão de fosfatase alcalina, osteocalcina, RANKL e formação da matriz mineralizada a partir dos osteoblastos após 16 dias com meio de diferenciação osteogênico. **Conclusão:** O estudo in vitro a partir de CTMs do tecido adiposo mostrou que as células aderem e proliferam em cultura. As células diferenciaram em osteoblastos quando cultivadas com esse meio osteoindutivo. Após 16 dias de diferenciação os osteoblastos expressaram fosfatase alcalina, osteocalcina, RANKL e apresentaram matriz mineralizada. Foi possível caracterizar essas células pela metodologia aplicada.

Palavras chave: Tecido adiposo, Células Tronco Mesenquimais, Osteoindução, osteoblastos.

Introduction: Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are able to differentiate into multiple cell lineages. The MSCs, when cultured, in the presence of activating cytokines bone suffer osteoinduction and differentiate into osteoblasts. However, little is known about the function and proliferation of osteoblastic progenitors, which can be essential for the integrity of bone tissue. **Objective:** Deploy the technique for osteoblast differentiation from human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. **Methods:** Adipose tissue was obtained from three female patients undergoing abdominoplasty. MSCs were maintained in complete D-MEM containing 10% FBS, maintained at 37 ° C in a humidified atmosphere with 95% O₂ / 5% CO₂. After confluence aliquots of cells were separated into the cellular characterization process. After this period, was performed using osteoinduction medium DMEN complete with addition of dexamethasone, ascorbic acid and β glicerofosfato. Cells were maintained in this medium for up to 16 days. As a negative control induction, cell cultures were maintained in standard medium for the same period of time. At the end of 16 days the cells were separated for the characterization and cellular RNA was collected for analysis of expression of RANKL. **Results:** The cells after six days of culture had adhered with 40% confluency and after seventeen days with 75% confluency. The MSCs expressed antibody CD 44 and 90. Found average level (20% - 40%) of DNA damage in 40% of MSCs analyzed. Immunofluorescence confirmed the homogeneity and positivity for anti-vimentin expression. The chemical differentiation was achieved by addition of dexamethasone, ascorbic acid and β glicerofosfato DMEN in half full. There expression of alkaline phosphatase, osteocalcin, RANKL and mineralized matrix formation from osteoblasts after 16 days with osteogenic differentiation medium. **Conclusion:** The in vitro study MSCs from adipose tissue showed that the cells adhere and proliferate in culture. The cells differentiate when cultured in osteoblasts osteoinductive with this medium. After 16 days of differentiation of osteoblasts expressed alkaline phosphatase, osteocalcin, and RANKL showed mineralized matrix. It was possible to characterize these cells by the methodology applied.

Keywords: Fat, Mesenchymal Stem Cells, osteoinduction, osteoblasts.

Figura 01: Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais e a habilidade de diferenciação em células de linhagem mesodérmica.....	20
Figura 02: Interação entre RANK e RANKL na regulação do metabolismo do osso e o papel da OPG nesse percurso.....	25
Figura 03: Delineamento do estudo.....	35
Figura 04: Células com seis dias de cultura, aderidas na placa T25cm ²	41
Figura 05: Células com dezessete dias de cultura, aderidas na placas de T75cm ²	42
Figura 06: Imagens representativas da análise da citometria de fluxo das células cultivadas com anticorpos monoclonais.....	42
Figura 07: Imagens representativas do teste do cometa para CTM.....	44
Figura 08: Imagens representativas da imunofluorescência para CTMs.....	44
Figura 09: Imagem representativas das células submetidas ao meio de diferenciação.....	45
Figura 10: Imagem representativa da matriz mineralizada dos osteoblastos.....	46
Figura 11: Imagem representativa da expressão do RANKL por PCR- Real Time.....	47
Figura 12: Imagem representativa da expressão do RANKL e GAPDH por PCR- Real Time.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 01: Tipo, fonte e plasticidade das células tronco embrionárias e adultas.....19

Tabela 02: Dosagens de fosfatase alcalina e osteocalcina no meio de cultura antes e depois do processo de diferenciação osteoblástica.....46

Lista de Abreviaturas

CD90- Contra o antígeno CD 90

CD 44- Contra o antígeno CD 44

CD 14- Contra o antígeno CD 14

CD 34- Contra o antígeno CD 34

CD 45- Contra o antígeno CD 45

Igg- anticorpo IgG

BSA- Tampão Bloqueador CT- Células Tronco

CTMs- Células Tronco Mesenquimais

CTEs- Células Tronco embrionárias

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar

DMEM - Dulbecco's Modificado

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DAPI- 4', 6 diamino- 2 Fenilindol

GAPDH- Proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

mRNA- RNA mensageiro

OPG- Osteoprotegerina

PBS- Tampão Fosfato Salino

RANK- Receptor ativador de NF-kB

RANKL- Receptor ativador de NF-kB ligante

RNA - Ácido Ribonucléico

SFB- Soro Fetal Bovino

TA- Tecido Adiposo

TAB- Tecido Adiposo Branco

TRICT- Fluorocromo Rodamina

VHS- Velocidade de hemossedimentação ou taxa de sedimentação de eritrócitos

1-INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Células Tronco.....	17
1.2 Células Tronco Mesenquimais.....	19
1.3 Critérios para utilização de CTMs em Laboratório.....	19
1.4 Osteoindução.....	23
1.5 Células Ósseas.....	24
1.6 Cultura de Osteoblastos e Importância Clínica.....	26
2-HIPÓTESE.....	29
3-OBJETIVOS.....	31
4-PACIENTES E MÉTODOS.....	33
4.1 Obtenção de Tecido adiposo.....	34
4.2 Obtenção de células-tronco adultas do tecido adiposo.....	34
4.3 Culturas de células-Tronco Mesenquimais.....	34
4.4 Caracterização das CTMs e manutenção da integridade celular.....	36
4.5 Citometria de Fluxo.....	37
4.6 Imunofluorescência.....	37
4.7 Indução das Células-Tronco Mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica.....	38
4.8 Comprovação da diferenciação de CTMs em osteoblastos.....	38
4.9 Formação de matriz mineralizada.....	39
4.10 Extração do RNA tota.....	39
4.11 Análise da qualidade do RNA.....	39
4.12 Transcrição reversa (RT) do RNA.....	40

5 RESULTADOS

5.1 Descrição das Pacientes.....	42
5.2 Cultura de CTMs.....	42
5.3 Fenotipagem das CTMs derivadas de tecido adiposo.....	43
5.4 Teste do Cometa.....	44
5.5 Imunofluorescência.....	45
5.6 Diferenciação celular das CTMs em osteoblastos.....	46
5.7 Comprovação da diferenciação de CTMs em osteoblastos.....	46
5.8 Formação de matriz mineralizada.....	47
5.9 Expressão gênica do RANKL.....	48
6-DISCUSSÃO.....	49
7-CONCLUSÃO.....	54
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
9-ANEXOS.....	65
10- APÊNDICE.....	71

1.1 Células Tronco

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de se auto-replicarem e se diferenciarem em diversas células do organismo (Watt & Hogan, 2000; Majka et al., 2005). Didaticamente, são divididas em dois tipos principais: embrionárias e adultas, sendo esta última conhecida como mesenquimais (Souza et al., 2010).

As células-tronco embrionárias (CTEs) são derivadas da massa interna do blastocisto ou do zigoto. Essas células são capazes de se diferenciar em qualquer linhagem derivada dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. As CT com origem a partir do zigoto, além de se diferenciar em células derivadas dos três folhetos embrionários, originam os tecidos extraembrionários (Souza et al., 2010).

Já as células-tronco mesenquimais (CTMs) estão presentes em muitos tecidos maduros onde atuam na manutenção dos mesmos, repondo células mortas. Essas células eram vistas como restritas na sua capacidade de diferenciação, somente originando células do próprio tecido onde residissem. Porém, alguns trabalhos (Ferrari, et al. 1998; Horwitz, et al. 2005; Johnstone, et al. 1998; Pittenger, et al. 1999; Wakitani, et al. 1995) mostraram que as CTMs possuem um potencial muito mais amplo de diferenciação, gerando tecidos diferentes daqueles onde habitam (Mizuno and Hyakusoku 2003). Por outro lado, ainda não estão bem esclarecidos os fatores envolvidos na proliferação e diferenciação das CTMs derivadas principalmente da medula óssea e do tecido adiposo. De acordo com Wagner & Ho (2007) uma das possíveis formas para compreensão desses fatores seria avaliar a capacidade de diferenciação e viabilidade dessas células.

A Tabela 01 apresenta alguns tipos de células embrionárias e mesenquimais, origem e tipos celulares que produzem (Zuk, et al. 2001).

Tabela 01. Tipo, fonte e plasticidade de células tronco embrionárias e adultas.

Tipo	Fonte	Tipos de Células Produzidas
Embrionária	Blastocisto, células germinativas	Todas as células
Hematopoética	Medula Óssea	Sanguíneas, endoteliais, hepáticas, musculares
Mesenquimal	Tecido adiposo, medula óssea	Condoblastos, células cardíacas, renais, osteoblastos

Quanto ao potencial de diferenciação celular, as CT podem ser classificadas como: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes. (MAJKA, KUCIA, RATAJCZAK, 2005). As células totipotentes e pluripotentes são aquelas capazes de se diferenciar em células de todos os tecidos que formam o corpo humano. Elas apresentam alta capacidade de proliferação e são encontradas principalmente no embrião. As células unipotentes podem gerar apenas um tipo celular e apresentam capacidade de se autorrenovar. As multipotentes são derivadas das CTMs, capaz dar origem a linhagens celulares específicas (WEISS et al., 2008).

1.2 Células Tronco Mesenquimais

As CTMs também conhecidas como células-tronco esqueléticas ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas, fazem parte das células tronco adultas e são originadas a partir do mesoderma, que forma todos os elementos do esqueleto. Uma das características dessas células é ter afinidade para aderir a placas de cultura (Dominici, et al. 2006) além de apresentar boa propagação no ambiente de cultura celular (Bobis, et al. 2006). Em condições adequadas de cultivo, as CTMs exibem morfologia fibroblastóide e exercem autorrenovação (Pittenger et al. 1999; Yarak & Okamoto, 2010). Podem ser expandidas em cultura por mais de 40 gerações mantendo a capacidade multipotente, embora nessa etapa reduzem as taxas de mitose, podendo levar a mutações (Deans and Moseley 2000).

No que se referem à diferenciação celular, as CTMs apresentam limitações por originar células distintas, diferentemente do que ocorre com as CTEs. Nesse contexto, as CTMs são capazes de diferenciar em várias linhagens de células, como as células cardíacas, renais, células epiteliais, neurônio, hepatócitos, condroblastos, osteoblastos entre outras (Pittenger et al. 1999) (Figura 1).

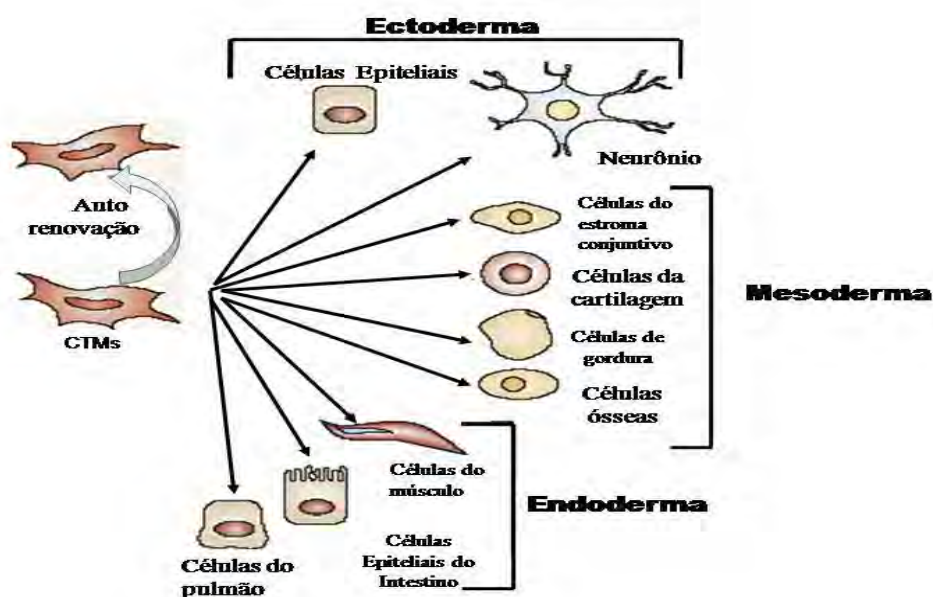


Figura 1: Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais e a habilidade de diferenciação em células de linhagem mesodérmica (Ucelli et al. 2008).

A possível obtenção das CTMs contribui para estabelecer novos perfis terapêuticos e na regeneração de tecidos, já que essas células são autoregenerativas e imunocompatíveis (Im, et al. 2005). De acordo com Chen et al. (2008) é fácil o acesso para obtenção de CTMs no tecido onde se encontram. Por outro lado, o isolamento das CTMs a partir da medula óssea, tem como resultado uma população de células heterogênea (Anversa, et al. 2004). Além disso, a maneira de obtenção dessas células, a partir da medula óssea, causa ao paciente desconforto e dor (Anversa et al. 2004).

O tecido adiposo (TA), assim como a medula óssea, é derivado do mesoderma embrionário e contém um estroma que é facilmente isolado (Mizuno and Hyakusoku 2003). O tecido adiposo marrom está praticamente ausente em seres humanos adultos. Porém, o tecido adiposo branco (TAB) está presente em várias regiões do corpo. Esse tecido distribui-se no organismo como tecido adiposo subcutâneo e visceral. É formado por uma matriz de tecido conjuntivo, fibras colágenas e reticulares, tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes leucócitos, macrófagos, fibroblastos e CTMs (Fruhbeck, et al. 2001; Osborne 2000).

No TAB é possível isolar uma população homogênea e abundante de CTMs facilmente cultiváveis (Anversa et al. 2004). As CTMs derivadas desse tecido foram isoladas pela primeira vez por meio de cirurgia plástica (Zuk et al. 2001) um procedimento menos desconfortável, doloroso e menos arriscado que a extração de medula óssea. Outro benefício relacionado à separação dessas células é sua concentração ser até 500 vezes maior que a encontrada na medula óssea (Fraser et al. 2006; Mizuno & Hyakusoku 2003; Zuk et al. 2001). Dessa maneira, torna ainda mais acessível o isolamento e o cultivo das CTM a partir desse tecido.

Coleman (1995) acredita que o TA seja uma fonte de CTMs para aplicações terapêuticas, por essas células estarem disponíveis em grandes quantidades. Além disso, as CTMs contidas nesse tecido podem servir para várias pesquisas. Uma das pesquisas de grande relevância seria na área de fisiopatologia de doenças genéticas humanas. Também podem ser empregadas para estudos básicos relacionados à compreensão dos mecanismos moleculares, genéticos e epigenéticos envolvidos no controle e nos processos das CT (Yarak & Okamoto, 2010). As CTMs por ter a capacidade de diferenciar em tecidos de linhagem mesodérmica como tecido ósseo, torna interessante o cultivo dessas células na aplicação da medicina regenerativa (Pittenger et al. 1999). Assim, a administração de MSCs torna viável como nova estratégia para tratar uma ampla gama de doenças.

1.3 Critérios para utilização de CTMs em Laboratório

Um fator importante para o avanço dos estudos com CTMs é a padronização dos métodos cirúrgicos e laboratoriais. Conforme Puissant et al. (2005) técnicas laboratoriais são de fundamental importância para a implantação de métodos de isolamento e caracterização CTMs, para posterior uso clínico. Além da padronização desses métodos, a preparação do tecido, o cultivo celular em escala e grau de pureza contribui para tais avanços. A qualidade das células a serem isoladas, a avaliação do potencial de diferenciação celular, presença de alterações genéticas ou epigenéticas, a compreensão da autorrenovação, bem como a interação do nicho celular também é relevante (Yarak & Okamoto, 2010).

Segundo Dominici et al. (2006) afirma que muitos laboratórios tem desenvolvido métodos para isolar e ampliar as CTMs. Tais métodos apresentam diferenças bastante significativas. Isso é resultado da falta de critérios universalmente aceitos para definir as CTMs. Dominici et al. (2006) ainda relatam que o Comitê Internacional de Células Tronco propõe um conjunto de padrões para definir CTMs humanas para fins laboratoriais e científico. Esses critérios têm como objetivo proporcionar aos pesquisadores um conjunto de bases dos melhores dados disponíveis nas CTMs a fim de definir a identidade dessas células. Tais critérios utilizados são a aderência ao plástico, ter capacidade de diferenciação e ter afinidade específica ao antígeno. Essa afinidade se deve pela presença de anticorpos específicos na membrana celular das CTMs. Dessa forma as CTMs, expressam altos níveis desse antígeno como CD13, CD29, CD44, CD105 e CD166 que são os mais frequentes (Barry & Murphy, 2004; Kern et al. 2006, Gronthos et al. 2001). A citometria de fluxo favorece a caracterização de CTMs através da expressão dessas proteínas.

Entretanto existem poucos trabalhos na literatura que abordam a caracterização celular e molecular das CTMs derivadas do TA (Bunnell, et al. 2008; Schaffler and Buchler 2007). Isso induz a necessidade de mais estudos comparativos sobre a natureza celular e do potencial de diferenciação das CTMs desse tecido. Segundo Yarak & Okamoto (2010) esse tipo de conhecimento básico poderá auxiliar no desenvolvimento de novas pesquisas com finalidade de aplicação clínica.

1.4 Osteoindução

As CTMs, quando em cultura, e na presença de citocinas ativadoras de osso, sofrem osteoindução. Nessa etapa, realizam osteopoesse, processo que envolve a proliferação e a maturação das células osteoprogenitoras, que darão origem a osteócitos, pré-osteoblastos e osteoblastos funcionais (Kobayashi & Kronenberg 2005). Essas células fornecem importantes informações sobre a produção de fatores de crescimento, transdução de sinais e mineralização (Kobayashi & Kronenberg 2005).

A ação da osteoindução tem como produto final a produção da matriz extracelular e células formadoras de osso determinando um parâmetro fundamental na engenharia tecidual óssea (Ramoshebi, et al. 2002). Entretanto, pouco se conhece sobre a função e a proliferação dos progenitores osteoblásticos, que pode ser essencial para a integridade do tecido ósseo (Zuk, et al. 2002).

Diferente dos materiais osteocondutores, as substâncias osteoindutoras promovem a formação óssea em locais extra-esqueletais, como em cultura celular (Einhom, 1996). Nesse ambiente, para que ocorra a indução osteogênica a partir de CTMs e a diferenciação em osteoblastos, é utilizado meio de cultura padrão. Esse meio é suplementado com baixas concentrações de ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerofosfato. O tratamento com dexametasona, um glicocorticóide sintético, estimula a proliferação das células-tronco mesenquimais e dá suporte para a osteogênese. Fosfatos orgânicos, assim como o β -glicerofosfato, agem na mineralização e modulação da atividade dos osteoblastos. O ácido ascórbico participa no aumento da atividade da fosfatase alcalina e na produção da osteocalcina e osteopontina (Beck, et al. 200; Tuan et al., 2002). CTMs, apesar de manifestarem um tempo finito de vida em cultura in vitro, técnicas atuais como a osteoindução, permitem que elas cresçam em número suficiente para aplicação clínica (Zuk et al. 2001). Para tais aplicações e progresso na medicina é importante a caracterização dos osteoblastos em laboratório. Conforme relata Dominici et al. (2006) o método para a identificação dos osteoblastos em laboratório depende não somente da expressão de proteínas ósseas, mas também da formação da matriz mineralizada.

1.5 Células Ósseas

Os osteoblastos e osteoclastos são essenciais para o remodelamento ósseo. Para que esse remodelamento ocorra é necessária a remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos, seguido pela formação de matriz óssea pelos osteoblastos (Hadjidakis & Adroulakis 2006).

A regulação desse remodelamento ocorre por meio de fatores locais e sistêmicos, que exercem seus efeitos sobre a replicação de células indiferenciadas, recrutamento e a função das células ósseas (Hill 1998). Entre os fatores locais que participam da regulação do remodelamento ósseo, o sistema osteoprotegerina (OPG)/receptor ativador de NF- κ B (RANK)/ligante de RANK (RANKL) mostra que o processo de reabsorção e formação são acoplados, tendo como objetivo manter a integridade esquelética (Hadjidakis & Adroulakis 2006).

A citocina RANKL está presente na membrana de células precursoras dos osteoblastos e osteoblastos maduros (Lacey, et al. 1998). Já na superfície de membrana dos osteoclastos é encontrada a citocina RANK. O principal papel do RANKL no tecido ósseo é a estimulação da diferenciação dos osteoclastos, sua ativação e a inibição de sua apoptose. Quando um precursor de osteoclastos encontra um osteoblasto, a interação resultante entre RANK e RANKL estimula os precursores osteoclásticos a diferenciarem-se completamente (Katagiri & Takahashi 2002). Essa interação induz a reabsorção óssea. Por outro lado, a deficiência do RANKL leva a osteoporose (Karsenty 1999).

A osteoprotegerina (OPG) é um receptor solúvel para RANKL, produzida pelos osteoblastos, que bloqueia a formação osteoclástica, inibindo a ligação do RANKL ao RANK (Simonet et al.,1997). A figura 2 apresenta o processo de maturação osteoclástica.

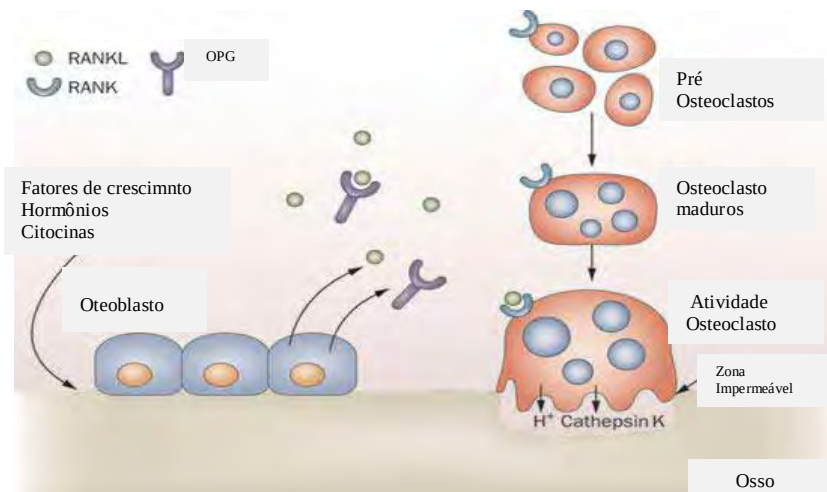


Figura 2: Interação entre RANK e RANKL na regulação do metabolismo do osso e o papel da OPG nesse percurso. RANKL, presente nos osteoblastos, liga-se ao RANK presente nos precursores dos osteoclastos, e promove a diferenciação dos osteoclastos. Dessa forma, os osteoblastos e osteoclastos funcionam de forma coordenada, exigindo comunicação entre os dois tipos de célula para o processo do remodelamento ósseo. OPG serve como inibidor natural, impedindo a ligação do RANK ao RANKL (Lewiecki 2011).

No processo inicial da formação do tecido ósseo, os osteoblastos, após secretarem a primeira camada de matriz orgânica, assumem um importante papel na mineralização. A partir dos osteoblastos adjacentes, originam-se pequenas vesículas na superfície da matriz orgânica óssea recentemente sintetizada. Essas estruturas arredondadas, que se originam da membrana plasmática dos osteoblastos, denominadas de vesículas da matriz, desprendem-se dos osteoblastos e são observadas entre os constituintes orgânicos da matriz óssea (Arana et al., 1995).

Os osteoblastos também produzem fatores de crescimento, principalmente membros da família de proteínas morfogenéticas ósseas. Sintetizam também produtos específicos como: colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína e fosfatase alcalina (Katagiri & Takahashi 2002) que quando liberada, contribui para o início da mineralização (Stein & Lian 1993). A fosfatase alcalina é uma enzima que hidrolisa os íons fosfatos, fornecendo-os para o interior das vesículas presentes na matriz óssea. Além disso, ocorre um aumento da concentração de íons cálcio no interior dessas vesículas, provavelmente através dos fosfolípidios em suas membranas. Posteriormente, ocorre o rompimento da membrana das vesículas e a mineralização espalha-se pela matriz (Arana et al., 1995).

1.6 Cultura de Osteoblastos e Importância Clínica

A cultura de osteoblastos adequadamente caracterizado em laboratório proporciona um modelo para o estudo do comportamento das células, bem como para determinação de aspectos biológicos no tecido ósseo (Togashi et al., 2007). Vários protocolos foram estabelecidos para a caracterização de células ósseas incluindo a determinação da fosfatase alcalina que indica um fenótipo osteoblástico (Manduca, et al. 1993).

Em cultura, a expressão dessa proteína assim como ou tro fenótipo osteoblástico depende do material biológico utilizado, a manipulação, meio e condições de cultura, tempo de crescimento presença de componentes que influenciam a proliferação e diferenciação das células (Chavassieux, et al. 1990; Coelho et al, 2000)

Togashi et al. (2007) descreve que é possível preservar o fenótipo dos osteoblastos congelados. Segundo esse estudo tais características foram confirmadas pela presença da atividade da fosfatase alcalina e de nódulos de cálcio após o descongelamento. Esse procedimento a partir de uma linhagem de células viáveis pode ser utilizado para posterior experiência em laboratório Togashi et al. (2007). Além disso, a utilização do meio de cultura DMEN é capaz de sustentar contínuas culturas de osteoblastos contribuindo com a utilização dessas células para a pesquisa em laboratório (Coelho et al., 2000).

A ausência de um modelo “*in vitro*” com boa reprodutibilidade no ambiente ósseo tem dificultado o entendimento claro dos mecanismos envolvidos na remodelação óssea. A dificuldade da compreensão dos mecanismos de ação das células ósseas junto á drogas anti-reabsortivas ósseas como o estrógeno também está relacionado à ausência de um modelo adequado de cultura (Ramalho et al., 2000).

Sabe-se que a menor ação dos osteoblastos pela maior ação dos osteoclastos resulta na perda de tecido ósseo que, dependendo da gravidade, poderá causar a osteoporose (Souza, 2010). Essa disfunção óssea pode ocorrer pela ação dos fatores sistêmicos como os hormônios tireoidianos que agem nesse remodelamento acelerando o *turnover* ósseo e encurtando o ciclo de remodelação (Serakides et al., 2004). Além disso, os estudos clínicos e bioquímicos das funções tireoidianas no

metabolismo ósseo e mineral são bem esclarecidos e sabe-se que o T3 induz a expressão de Rankl “in vitro.” Por outro lado, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na ação catabólica e a ação molecular dos hormônios sobre as células ósseas (Miura et al., 2002) .

O presente trabalho contribuirá para caracterização dos osteoblastos derivadas de CTMs do tecido adiposo para que a metodologia aplicada possa contribuir com o estudo do mecanismo da ação hormonal nos osteoblastos e ser a base para estudos futuros.

As CTMs derivadas do tecido adiposo humano se diferenciam em linhagens puras de osteoblastos após o uso de agentes de diferenciação “in vitro.”

Objetivo Geral:

Implantar a técnica para diferenciação osteoblástica a partir de células tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo.

Objetivo Específico:

- Obter CTMs a partir do tecido adiposo humano.
- Caracterizar as CTMs.
- Diferenciar em osteoblastos.
- Validar os osteoblastos conforme as técnicas utilizadas.

4- PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Obtenção de Tecido adiposo

O tecido adiposo foi obtido de três pacientes do sexo feminino submetidas à abdominoplastia do Serviço de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu. Para os processos de caracterização celular foram utilizados células de uma paciente. O material obtido foi colocado em um tubo falcon de 50ml em condição estéril e transportado para o Laboratório Experimental de Clínica Médica – Unesp Botucatu. Como critério de inclusão foi verificado o teste de velocidade de hemossedimentação ou taxa de sedimentação de eritrócitos (VHS) das pacientes menores de 50 anos de idade (valor de referência: até 20mm/h) (Collares & Vidigal 2004). Todas as inclusas na pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Obtenção de células-tronco adultas do tecido adiposo

As amostras teciduais foram submetidas a dissociação enzimática. Para isso foi utilizado 2gr de tecido, 4mg de collagenase tipo I e 8ml de PBS para cada amostra. Primeiramente o tecido foi lavado com soro fisiológico para remoção de supostas sujeiras. Posteriormente 2g de tecido foi picotado para melhor reação com a enzima. A collagenase foi diluída com PBS numa placa de petri. Essa solução foi aspirada por uma seringa de 20ml e filtrada por Syringe- Filter- 0,22 μ m direto num tubo falcon estéril de 50ml. Nesse tubo, foi colocado o tecido picotado e em seguida foi mantido a 37° C em uma atmosfera umidificada com 95% O₂/5% CO₂ por 15 horas. A collagenase digeriu os pedaços de gordura liberando as CTMs nesse meio. Após o tempo de 15 horas, a gordura digerida ficou acima da solução com collagenase e PBS e essa gordura foi retirada e descartada. Após a retirada da gordura digerida foi adicionado 3ml de meio Dulbecco's Modificado (DMEM) (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 1% antibiótico/antimicótico (Sigma®) Esse meio inativa a ação da enzima. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1200rpm por 10 minutos a - 4°C. Depois desse tempo, foi retirado o sobrenadante preservando o pellet contido no tubo. Nesse pellet foi adicionado 2ml de meio DMEN completo com

10% de SFB e novamente foi centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a - 4°C. Após esse período foi retirado todo o sobrenadante e colocado 1ml de meio DMEN completo. O pellet foi homogenizado com esse meio e retirado dessa solução 30ul para a contagem e viabilidade das células em câmara de Neubauer.

4.3 Culturas de células-Tronco Mesenquimais

As células obtidas do tecido adiposo foram semeadas inicialmente em uma densidade de 2×10^5 e cultivadas em garrafas de cultura de T 25cm². As CTMs foram mantidas em meio D-MEM completo contendo 10% de SFB com 1% de estreptomicina-penicilina (10.000 g/mL, 10.000 µ/mL, Invitrogen, USA) e 0,1% de gentamicina (10 mg/mL, Invitrogen, USA). Após 70% de confluência das células, elas foram tripsinizadas. Para essa reação, as CTMs foram lavadas duas vezes com PBS. Logo após, foi colocado 1ml da solução de tripsina 1X (Gibco, USA) e incubada durante 3 minutos em estufa à 37°C. Ao término desse tempo foi acrescentado 8ml de meio DMEN completo com 10% SFB. A solução foi transferida para um tubo falcon estéril de 15 ml seguido de centrifugação por 10 minutos a 1200rpm, temperatura ambiente. Após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e o pellet foi resuspendido em 1ml de meio DMEN completo com 10% SFB. Esse meio foi transferido para a garrafa de cultura de T75cm² para expansão celular.

Sete dias após a confluência de 70% das células em garrafas de T75cm², as CTMs foram novamente tripsinizadas conforme descrito acima. As células foram transferidas para duas placas de seis orifícios e duas placas de petri para posterior diferenciação osteoblástica. Também foram separadas alíquotas e congeladas no nitrogênio líquido até o momento do processo de caracterização celular.

A morfologia das células foi observada in vitro a cada três dias no momento da troca do meio de cultura utilizando um microscópio invertido e as imagens foram obtidas utilizando uma câmera digital.

Nesse momento alíquotas foram separadas para caracterização celular e comprovação da integridade das células e as demais foram guardadas no nitrogênio líquido até o momento da análise. As células contidas no meio foram transferidas para

uma garrafa de cultura (T25cm²) e acrescentado 5ml de meio DMEN completo. As garrafas de cultura foram mantidas a 37° C em uma atmosfera umidificada com 95% O₂/5% CO₂. Na figura 03 está representado o delineamento do estudo.

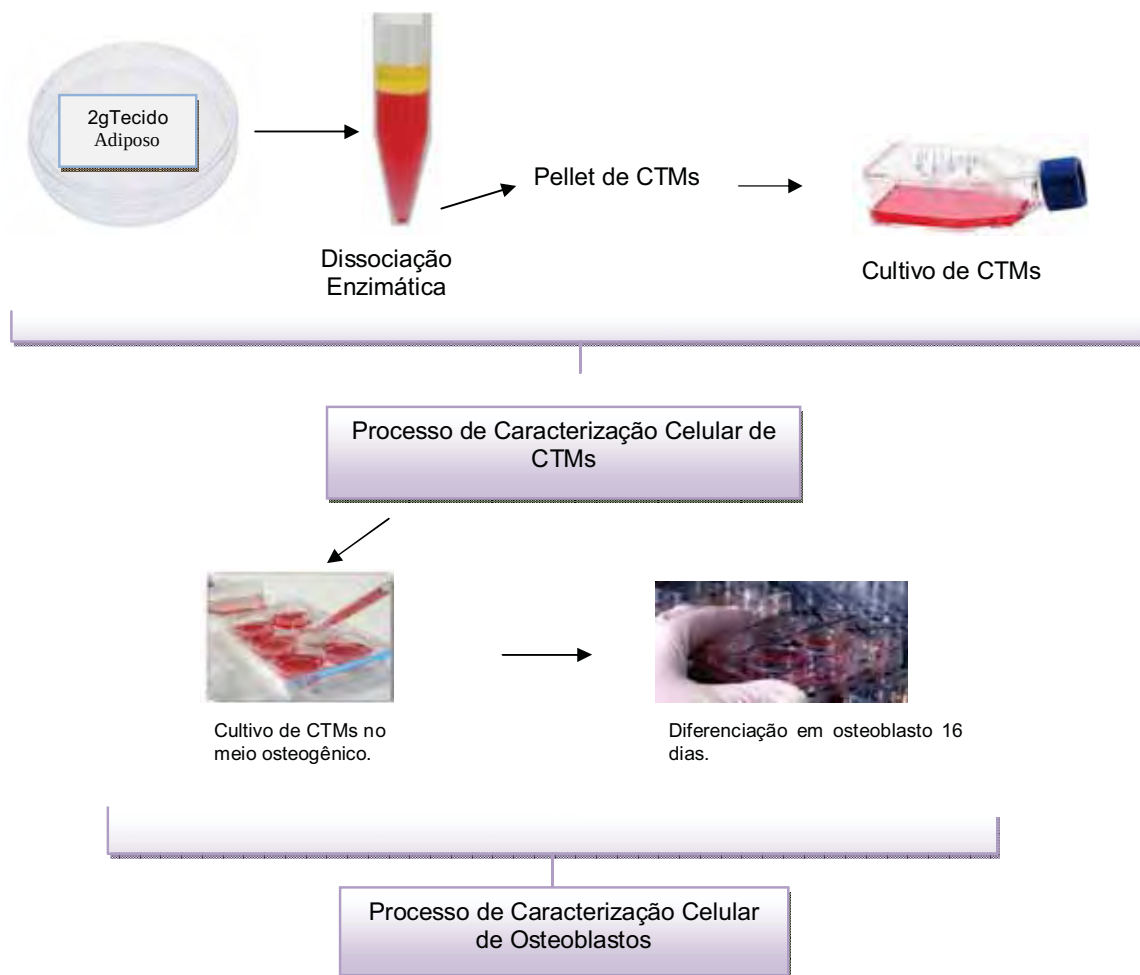


Figura 3: Delineamento do estudo.

4.4 Caracterização das CTMs e manutenção da integridade celular

Comprovação da integridade celular (Teste do Cometa)

A avaliação de conteúdo de DNA foi realizado por meio do ensaio por eletroforese de células individualizadas em gel de agarose, seguindo as indicações de

Tice et al., 2000. Desse modo, células provenientes da cultura celular (20 µL da suspensão celular obtida no término da dissociação enzimática), foram adicionadas a 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão, à 37°C, e depositado sobre lâminas histológicas recobertas com agarose de ponto de fusão normal a 0,5% (cada determinação em quintuplicata). As lâminas foram analisadas com um microscópio de fluorescência, que permite a visualização das seguintes imagens microscópicas: com contorno circular (sem danos no DNA) ou estruturas em forma de “cometa” (com danos no DNA). A extensão de cada imagem significa a distância de migração da fita de DNA danificada, que foi classificada segundo Speit & Hartmann 1995. As células foram classificadas em cinco categorias (0-4) correspondentes às seguintes quantidades de danos na cauda do DNA. Anexo I

4.5 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (Flow Cytometry BD-Facscalibur, com laser de argônio a 480nm, de 15mW) foi executada utilizando-se os anticorpos monoclonais com especificidade conhecida: anti-CD 44, 90, 14, 34, e 45. Cada anticorpo foi incubado com células para posterior cultura e ressuspensas na concentração entre 5×10^5 e 5×10^6 células/mL. Foi utilizado um programa de leitura Cell Quest® (Becton Dickinson). O volume aspirado foi de 100µL com taxa de fluxo de 5µL/min e amostras foram analisadas em até 48 horas.

4.6 Imunofluorescência

As células contidas nas lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% em temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente foram lavadas com PBS (três vezes por 10 minutos) e bloqueadas por 40 minutos, a temperatura ambiente com PBS contendo BSA 3 % e saponina 0,1 %. As lamínulas foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-vimentina por 1 hora à temperatura ambiente. Logo em seguida foram lavadas com PBS contendo BSA 1 % e saponina 0,1 %, solução esta

utilizada em todas as lavagens posteriores (três vezes por 10 minutos) e reveladas com anti-IgG de humano conjugado com TRICT por 50 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida foi realizada nova lavagem (três vezes de 10 minutos) para marcação extracelular. Para marcação nuclear foi realizado o mesmo procedimento com outras lâminas marcada com DAPI por 20 minutos e posteriormente foi realizada nova lavagem (três vezes de 10 minutos). As lâminas foram montadas e examinadas em um microscópio Zeiss Axiovert 200 acoplado a um sistema de fluorescência EBQ 100.

4.7 Indução das Células-Tronco Mesenquimais para diferenciação na linhagem osteogênica

CTMs contidas na placa de seis orifícios e na placa de petri foram tratadas para a diferenciação osteogênica. Para a indução da diferenciação em osteoblasto foi utilizado meio DMEN completo com 10% de SFB acrescido de 0,1 μ M de dexametasona (Sigma), 50 μ M de ácido ascórbico (Gibco), 10 mM de β glicerofosfato (Sigma). As células foram mantidas nesse meio por até 16 dias.

Três vezes por semana o meio de cultura com os compostos para diferenciação osteogênica era substituído. Como controle negativo da indução, culturas de células de placa de seis orifícios e placa de petri foram mantidas em meio convencional (D-MEM completo) pelo mesmo período de tempo.

4.8 Comprovação da diferenciação de CTMs em osteoblastos

Dosagem de Osteocalcina e Fosfatase alcalina:

As dosagens de fosfatase alcalina e osteocalcina foram realizadas pelo Método de Ensaio Imunométrico conforme as orientações do fabricante (Eliza Linco Research Inc., USA, Catálogo n° KAQ1381- osteocalcina, Catálogo n° AHI0105- fosfatase alcalina). Para isso, o meio de cultura não foi substituído. Ao término de 16 dias, foi coletado 2ml do meio das placas (controle negativo) e 2 ml do meio das placas com os fatores de diferenciação. As amostras foram congeladas a -8°C até o momento das análises.

4.9 Formação de matriz mineralizada

Células cultivadas na placa de petri contendo fatores de diferenciação foram utilizadas para a análise da matriz mineralizada. As células que foram cultivadas na placa de petri contendo meio completo sem fatores de diferenciação foram utilizadas como controle. As células foram lavadas três vezes por PBS e incubadas com solução de formalina a 37° C por 30 minutos em uma atmosfera umidificada com 95% O₂/5% CO₂. Em seguida as células foram desidratadas com soluções crescentes de etanol (30% a 96%). Os poços secos foram cobertos por Alizarin red (Sigma) 20mg/ml ph 4,2 por 10 minutos. Após esse tempo os poços foram lavados com água destilada. A morfologia das células foi observada utilizando um microscópio invertido e as imagens foram obtidas utilizando uma câmera digital.

Logo após o término do processo de caracterização celular, foi descartada a placa de petri utilizada para coloração da matriz mineralizada e placa controle contendo meio completo sem fatores osteogênicos.

4.10 Extração do RNA total

Ao término de 16 dias de cultivo das células com fatores osteogênicos, foi realizada a extração do RNA total de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando-se TRIZOL Reagente (Gibco TM, Cat. nº 15596-026). Para visualizar a técnica em todos os detalhes vide anexo II.

4.11 Análise da qualidade do RNA

A visualização do RNA foi feita em gel de agarose 1%. Segue anexo III a técnica do preparo do gel de agarose 1% e visualização do RNA.

4.12 Transcrição reversa (RT) do RNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil, Cat. nº 11904-018). Segue em anexo IV a técnica detalhada da transcrição reversa do RNA.

5.1 Descrição das Pacientes

No apêndice I encontra-se a descrição do resultado de VHS de cada paciente realizado no Laboratório Clínico da Faculdade de Medicina de Botucatu.

5.2 Cultura de CTMs

A cultura de CTMs iniciou com 2×10^5 cel/ml. As células foram cultivadas em garrafas de cultura de T25cm². Após seis dias de cultura apresentaram aderidas com confluência de 40% (Figura 4)

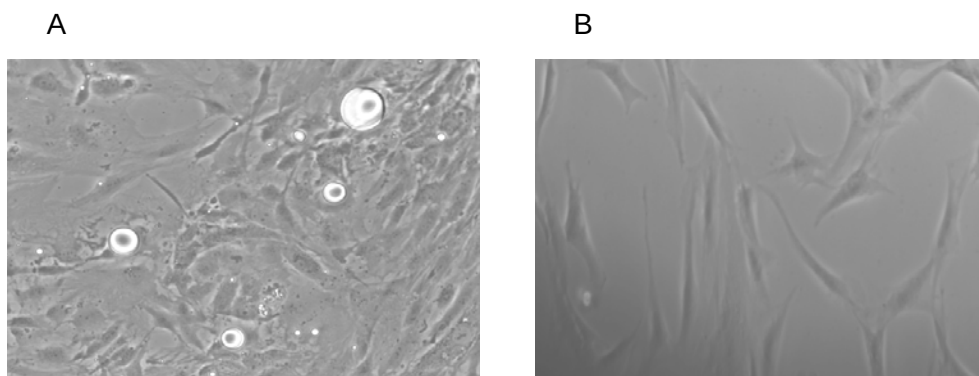


Figura 4 : Imagens representativas das células com seis dias de cultura, aderidas na placa T25cm². A: Células com 40% de confluência e alguns depósitos de gordura; B: Células com 40% de confluência sem depósitos de gordura, visualizados no aumento de 10X.

Dezessete dias após o início da cultura, as células apresentavam 75% de confluência, cultivadas em garrafas de cultura de T75cm² (Figura 5).

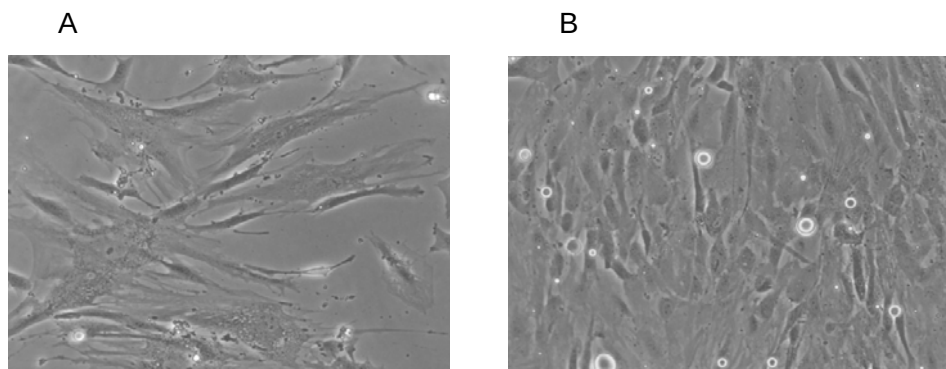
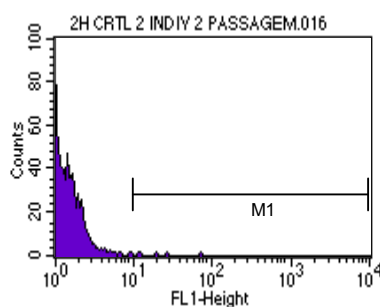


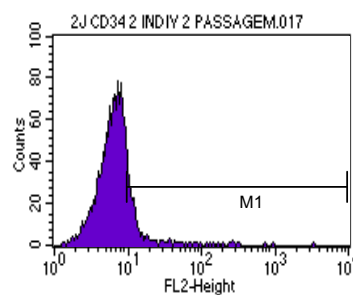
Figura 5: Imagens representativas das células com dezessete dias de cultura, aderidas na placas de T75cm². Visualizadas no aumento de 10x.

5.3 Fenotipagem das CTMs derivadas de tecido adiposo

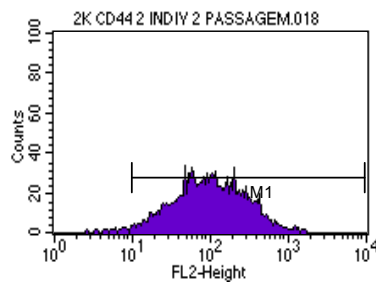
As células em suspensão após a extração no tecido adiposo utilizadas para a cultura celular foram caracterizadas pela técnica de citometria de fluxo. Foram utilizados os anticorpos monoclonais com especificidade conhecida: anti-CD 44, 90, 14, 34, e 45. As CTM foram positivas para CD90 e 44, e negativas para CD 14, 45 e 34. Os resultados estão representados na figura abaixo (Fig. 6), comprovam tratar-se de CTMs.



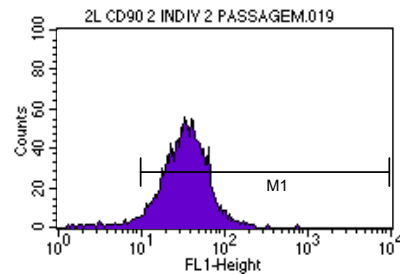
A: Grupo Controle



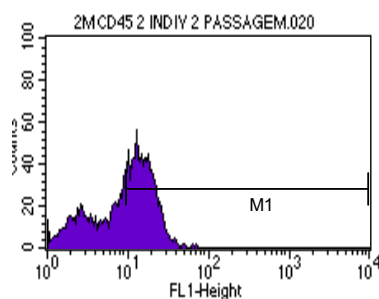
B: CTMs cultivadas com anticorpo monoclonal CD 34.



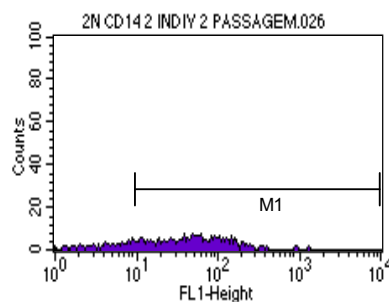
C: CTMs cultivadas com anticorpo monoclonal CD 44.



D: CTMs cultivadas com anticorpo monoclonal CD 90.



E: CTMs cultivadas com anticorpo monoclonal CD 45.



F: CTMs cultivadas com anticorpo monoclonal CD 14.

Figura 6: Imagens representativas da análise da citometria de fluxo das células cultivadas com anticorpos monoclonais .A: Grupo controle, B: marcação CTMs para CD34, C: marcação CTMs para CD 44, D: marcação CTMs para CD 90, E: marcação CTMs para CD 45, F: marcação CTMs para CD 14.

5.4 Teste do Cometa

A extensão do dano do DNA foi avaliada pelo tamanho e intensidade da cauda produzida a partir de um único núcleo, durante a eletroforese. Essa análise demonstrou que foi encontrado nível 02 de dano de DNA em 40% das CTMs analisadas. Isso possibilitou a continuidade do cultivo das células para as posteriores análises da caracterização celular e diferenciação osteogênica. Na figura 07 estão representadas imagens da análise do teste, indicando ausência (A) e médio nível de dano ao DNA (B).

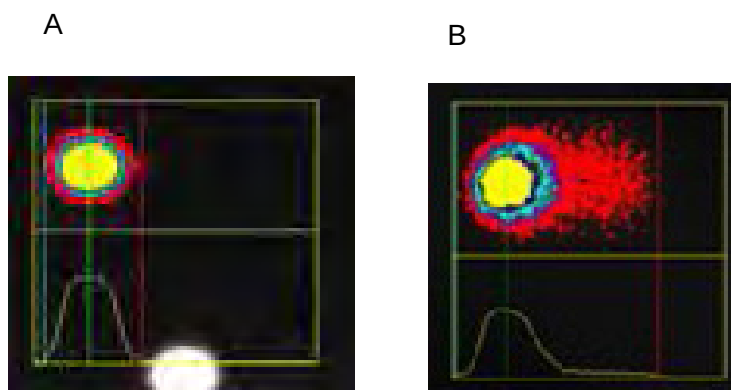


Figura 7: Imagens representativa do teste do cometa para CTMs. A: Ausência de dano de DNA. B: Médio nível (20%- 40%) de dano de DNA para CTMs.

5.5 Imunofluorescência

O resultado das reações de imunocitoquímica confirmou a homogeneidade e positividade para expressão de anti-vimentina, apontando para caracterização mesenquimal (Fig. 08).

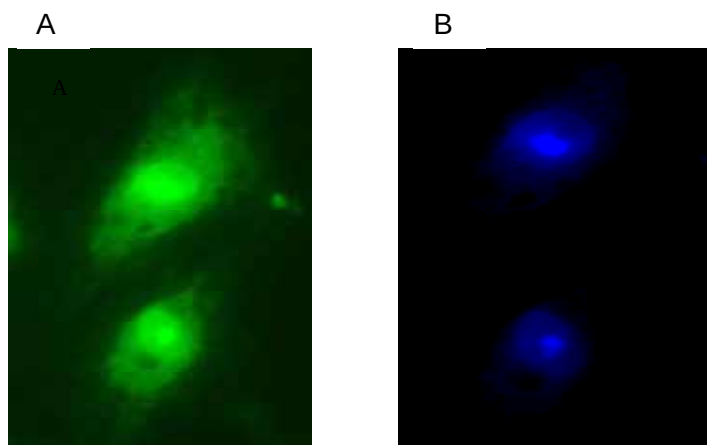


Figura 8: Imagens representativas da imunofluorescência para CTMs. A: Expressão citoplasmática de vimentina; B: Marcação nuclear com DAPI no mesmo campo de A. No campo A: presença de anticorpo secundário- IgG conjugado a TRITC e B: mesmo campo marcado com DAPI (100x).

5.6 Diferenciação celular das CTMs em osteoblastos

A diferenciação química foi conseguida pela adição de dexametasona, ácido ascórbio e b glicerofosfato ao meio DMEN completo. Nessas condições de cultura, induziu a diferenciação osteoblástica a partir de células mesenquimais indiferenciadas (Fig. 09).

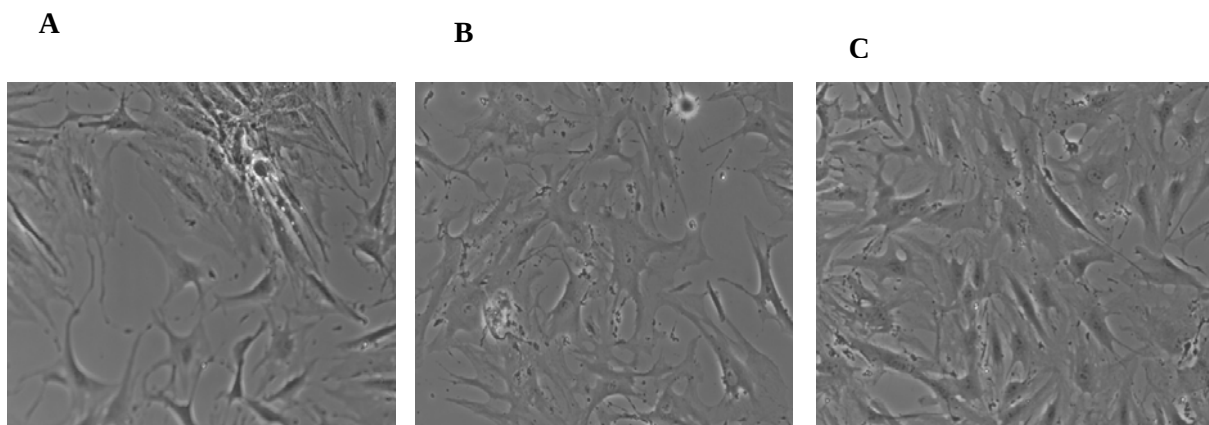


Figura 09: Imagens representativas das células submetidas ao meio de diferenciação. A: 5 (Cinco) dias de cultura; B: 11 (Onze) dias de cultura; C: 16 (Dezesseis) dias de cultura. Visualizadas no

5.7 Comprovação da diferenciação de CTMs em osteoblastos:

Dosagem de Osteocalcina e Fosfatase alcalina:

A fosfatase alcalina e osteocalcina são consideradas marcadores na presença de osteoblastos. As dosagens da atividade da fosfatase alcalina e osteocalcina foram determinadas a partir do sobrenadante dos poços de células com meio osteogênico de umas das pacientes. A quantidade de sobrenadante foi considerada suficiente e a análise dos resultados foram quantitativa para essas células. A análise também foi realizada em CTMs evidenciando quantidades inferiores de fosfatase alcalina e osteocalcina comparadas aos osteoblastos. As análises foram realizadas pelo Método de Ensaio Imunométrico (Tabela 02).

Tabela 02. Dosagens de fosfatase alcalina e osteocalcina no meio de cultura antes e depois do processo de diferenciação osteoblástica.

	CTMs (dia 0)	Osteoblastos (dia 16)
Fosfatase alcalina U/L)	10,62 U/L	21 U/L
Osteocalcina	0,6 ng/mL	13,7ng/mL

Valores de referência em humanos: fosfatase alcalina=12 a 43U/L;
osteocalcina=2,0 – 21ng/mL.

5.8 Formação de matriz mineralizada

A matriz mineralizada foi corada com Alizarin red (Sigma) e evidenciou em vermelho, os nódulos de mineralização, ricos em cálcio dos osteoblastos com 16 dias com meio de diferenciação. Para CTMs não houve coloração demonstrando a caracterização dessas células e o que possibilitou a diferenciação osteoblástica (Figura 10).

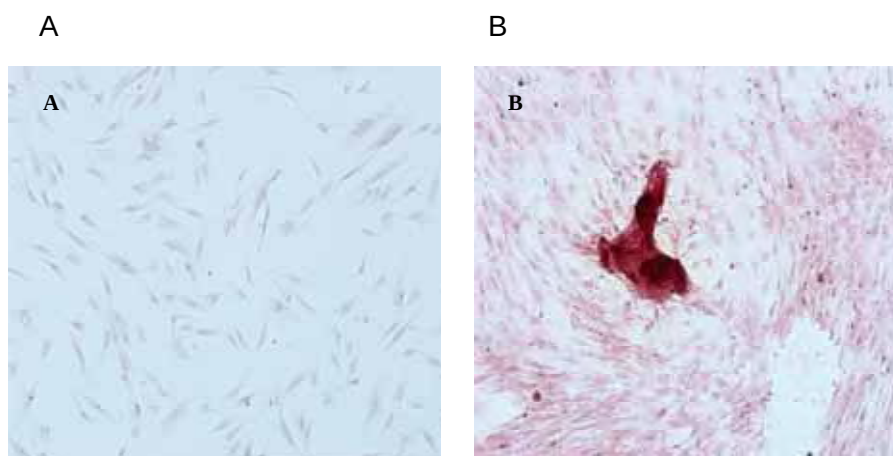


Figura 10: Imagem representativa da matriz mineralizada dos osteoblastos. A coloração foi realizada por alizarina e em vermelho evidência a matriz mineralizada. (A): células indiferenciadas; (B): células com 16 dias de indução osteogênica. Microscopia de contraste de fase 20X.

5.9 Expressão gênica do RANKL

Rankl é secretado por linhagens osteoblásticas. Participa ativamente no processo de reabsorção do osso. Como demonstrado na figura 11 e 12 a expressão gênica de Rankl realizada a partir dos osteoblastos. A expressão foi verificada em células com 16 dias com meio de diferenciação osteogênica e junto ao controle interno GAPDH.

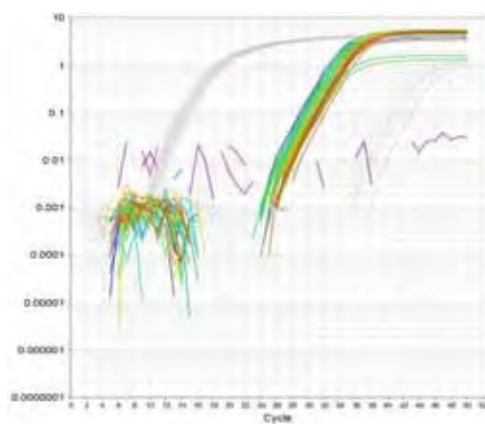


Figura 11: Imagem representativa da expressão do RANKL observada nas células diferenciadas (osteoblastos) cultivadas por 16 dias com fatores osteogênicos.

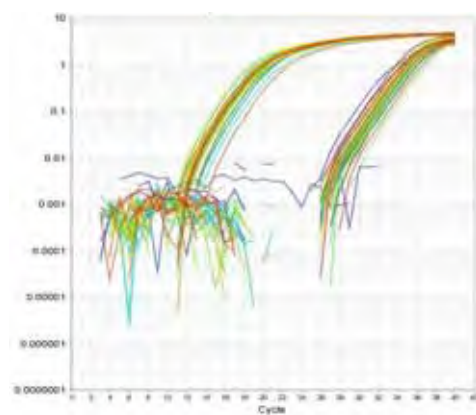


Figura 12: Imagem representativa da expressão do RANKL e GAPDH observada nas células diferenciadas (osteoblastos) cultivadas por 16 dias com fatores osteogênicos.

Ainda não estão bem esclarecidos os fatores envolvidos na proliferação e na diferenciação das células-tronco adultas derivadas da medula óssea e do tecido adiposo. Para que seja possível a utilização de células-tronco adultas de qualquer fonte é de fundamental importância que se avalie sua potencialidade com relação à capacidade de proliferação, viabilidade e capacidade de diferenciação (Wagner & Ho 2007).

No ambiente de cultura celular, Pu et al. (2006) afirma que a viabilidade das CTMs derivadas do TA aparentemente não se altera. Nós observamos semelhança em todas as amostras de culturas de CTMs logo após a criopreservação do fragmento de gordura. Nessas culturas, a porcentagem de células viáveis foram sempre superior a 70%. Isso contribuiu para o processo de expansão celular e posteriormente para diferenciação osteoblástica.

Além disso, as CTMs recentemente extraídas do tecido adiposo, apresentaram em cultura aspecto morfológico de células com crescimento em suspensão. No entanto, após quatro dias, essas culturas passaram a apresentar populações que cresciam aderidas com morfologia fibroblastóide. Essa propriedade de adesão é característica das células tronco mesenquimais citadas pelo trabalho de (Lee, et al. 2003; Romanov, et al. 2003). Em nosso estudo, observamos o mesmo comportamento de aderência celular com características fibroblásticas por toda a extensão da garrafa e placas de cultura.

Segundo Wagner & Ho (2007) e Dominici et al. (2006) descreveram que existe uma necessidade urgente para a identificação e caracterização das CTMs. Até agosto de 2006, não havia um consenso em relação aos marcadores moleculares que deveriam ser utilizados para o controle da qualidade dessas células. De fato, Dominici et al 2006 descreve que a Sociedade Internacional de Terapia Celular definiu que as célula-tronco mesenquimais devem expressar pelo menos um dos marcadores como CD105, CD73 e CD90 e não devem conter marcadores hematopoiético como o CD45, CD34, CD14 ou CD11b. Os resultados obtidos em nosso trabalho, com relação aos marcadores expressos na superfície das CTMs derivadas de tecido adiposo, estão de acordo com essa premissa e com outros estudos descritos na literatura (de Girolamo, et al. 2007; Dominici et al. 2006; Wagner & Ho 2007; Zuk et al. 2001). Foi observada uma maior frequência de expressão do

CD90, indicando a presença de células precursoras mesenquimais capazes de se diferenciar em fibroblastos, adipócitos, condroblastos e osteoblastos quando expostas *in vitro* (Dominici et al. 2006).

Além desses dados, também foi demonstrada a presença de CTMs por imunofluorescência. Achados semelhantes foram publicados por outros autores. Ainda no processo de caracterização celular, o ensaio do cometa foi utilizado para avaliar os danos de DNA em células individuais. Essa técnica permite otimizar a desnaturação do DNA para uma possível avaliação de quebras de fita-simples (Tice, et al. 2000).

Ao longo dos anos, esse teste se tornou mais utilizado para avaliação de danos no DNA. Esse ensaio têm sido aplicado para testes como genotoxicidade, biomonitoramento humano, ecogenotoxicologia e estudos fundamentais relacionados ao dano (Collins 2004). De acordo com Hussein & Hasan (2010) mostrou em seu trabalho que houve poucos danos no DNA em culturas de CTMs. Nossos resultados estão de acordo com esse estudo. Observamos que inicialmente houve poucos danos de DNA (nível II) em 40% das células analisadas após o processo de extração celular do tecido. Com isso, foi possível dar continuidade no cultivo dessas células para a diferenciação osteoblástica.

A diferenciação osteogênica requer a presença de indutores, que incluem o β glicerofosfato, o ácido ascórbico e a dexametasona. Uma vez nesse meio de cultivo as células mesenquimais entram em uma cascata de desenvolvimento e adquirem uma morfologia osteoblástica. Essas células osteoprogenitoras passam a expressar a fosfatase alcalina e a depositar matriz extracelular rica em cálcio e certas proteínas, como por exemplo, a osteopontina e a osteocalcina (Beck, et al. 2000; Im et al. 2005; Muschler, et al. 2003). Como produto final da osteoindução obtivemos células osteoblásticas a partir dessas substâncias osteoindutivas. Dessa forma, os resultados de nossa investigação foram semelhantes ao descrito anteriormente por esses autores.

A formação da matriz mineralizada é uma das principais funções dos osteoblastos maduros comprovando que os mesmos estão diferenciados. Dessa maneira, as CTMs, quando cultivadas com as substâncias osteoindutivas, diferenciaram em osteoblastos e foram capazes de realizar a deposição de matriz mineralizada. Essa marcação foi realizada através da coloração Alizarin Red,

apresentando um maior acúmulo de cálcio no meio extracelular. Isso apóia nossos resultados que, segundo Pittenger et al. (1999), este método de avaliação do potencial osteogênico é mais eficiente, em comparação com a simples análise da morfologia celular. Já que nessas condições é visível o depósito de cálcio confirmando a mudança no metabolismo celular indicando sua diferenciação para osteoblastos

Durante a diferenciação de pré osteoblasto em osteoblasto, a atividade da fosfatase alcalina encontra-se aumentada. Essa expressão está relacionada ao momento próximo da fase de proliferação celular e durante o período de depósito da matriz extracelular (Beck et al. 2000) (Minguell et al., 2001). Por essa razão, a expressão dessa proteína é freqüentemente usada como um marcador de osteoblasto (Minguell et al., 2001).

Em nosso trabalho foi observado níveis mais elevados de fosfatase alcalina e osteocalcina comparado a CTMs. Isso é mais uma evidência da caracterização dos osteoblastos e estão de acordo com os trabalhos relatados na literatura(Aksu, et al. 2008; Fraser, et al. 2006; Mizuno and Hyakusoku 2003). Contudo, os osteoblastos e osteoclastos estão sob a ação de múltiplos fatores locais e sistêmicos. A interferência desses fatores no metabolismo ósseo contribui para a compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em diversas doenças ósseas. Entre os fatores locais, RANKL secretado pelos osteoblastos participa ativamente do processo do metabolismo ósseo. Também é primordial para o balanço da remodelação óssea, já que determinam o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclasto(Katagiri and Takahashi 2002). Em nosso trabalho demonstramos que RANKL foi expresso pelos osteoblastos e essa expressão foi confirmada por PCR em tempo real. A presença dessa citocina indica a maturação de osteoblastos. Já que as CTMs passaram pelo processo de diferenciação e se estabeleceu com essa técnica uma caracterização celular mais específica para osteoblasto. Como descrito na literatura por (Herman, et al. 2006; Sato and Takayanagi 2006; Tracey, et al. 2008).

Contudo, ainda é necessária a padronização de técnicas laboratoriais de isolamento de CTMs derivadas do tecido adiposo. Além disso, ainda é controversa a melhor definição de marcadores para subpopulações celulares e a padronização de métodos de expansão de células-tronco adultas bem como a diferenciação celular (WAGNER; HO, 2007). O conhecimento relacionado a esses critérios é requisito não

apenas para cultura e diferenciação de linhagem celular específica como osteoblastos, mas para o progresso para terapias com maior eficácia (Dominici et al 2006).

Os osteoblastos derivadas de CTMs têm sido freqüentemente estudados na área de terapia celular e engenharia de tecidos. As pesquisas com biologia molecular visam esclarecer os diversos fatores que interferem com a proliferação, migração, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas. Além disso, ainda não são entendidos nessas células os mecanismos moleculares que podem ser eficazes para o desenvolvimento das terapias celulares. Embora, ainda seja necessária a elucidação de muitos desses mecanismos estudos revelam resultados animadores quanto ao uso de CTMs na diferenciação celular e para tratamento de doenças. Nesse sentido as CTMs tornam ferramentas promissoras na medicina por possuir propriedades interessantes como a diferenciação em células específicas (Dominici et al 2006)

Além disso, os conhecimentos de estudos com CTMs para diferenciação em uma determinada linhagem celular poderá auxiliar no desenvolvimento de novas terapias e avaliar as questões de biossegurança em protocolos clínicos futuros (Yarak; Okamoto ; 2010)

Segundo (Yarak; Okamoto; 2010) as práticas terapêuticas a partir de CTMs derivada do tecido adiposo não tem sido amplamente testado em humano. Isso depende dos avanços técnicos científicos nas áreas de biologia molecular que facilita de modo positivo os avanços na pesquisa clínica. Dessa maneira, o crescimento desses estudos a partir de CTMs pode ser a chave para o desenvolvimento de um tratamento que poderia levar ao equilíbrio referente às doenças ósseas (KASSEM et al., 2008).

A técnica aplicada permitiu o cultivo e caracterização das CTMs, a diferenciação osteoblástica a partir de agentes osteoindutivos e a comprovação da existência de osteoblastos foi conseguida pelos métodos aplicados. Dessa forma, a metodologia pode ser a base que irá contribuir para novas pesquisas a partir de osteoblastos humanos derivadas de CTMs do tecido adiposo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aksu AE, Rubin JP, Dudas JR & Marra KG 2008 Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg* **60** 306-322.

Anversa P, Sussman MA & Bolli R 2004 Molecular genetic advances in cardiovascular medicine: focus on the myocyte. *Circulation* **109** 2832-2838.

Barry FP, Murphy JM 2004 Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* **36** 568-8417.

Beck GR, Jr., Zerler B & Moran E 2000 Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97** 8352-8357.

Bobis S, Jarocha D & Majka M 2006 Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* **44** 215-230.

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B & Ripoll C 2008 Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* **45** 115-120.

Chavassieux PM, Chenu C, Valentin-Opran A, Merle B, Delmas PD, Hartmann DJ, Saez S & Meunier PJ 1990 Influence of experimental conditions on osteoblast activity in human primary bone cell cultures. *J Bone Miner Res* **5** 337-343.

Chen Y, Shao JZ, Xiang LX, Dong XJ, Zhang GR 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol* 40(5) 815-20.

Coelho MJ, Fernandes MH 2000. Culturas de células ósseas humanas em testes de biocompatibilidade. Parte II: Efeito do ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona sobre a diferenciação dos osteoblastos. *Biomateriais* **21** 1095-102.

Coleman SR 1995. Long-term survival of fat transplant: controlled demonstrations. *Aesthetic Plast Surg* **19** 421-5.

Collares G B, Vidigal P G 2004. recommendations for the use of the erythrocyte sedimentation rate. *Rev Med Minas Gerais* **14**(1) 52-7.

Collins AR 2004 The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* **26** 249-261.

de Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W & Brini AT 2007 Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med* **1** 154-157.

Deans RJ & Moseley AB 2000 Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* **28** 875-884.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D & Horwitz E 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8** 315-317.

Einhom TA 1996. Enhancement of fracture healing. *The Journal of Bone and Joint Surgery American* **45** 401-16.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G & Mavilio F 1998 Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* **279** 1528-1530.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z & Hedrick MH 2006 Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* **24** 150-154.

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ & Burrell MA 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280** E827-847.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* **189** 54-63.

Hadjidakis DJ & Androulakis, II 2006 Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* **1092** 385-396.

Herman S, Muller RB, Kronke G, Zwerina J, Redlich K, Hueber AJ, Gelse H, Neumann E, Muller-Ladner U & Schett G 2008 Induction of osteoclast-associated receptor, a key osteoclast costimulation molecule, in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **58** 3041-3050.

Hill PA 1998 Bone remodelling. *Br J Orthod* **25** 101-107.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A & International Society for Cellular T 2005 Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7** 393-395.

Hussein AM, Hasan S 2010. Cadmium affects viability of bone marrow mesenchymal stem cells through membrane impairment, intracellular calcium elevation and DNA breakage. *Indian J Med Sci* **64(4)** 177-86.

Im GI, Shin YW & Lee KB 2005 Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* **13** 845-853.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM & Yoo JU 1998 In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* **238** 265-272.

Karsenty G 1999 The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* **13** 3037-3051.

Kassem M, Abdallah BM & Saeed H 2008 Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys* **473** 183-187.

Katagiri T & Takahashi N 2002 Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* **8** 147-159.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24** 1294-301.

Kobayashi T & Kronenberg H 2005 Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology* **146** 1012-1017.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, et al. 1998 Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* **93** 165-176.

Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH & Jiang CC 2003 Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells* **21** 190-199.

Lewiecki EM 2011 New targets for intervention in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nat Rev Rheumatol* **7** 631-638.

Majka M, Kucia M & Ratajczak MZ 2005 Stem cell biology: a never ending quest for understanding. *Acta Biochim Pol* **52** 353-358.

Manduca P, Sanguineti C, Pistone M, Boccignone E, Sanguineti F, Santolini F & Federici A 1993 Differential expression of alkaline phosphatase in clones of human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* **8** 291-300.

Minguell JJ, Erices A, Conget P 2001. Mesenchymal Stem Cell. *Experimental Biology and Medicine*.

Miura M, Kiyoshi T, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, et al 2002. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)₂D₃ in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun* **291** 987-94.

Mizuno H & Hyakusoku H 2003 Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch* **70** 300-306.

Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K & Easley K 2003 Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res* 102-118.

Osborne TF 2000 Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem* **275** 32379-32382.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S & Marshak DR 1999 Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284** 143-147.

Pu LLQ, Xiangdong C, Fink BF, Dayong G, Vasconez HC 2006. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg* **117** 1845-50.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, et al 2005. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: Comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol* **129** 118-29.

Ramalho AC, Castro ML, Solal MEC, Vernejoul MC 2000. Por Que Estrógeno e Raloxifeno Melhoram a Densidade Mineral Óssea? Mecanismo de Ação do strógeno e de Um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) no Osso. *Arq Bras Endocrinol Metab* **44** (6).

Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, Renton L, Patton J & Ripamonti U 2002 Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med* **4** 1-11.

Romanov YA, Svintsitskaya VA & Smirnov VN 2003 Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* **21** 105-110.

Sato K & Takayanagi H 2006 Osteoclasts, rheumatoid arthritis, and osteoimmunology. *Curr Opin Rheumatol* **18** 419-426.

Schaffler A & Buchler C 2007 Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells* **25** 818-827.

Serakides R, Nunes VA, Ocarino NM, Nascimento EF 2004. Bone effects of the association hyperthyroidism-castration of adult female rats. *Arq Bras Endocrinol Metab* **48**(6).

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al 1997 Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density *Cell* **89** 309-19

Souza LCG, Carvalho KAT, Rebelatto C, Senegaglia A, Hansen P, Furuta M, et al 2005. Comparison of mononuclear and mesenchymal stem cell transplantation in myocardium infarction. *Braz J Cardiovasc Surg* **20**(3) 270-8.

Speit G, Hartmann A 1995 The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* **10**(6) 555-9

Stein GS, Lian JB 1993 Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrin Rev* **14** 424-42.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC & Sasaki YF 2000 Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35** 206-221.

Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LAPAJ 2007. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. *Appl. Oral Sci* **15(5)**.

Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG & Tak PP 2008 Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* **117** 244-279.

Tuan RS, Boland G, Tuli R 2002 Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* **5(1)** 32-45.

Uceli A, Moretta L, Pistoia V 2008 Mesenchymal stem cell in health and disease. *Nature Reviews Immunology* **8** 726-36.

Wagner W & Ho AD 2007 Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* **3** 239-248.

Wakitani S, Saito T & Caplan AI 1995 Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* **18** 1417-1426.

Watt F M, Hogan BLM 2000 Out of the Eden: stem cells and their niches. *Science* **287** 1427-1430.

Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, Panoskaltsis-Mortari A & Prockop DJ 2008 Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. *Proc Am Thorac Soc* **5** 637-667.

Yarak S, Okamoto OK 2000 Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol* **85(5)** 647-56.

Yilmaz S, Inandiklioglu N, Yildizdas D, Subasi C, Acikalin A, Kuyucu Y, Bayram I, Topak A, Tanyeli A, Duruksu G, et al. 2012 Mesenchymal Stem Cell: Does it Work in an Experimental Model with Acute Respiratory Distress Syndrome? *Stem Cell Rev*.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P & Hedrick MH 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* **13** 4279-4295.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP & Hedrick MH 2001 Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7** 211-228.

Anexo I

Níveis dos danos de DNA.

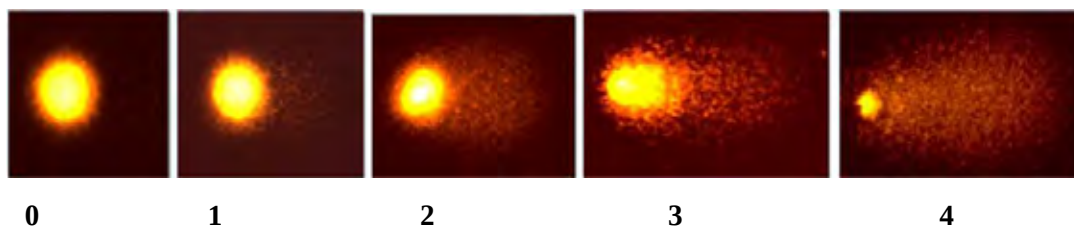
0 $\Rightarrow$ sem danos (<5%)

1 $\Rightarrow$ baixo nível de danos (5-20%)

2 $\Rightarrow$ médio nível de danos (20-40%)

3 $\Rightarrow$ alto nível de danos (40-95%)

4 $\Rightarrow$ dano total (>95%)



Imagens ilustrativas da quantidades de dano de DNA conforme a categoria de 0-4.

ANEXO II

Extração de RNA total

1- Homogeneização

As amostras foram colocadas em tubos de centrifuga (Corex) contendo 1 mL de TRIZOL Reagente.

2- Fase de Separação

As amostras de homogenato forão incubadas durante 5 min a 15 – 30°C para permitir a completa dissociação dos complexos das nucleoproteínas. Adicionou-se então, 0,2 mL de Clorofórmio por 1 mL de Trizol. Os tubos forão fechados adequadamente e foi feito uma agitação manual vigorosa por 15 segundos. Forão então incubados a 15 – 30°C durante 2 a 3 minutos. As amostras Forão centrifugadas durante 15 minutos a 14000g a 4°C. Após a centrifugação, a mistura esteve separada em 3 fases: a mais inferior rosa, a fase intermediária de fenolclorofórmio e a superior, aquosa. O volume da fase aquoso é constituído por aproximadamente 60% do volume do Trizol usado para o homogenato.

3-Precipitação do RNA

Foi transferida a fase aquosa para um novo tubo e adicionado 0,5 mL de álcool isopropílico para cada 1 mL de Trizol. As amostras forão incubadas a 15 – 30°C durante 10 minutos e centrifugadas a 14000g durante 10 minutos a 4°C. Formar-se-á um *pellet* no fundo do tubo, o qual é o precipitado de RNA.

4-Lavagem do RNA

Foi removido o sobrenadante. O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% por 1 mL de Trizol. As amostras foram agitadas no vortex e centrifugadas durante 5 minutos a 14000g a 4°C.

5- Redissolvendo o RNA

No final do procedimento, retirou-se o sobrenadante por inversão do tubo e secou-se as paredes dos tubos com cotonete autoclavado, sem perturbar o *pellet*. Dissolveu-se o RNA com 15 µL de água ultrapura (Gibco, Cat. nº 10977-015, ou em sua falta, foi utilizada água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato, também chamada água tratada com DEPC), passando-se a solução várias vezes pela ponteira de uma micropipeta. Incubou-se as amostras durante 10 minutos a 55 – 60°C. O RNA foi acondicionado em freezer -80°C.

6- Concentração do RNA

A concentração de RNA foi determinada por leitura espectrofotométrica a 260 nm. Esta leitura permitiu o cálculo da concentração de ácido nucléico da amostra. Uma unidade de densidade óptica (D.O.) corresponde a aproximadamente 40 µg/ml de RNA de fita simples e a relação entre as leituras a 260 nm (D.O. 260/D.O. 280) permite estimar a pureza do ácido nucléico. Esta relação, para uma preparação pura de RNA, deve ser de 1,8 a 2,0.

ANEXO III

Análise da qualidade do RNA

Para verificar a integridade do RNA, amostras de um μL do RNA total foram diluídas em oito μL de água ultrapura e um μL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, três μL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 30 minutos. Terminada a eletroforese o gel foi colocado sobre o Foto UV/WhiteDarkroom (UVP Laboratory Products) que, corado com laranja de acridina, permite que o RNA seja visualizado e fotografado. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S, 18S e 5S. Além da verificação da integridade do RNA pelo gel, as amostras de RNA total foram analisadas com auxílio de um espectrofotômetro (NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific). As amostras, cujas razões 260/280 estiverem inferiores a 1,6, foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. As amostras íntegras foram mantidas a -80°C até o momento de uso.

ANEXO IV

Reação de Transcrição Reversa (mRNA)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). O cDNA foi sintetizado a partir de um µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando-se do High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: dois µl de tampão 10x, 0,8 µl do mix de dNTP 100 mM, dois µl de random primer, um µl de inibidor de RNase, um µl da enzima Transcriptase Reversa e 11,2 µl de água livre de nuclease. Em seguida, as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 segundos e mantidos a 4°C. Ao final da reação o cDNA foi estocado em freezer -20°C.

PCR quantitativo em Tempo Real (mRNA)

Cada amostra de cDNA foi analisada com ensaios TaqMan (Life Technologies, EUA), com o primers específico (Tabela 2) para o mRNA alvo. Para cada reação, foram utilizados 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), 4 µL do produto da reação de transcrição reversa. As amostras foram normalizadas pelo controle interno GAPDH e a quantificação da expressão realizada pelo método 2-RRCT (Livak & Schmittgen, 2001).

<i>PRIMER</i>	<i>CÓDIGO</i>
RANKL	AB037599.1
GAPDH	AB062273.1

RANKL: Ativador do receptor do fator nuclear kappa -B ligante; GAPDH: gliceral 3 fosfato desidrogenase, controle interno para as reações do RT-qPCR.

Primer para reação de PCR em tempo real do gene RANKL e seu controle interno GAPDH.

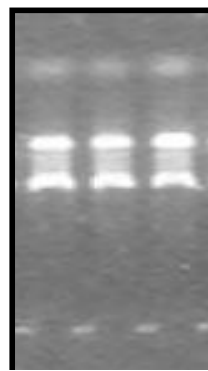
Apêndice I

Resultado de VHS das Pacientes.

Paciente 01	13mm/1h
Paciente 02	10mm/1h
Paciente 03	16mm/1h

Apêndice II

Bandas de RNA de células osteoblásticas das três pacientes com 16 dias com meio de diferenciação.



P01 P02 P03