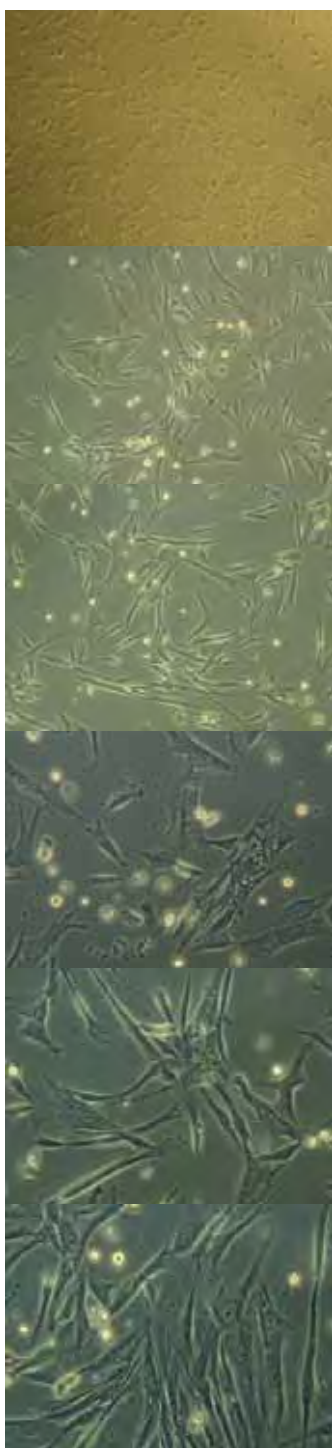




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU



Influência de diferentes
extratos de *Cordia*
ecalyculata em cultura de
células-tronco mesenquimais

Paula Scatena

Botucatu

2010

Paula Scatena

Influência de diferentes extratos de *Cordia
ecalyculata* em cultura de células-tronco
mesenquimais humanas

Proposta de Monografia a ser
apresentada ao Instituto de Biociências
de Botucatu da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientadora: Dra. Elenice Deffune

Co-orientador: Josy C. Vicentini de Oliveira

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Scatena, Paula.

Influência de diferentes extratos de *Cordia ecalyculata* em cultura de células-tronco mesenquimais humanas / Paula Scatena. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Elenice Deffune

Co-orientador: Josy C. Vicentini de Oliveira

Capes: 20603002

1. Células-tronco. 2. Citometria de fluxo. 3. Tecido adiposo.

Palavras-chave: Caspase-3; Células-tronco mesenquimais; Citometria de fluxo; Índice de apoptose; Tecido adiposo.

A meus pais, irmã e avó.

Agradecimentos

Agradeço a toda à equipe que fez e ainda faz parte do Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu:

Dra. Elenice Deffune, minha orientadora, mentora, que me ajudou a amadurecer e nunca negou a sua ajuda.

À Josy, minha co-orientadora e amiga, que sempre me tranquilizou nos momentos difíceis.

Pri, que desde o começo me ajudou em minhas escolhas e me guiou sempre com muita paciência e vontade de ensinar.

Dra. Rosana, que sempre está disposta a auxiliar a todos que precisam e me apoiou em todas as horas.

Michele, que esteve presente nos momentos mais tensos e sempre ajudava com o seu espírito positivo, me acalmando e animando quando precisei.

À Marjorie que sempre deixou o seu laboratório a disposição e tirou muitas dúvidas quando precisei.

Flávia, que sempre se mostra preocupada, disposta a ajudar e braço direito de todos.

Ao Dr. Aristides, a toda a equipe do Centro Cirúrgico e a enfermaria que sempre guardou as amostras para nós e nunca negaram qualquer tipo de auxílio

Juliana e Regina, minhas eternas companheiras! Estavam sempre do meu lado e crescemos junto aqui dentro, nunca esquecerei esses momentos. Apesar de, às vezes acharmos que não valia à pena, agora descobro que fizemos o melhor que podíamos! Levarei vocês para sempre em mim!

Thaiane, Flávia e Aline A., obrigada por me ensinar e pela força (vamo timee!).

Ao Henrique, companheiro, sem você, esse trabalho não existiria! Este trabalho também é seu!

À Gabi que, apesar do pouco convívio, teve uma presença marcante neste trabalho.

À Mariele que, mesmo antes de eu entrar no laboratório já fazia parte da minha vida, obrigada por me ajudar.

Ao Gabriel e Aline por me fazer companhia e pela força.

Ao Woner e Angelo que sempre são prestativos com todos da equipe.

Ao Renan e Daniel, que me ensinaram coisas básicas no início, mas que no final se mostraram importantes.

À Ondina que dá base e estrutura ao laboratório, fazendo o seu e lavando os materiais.

Às meninas da república: Kama, Kktua. Takííí, Dupexe, Galah, Doug e Carol por serem as minha família, minhas companheiras e por dividir essa experiência comigo.

À IBB Junior e todos os membros por deixarem os meus dias mais felizes e me deixar com orgulho todos os dias!

E por último, aos pacientes que concordaram em participar e ajudar na pesquisa.

Lista de Ilustrações

Figura 1- Origem de célula-tronco e de célula diferenciada.....	4
Figura 2- Representação esquemática da concepção da cascata mesenquimal e endotelial do modelo murino e humano. Todas as células dos sistemas mesenquimal e endotelial são negativas para o antígeno CD45. As setas semicirculares indicam potencial para auto-renovação. As setas em linha contínua indicam o sentido da diferenciação celular e as setas pontilhadas indicam hierarquias possíveis, mas ainda não comprovadas experimentalmente. As interrogações indicam ressaltam a ausência do conhecimento da via.....	5
Figura 3- Lavagem com solução fisiológica do fragmento de tecido adiposo.....	13
Figura 4- Detalhamento da câmara de Neubauer.....	15
Figura 5- Esquema de diluição do EB com o meio de cultura e aditivos.....	18
Figura 6- Esquema de diluição da FA com o meio de cultura e aditivos.....	19
Figura 7- Esquema de diluição da FH com o meio de cultura e aditivos.....	20
Figura 8- Esquema de diluição da FE com o meio de cultura e aditivos.....	21
Figura 9- Fluxograma do plaqueamento das CTMs com os diferentes extratos de córdia.....	22
Figura 10- Plaqueamento dos extratos de córdia em CTM.....	23

Figura 11- Esquema de citometria de fluxo, onde as flechas representam o laser e as circunferências coloridas, as células.....	24
Figura 12- Isolamento do tecido adiposo de pele de descarte consentido.....	27
Figura 13- Fotomicrografia em microscopia invertida, contraste de fase, evidenciando a aderências das CTMs. Em A, B e C aumento de 5X, 10X e 20X respectivamente.....	28
Figura 14- Fotomicrografia em microscopia invertida, contraste de fase, evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Em A, B e C aumento de 5X, 10X e 20X respectivamente.....	29
Figura 15- CTM em confluência de 80% em aumento de 5x.....	30
Figura 16- Gráficos das CTMs em presença de marcador CD45 antes (A) e após expansão celular (B).....	30
Figura 17- Gráficos das CTMs em presença de marcador CD34 antes (A) e após expansão celular (B).....	31
Figura 18- Gráficos das CTMs em presença de marcador CD90 antes (A) e após expansão celular (B).....	31
Figura 19- Controle observado no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo.....	33
Figura 20- Extrato Bruto 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo.....	33
Figura 21- Fase Aquosa 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	34

Figura 22- Fase Hexânica 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	34
Figura 23- Fase Etérea 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo.....	34
Figura 24- Extrato Bruto 50µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	35
Figura 25- Fase Aquosa 50µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	35
Figura 26- Fase Hexânica 50µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	35
Figura 27: Fase Etérea 50µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	36
Figura 28- Extrato Bruto 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	36
Figura 29- Fase Aquosa 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	37
Figura 30-Fase Hexânica 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	37
Figura 31- Fase Etérea 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo.....	37

Lista de Tabelas

Tabela 1- Classificação das CT quanto à origem e capacidade de diferenciação.....	6
Tabela 2- Cálculo de pipetagem dos extratos no meio de cultura.....	17
Tabela 3- Marcadores de superfície de CTMs.....	25
Tabela 4- Registro da contagem e viabilidade celular em cada passagem.....	29
Tabela 5- Monitoramento dos marcadores de superfície de CTM por citometria de fluxo.....	30
Tabela 6- Diferentes indicadores monitorados após plaqueamento de CTMs com a córdia, 15h, 20h e 38 h após a exposição: confluência das células; viabilidade e índice de apoptose.....	32

Lista de Gráficos

Gráfico 1- Observação das CTMs com os diferentes extratos de córdia quanto à adesão celular nos tempos de 15, 20 e 38 horas.....	39
Gráfico 2- Análise da Citometria de Fluxo dos Índices de apoptose das CTMs nos diferentes extratos.....	40
Gráfico 3- Análise da viabilidade celular das CTMs expostas aos diferentes extratos de córdia antes a após plaqueamento.....	41

Resumo

Diante da constatação clínica de que muitos pacientes não conseguem benefício completo da remissão da ulceração em membros inferiores com os tratamentos convencionais, o Setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu estabeleceu o protocolo de produção de curativos bioativos, que interagem com a lesão e estimulam via hormônios de crescimento (PDGF, VEFG, FGF e outros) a recuperação da área danificada por indução das células-tronco comissionadas da pele. Estudos realizados na Faculdade de Química de Araraquara culminaram com a purificação do princípio ativo do fitoterápico *Cordia ecalyculata* para analisar *in vitro* o seu alto potencial antiinflamatório. Seus diferentes extratos foram enviados ao Laboratório de Engenharia Celular da Faculdade de Medicina de Botucatu: extrato bruto (EB), fase aquosa (FA), fase hexânica (FH) e fase etérea (FE), que foram testados em diferentes concentrações em cultura de células-tronco mesenquimais humanas (CTM), oriundas de tecido adiposo, com a finalidade de analisar, através de caspase-3, marcador intracelular, o índice de apoptose. Aquele que apresentar o melhor resultado será adicionado à fórmula dos biocurativos. Este trabalho tem os objetivos de avaliar a contribuição da cultura celular de CTM nos testes de tolerância com *Cordia ecalyculata*, estabelecer o índice de apoptose celular e avaliar o tempo de confluência maior que 80% na cultura de CTM em diferentes concentrações de *C. ecalyculata*. Os resultados encontrados comprovaram que os extratos que apresentaram os melhores desempenhos foram os da FA em todas as concentrações e FE de 25µg/mL. Os extratos FE nas demais concentrações demonstraram um desempenho insatisfatório, o que nos indica que uma concentração entre 25 e 50µg/mL seja o limite entre a boa execução nas células e toxicidade. Mais testes terão que ser realizados para demonstrar qual é essa concentração limite e também para comprovar qual concentração de FA é realmente a melhor a ser utilizada.

Palavras-chave: *Cordia ecalyculata*, cultura celular, células-tronco mesenquimais

Sumário

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

1 Introdução.....	1
2 Terapia Celular.....	3
3 Células-Tronco.....	3
3.1 Células-Tronco Pluripotentes.....	5
4 Razões da Cultura Celular.....	6
5 Por que cultivar células?.....	7
6 O Papel da Caspase-3 na Apoptose	9
6.1. Via Mitocondrial da Apoptose (Intrínseca).....	10
6.2. Via Receptor de Morte da Apoptose (Extrínseca).....	11
7 Objetivos.....	12
8 Material e Métodos.....	13
8.1 – Obtenção de Tecido Adiposo.....	13
8.2 – Isolamento e preparação do tecido adiposo.....	14
8.3. - Cultura e expansão das CTM,.....	16
8.4. – Estudo da ação das diferentes fases de purificação do extrato de <i>Cordia Ecalyculata</i> em cultura de CTM humanas.....	16
8.5.- Preparação do meio de cultura com os extratos da córdia.....	17
8.6. – Caracterização fenotípica das células por citometria de fluxo.....	23
8.6.1– Marcadores de Superfície.....	24
8.6.2- Protocolo de Marcação Intracelular com Anti-caspase-3.....	26
9 - Resultados e Discussão.....	27

9.1 - Análise dos resultados.....	38
10- Conclusões.....	42
11- Referências.....	43

1 - Introdução

A Dermatologia iniciou suas atividades em Botucatu no ano de 1966 com o Curso de Semiologia Dermatológica para o ano seguinte iniciar as atividades didáticas, docentes e assistenciais. Desde esta época, o desafio de tratar feridas crônicas se impôs. Apesar da evolução tecnológica, muitos são os pacientes com lesões cronificadas que atingem não apenas seu corpo, mas têm repercussões sócio-psicológicas bem como trabalhistas e recreativas, as mais devastadoras¹. Estima-se que 1 a 3 % da população nos países em desenvolvimento sofram de ulcerações de membros inferiores, tendo em vista tratar-se de patologia de alta incidência e prevalência².

Diante da constatação clínica de que muitos pacientes não conseguem benefício completo da remissão da ulceração com os tratamentos convencionais associados ou não à fitoterapia, o Setor de Biotecnologia do Hemocentro de Botucatu estabeleceu desde 2003, protocolo de produção de curativos bioativos, curativos estes que interagem com a lesão e estimulam via hormônios de crescimento (PDGF, VEGF, FGF e outros) a recuperação da área danificada por indução das células-tronco comissionadas da pele. Após validação de dois curativos bioativos: cola de fibrina e gel de plaquetas para uso em seres humanos, 538 pacientes já receberam a aplicação desta Terapia Celular Indutiva. Destes, 199 (36,98%) não obtiveram remissão completa da lesão. Para estes pacientes, como já haviam se submetido sem nenhum sucesso a outras terapêuticas, há que se prospectar o uso da Terapia Celular propriamente dita, composta da aplicação de células-tronco autólogas expandidas *ex vivo*.

Diante da aprovação pelo CONEP (Conselho Nacional de Ética em Pesquisa) do uso de Biocurativos em seres humanos, criou-se o Ambulatório especializado na Faculdade de Medicina de Botucatu com intuito de receber pacientes com feridas crônicas de difícil resolução oriundas de diversas regiões do Estado de SP. Neste ambulatório os pacientes ou cuidadores recebem treinamento de como aplicar os produtos.

Avaliando a co-morbidades que afetam estes pacientes, identificamos muitos fatores que contribuem para o aparecimento deste tipo de patologia, dentre os principais estão a hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, obesidade, entre outros bastante comuns com a avançar da idade³. Devido a isso, há um grande interesse em aprimorar o tratamento desses pacientes, principalmente nos casos mais crônicos, com exposição da matriz extracelular subendotelial, no qual o processo de cura se torna mais difícil e lento.

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido. Os curativos bioativos agem como Terapia Celular Indutiva, nas diferentes fases, mas não controla o processo inflamatório. Alguns fitoterápicos no mercado são utilizados com esta finalidade. A calêndula é um destes produtos, no entanto, ao ser adicionado no curativo bioativo observou-se importante queixa de dor nos pacientes, o que determinava o abandono do tratamento. Portanto, aprimorar a capacidade deste curativo bioativo, intensificando seu poder antiinflamatório continua sendo um desafio.

Tendo isso em vista, estudos desenvolvidos na Faculdade de Química de Araraquara-UNESP (FQ) sobre o forte caráter antiinflamatório encontrado em uma planta medicinal do gênero *Cordia*, a *Cordia ecalyculata*, culminaram com a purificação do princípio ativo desta planta para estudos *in vitro*, sendo assim optou-se em estudar este efeito em cultura celular em parceria com aquele serviço.

O gênero *Cordia L.* foi descrito por Linnaeus em 1753 e pertence à família *Boraginaceae*, a qual conta com cerca de 100 gêneros e 2.000 espécies difundidas nos trópicos, nas regiões temperadas e árticas⁴.

A *Cordia ecalyculata*, conhecida como porangaba, chá-de-bugre ou café-do-mato, tem um tamanho que varia de oito a doze metros. Produz uma fruta vermelha que pode ser usada para substituir chá ou café e tem sido empregada em muitos produtos já a venda como diurética e na redução de peso. O gênero *Cordia L.*, representado por 26 espécies somente no Estado de São Paulo, têm sido usado na medicina popular, principalmente no tratamento de úlceras gástricas, como antiinflamatórias e no tratamento de obesidade^{4,5}.

O princípio ativo contido na planta, por exemplo, a alantoína, favorece a proliferação celular acelerando a regeneração da pele lesada, age nos vasos linfáticos, promovendo uma “drenagem” sendo, portanto, auxiliar no combate à celulite. Diurética, auxilia na eliminação do excesso de líquido e também estimula a epitelização e a proliferação de novas células.

O presente trabalho se justifica unindo duas fortes tendências da tecnologia atual: uso de novos fármacos e a terapia celular.

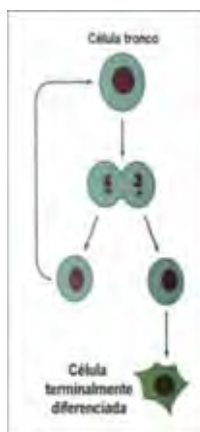
2 - Terapia Celular

A terapia celular é a definição de um procedimento terapêutico que visa restabelecer a estrutura e a função do tecido por meio da utilização de uma célula ou grupo de populações celulares. Essa atividade está envolvida em tratamentos relacionados a traumas, doenças, processos degenerativos, entre outros. Os avanços ocorridos nessa área possibilitaram a criação de uma nova atuação profissional na área de biotecnologia e bioengenharia. As terapias celulares são apontadas como capazes de eliminar filas para transplantes cardíacos, reduzir o tempo de internação e diminuir a morbidade em casos de queimadura graves, entre outros avanços⁶.

A terapia celular, como ramo da medicina regenerativa, possui três vertentes terapêuticas: *condutiva*, a qual se refere ao restabelecimento autônomo das células através de estímulo externo como o uso de polímeros sintéticos; *indutiva*, que consiste no fornecimento de fatores de crescimento aos tecidos lesados para que seja re-estabelecido o “diálogo químico” entre as células e estas se regenerem e por último a *terapia celular* propriamente dita com o uso de células-tronco utilizadas para regeneração tecidual. O estudo a ser apresentado a seguir refere-se ao estudo potencial de novo fármaco que poderá ser utilizado como coadjuvante na terapia com células tronco pela ação esperada anti-inflamatória.

3 - Células-Tronco

Toda célula-tronco é definida como uma entidade primitiva ou indiferenciada, capaz de auto-renovação e diferenciação em um ou vários tipos de células diferenciadas que exercem funções específicas. Uma célula-tronco, célula-mãe, em divisão mitótica pode gerar uma unidade idêntica e outra com identidade distinta (célula-filha)⁷ (Figura 1).

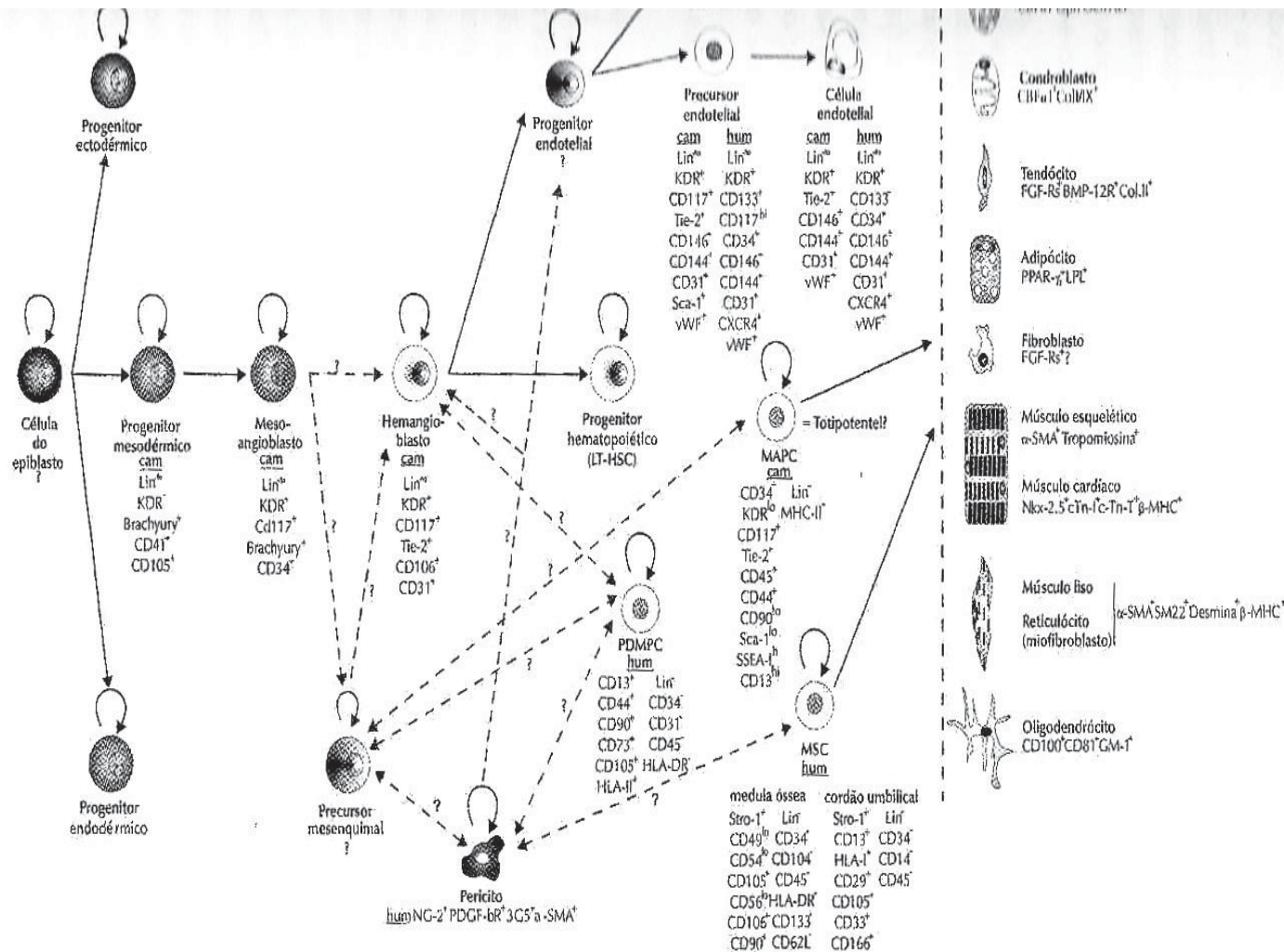


Fonte: rc.unesp.br

Figura 2: Origem de célula-tronco e de célula diferenciada

Na medula óssea, existem pelo menos três desses sistemas: as células-tronco hematopoiéticas, as células-tronco endoteliais e as células-tronco mesenquimais (CTM). Dessas três, são as CTMs que são apontadas na literatura como a esperança para a terapia de inúmeras doenças, mas, ao mesmo tempo, possuem aspectos da sua fisiologia e potencial de diferenciação não tão bem esclarecidos. O nome “mesenquimal” traz uma conotação de origem de tecidos embrionários internos, que não possuem contato direto com o ambiente externo, como é o caso dos epitélios⁷.

As CTM são capazes de restaurar os elementos de infra-estrutura tecidual, como o estroma e a matriz extracelular, além de influenciar na diferenciação das outras células-tronco e delas mesmas. Há indícios de que elas sejam pluripotentes e, portanto, possam gerar qualquer tipo celular de um organismo⁷ (Figura 2).



(Fonte: Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos a Terapia Gênica)

Figura 2: Representação esquemática da concepção da cascata mesenquimal e endotelial do modelo murino e humano. Todas as células dos sistemas mesenquimal e endotelial são negativas para o antígeno CD45. As setas semicirculares indicam potencial para auto-renovação. As setas em linha contínua indicam o sentido da diferenciação celular e as setas pontilhadas indicam hierarquias possíveis, mas ainda não comprovadas experimentalmente. As interrogações indicam ressaltam a ausência do conhecimento da via.

3.1. - Células-Tronco Pluripotentes(CTP)

São células capazes de dar origem aos mais de 250 tipos diferentes de tecidos do adulto encontradas nos anexos embrionários e embrião. Mais recentemente, um grande número de laboratório tem trabalhado com as CTP induzidas ou IPS, obtidas a partir do embrião, feto ou de um tipo de célula híbrida em um processo chamado de *transferência de núcleo somático*

(ou clonagem), em sua fase precoce de desenvolvimento. A transferência de núcleo somático permite criar uma célula pluripotencial a partir de uma célula somática. O núcleo de uma célula adulta é retirado e transferido para um óvulo do qual o próprio núcleo foi removido. Essa célula híbrida pode ser estimulada a se dividir originando uma massa celular semelhante à blástula de um embrião normal e, dessa massa, podem ser retiradas células que se diferenciam em muitos tecidos humanos⁸.

Tabela 1: Classificação das CT quanto à origem e capacidade de diferenciação

CT Pluripotentes	CT Adultas
- CT embrionárias: derivadas da massa interna do blastocisto de 4-5 dias.	- CT hematopoiéticas: obtidas de medula óssea, sangue ou cordão umbilical.
- Células germinais embrionárias: derivadas da prega genital do feto de 5-10 semanas.	- CT cerebrais
- CT embrionárias híbridas: obtidas por transferência de núcleo somático em adultos.	- CT de outros tecidos adultos: pele, mucosa intestinal, epitélio olfativo, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, músculo esquelético e cardíaco e pulmão.

Fonte: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina**. Ed. Atheneu, 2006, p. 9, cap.1

4 - Razões da Cultura Celular

As primeiras experiências de cultivo de células animais, ainda que incipientes, datam do início do século XX, com os experimentos de Harrison entre 1906 e 1910 que tentou esclarecer como era originada a fibra nervosa, utilizando linfa decoração de rã. Harrison confirmou que a fibra nervosa é resultado do crescimento da própria célula nervosa⁶.

Há algumas diferenças essenciais entre a situação das células no organismo *in vivo* e sua mimetização em cultura celular *in vitro*, entre elas:

- 1- Os tecidos são tridimensionais, já as culturas são de dimensão zero (monodispersas em cultivo suspenso) ou bidimensionais (crescimento em camadas), embora formas mais recentes de cultivo explorem tridimensionalidade; mais representativas do seu tecido de origem.
- 2- As células em cultivo não estão sujeitas a tensões e compressões, diferentemente do que ocorre nos tecidos;

- 3- Em cultura, linfocinas e quimiocinas possuem parâmetros invariantes e, nos tecidos elas variam em proporção e concentração;
- 4- Os mecanismos de controle de diferenciação celular entre tecidos e cultivo são distintos.

Tendo em vista as enormes expectativas criadas para uma melhoria da qualidade de vida e o volume de negócios que os produtos de células animais já atingiram, não surpreende que nos últimos anos, o potencial para uso de cultura celular tenha ampliado para diagnóstico, prevenção, terapia e cura de doenças. Muitos são os produtos desenvolvidos por meio de cultura celular entre eles: Kogenate® (Fator VIII), Crono-f® (Hormônio folículo estimulante), Avastin® (Anticorpo monoclonal humanizado)⁹.

5 - Por que cultivar células?

A utilização de linhagens celulares e células primárias de tumores permitem a avaliação de potencial antitumoral de compostos sem indução de tumores em animais⁹.

A confiabilidade dos testes *in vitro* representa um dos maiores desafios tanto em relação à pesquisa e desenvolvimento quanto em âmbito comercial. Nesse tipo de teste, o uso de células humanas em cultura é bastante promissor para a avaliação da citotoxicidade aguda e crônica. Tecnologias têm sido desenvolvidas para incorporar análise de expressão de genes e utilização de células específicas, visando a uma determinação mais precisa da toxicidade em vários órgãos e da toxicidade de substâncias que não induzem morte celular⁹.

Hoje em dia, o campo da toxicologia utiliza vários modelos *in vivo* para avaliar o potencial tóxico de compostos químicos. Esses testes em animais apresentam limitações significativas na equivalência dos resultados para os humanos e expõem problemas éticos quanto à utilização dos mesmos. O desenvolvimento de testes que empregam o cultivo *in vitro* de células animais podem, então, representar importante progresso nessa área⁹.

As culturas primárias são isoladas diretamente de órgãos ou tecidos. Denominam-se primárias até a sua primeira passagem ou diluição, após o que são consideradas culturas em série ou subculturas. As culturas primárias são inicialmente heterogêneas e mais representativas do seu tecido de origem e, ao longo do tempo de cultivo, observa-se uma

crescente predominância de fibroblastos. A preparação de culturas primárias é laboriosa e as células podem ser mantidas *in vitro* por apenas um período limitado⁶.

Durante o estabelecimento da cultura primária e nos sucessivos subcultivos da população celular, as células podem ser submetidas a consideráveis níveis de estresse. Por exemplo, a dissociação enzimática de fragmentos de órgãos ou de células aderentes rompe as interações existentes entre duas células próximas entre si ou entre a célula e a superfície. As culturas em série, selecionadas para obtenção de um único tipo de células, são denominadas linhagens celulares que são homogêneas e possuem uma velocidade de crescimento maior. Tanto as linhagens celulares finitas (células capazes de um número limitado de duplicações, após o qual a proliferação cessa), como as linhagens celulares contínuas, podem ser propagadas e expandidas para a produção de bancos celulares bem caracterizados, onde são preservadas recorrendo-se a técnicas de criopreservação⁶.

Nem todas as células sobrevivem à manipulação em cultura. As que sobrevivem devem ser capazes de corrigir as lesões sofridas e adaptar-se às mudanças em seu ambiente. A adaptação da cultura leva tempo e é influenciada pelas condições de cultivo⁷.

Uma vez que uma cultura é iniciada, é necessária a troca periódica de meio, seguida eventualmente de um subcultivo, no caso de as células estarem se proliferando. Os intervalos entre as trocas de meio e entre os subcultivos variam de acordo com a linhagem, dependendo do meio de cultivo, da taxa de crescimento e do metabolismo celular. Alguns fatores que indicam a necessidade de troca do meio de cultura são a queda do pH, o aumento da concentração celular, a diminuição da concentração de determinados componentes do meio de cultura e variação na morfologia da linhagem⁷.

As células que dependem de um suporte sólido para se desenvolverem são chamadas de células aderentes. Tais células crescem em monocamadas e apresentam inibição por contato, sendo seu crescimento geralmente limitado pela superfície disponível do suporte. Células suspensas dependem de um suporte sólido e desenvolvem-se em suspensão. A forma assumida pela célula geralmente reflete sua origem. Células derivadas do sangue e/ou tumorais costumam apresentar crescimento em suspensão, enquanto células derivadas de tecidos sólidos têm crescimento na forma aderente. Para o subcultivo de linhagens aderentes, a remoção do meio de cultura e o desprendimento das células da monocamada são necessários. Esse desprendimento é geralmente realizado com tripsina, mas outras proteases também podem ser utilizadas, como a pronase, a dispase e a collagenase. Em geral, adiciona-

se também um agente quelante, como o EDTA, para capturar o cálcio envolvido no processo de adesão celular⁶.

6 – O Papel da Caspase-3 na Apoptose

Apoptose é um termo aplicado a um grupo de características estruturais e moleculares que ocorre em uma única célula que leva a morte celular. É um processo seletivo de eliminação de células em vários sistemas biológicos, desempenhando um papel fundamental na homeostasia e na regeneração tecidual¹⁰.

Há dois tipos de morte celular, necrose e apoptose, que diferem em suas morfologias, mecanismos e papéis na fisiologia. Quando o dano às membranas é grave, as enzimas extravasam dos lisossomos, entram no citoplasma e digerem a célula, resultando em necrose. Os conteúdos celulares também extravasam através da membrana plasmática lesada e iniciam uma reação inflamatória no hospedeiro. A necrose é a maior via de morte celular na maioria das lesões encontradas, como as que resultam de isquemia, de exposição a toxinas, várias infecções e trauma. Quando a célula é privada de fatores de crescimento ou o DNA celular ou as proteínas são danificadas sem reparo, a célula se suicida por outro tipo de morte, chamado de apoptose, caracterizada pela dissolução nuclear sem a perda da integridade da membrana¹¹.

A apoptose é uma via de morte celular induzida por um programa de suicídio rigorosamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas capazes de degradar seu próprio DNA, proteínas nucleares e citoplasmáticas. A membrana plasmática da célula apoptótica permanece intacta, mas é alterada de tal maneira que a célula e seus fragmentos tornam-se alvos para os fagócitos. Rapidamente a célula morta é removida, antes que seu conteúdo extravase e, por isso, a morte celular por essa via não induz uma reação inflamatória no hospedeiro. Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose exerce muitas funções normais e não está necessariamente associada à lesão celular patológica¹¹.

Em geral, a apoptose funciona para eliminar células potencialmente prejudiciais e células que tenham sobrevivido mais que sua utilidade, proporcionando a manutenção de número constante de populações celulares. Em condições patológicas, elimina células que estão alteradas sob o aspecto genético ou lesadas de tal modo que não podem ser reparadas, sem iniciar uma reação acentuada, mantendo a lesão tão contida quanto possível¹¹.

Muitos grupos de moléculas estão envolvidos no processo de apoptose e um conjunto de mediadores associados a ela são enzimas chamadas caspases¹⁰. Usa-se após o nome caspase (“c” vem de cisteína e “aspases” de ácido aspártico) a numeração arábica de acordo com as datas de suas descobertas. Como as caspases foram descobertas em diferentes épocas, quando a biologia molecular ainda não era muito desenvolvida, elas foram recebendo diferentes nomes os quais erroneamente, são utilizados até hoje¹².

Essas proteínas estão presentes nas células na sua forma inativa, sendo denominadas pró-caspases com o referido número do membro da família. Após clivagem, elas se tornam maduras^{12,13}. As caspases ativadas clivam numerosos alvos, culminando na ativação de nucleases que degradam o DNA e outras enzimas que provavelmente destroem nucleoproteínas e proteínas do citoesqueleto. A ativação das caspases depende de um equilíbrio finamente sintonizado entre vias moleculares pró e antiapoptóticas. Duas vias distintas convergem para ativação de caspase, chamadas *via mitocôndria* e *via receptor de morte*¹¹.

6.1.– Via Mitocôndria da Apoptose (Intrínseca)

As mitocôndrias contêm uma série de proteínas capazes de induzir apoptose. Por exemplo, o citocromo c. A escolha entre a sobrevivência e a morte celular é determinada pela permeabilidade da mitocôndria, controlada por uma família de mais de 20 proteínas, cujo protótipo é a Bcl-2. Quando as células são privadas de fatores de crescimento e hormônios tróficos ou são expostas a agentes que lesam o DNA ou ainda acumulam quantidades inaceitáveis de proteínas mal dobradas, um grupo de sensores é ativado. Alguns desses sensores, membros da família Bcl-2, ativam dois membros pró-apoptóticos da família chamada Bax e Bak, que se dimerizam e se inserem no interior da membrana mitocondrial, formando canais através dos quais o citocromo c e outras proteínas mitocondriais extravasam para o citosol. Outros sensores relacionados inibem as moléculas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x_l com o mesmo resultado final – o extravasamento de proteínas mitocondriais. O citocromo c, em conjunto com alguns co-fatores, ativam a caspase-9, enquanto outras proteínas bloqueiam as atividades dos antagonistas das caspases, os quais funcionam como inibidores fisiológicos da apoptose. O resultado final é a ativação da cascata de caspases, levando por fim à fragmentação nuclear¹¹.

As células privadas de fatores de crescimento, não apenas ativam as proteínas pró-

apoptóticas, mas mostram também níveis reduzidos de Bcl-2 e Bcl-x_L, portanto tendendo mais tarde ao balanço em direção à morte. Esta é a via responsável pela maioria das situações de apoptose¹¹.

6.2. – Via Receptor de Morte da Apoptose (Extrínseca)

Muitas células expressam moléculas de superfície, chamadas receptores de morte, que disparam a apoptose. Essas moléculas, na maioria receptores, são membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) que contém em suas regiões citoplasmáticas um “domínio de morte” conservado. Os receptores de morte são do tipo TNF I e Fas (CD95)¹¹.

Um membro dessa família, a caspase-3, foi identificado como um mediador importante na apoptose de células de mamíferos e possui um papel fundamental na inflamação¹⁰. A Caspase-3 é uma protease chave que é ativada durante os primeiros estágios da apoptose, responsável pela clivagem proteolítica dos substratos chaves para a manutenção da sobrevivência celular¹⁴ e, como outros membros da família das caspases, é sintetizada como uma pró-enzima inativa, que é processada dentro das células¹⁰. As formas processadas das caspases consiste em grandes (17-22 kDa) e pequenas (10-12 kDa) subunidades que se associam a forma ativa da enzima. A caspase-3 ativa, um marcador para células em apoptose, consiste em um heterodímero de 17 e 12 kDa subunidades que são derivadas da pró-enzima de 32 kDa. A caspase-3 ativada na forma proteolítica cliva e ativa outras caspases e está relacionada a moléculas do citoplasma, como D4-GDI e Bcl-2, e também com o núcleo¹⁵.

A principal família supressora de apoptose são as proteínas inibidoras de apoptose (IAP) que agem diretamente nas vias da cascata apoptótica. Nos mamíferos existem seis IAPs principais: NAIP, c- IAP1, c- IAP2, XIAP, Survivin e BRUCE. A expressão aumentada de qualquer uma dessas proteínas inibe a apoptose. As IAPs agem diretamente sobre as caspases ativas bloqueando-as. Entretanto, esse bloqueio só retarda o processo apoptótico. Para ocorrer supressão total, as IAPs devem bloquear a transmissão do sinal apoptótico assim que ocorra a indução¹⁴.

7 - Objetivos:

– Objetivo Geral

- Avaliar a contribuição da cultura celular de células-tronco mesenquimais (CTM) nos testes de tolerância com *Cordia ecalyculata*;

– Objetivos Específicos

- Estabelecer o índice de apoptose em cultura de CTM *ex vivo*;
- Estabelecer a viabilidade das CTM no momento do plaqueamento e após 38h após exposição.
- Avaliar o tempo de confluência maior que 80% na cultura de CTM em diferentes concentrações de *Cordia ecalyculata*.

8 - Material e Métodos:

Para a obtenção de CTM, utilizou-se o tecido adiposo, que é uma fonte de células-tronco adultas multipotentes que podem se diferenciar em uma linhagem mesenquimal¹⁶.

O tecido adiposo é abundante, acessível e de fácil reposição no organismo e uma de suas principais vantagens é a de ser necessária apenas uma pequena quantidade deste tecido subcutâneo para se obter um número de células suficiente para serem cultivadas em laboratório¹⁶.

8.1 – Obtenção de Tecido Adiposo

O fragmento de tecido adiposo foi obtido de pacientes programados para cirurgias eletivas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP – Botucatu pela disciplina de cirurgia plástica. Os pacientes foram abordados no pré-operatório e convidados a participar do projeto assinando o termo de consentimento livre e esclarecido - descarte consentido, aprovado pelo Comitê de ética da Faculdade de Medicina de Botucatu – FMB – UNESP (anexo 1).

8.2 – Isolamento e preparação do tecido adiposo

Após notificação do consentimento do paciente bem como da data do procedimento, o fragmento de pele, logo após ser retirado da paciente, foi armazenado em recipiente de inox estéril com HEPES contendo antibiótico (100 U/mL de penicilina sódica e 100 mg/mL de estreptomicina) e antimicótico (100 mg/mL de fluconazol), ainda no Centro Cirúrgico da FMB.

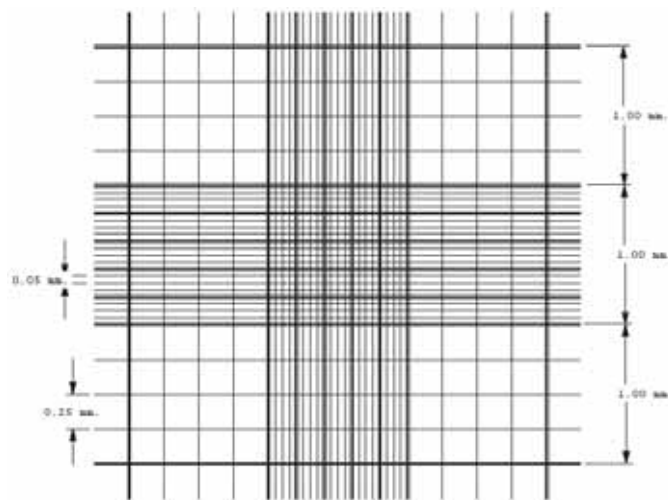
O material foi transportado com segurança para Laboratório de Engenharia Celular onde foi pesado e posteriormente, em ambiente de capela de fluxo laminar, a amostra foi então lavada com solução fisiológica 0,9%, e dependurada em um apoio de forma a ser lavado por toda a circunferência da amostra (Figura 3).



Figura 3: Lavagem com solução fisiológica do fragmento de tecido adiposo

Após esse procedimento, a amostra foi colocada a $\pm 4-6^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Em seguida, foi realizada a separação entre a pele e o tecido adiposo com bisturi e pinça estéreis. O método de obtenção das CTM de TA utilizado foi a digestão enzimática com collagenase. Para tal, foi procedida a retirada de 1 (um) grama de tecido adiposo, tendo sido adicionado o dobro de collagenase (2 gramas) e o dobro de HEPES (4mL) para diluir a enzima. Após a diluição da collagenase, foi feita a filtração desta solução com filtro de seringa de $0,22\ \mu\text{m}$, para retirar possíveis impurezas e então passada para um tubo cônico estéril de 50 mL junto com o

fragmento de tecido adiposo. O tubo foi armazenado em estufa a 37°C, com nível de CO₂ a 5% durante 15 (quinze) horas. Ao tubo estéril, foi adicionado meio de cultura contendo soro fetal bovino, para inativar ação da collagenase subtraindo-se à centrifugação 1200 rpm durante 10 (dez) minutos, repetindo-se duas vezes. O *pellet* de células linfomononucleares foi quantificado em câmara de Neubauer, estabelecendo-se a viabilidade por azul de tripano. A técnica usa a contagem de células nos 4 (quatro) quadrantes e posteriormente considera-se o volume para se encontrar o número total de células.



Fonte: <http://metodoslabideanellydiazpuentes.blogspot.com/2009/11/conteo-de-celulas-en-camara-de-neubauer.html>

Figura 4- Detalhamento da câmara de Neubauer

Exemplificando, em uma determinada contagem celular, foram encontradas 17 células vivas e 5 células mortas. O cálculo fica:

$$\text{Número total de células} = \frac{[\text{células vivas} + \text{células mortas}] \times \text{FD (Fator de diluição)} \times 10^4}{4 \text{ (média dos 4 quadrantes)}}$$

$$\text{Número total de células} = \frac{[17 + 5] \times 2 \times 10^4}{4} = 11 \times 10^4 \text{ células/mm}^3$$

$$\text{Número de Células vivas} = 8,5 \times 10^4 \text{ ou } 85.000 \text{ células/mm}^3$$

$$\text{Número de Células mortas} = 2,5 \times 10^4 \text{ ou } 25.000 \text{ células/mm}^3$$

$$\% \text{ de Viabilidade} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100 = 77,3\%$$

Do volume de 1mL de células (11×10^4), 50 μ l foi retirado para a contagem, 950 μ l contendo $10,4 \times 10^4$ células foram semeadas em frasco plástico, estéril, de 25cm² com 10 (dez) mililitros de meio de cultura DMEM Knockout 10% de soro fetal bovino, permanecendo assim por três dias para as células-tronco induzir a adesão celular. O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, observando a confluência e realizando registro fotográfico.

8.3. - Cultura e expansão das CTM

As células linfomonocnucleares já fenotipicamente caracterizadas foram plaqueadas na quantidade de 1×10^6 células por frasco e mantidas em meio específico *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) suplementado com 10% soro fetal bovino e antibióticos¹⁹ (100 U/ml de penicilina sódica e 100 mg/mL de estreptomicina). Os frascos de cultura foram mantidas em estufa de CO₂ a 5%, 37°C, ambiente com umidade controlada, e observada diariamente por microscopia invertida. Quando a confluência das células se apresentou maior ou igual a 80%, as mesmas foram retiradas do frasco de cultura, quantificadas e congeladas para a constituição do banco de células para estudo. Uma vez, constatado o número de ampolas de criopreservação suficiente para o experimento, as células foram descongeladas e re-plaqueadas para o estudo propriamente dito.

8.4. – Estudo da ação das diferentes fases de purificação do extrato de *Cordia ecalyculata* em cultura de CTM humanas.

Em experimento realizado em camundongos *Suiss* pela Professora Doutora Dulce Helena Siqueira Silva, chefe do departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP – Araraquara testou-se quatro fases de *C. ecalyculata*: extrato bruto, fase aquosa, fase hexânica e fase etérea, cada uma com sete concentrações diferentes (200, 100, 50, 25, 10, 5 e 2,5 μ g/mL),

para verificar a toxicidade de cada fase em células normais. Somente na fase etérea, na concentração de 200 µg/mL, a viabilidade das células foi de 40%, sendo que, nas demais, a viabilidade foi de 100% (dados não publicados).

As CTM expandidas foram descongeladas segundo POP (Procedimento Operacional Padrão) do Laboratório de Engenharia celular do Hemocentro e plaqueadas em 13 frascos de cultura de 25cm². Para que houvesse uniformidade, foi realizado um *pool* com todas as células e retirada uma alíquota para contagem e verificação da viabilidade.

8.5.- Preparação do meio de cultura com os extratos da Córdia

Criou-se uma denominação de fácil entendimento e registros nas ampolas e tubos de ensaio, a saber:

Extrato bruto= EB; Fase aquosa=FA; Fase hexânica=FH e Fase etérea = FE

1. Adicionou-se em um tubo cônico de 15 mL, estéril, a quantidade de meio de cultura DMEM-F12 sem soro fetal, mas com aditivos;
2. Foi realizada a diluição pensando no volume e concentrações dos diferentes extratos:

Tabela 2: Cálculo de pipetagem dos extratos no meio de cultura

Extrato/Fase	Volume	Concentração mg/mL	Volume a ser pipetado para 1750µg = {(100µg+50µg+25µg) x 10mL de meio}
Extrato Bruto – EB	2,0 mL	10.040µg/mL	1750µgx2000µL/10.040µg/mL= 348µL
Fase Aquosa – FA	1,5mL	17.360µg/mL	1750µgx1500µL/17.360µg/mL= 152µL
Fase Hexânica – FH	1,0mL	10.640µg/mL	1750µgx1000µL/10.640µg/mL= 165µL
Fase Etérea – FE	2,0mL	10.260µg/mL	1750µgx2000µL/10.260µg/mL= 341µL

3. Separou-se uma estante com 4 TUBOS cônicos para preparar a diluição contendo:

Tubo 1 - **EB**:

- Foi colocado 652 μL de meio de cultura sem soro fetal (Pois: 1000 μL - 348 μL);
- Adicionou-se 348 μL de **EB** e a solução foi filtrada em filtro de seringa 0,22 μ ;
- Pipetou-se os volumes indicados e completou-se cada tubo com D-MEM-F12 completo (aditivos e soro fetal a 20%).

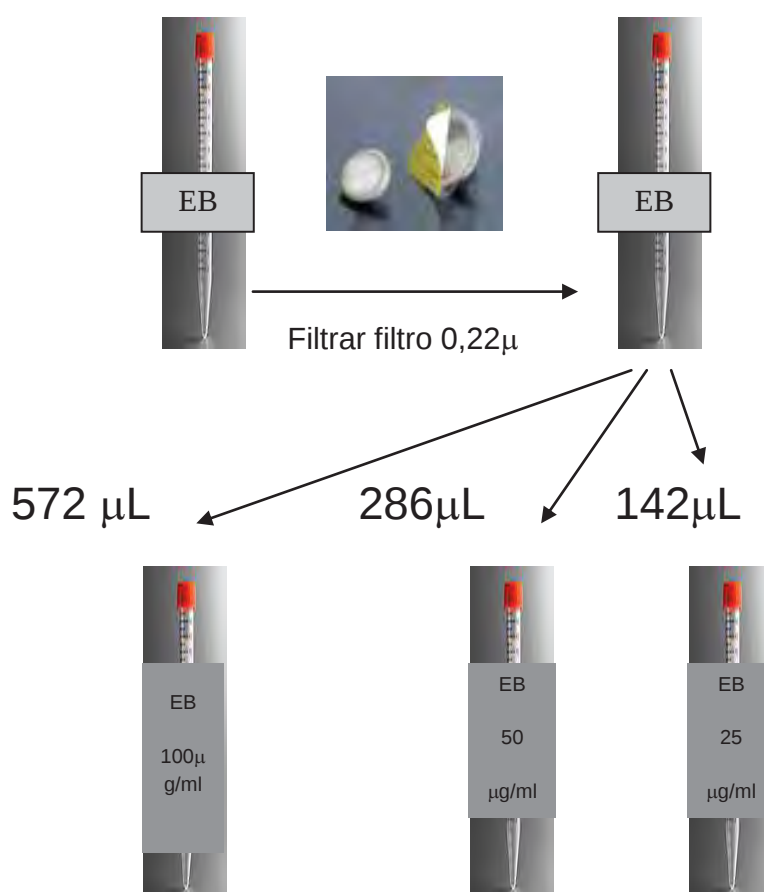


Figura 5: Esquema de diluição do EB com o meio de cultura e aditivos

Tubo 2 - FA :

- Foi colocado 848 μ L de meio de cultura sem soro fetal (Pois: 1000 μ L-152 μ L);
- Adicionou-se 152 μ L de FA e a solução foi filtrada em filtro de seringa 0,22 μ ;
- Pipetou-se os volumes indicados e completou-se cada tubo com D-MEM-F12 completo (aditivos e soro fetal a 20%).

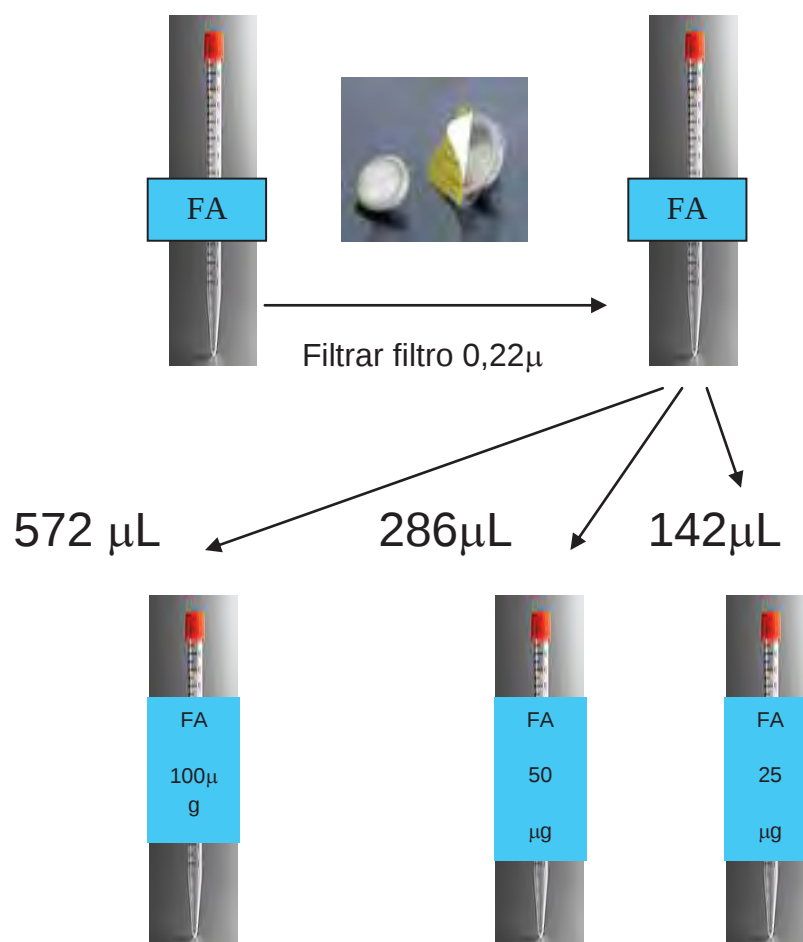


Figura 6: Esquema de diluição da FA com o meio de cultura e aditivos

Tubo 3 - FH :

- Foi colocado 835 μ L de meio de cultura sem soro fetal (Pois: 1000 μ L-165 μ L);
- Adicionou-se 165 μ L de FH e a solução foi filtrada em filtro de seringa 0,22 μ ;
- Pipetou-se os volumes indicados e completou-se cada tubo com D-MEM-F12 completo (aditivos e soro fetal a 20%).

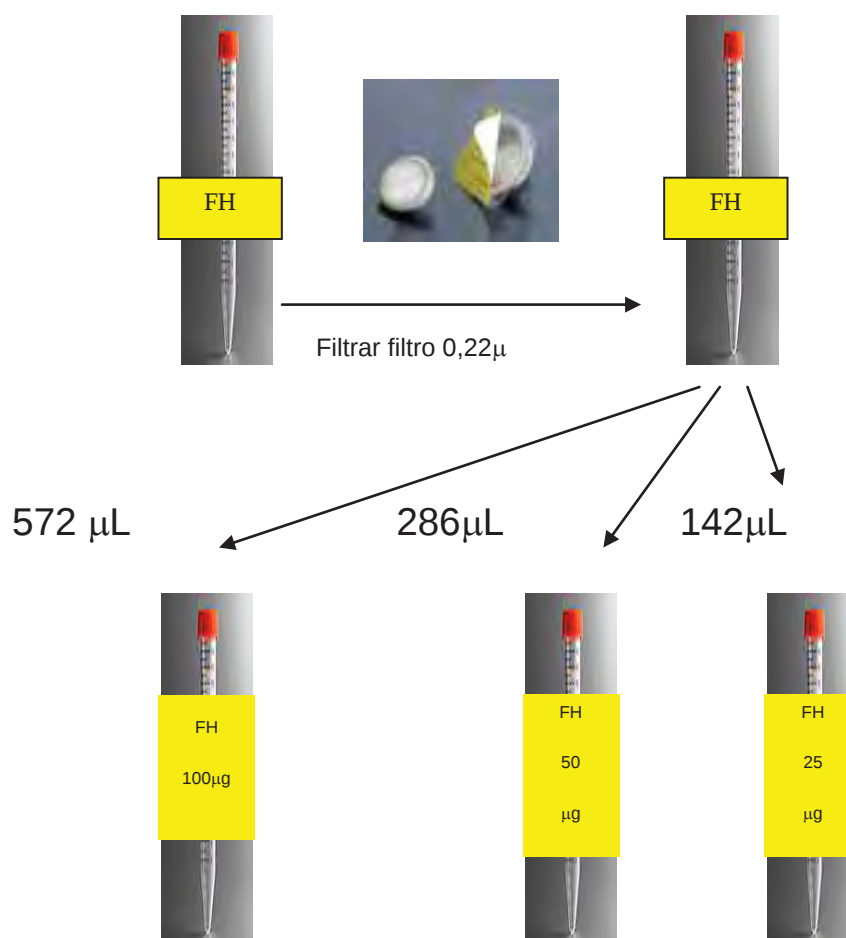


Figura 7: Esquema de diluição da FH com o meio de cultura e aditivos

Tubo 4 - FE :

- Foi colocado 659 μ L de meio de cultura sem soro fetal (Pois: 1000 μ L-341 μ L);
- Adicionou-se 341 μ L de FE e a solução foi filtrada em filtro de seringa 0,22 μ ;
- Pipetou-se os volumes indicados e completou-se cada tubo com D-MEM-F12 completo (aditivos e soro fetal a 20%).

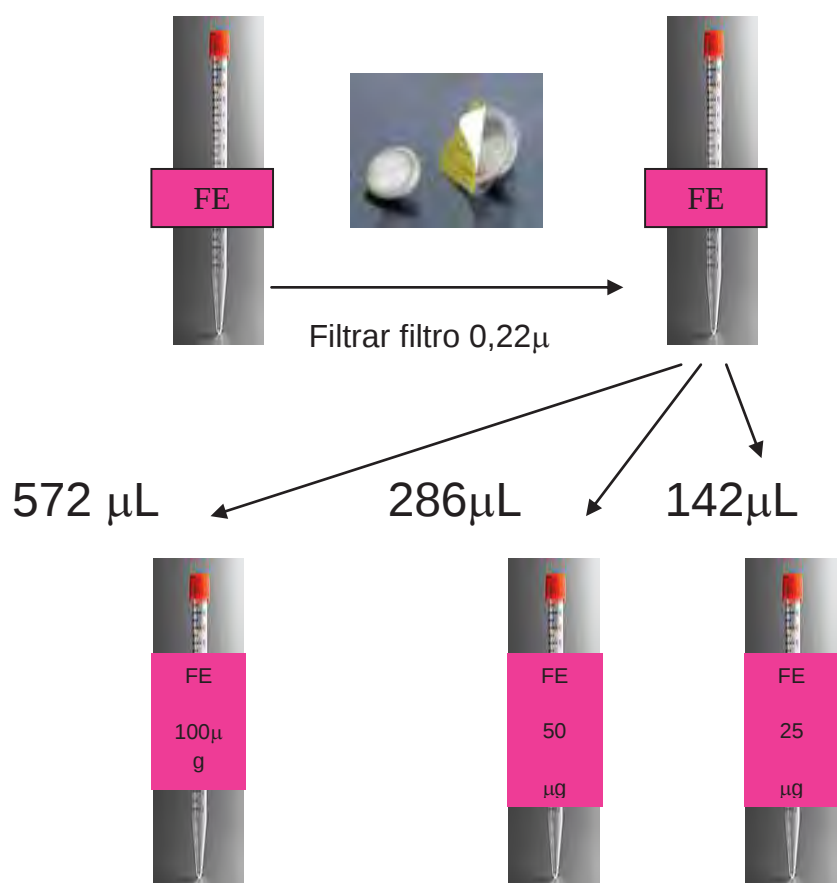


Figura 8: Esquema de diluição da FE com o meio de cultura e aditivos

As células foram então distribuídas em 13 frascos na concentração de 1×10^6 células/frasco em cada um (12 contendo a córdia e um controle) e permaneceram em cultura com os extratos por 38 horas, tempo suficiente para ocorrer morte celular. Vide o fluxograma do plaqueamento (Figura 9).

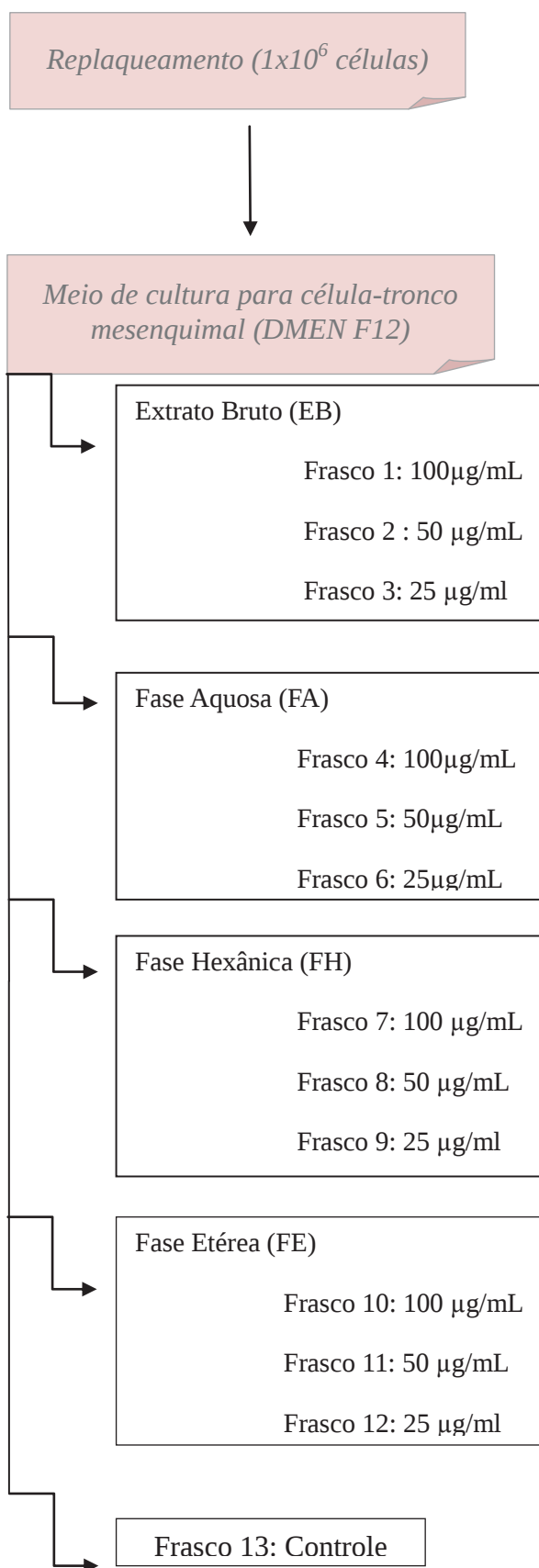


Figura 9: Fluxograma do plaqueamento das CTMs com os diferentes extratos de córdia

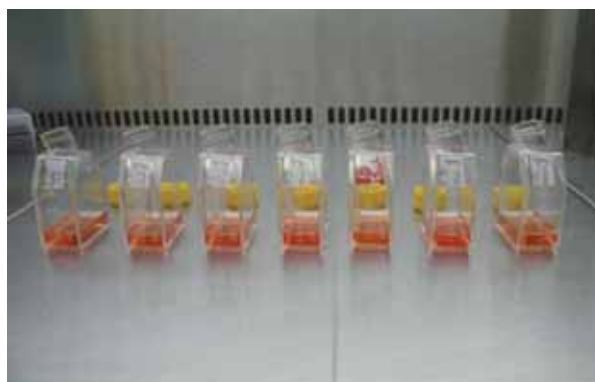


Figura 10: Plaqueamento dos extratos de *Cordia* em CTM

Durante esse período, foi observado o tempo de confluência e o aspecto celular. Após 38 horas, todos os frascos foram submetidos aos seguintes procedimentos:

- Os sobrenadantes foram centrifugados (para obterem-se as células que estavam em suspensão) e, em seguida foram congelados para futura análise de citocinas inflamatórias em futuro trabalho.
- Foi realizado o protocolo da tripsina segundo POP (Procedimento Operacional Padrão) do Laboratório de Engenharia celular do Hemocentro para desprendimento das células aderidas.
- Foi separada uma alíquota de cada frasco para verificação da viabilidade.

8.6. – Caracterização fenotípica das células por citometria de fluxo

Na primeira etapa, as células obtidas e quantificadas tiveram seu perfil fenotípico estudado pré-plaqueamento. Esta metodologia foi realizada por citometria de fluxo utilizando equipamento FACScalibur da BD com leitura através de *software* CellQuest Pro® em parceria com Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu. A citometria de fluxo traça o perfil fenotípico da superfície celular. É uma técnica relativamente simples que utiliza moléculas conjugadas de anticorpos monoclonais e fluorocromos excitáveis por uma emissão a laser. Essas moléculas, após a excitação foto-iônica, emitem uma luz de intensidade conhecida, que pode ser captada e traduzida por um sistema eletrônico informatizado, gerando uma imagem definida. A análise é quantitativa e qualitativa para cada uma das células analisadas, e centenas de milhares de células podem ser analisadas em um único procedimento. Dessa forma, podem-se combinar diversos marcadores celulares e, assim, define-se uma subpopulação celular⁷.

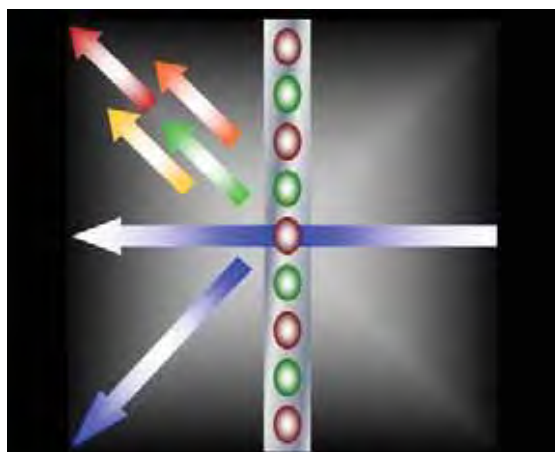


Figura 11: Esquema de citometria de fluxo, onde as flechas representam o laser e as circunferências coloridas, as células

A citometria de fluxo pode ser utilizada somente para células em suspensão, não permitindo a localização anatômica precisa. Entretanto possui a vantagem de permitir a quantificação exata do número de células em análise, bem como a identificação de várias características dessas células, incluindo a densidade das moléculas de superfície e a complexidade celular interna. A citometria também permite determinar as fases do ciclo celular em que se encontram as células, combinar a análise de mais um marcador concomitantemente e determinar o conteúdo de RNA ou de DNA celular¹⁸.

8.6.1– Marcadores de Superfície

As CTMs apresentam inúmeros marcadores imunofenotípicos. Entretanto esses marcadores não são específicos, ocorrendo em outros tipos celulares. Embora não existam anticorpos exclusivos para as CTMs, a análise com um conjunto dos mais expressos nestas células permite determinar um perfil imunofenotípico das CTMs expandidas em cultura¹⁹.

Desde as primeiras descrições das CTMs, chamava atenção a sua semelhança morfológica com os fibroblastos em cultura. Inicialmente, Friedenstein (1966) denominou as CTMs de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F). Fibroblastos, de forma geral, são células derivadas do mesênquima que sintetizam o colágeno fibrilar intersticial que providencia o suporte estrutural para os diversos tecidos e órgãos¹⁹.

Foram escolhidos marcadores positivos e negativos para o experimento. Todos estes marcadores são compostos de anticorpos monoclonais altamente específicos, purificados e marcados com fluorocromo. O quadro abaixo especifica os marcadores que foram utilizados:

Tabela 3: Marcadores de superfície de CTMs

CD90	positivo
CD45	negativo
CD34	negativo

As CTs são extremamente raras nos tecidos em que ocorrem. A sua frequência varia de 0,01% a 0,0001%. A identidade de células tão raras no meio de outras mais abundantes somente pode ser determinada com a utilização de recursos técnicos apropriados. A identificação precisa das CTs é possível utilizando marcadores de superfície que, em conjunto, refletem as características biológicas e funcionais das células de forma geral e permitem, por outro lado, a individualização de um determinado tipo celular. Marcadores de superfície são moléculas biológicas embebidas ou postas à superfície externa de todas as células. Estas moléculas funcionam como receptores celulares, permitindo que as células se comuniquem umas com as outras ou que liguem especificamente a determinadas estruturas biológicas ou celulares. Estas moléculas que refletem a função celular podem também ser utilizadas para efeito de marcação e identificação de tipos celulares particulares, incluindo as CTs²⁰. Para a identificação destas moléculas de superfície são empregadas outras moléculas acopladas com substâncias marcadoras (fluorocromos ou enzimas) que vão indicar, por cores diferentes, a ocorrência da molécula na superfície celular. Estas moléculas reveladoras são os ligantes específicos dos receptores celulares ou são anticorpos com afinidade exclusiva para estes receptores. As CTs hematopoiéticas, por exemplo, apresentam em sua superfície o marcador CD34. Para identificarmos este marcador utiliza-se um anticorpo marcado dirigido contra o CD34. As CT hematopoiéticas CD34⁺ se tornarão marcadas após reagirem com este anticorpo. De forma

semelhante, outras CTs possuem marcadores específicos que podem ser identificados. A visualização das células marcadas pode ser feita basicamente por duas metodologias: a microscopia óptica e a citometria de fluxo²⁰.

8.6.2- Protocolo de Marcação Intracelular com Anti-caspase-3

Após decorridas as 38 horas de cultura, foi utilizada a enzima tripsina para que as células aderidas se soltassem do frasco e pudesse ser verificado o índice de apoptose, testando as células com o anticorpo anti-caspase-3. Foi utilizado o kit “*PE – Conjugated Monoclonal Active Caspase-3 Antibody Apoptoses Kit*” - BD Pharmingen® 550914.

Materiais utilizados:

- a) Solução PBS pH 7,4 estéril;
- b) Solução permeabilizante com saponina (1%) da Calbiochem (1:10);
- c) Anticorpo monoclonal de coelho anti-caspase-3 ativo conjugado com PE;

Procedimentos:

- a) Lavar as células com 1 mL de PBS (2400rpm por 5 minutos);
- b) Ressuspender o pellet celular em 100µL da solução de permeabilização;
- c) Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
- d) Lavar novamente com PBS;
- e) Ressuspender o pellet em 20µL do anticorpo e 100µL da solução de permeabilização;
- f) Incubar por 45 minutos no escuro a temperatura ambiente.
- g) Lavar com PBS;
- h) Ressuspender em 0,5mL de PBS e ler por citometria de fluxo.

9 - Resultados e Discussão

Oito fragmentos de pele de diferentes pacientes foram processados para a padronização da obtenção das CTM e do protocolo de cultura. Destes segmentos foram separadas as diferentes camadas da pele: tecido adiposo, derme e epiderme. O tecido adiposo foi utilizado para este projeto e a derme e epiderme para demais projetos em andamento no mesmo laboratório. A figura abaixo representa a dissecação das diferentes camadas do tecido para posterior isolamento e amplificação das CTMs (Figura 12).



Figura 12: Isolamento do tecido adiposo de pele de descarte consentido

Do tecido adiposo obtido, 1 grama foi isolado e dissociado pela enzima collagenase conforme descrito. Desta amostra a quantidade média de células obtidas foi de $2,4 \times 10^3$ células/mm³. Após confirmação de que a viabilidade era $\geq 75\%$ as células foram plaqueadas para amplificação em meio de cultura DMEM F-12. As amostras foram observadas por microscopia invertida em contraste de fase, diariamente para se observar a confluência das mesmas. As CTM apresentaram características típicas como aderência ao plástico evidenciada na figura 13.



Figura 13: Fotomicrografia em microscopia invertida, contraste de fase, evidenciando a aderências das CTMs. Em A, B e C aumento de 5X, 10X e 20X respectivamente.

Nos primeiros experimentos houve a intercorrência da contaminação por levedura que levou à perda do protocolo, tendo sido necessário o reinício do mesmo. A figura 14 representa fotos dos primeiros ensaios onde se observam células aderidas recobertas por leveduras. Desde que houve a introdução dos antibióticos nos meios de cultura que um dos maiores problemas foi equacionado, porém jamais eliminados: a contaminação. Esta contaminação pode vir do próprio espécime, do material, dos meios utilizados e da manipulação indevida²¹. Levando-se em consideração o uso de material humano proveniente de cirurgia, e em especial, fragmento de pele, o controle da contaminação foi um dos problemas enfrentados neste trabalho. Portanto o maior empecilho foi a contaminação por levedura que foi identificado em 3 das oito amostras processadas. Após a adesão inicial, com aspecto fibroblastóide, foram evidenciadas formações brilhantes, em formas de cachos, confirmadas como leveduras. Com o aumento da contaminação, o sofrimento celular tornou-se visível. As células ficaram intumescidas, com citoplasma dilatado por metabólitos indesejáveis secretados pelo contaminante até a morte da mesma. Na figura 14, observa-se nos diferentes aumentos: 5X (A) CTMs aderidas no fundo do frasco e as leveduras, como pequenas esferas brilhantes, não aderidas, mas formando cachos ou correntes. Em C, detalhe em 20X onde a CTM possui seu citoplasma extremamente edemaciado, e o aspecto de sofrimento celular é evidenciado.

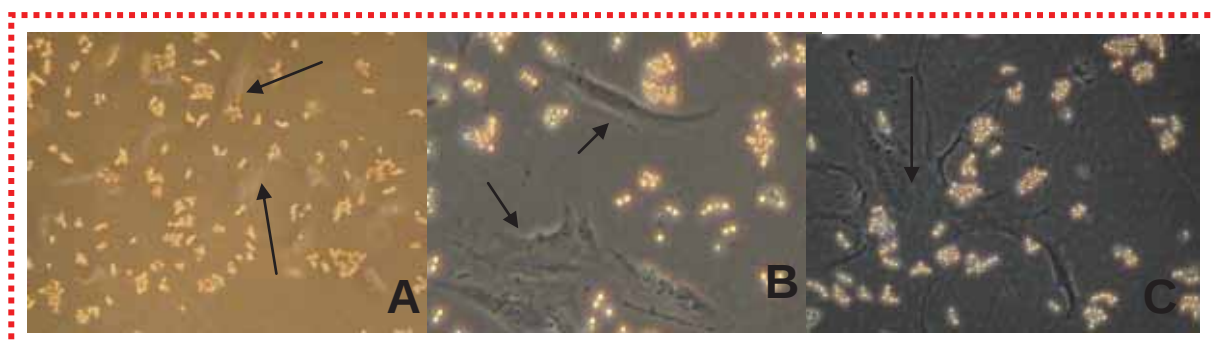


Figura 14: Fotomicrografia em microscopia invertida, contraste de fase, evidenciando a contaminação por levedura na cultura de CTMs aderentes. Em A, B e C aumento de 5X, 10X e 20X respectivamente.

No decorrer da expansão celular, cada passagem foi contabilizada a quantidade de células e feito o cálculo da viabilidade celular, como está demonstrado na tabela 4:

Tabela 4: Registro da contagem e viabilidade celular em cada passagem

Data	Contagem Celular Nº de células/mm ³	Viabilidade (%)
D0	2,4 x10 ³	73
D23	3,06 x10 ⁶	93
D29	2,55 x10 ⁶	98
D32	7,06 x10 ⁶	97
D36	6,87x10 ⁶	98
D41	6,31x10 ⁶	95
D43	14,41x10 ⁶	83
D47	16,2x10 ⁶	97
D53	9,73x10 ⁶	91
D77	14,13 x 10 ⁶	75

*D77 corresponde ao momento pré-plaqueamento com a córdia (em que foi realizado um pool de células, para se obter uma amostra homogênea)

Durante todo o período de amplificação das CTM em cultura, o procedimento foi monitorado por microscopia invertida em contraste de fase com auxílio de microscópio Zeiss® Axiovert 200 com sistema de foto-documentação, possibilitando o registro das imagens da confluência das células como mostra a figura 15:



Figura 15: CTM em confluência de 80% em aumento de 5x

Na primeira parte do experimento, antes de serem adicionados os extratos de córdia, foi separado uma alíquota para análise em citometria, para comprovar o perfil das células em questão são CTM. Foram analisados os perfis das células antes e após expansão em cultura. A citometria de fluxo identificou que a cultura celular foi satisfatória para a amplificação de CTMs conforme a tabela 5:

Tabela 5: Monitoramento dos marcadores de superfície de CTM por citometria de fluxo

Paciente	Marcadores pré			Marcadores pós-expansão em cultura		
	CD45	CD34	CD90	CD45	CD34	CD90
T R B C	18,32%	35,85%	9,63%	43,57%	40,38%	24,47%

As figuras 16, 17 e 18 representam em gráficos os valores citados na tabela acima:

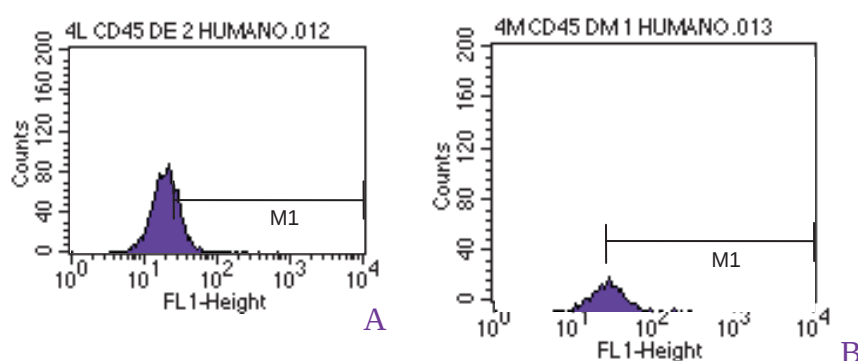


Figura 16: Gráficos das CTMs em presença de marcador CD45 antes (A) e após expansão celular (B)

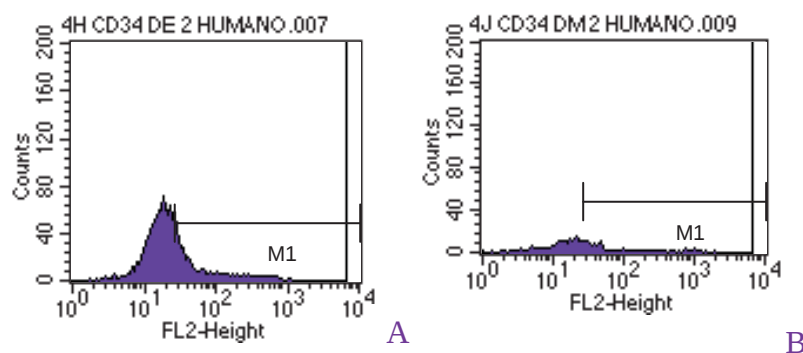


Figura 17: Gráficos das CTMs em presença de marcador CD34 antes (A) e após expansão celular (B)

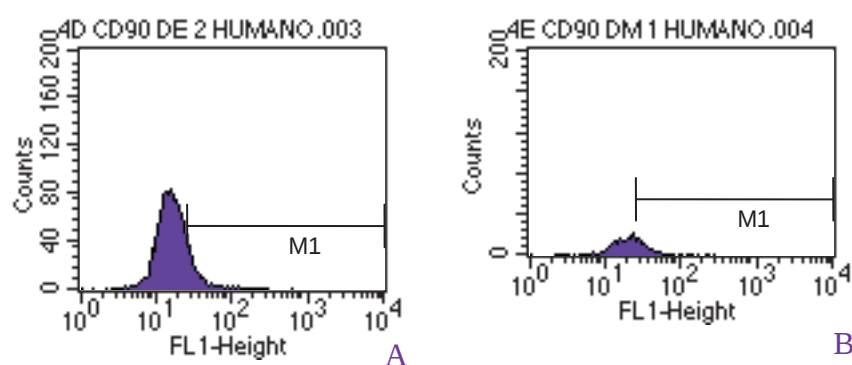


Figura 18: Gráficos das CTMs em presença de marcador CD90 antes (A) e após expansão celular (B)

Depois de ser obtida amostra suficiente de células, realizou-se o descongelamento e formação do *pool* das mesmas. O número total de células obtidas foi de $14,13 \times 10^6$ células/mm³. A viabilidade encontrada foi de 75%, considerada adequada para amostras recentemente descongeladas.

Após adicionar os diferentes extratos da córdia nas células *in vitro*, observou-se o aspecto celular e a confluência em três momentos diferentes: após 15 horas, 20 horas e 38 horas. Assim, conseguiu-se observar a progressão celular na presença de cada extrato (Tabela 6).

Tabela 6: Diferentes indicadores monitorados após plaqueamento de CTMs com a córdia, 15h, 20h e 38 h após a exposição: confluência das células; viabilidade e índice de apoptose

Frasco	Aspecto celular			VB*	IA**
	15h depois da aplicação	20h depois da aplicação	38h depois da aplicação		
CTRL	Muitas células em suspensão; 15% de adesão	Algumas células em suspensão; 30% de adesão	Algumas células em suspensão; 35% de adesão	80,60%	6,37%
EB100µg	Muitas células em suspensão; 25% de adesão	Algumas células em suspensão; 25% de adesão	Algumas células em suspensão; 35% de adesão	82,60%	22,08%
EB 50µg	Muitas células em suspensão; 30% de adesão	Muitas células em suspensão; 35% de adesão	Algumas células em suspensão; 55% de adesão	82,00%	10,20%
EB 25µg	Muitas células em suspensão; 20% de adesão	Algumas células em suspensão; 40% de adesão	Algumas células em suspensão; 45% de adesão	81,00%	9,14%
FA100µg	Menos células em suspensão; 40% de adesão	Muitas células em suspensão; 50% de adesão	Muitas células em suspensão; 55% de adesão	80,00%	13,66%
FA50µg	Menos células em suspensão; 45% de adesão	Muitas células em suspensão; 50% de adesão	Muitas células em suspensão; 55% de adesão	80,00%	10,88%
FA 25µg	Menos células em suspensão; 35% de adesão	Algumas células em suspensão; 45% de adesão	Algumas células em suspensão; 45% de adesão	85,00%	8,69%
FH100µg	Muitas células em suspensão; 25% de adesão	Muitas células em suspensão; 40% de adesão	Muitas células em suspensão; 30% de adesão	85,50%	20,76%
FH 50µg	Muitas células em suspensão; 40% de adesão	Algumas células em suspensão; 45% de adesão	Algumas células em suspensão; 45% de adesão	73,00%	20,58%
FH 25µg	Muitas células em suspensão; 45% de adesão	Algumas células em suspensão; 50% de adesão	Algumas células em suspensão; 55% de adesão	55,00%	7,93%
FE100µg	Muitas células em suspensão; 30% de adesão	Algumas células em suspensão; 35% de adesão	Muitas células em suspensão; 8% de adesão (houve regressão)	13,50%	86,36%
FE 50µg	Poucas células em suspensão; 35% de adesão	Muitas células em suspensão; 45% de adesão	Muitas células em suspensão; 10% adesão (houve regressão)	76,00%	53,85%
FE 25µg	Poucas células em suspensão; 40% de adesão	Muitas células em suspensão; 50% de adesão	Muitas células em suspensão; 35% de adesão (houve regressão)	70,00%	5,91%

- VB*= Viabilidade celular e IA**= Índice de apoptose

Seguem os registros fotográficos realizados em cada frasco no aumento de 5x em microscópio com contraste de fase e seu respectivo plot após análise de citometria de fluxo:

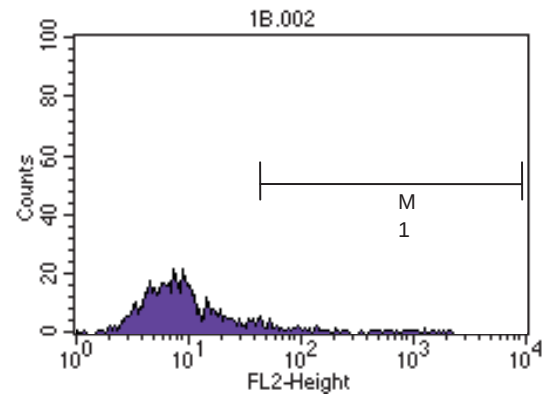
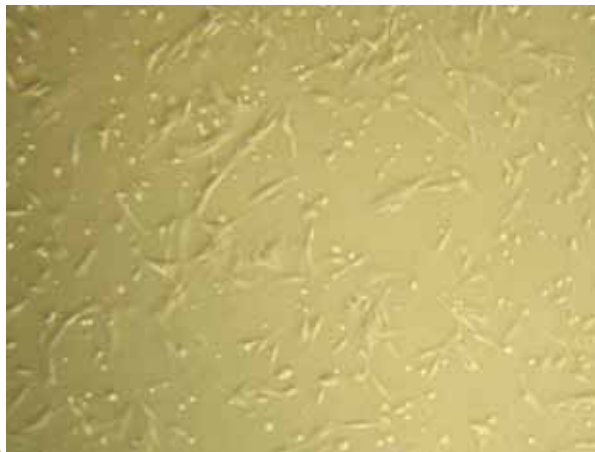


Figura 19: Controle observado no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo

Córdia na concentração de 25 μ g/mL:

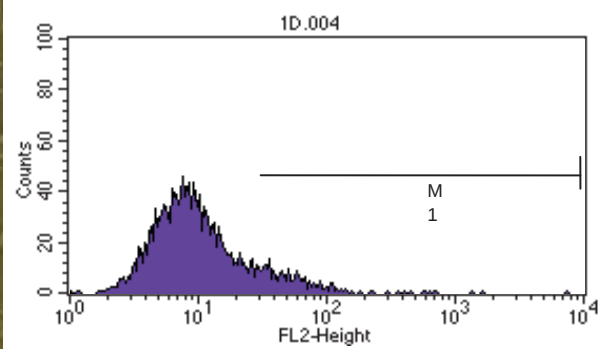
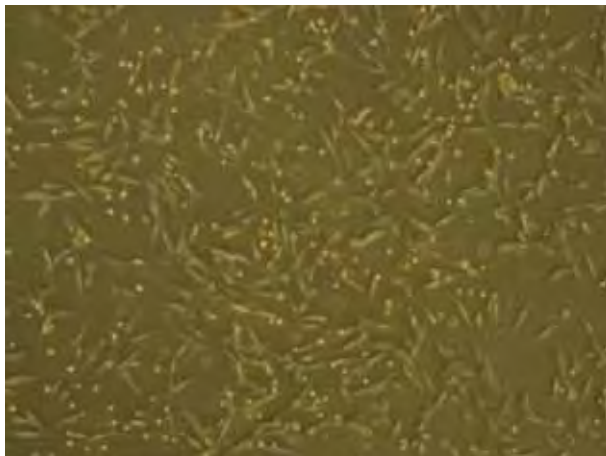


Figura 20: Extrato Bruto 25 μ g/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo

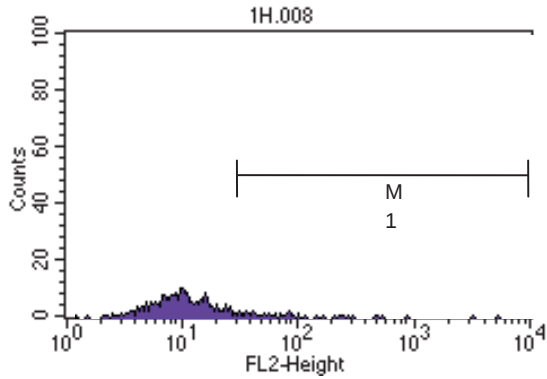
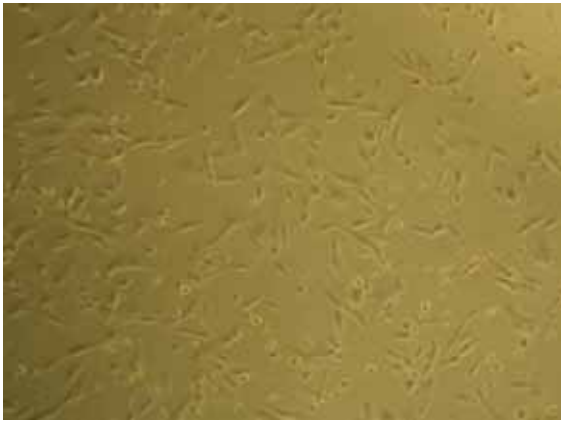


Figura 21: Fase Aquosa 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

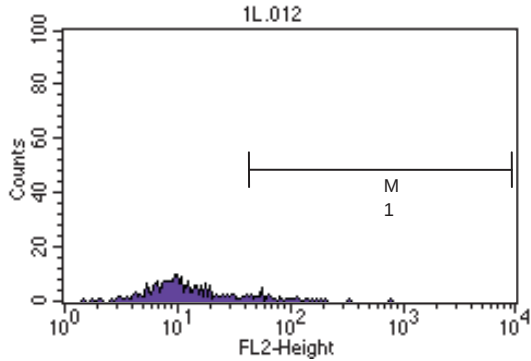


Figura 22: Fase Hexânica 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

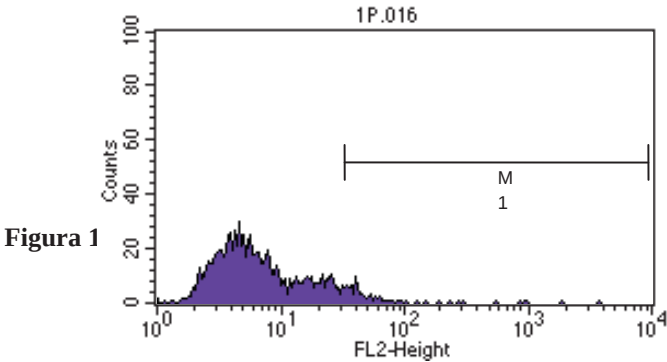


Figura 1

Figura 23: Fase Etérea 25µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de fluxo

Córdia na concentração de 50 μ g/mL:

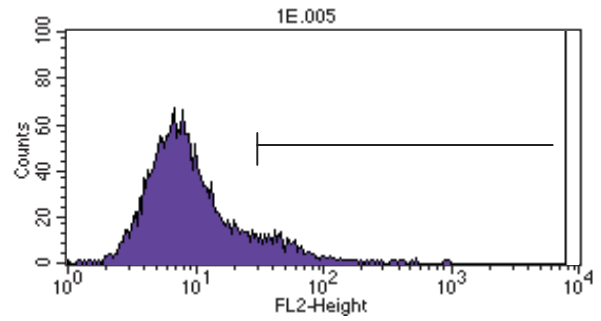
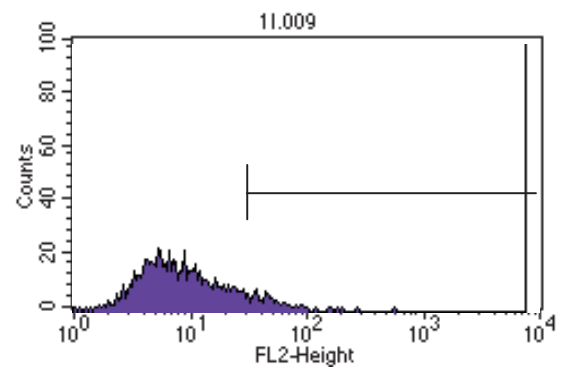
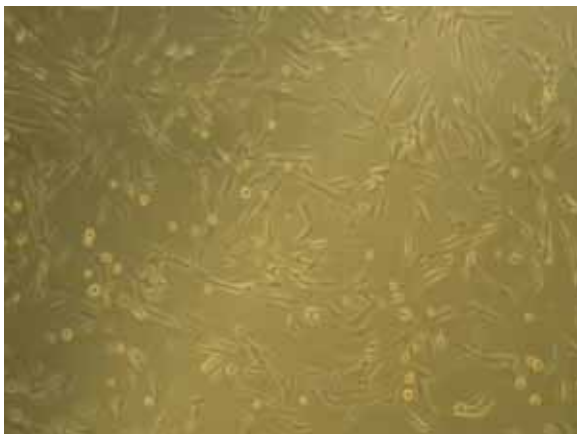


Figura 24: Extrato Bruto 50 μ g/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo



1

Figura 25: Fase Aquosa 50 μ g/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

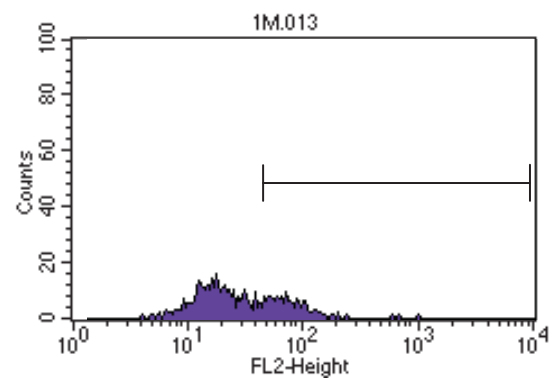
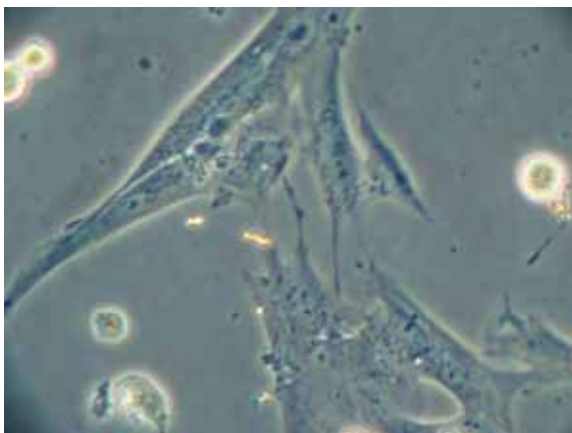


Figura 26: Fase Hexânica 50 μ g/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

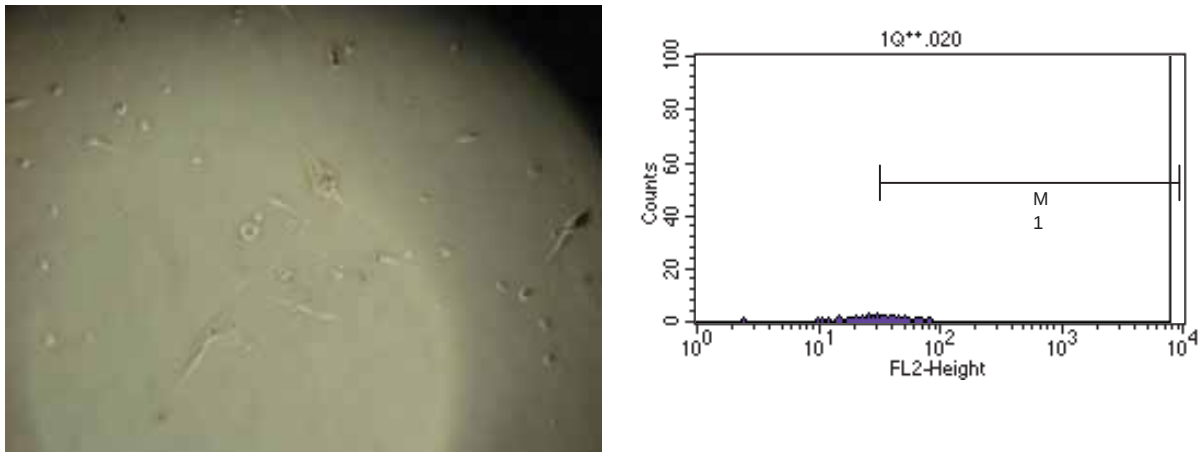


Figura 27: Fase Etérea 50µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

Córdia na concentração de 100µg/mL:

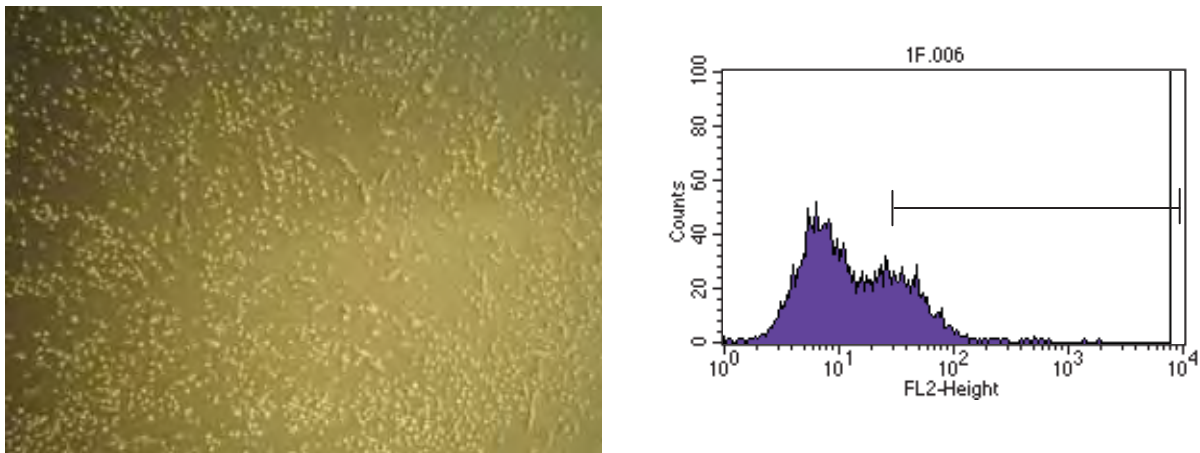


Figura 28: Extrato Bruto 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

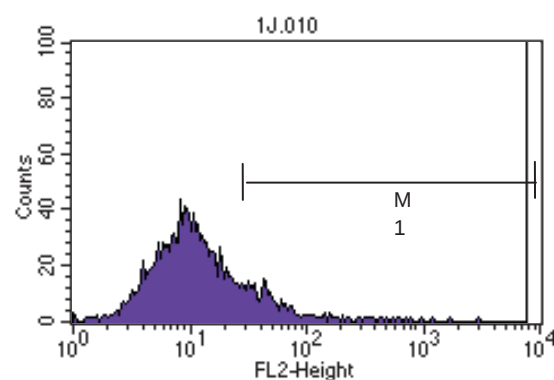


Figura 29: Fase Aquosa 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

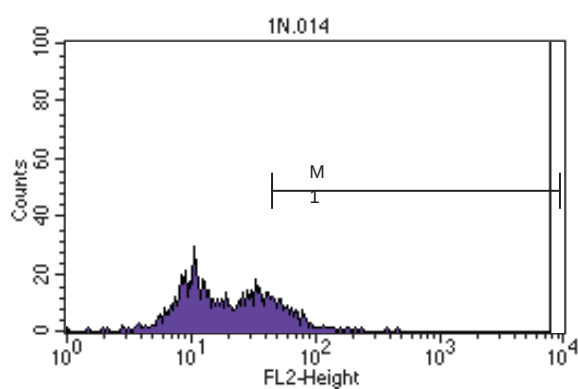


Figura 30: Fase Hexânica 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

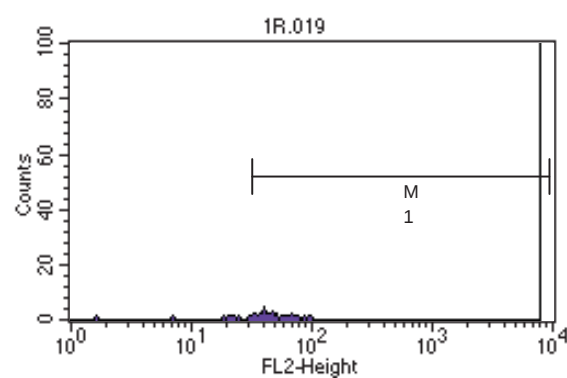


Figura 31: Fase Etérea 100µg/mL no aumento de 5x e gráfico da Citometria de Fluxo

9.1 - Análise dos resultados

O extrato de córdia na fase hexânica, na concentração de 25µg/mL, favoreceu a adesão das CTMs. Quinze horas após a exposição com a córdia, esta chegou a 45%, aumentando para 50 e 55% com 20 e 38 horas após a aplicação, respectivamente. Seu índice de apoptose foi de 7,93%. A fase aquosa na concentração de 50µg/mL teve o mesmo desempenho quanto à adesão celular em todas as observações. No entanto, a viabilidade das células na FA foi bem maior (80%) em relação à observada na FH (55%), cerca de 25% superior. Porém, o índice de apoptose da FA foi 2,95% superior ao correspondente da FH, o que pode indicar que, ao longo do tempo, a concentração de FA 50µg/mL possa ser indutora da apoptose.

Este fato é reforçado quando se compara a amostra 7 com a 10 (FA 25µg/mL e FH 25µg/mL): 15 horas após o plaqueamento, o desempenho das células que receberam FA foi menor, indicando que esta concentração induziu menor quantidade de células à adesão. Com o passar do tempo, 20 horas após a exposição com o extrato, a adesão foi de 45% para as que receberam FA e 50% para as que receberam FH. Esta diferença se manteve mesmo 38 horas depois da aplicação, apontando para a possibilidade de que uma concentração entre 25 e 50µg/mL da FA possa equilibrar esses resultados (induzir menos apoptose e possibilitar maior adesão celular).

O indicador marcante favorável para a fase aquosa foi a viabilidade que, na FA 25µg/mL, foi de 85% contra 55% da FH na mesma concentração. A diferença do índice de apoptose entre esses dois extratos é menor que 1%.

Podemos observar também que a FE, não desempenhou um bom resultado nas concentrações de 100 e 50µg/mL, tanto no fator viabilidade quanto índice de apoptose. A exceção é a concentração de 25µg/mL que teve uma viabilidade próxima à anterior ao plaqueamento com a córdia e seu índice de apoptose foi menor que o do controle. Ao analisarmos os gráficos abaixo é possível visualizar melhor:

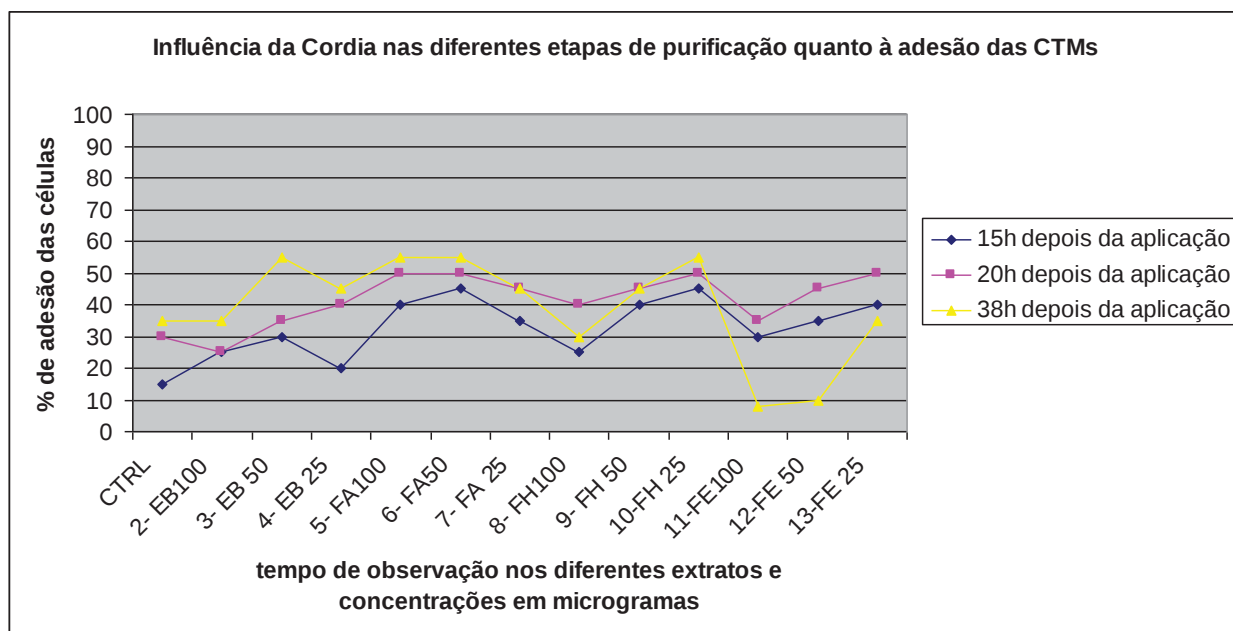


Gráfico 1: Observação das CTMs com os diferentes extratos de córdia quanto a adesão celular nos tempos de 15, 20 e 38 horas

Ao analisar o gráfico 1, pode-se observar os extratos que tiveram desempenho inferior em relação ao controle: FE 100 μ g/mL e FE 50 μ g/mL, o que indica que esses extratos não favorecem a adesão celular. Aqueles que tiveram o melhor resultado em todos os momentos foram: FA 100 μ g/mL, FA 50 μ g/mL, FH 25 μ g/mL e FE 25 μ g/mL, sendo que FA 50 μ g/mL e FH 25 μ g/mL tiveram ação semelhante, portanto, favorecem a adesão celular na mesma intensidade. Observando a adesão celular em EB, FA e FH, conclui-se que estes, nas três concentrações, induzem a adesão de CTM.

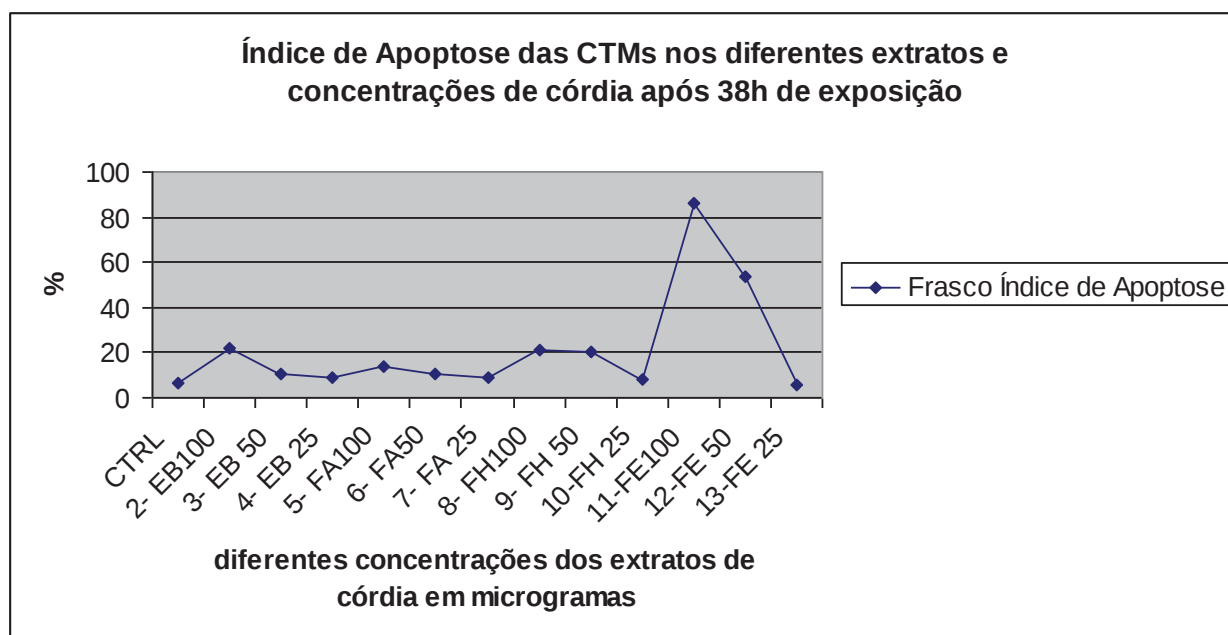


Gráfico 2: Análise da Citometria de Fluxo dos Índices de apoptose das CTMs nos diferentes extratos

O gráfico 2 demonstra que os extratos FE 100µg/mL e FE 50µg/mL tiveram os maiores índices de apoptose o que confirma o resultado da viabilidade visto anteriormente. Houve outros extratos que tiveram resultado superior ao controle: EB 100µg/mL, FH 100µg/mL e FH 50µg/mL, fato que pode indicar algum tipo de toxicidade celular.

FA 50µg/mL e FH 25µg/mL também apresentaram resultados similares em relação à apoptose, o que reforça que estes induzem as células de forma semelhante. Os demais extratos tiveram desempenho semelhante ao controle, ou seja, EB 50µg/mL, EB 25µg/mL, as três concentrações de FA, FH 25µg/mL e FE 25µg/mL não induzem à morte celular.

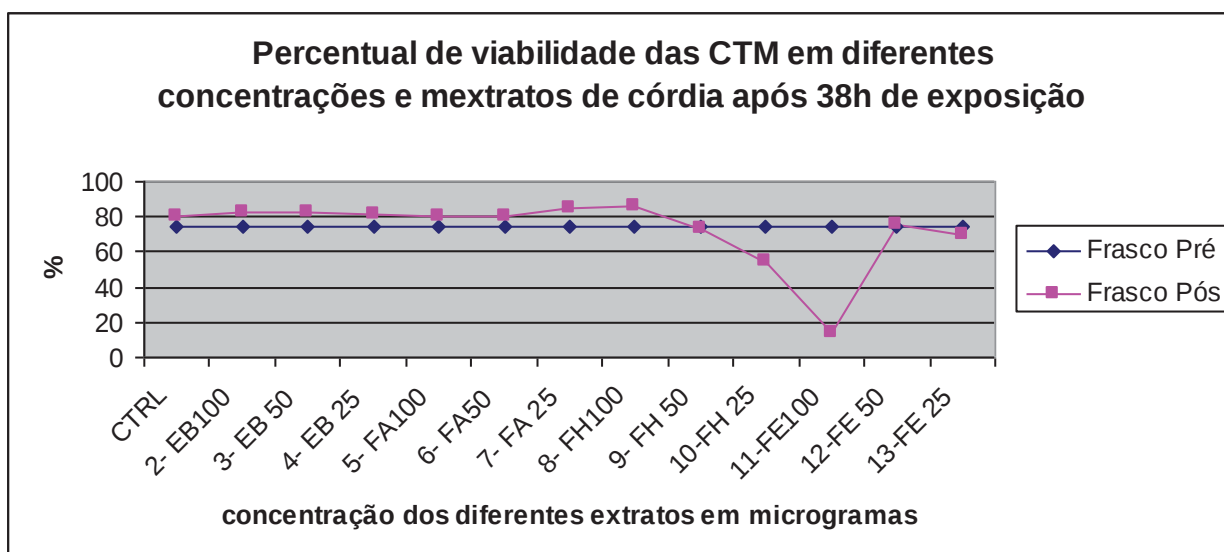


Gráfico 3: Análise da viabilidade celular das CTMs expostas aos diferentes extratos de córdia antes a após plaqueamento

A viabilidade celular pré plaqueamento foi a mesma (75%), pois as células faziam parte da uma mesma amostra. O cálculo da viabilidade após o plaqueamento foi realizado anteriormente à análise da citometria de fluxo.

Segundo o gráfico 3 observou-se que, novamente, o FE 100µg/mL apresentou um resultado insatisfatório, com uma viabilidade muito inferior ao controle. O FH 25µg/mL também apresentou uma viabilidade baixa, apesar de ter apresentado aderência e índice de apoptose satisfatórios, portanto, esse último resultado demonstra que talvez o seu uso não seja adequado. Por outro lado, o FE 50µg/mL que, anteriormente, apresentou um desempenho ruim na aderência e no índice de apoptose, obteve uma viabilidade semelhante ao controle.

FA 25µg/mL e FH 100µg/mL obtiveram um resultado melhor que o do controle e os demais extratos tiveram um desempenho semelhante.

10- Conclusões

Após análise dos resultados, foi possível concluir que FE 100µg/mL e FE 50µg/mL, não favorecem a adesão celular e aumentam o índice de apoptose, portanto, tais extratos não são adequados para as CTMs. FE 100µg/mL apresentou uma viabilidade muito inferior ao controle o que confirma a afirmação anterior e, apesar de FE 50µg/mL apresentar uma viabilidade semelhante ao do controle, isto não pode confirmar a sua utilidade. Já, FA 50µg/mL e FH 25µg/mL favorecem a adesão celular na mesma intensidade.

Em relação ao índice de apoptose, EB 100µg/mL, FH 100µg/mL e FH 50µg/mL, que tiveram seus resultados superiores ao controle, podem indicar algum tipo de toxicidade celular.

O extrato FH 25µg/mL apresentou uma viabilidade baixa, portanto, apesar de ter apresentado aderência e índice de apoptose aceitáveis, seu uso não é adequado. FA 25µg/mL obteve aderência e índice de apoptose satisfatórios e sua viabilidade foi superior ao controle. O extrato FH 100µg/mL também obteve uma aderência boa e viabilidade superior ao controle, porém, seu índice de apoptose foi maior do que o controle.

Os extratos que obtiveram os melhores resultados, portanto, foram os da FA em todas as concentrações e FE somente na concentração de 25µg/mL. Os extratos de FE nas demais concentrações demonstraram um desempenho insatisfatório, o que nos indica que, possivelmente, uma concentração entre 25 e 50µg/mL seja o limite entre bom desempenho as células e toxicidade. Portanto, mais testes terão que ser realizados para demonstrar qual é essa concentração limite e também para comprovar qual concentração de FA é realmente a melhor a ser utilizada.

O experimento demonstrou por fim que é possível ter um resultado significativo utilizando a cultura de células-tronco mesenquimais humanas em ensaios de tolerância a fitoterápicos, podendo ser viáveis para ensaios preliminares nesses estudos. Essa ferramenta permite minimizar a necessidade de ampla experimentação em animais nobres, um dos principais temas discutidos atualmente em pesquisa.

11- Referências:

1. BRUNNER & SUDDARTH. **Tratado de enfermagem médico-cirúrgica**. 9º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.v.1e 3.
2. ABBADE, L.P.F. **Úlcera venosa do membro inferior: avaliação clínica e pelo mapeamento dúplex venoso**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia. Área de concentração em isquemia, reperfusão e trombose, como requisito para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia. Botucatu – SP, 2006.
3. LESSA, I. **O adulto brasileiro e as doenças da modernidade. Epidemiologia das doenças crônicas não transmissíveis**. São Paulo: Abrasco, Editora Hucitec, 1998.
4. ARREBOLA, M.R.B. ; PETERLIN, M.F.; BASTOS, D. H. M.; RODRIGUES, R. F. de O.;CARVALHO, P. de O. **Estudo dos componentes lipídicos das sementes de três espécies do gênero Cordia L. (Boraginaceae)**. Revista Brasileira de Farmacognosia, V. 14, n. 1, p.57-65, 2004.
5. SILVA, C.J.; BASTOS, J.K.; TAKAHASHI, C.S. **Evaluation of the genotoxic effects of crude extracts of Cordia ecalyculata and Echinodorus grandiflorus**. Journal of Ethnopharmacology, 2009.
6. MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L.R._**Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos a Terapia Gênica**, Ed. Rocca, 1a Edição, 2008, p.466-468, cap20
7. MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L.R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos a Terapia Gênica**, Ed. Rocca, 1a Edição, 2008, p.468-469,cap.20

8. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina**. Ed. Atheneu, 2006, p. 7 e 8 cap.1

9. MIYAZAKI, T.; KITAGAWA, Y.; TORIYAMA, K.; KOBORI, M.; TORII, SHUHEI. **Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potencial differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue**. *Differentiation* (2005) 73;69-78

10. MORAES, A.M., AUGUSTO, E.F.P., CASTILHO, L.R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais, de Biofármacos a Terapia Gênica**, Ed. Rocca, 1a Edição, 2008, p.2-6, cap. 1

11. SOUTO, L.R.M.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M.L.; KRAEMER, M.H.S.; PUZZI, M.B. **Model for human skin reconstructed *in vitro* composed of associated dermis and epidermis**. *São Paulo Med J*. 2006;124(2):71-6.

12. KOTHAKOTA, S *et al*: **Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis**. *Science* 278, 294-298, 1997

13. KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**, Ed.Saunders Elsevier, 8ª Edição, p.6-22, cap.1

14. COHEN, G.M. **Caspases: the executioners of apoptosis**. *Biochem.J.* v. 326, p.1-16, 1997

15. ALNEMRI, E.S.; LIVINGSTON, D.J.; NICHOLSON, D.W.; SALVESEN, G.; THORNBERRY, N.A.; WONG, W.W.; YNAM, J. **Human ICE/CED – 3 Protease Nomenclature** *Cell* v.87, p.171, 1996

16. DEVERAUX, Q.Q.L.; REED, J.C. **IAP family proteins – suppressors of apoptosis.** Gene and Development, v. 13, p.239, 1999
17. Technical Data Sheet: **PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit**, BD Pharmingen
18. FRASER, J.K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; HEDRICK, H. **Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology.** Trends in Biotechnology, vol. 24, no. 4, 2006.
19. RODBELL, M. **Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue.** The Journal Of Biological Chemist, Vol. 239, No. 3, March 1964.
20. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina.** Ed. Atheneu, 2006, p.87-88, cap. 6
21. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina.** Ed. Atheneu, 2006, p.37-39, cap. 3.
22. ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina.** Ed. Atheneu, 2006, p.87-88, cap. 6.
23. PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células.** Ed. Guanabara Koogan, 2005, cap 1 e 2, p. 3-8