UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - HEMOCENTRO

# MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS-TRONCO: ESTUDO DE REAÇÃO CRUZADA INTER-ESPÉCIES

Juliana Ravelli Baldassarre Martins

Botucatu
2010

**Juliana Ravelli Baldassarre Martins**

# MARCADORES DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS-TRONCO: ESTUDO DE REAÇÃO CRUZADA INTER-ESPÉCIES

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biomédicas

Orientadora: Profa. Dra. Elenice Deffune

Co-orientador: Ms. Andrei Moroz

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*

Martins, Juliana Ravelli Baldassarre.
Marcadores de superfície de Células-tronco : estudo de reação cruzada inter-espécies / Juliana Ravelli Baldassarre Martins. - Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010
Orientadora: Elenice Deffune
Capes: 20601000

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Medula óssea – Estudos experimentais. 3. Tecido adiposo.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; Marcadores de superfície celular; Medicina regenerativa; Medula óssea; Tecido adiposo.

# *Dedicatória*

Dedico este trabalho, com muito carinho, aos meus pais
Cláudio Manoel Martins dos Santos e
Ozília Baldassarre dos Santos, e ao
meu irmão, Gustavo Ravelli
Baldassarre Martins

Esta monografia também é dedicada aos pacientes
e animais que são os autores principais deste
trabalho. A eles, meu eterno agradecimento.

# *Agradecimentos*

Agradeço a Deus pela oportunidade de fazer parte da equipe que desenvolveu este trabalho, pela realização do meu grande sonho de estudar no curso universitário de minha escolha e pelo privilégio de poder ter conhecido pessoas maravilhosas ao longo de minha vida que tanto me ajudaram.

Aos meus pais, Cláudio Manoel Martins dos Santos e Ozília Baldassarre dos Santos, e ao meu irmão, Gustavo Ravelli Baldassarre Martins, pessoas a quem amo tanto que dificulta a expressão de meus sentimentos de amor e gratidão. Obrigada pelo apoio na carreira que escolhi e pelo amor e cuidados oferecidos ao longo de toda a minha vida.

À minha mãe, a quem devo meu eterno agradecimento pelo carinho e apoio em todos os momentos de minha vida, inclusive durante este trabalho. Obrigada, mãe, por me ouvir todos os dias, por me ajudar a resolver os problemas que precisei enfrentar e por ficar feliz pelo simples motivo de que eu estava feliz com alguma conquista.

Ao meu pai, pelo apoio em minhas escolhas e por todo o cuidado que me ofereceu. Agradeço pela preocupação constante em todos os momentos e pelas conversas e conselhos valiosos.

Ao meu irmão, meu grande exemplo de pessoa generosa e honesta, por ser uma das melhores pessoas que conheço. Muito obrigada pelo apoio, conversas, opiniões que enriqueceram este trabalho e por me ajudar no momento em que mais precisei.

À minha orientadora, Profª. Draª. Elenice Deffune, exemplo de pessoa generosa e consciente de seu papel na sociedade, por me receber tão bem em seu Laboratório e por confiar em mim para a realização deste trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, os quais levarei sempre comigo, e pelos conselhos que serão muito importantes tanto para minha vida profissional quanto pessoal.

À minha querida amiga Prof$^{a}$. Dr$^{a}$. Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves, sem a qual este trabalho não teria se concretizado. Obrigada por me ajudar em todos os períodos e compartilhar comigo momentos de alegria e tristeza. Agradeço por estar ao meu lado sempre e por conseguir me acalmar apenas com o olhar. Palavras não são suficientes para eu expressar todo respeito, carinho e admiração que sinto por você.

À Prof$^{a}$. Dr$^{a}$. Rosana Rossi-Ferreira, por ser uma pessoa de grande coração e por deixar qualquer ambiente mais alegre pela sua presença. Agradeço pelo apoio fundamental neste trabalho, bem como os conselhos e conversas. Gostaria também de expressar meu carinho e admiração pela sua generosidade e competência.

À Prof$^{a}$. Dr$^{a}$. Maria Dalva Cesário que aceitou tão gentilmente ser minha supervisora no I.B. e que sempre me ajudou e me incentivou ao longo destes anos de Faculdade.

Ao meu co-orientador Andrei Moroz, pela ajuda e ensinamentos fundamentais que me permitiram desenvolver este trabalho.

À minha querida amiga Paula Scatena (“Baya”), por ser minha grande companheira de Faculdade, por estar sempre ao meu lado, por sonhar comigo coisas que não teriam acontecido sem a sua ajuda. Agradeço por “salvar a minha vida todos os dias” e por me deixar feliz e tranquila pela simples presença.

À minha querida amiga Larissa Mayumi Ribeiro (“Fass Mal”), a quem tive o grande privilégio de conhecer e conviver, por estar ao meu lado durante os anos de Faculdade, me ajudando em tudo o que precisei. Agradeço também pelas refeições que fizemos juntas e pelas conversas mais que agradáveis.

Ao amigo Henrique de Souza Vieira pela grande ajuda na cultura das células e por sempre me fazer sorrir com o seu bom humor de todas as horas. Obrigada por ser uma pessoa tão especial e por fazer dos dias de trabalho menos cansativos com a sua ajuda e companhia agradável.

Ao meu namorado Roberto da Silva Mota, por ser o meu grande incentivador na escolha de minha profissão e pelo importante apoio neste trabalho. Agradeço a você, Beto, por todas as vezes em que se preocupou comigo, por estar sempre ao meu lado mesmo com a distância entre nós, pelo carinho e amor nas horas em que mais precisei.

À minha amiga Suely, por sempre me incentivar a alcançar meus objetivos e a quem mesmo não podendo mais ver e conversar, está todos os dias em meus pensamentos e no meu coração dando forças para eu seguir em busca de meus sonhos.

À Profª. Drª. Norma Gerusa Santos Mota, por ser a grande responsável pela escolha da minha carreira. Agradeço pela ajuda ao longo desses anos de Faculdade e pela colaboração neste trabalho com suas opiniões de grande importância.

À Thaiane Cristine Evaristo, minha grande companheira de trabalho. Obrigada pela importante colaboração na cultura das células, pelos valiosos ensinamentos, pelas conversas, pelas risadas e pelo bom humor contagiante. Foi um grande presente conviver com uma pessoa tão honesta, generosa, dedicada e competente como você. Muito, muito obrigada!

Ao Armando de Mattos Carvalho, por me ajudar sempre com tanta gentileza em todos os momentos que precisei. Agradeço muito pela ajuda fundamental na coleta, processamento e cultura celular dos tecidos adiposos e medulas ósseas para este trabalho. Gostaria de agradecer também pelo incentivo, por me deixar aprender com o seu trabalho e por ser uma pessoa tão educada e generosa, o que fez com que os dias de trabalho se tornassem mais agradáveis.

À Ana Lúcia Yamada, por permitir gentilmente que eu utilizasse as suas amostras de cavalo, pelas coletas, e por permitir que eu acompanhasse seu trabalho. Muito obrigada pelas conversas e ensinamentos. É um grande prazer conhecer e conviver com pessoas como você!

À Patrícia Gomes, pela ajuda fundamental nas coletas de amostras de cavalo e pelos ensinamentos que tanto me ajudaram.

À Juliane de Campos Inácio, que nos momentos difíceis sempre teve uma palavra amiga e que soube como ninguém me animar quando mais precisei. Agradeço pela ajuda fundamental neste trabalho, por me ajudar sempre que necessário e por ser uma pessoa em quem pude confiar.

À Aline Garcia Aun, pela grande ajuda desde o momento em que entrei no Laboratório, por me ensinar grande parte do que sei e por muitas vezes deixar de fazer seu trabalho para me ajudar. Muito obrigada pelas diversas vezes em que perguntou se eu precisava de ajuda, por ser uma pessoa tão generosa e sincera, a quem admiro muito pelo esforço e dedicação ao trabalho e à família.

À Flávia Ribeiro, por me ajudar sempre e por alegrar o ambiente com a sua presença. Muito obrigada pela ajuda com as amostras que precisei para a realização dos testes com as células e por sempre me oferecer ajuda.

À Regina Avelina (“Taga”), pelas muitas vezes que me esperou para ir embora, pelas caronas que tanto me ajudaram e pela ajuda na cultura com as células. Agradeço muito também pelos ensinamentos, conversas e risadas que faziam com que os dias fossem mais felizes.

À Josy C. Vicentini de Oliveira pelo auxílio fundamental neste trabalho, pelas coletas de amostras dos camundongos, pelas conversas, conselhos, ensinamentos, e por me fazer companhia no laboratório nos horários mais estranhos.

Ao Woner e ao Ângelo, exemplos de pessoas generosas, prestativas e inteligentes que tanto contribuem para o bom funcionamento do Laboratório.

Ao Gabriel Alves pelas vezes que me acompanhou nos trabalhos, pelas conversas agradáveis e por ser uma pessoa de coração puro que tanto me ajudou.

À Mariele Gobo, pessoa que gostei logo que conheci pela paciência, preocupação e dedicação aos seus pacientes, além de ser uma pessoa tão generosa e simpática. Obrigada pelas conversas e companhia agradáveis.

À Priscila Murador por me receber tão bem no Laboratório, pelas conversas, risadas e pela companhia dentro e fora do Laboratório. Pri, muito obrigada por ser uma das pessoas mais legais que conheci e por sempre me ajudar e aconselhar quando precisei.

Ao Renato Colenci pela importante ajuda na análise estatística e contribuições que muito ajudaram a melhorar este trabalho.

À querida Ondina, por tornar os ambientes mais alegres, por sempre nos ajudar de maneira tão gentil e por cuidar tantas vezes da nossa alimentação. Muito obrigada por tudo!

À Néia, Lilian e toda a equipe da limpeza que sempre deixaram os laboratórios em ótimas condições para o nosso trabalho.

Aos pacientes da Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu por nos receber sempre tão bem e por colaborar gentilmente com este trabalho.

À enfermeira Simone da enfermaria da Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu por sempre nos ajudar de maneira prestativa e nos informar sobre as datas de cirurgia.

Ao Dr. Aristides Palhares do Departamento de Cirurgia Plástica da Faculdade de Medicina de Botucatu pela colaboração fundamental com as amostras de tecido adiposo necessárias para a realização deste trabalho e por nos receber de maneira tão gentil no Centro Cirúrgico.

Ao Leandro, sempre tão gentil e prestativo em todos os momentos que precisei.

À minha querida Nora Jeane Santos Silva, pessoa responsável pela minha entrada na Faculdade. Obrigada, Nora, por incentivar meus estudos e por ser um anjo em minha vida que me permitiu alcançar meu sonho. É um privilégio poder conhecer alguém tão especial e admirável como você. Muito obrigada, de coração.

Ao Carlinhos do Biotério de Roedores e ao Ednelson do Biotério do Departamento da Ortopedia pelas coletas de tecido adiposo e medula óssea dos coelhos. Muito obrigada por nos receber tão bem e por nos oferecer ajuda sempre.

Ao grupo PET-CBB do Instituto de Biociências de Botucatu, em especial à nossa tutora Prof$^{a.}$ Dr$^{a}$. Cláudia Helena Pellizzon, por me fazer crescer e me incentivar em todos os aspectos nestes quase 3 anos de convivência. Muito obrigada a todo o grupo por fazer parte da minha vida e pelo crescimento que tivemos juntos.

À Cléo, por me fazer sorrir apenas com a sua presença e por ser uma pessoa tão iluminada que contagia quem está por perto.

À Regiane Marques Castro Olimpo que sempre com um sorriso simpático tornava o ambiente de trabalho mais agradável. Agradeço por ser uma pessoa tão generosa que sempre me ofereceu ajuda e muito contribuiu na cultura das células.

À Márjorie de Assis Golim do Laboratório de Citometria de Fluxo pela importante colaboração neste trabalho e por estar sempre disponível a nos ajudar.

À Michele Janegitz Acorci Valério e à Aline Del`Vescovo pela ajuda fundamental neste trabalho no tratamento das células para citometria de fluxo e análise dos resultados.

Aos animais (coelhos, camundongos, macacos e éguas) que contribuíram de forma fundamental neste trabalho. Dedico a eles todo meu carinho e respeito.

Tente!

E não diga

Que a vitória está perdida.

Se é de batalhas

Que se vive a vida

Tente outra vez!...

Raul Seixas

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidade de diferenciação das células-tronco..... 21

Figura 2 – Diferenciação das células-tronco mesenquimais.....23

Figura 3 – Diferenciação das células-tronco hemetopoiéticas.....25

Figura 4 – Microscópio invertido com contraste de fase Axiovert 200 – Zeiss® .....31

Figura 5 – Dissociação mecânica com *cell scraper*.....32

Figura 6 – Lavagem do tecido adiposo humano..... 33

Figura 7 – Detalhe da abertura da pele para retirada do tecido adiposo de cavalo.....34

Figura 8 – Camundongo Balb/c utilizado na experimentação.....36

Figura 9 – Aspecto do macaco-prego *Cebus apella*.....37

Figura 10 – Aspecto do equipamento de citometria de fluxo, modelo FACSCalibur BD® .....38

Figura 11 – CTMs de tecido adiposo de coelho obtidas por DE após 7 dias de cultura.....44

Figura 12 – CTMs de tecido adiposo de coelho obtidas por DM após 7 dias de cultura.....45

Figura 13 - Gráfico do desempenho da % de confluência das amostras 1, 2, 3 e 4 nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento.....46

Figura 13A – Gráfico do desempenho da % de confluência das amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento.....47

Figura 14 - CTMs de tecido adiposo humano processadas por DM 15 dias após o plaqueamento.....49

Figura 15 – CTMs de tecido adiposo humano processadas por DE 15 dias após o plaqueamento..... 50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Marcadores de superfície positivos e negativos de CTMs..... 39

Quadro 2 – Marcadores utilizados para cada espécie. MO: Medula Óssea; TA: Tecido Adiposo..... 39

Quadro 3 – Desempenho dos métodos DM e DE nos dias (D) 7, 9, 11, 13 e 15 de observação..... 48

Quadro 4 – Desempenho dos diferentes marcadores analisados por citometria de fluxo em amostras de medula óssea ou tecido adiposo dissociado meanicamente ou por enzimas..... 54

Quadro 5 – Média de fluorescência do anticorpo A69 por citometria de fluxo em amostras de medula óssea ou tecido adiposo dissociado mecanicamente ou por enzima..... 56

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Desempenho do percentual de confluência comparando as técnicas DM e DE em diferentes dias de observação após plaqueamento..... 48

Gráfico 2 – Média das porcentagens de confluência das células obtidas por digestão enzimática e dissociação mecânica nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 dias após plaqueamento..... 51

Gráfico 3 – Porcentagem da confluência das células obtidas por DE e DM nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento..... 52

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO
   1.1 Terapia Celular..... 20
   1.2 Células-Tronco e Cultura Celular..... 20
   1.3 Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)..... 22
   1.4 Medula Óssea..... 24
   1.5 Tecido Adiposo..... 25
   1.6 Medicina Regenerativa em Animais..... 26
2. JUSTIFICATIVA..... 28
3. OBJETIVOS
   3.1 Objetivo Geral..... 29
   3.2 Objetivos Específicos..... 29
4. MATERIAL E MÉTODOS
   4.1 Técnicas de Obtenção de CTMs do Tecido Adiposo..... 30
      4.1.1 Digestão Enzimática (DE)..... 30
      4.1.2 Dissociação Mecânica (DM)..... 31
   4.2 Obtenção de Tecido Adiposo Humano..... 32
   4.3 Obtenção de Tecido Adiposo dos Animais..... 33
      4.3.1 Cavalos..... 33
      4.3.2 Coelhos..... 34
   4.4 Comparação dos Métodos de Obtenção de CTMs de Tecido Adiposo: Dissociação Mecânica *versus* Digestão Enzimática..... 34
   4.5 Obtenção de Medula Óssea de Animais..... 35
      4.5.1 Camundongos..... 35
      4.5.2 Cavalos..... 36
      4.5.3 Coelhos..... 36
      4.5.4 Macacos..... 37
   4.6 Citometria de Fluxo..... 38
   4.7 Teste do Cometa..... 39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1 Morfologia das Células em Cultura – Coelhos.....44
5.1.2 Células Obtidas Pelo Método DE..... 44
5.1.3 Células Obtidas Pelo Método DM.....45
5.1.4 Comparação dos Métodos DE e DM.....45
5.2 Morfologia das Células em Cultura – Humanos.....48
5.3 Teste do Cometa.....50
5.4 Análise Estatística.....51
5.5 Expressão Fenotípica das Células das Diferentes Espécies Obtidas por Citometria de Fluxo.....52
6. CONCLUSÕES.....57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....58

# RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas multipotentes com morfologia fibroblastóide e aderentes ao plástico. Além disso, podem ser obtidas de diferentes fontes. Além da medula óssea, estas células são retiradas do sangue de cordão umbilical, da veia umbilical, da veia safena, do sangue periférico, da parede de artérias, do fígado e do pâncreas fetais, da placenta, da polpa dentária e do tecido adiposo. As CTMs obtidas do tecido adiposo se destacam devido à abundante quantidade de células que podem ser retiradas deste tecido, fácil acesso e pouco desconforto para o paciente. Neste estudo foram comparadas duas técnicas para obtenção de CTMs de tecido adiposo: dissociação mecânica (DM) e digestão enzimática (DE). Foram também analisadas reações cruzadas inter-espécies utilizando anticorpos monoclonais comerciais dirigidos contra antígenos de superfície de células-tronco de diferentes espécies: camundongo, cavalo, coelho, macaco e humano. Observamos que a técnica de DM é favorável em relação à DE após 15 dias de cultura, sendo que a DE mostra-se mais eficiente nos primeiros dias de cultura. Os dados encontrados mostraram também que a DM causa menos dano ao DNA celular. Com relação às reações cruzadas inter-espécies, destaca-se o anticorpo monoclonal A69 dirigido contra células-tronco de coelhos, o qual pode ser utilizado em medicina veterinária, em especial na pesquisa envolvendo equinos.



Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; Marcadores de superfície celular; Medicina regenerativa; Medula óssea; Tecido adiposo

**ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent cells with fibroblastoid morphology and adherent to plastic. Furthermore, they can be obtained from different sources. Besides bone marrow, these cells are taken from umbilical cord blood, umbilical vein, saphenous vein, peripheral blood, arteries, liver and fetal pancreas, placenta, dental pulp and adipose tissue. MSCs derived from adipose tissue are important because of the abundant number of cells that can be obtained from this tissue, easy access and little discomfort to the patient. This study compared two techniques for obtaining MSCs from adipose tissue: mechanical dissociation (MD) and enzymatic digestion (ED). We also analyzed the inter-species cross-reactions using commercial monoclonal antibodies directed against surface antigens of stem cells from different species: mouse, horse, rabbit, monkey and human. We found that MD technique is favorable in relation to ED within 15 days of culture, and ED is more efficient in the first days of culture. The data also showed that MD causes less damage to cellular DNA. About inter-species cross-reactions, the monoclonal antibody A69 directed against stem cells from rabbits, which can be used in veterinary medicine, particularly in research involving horses.

Keywords: Mesechymal stem cells, Cell surface markers, Regenerative medicine, Bone marrow, Adipose tissue

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Terapia Celular

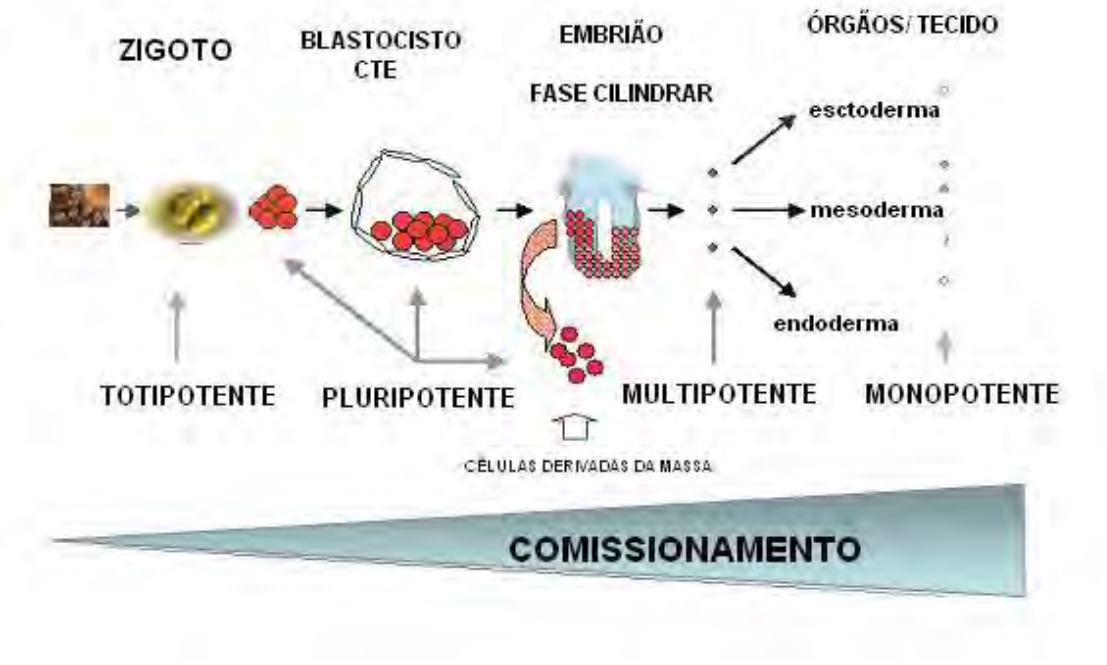
A terapia celular (TC) é um ramo da medicina regenerativa que apresenta evolutivamente várias etapas. Na primeira etapa, com registros iniciais datando de 1985, aparece a TC condutiva permeada por uma série de novos polímeros que foram surgindo no mercado mundial com a finalidade de conduzir as células-tronco do tecido em questão ao auto-reparo. Nos anos 90 aparece nova era de produtos também denominados de bioativos, que caracterizam a segunda etapa da TC, que passa então a ser denominada de TC indutiva. Nesta, a síntese de fatores de crescimento e a produção de outros fatores pela tecnologia recombinante faz emergir a recuperação das células-tronco autólogas pelo estímulo e interação biológica com o tecido lesado. Mas, para muitos pacientes, nem os produtos de uma fase, nem os hormônios de outra fase foram suficientes para recuperar grandes lesões em órgãos danificados por muito tempo. Para estas situações, surge então a terceira etapa da medicina regenerativa, já com o aspecto de "personalizada", onde a TC é aquela realizada com células-tronco autólogas originárias dos mais diferentes tecidos.[1]

## 1.2 Células-Tronco e Cultura Celular

As células-tronco são classificadas de acordo com a espécie de origem das células, tecido de origem e potencial de diferenciação em um ou mais tipos celulares.[2]

Quanto à classificação de acordo com a capacidade de diferenciação, a célula-tronco mais primitiva é a totipotente, a qual se divide em células que formam o embrião e a placenta. É, portanto capaz de originar todos os tecidos fetais. Células-tronco pluripotentes contribuem para a formação das três camadas germinativas presentes no desenvolvimento do embrião: ectoderme, mesoderme e endoderme. Estas células originam todos os tecidos de um indivíduo adulto (excluindo as membranas embrionárias).

Células-tronco multipotentes originam apenas uma das camadas germinativas e as células-tronco monopotentes originam células de uma única linhagem, ou seja, de um tecido específico **(Figura 1).** [23]




From: Modificado de: Bone-marrow-derived stem cells-our key to longevity?

**Figura 1** - Capacidade de diferenciação das células-tronco

Nas duas últimas décadas, o conhecimento sobre células-tronco evoluiu de forma significativa, em particular sua capacidade de expansão e diferenciação. Tais propriedades tornam as células-tronco únicas como ferramenta potencial no tratamento de diversas doenças que não podem ser tratadas da forma tradicional. Para utilizar essas células em protocolos clínicos torna-se, no entanto, necessário compreender a natureza e as propriedades das células-tronco dos vários tipos de tecido e os mecanismos pelos quais elas se diferenciam em células maduras perfeitamente funcionais. É possível observar estas características das células-tronco por meio do cultivo de células.[4]

O termo cultura de células refere-se a cultivos derivados de células dispersas, obtidas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular. A prática de cultivar células ocorre desde o início do século XX e evoluiu de uma simples fase exploratória para uma fase de expansão nos anos 1950.[5]

Fundamentalmente, as células podem se desenvolver *in vitro* após dissecção e dispersão total ou parcial do tecido de origem, resultando em culturas celulares propriamente ditas, em culturas de explantes ou, mesmo, em cultura de órgãos, dependendo de seu grau de dispersão. Células em cultura podem ser mantidas por períodos de tempo variados, o que depende da espécie e órgão de origem.[5]

As culturas primárias são obtidas diretamente, a partir de fragmentos de órgãos e tecidos animais ou humanos, intactos, dissociados mecanicamente ou por enzimas.

Uma cultura é considerada primária até seu primeiro subcultivo (repique ou passagem), depois do qual é chamada linhagem celular.[5]

### 1.3 Células-Tronco Mesenquimais (CTMs)

Nos últimos anos muito se tem pesquisado sobre células-tronco e a literatura especializada aponta as células-tronco mesenquimais (CTMs) como as mais promissoras. As CTMs são células adultas multipotentes e foram originalmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea por Alexander Friedenstein e cols em 1966.[3] Em cultura, as CTMs apresentam morfologia fibroblastóide e são aderentes ao plástico. As culturas primárias geralmente são mantidas por dez a 15 dias até que as células atinjam alta confluência. Neste período, as células não-aderentes, incluindo as hematopoiéticas, são depletadas, resultando em uma cultura relativamente homogênea de CTMs em diferentes graus de maturação.[5]

Estas células são denominadas de mesenquimais devido à sua capacidade de se proliferar e se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos.[6, 7]. Além disso, em um meio de cultura celular com fatores de crescimento e de diferenciação específicos, as CTMs podem originar várias linhagens de tecido, conforme **Figura 2**, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo, neurônios e estroma medular.

From: http://www.sitedecuriosidades.com/ver/celulas_tronco.html

**Figura 2 -** Diferenciação das células-tronco mesenquimais

Uma das mais promissoras capacidades das CTMs é a imunomodulação, sendo que a identificação desta propriedade trouxe grande avanço científico, pois estas células são capazes de induzir tolerância periférica, sugerindo que elas possam ser utilizadas em protocolos terapêuticos das desordens imuno-mediadas. Estudos sobre como este mecanismo de imunossupreessão acontece ainda estão em avaliação, mas acredita-se que a interação de citocinas e do óxido nítrico contribuam para a inibição das citocinas pró-inflamatórias nos tecidos. Diversos autores mostraram que o interferon (IFN), juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) ou IL- 1, são necessários para induzir a atividade supressora das CTMs.[1]

Diante da busca pela melhoria na qualidade de vida de pacientes com doenças degenerativas, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar o papel das CTMs na regeneração tecidual. A capacidade das CTMs de migrar para locais do organismo que sofreram danos, exercendo efeitos terapêuticos por meio de moléculas bioativas, aumenta o potencial dessas células na aplicação clínica.[8]

Sendo assim, as CTMs são fontes promissoras para reparação tecidual e terapia gênica pelo fato de que estas células podem ser diferenciadas em diferentes tipos celulares *in vitro* e são facilmente expandidas em cultura.[9]

Modelos animais são utilizados para desenvolver novas estratégias para o tratamento de doenças humanas e para testes terapêuticos com CTMs. Nas pesquisas relacionadas à ortopedia, CTMs obtidas de cabras, bodes, cachorros, ovelhas e porcos são estudadas com o objetivo de corrigir defeitos de cartilagem e ossos. CTMs obtidas de cachorros, porcos e ovelhas são estudadas para a reconstrução de válvulas cardíacas e

para a terapia celular no tratamento de infarto do miocárdio. CTMs de macacos *rhesus* são estudadas para o tratamento de desordens neurológicas.[10]

Estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado a importância das CTMs em diversas condições, tais como: defeitos ósseos ou cartilaginosos, problemas cardíacos, desordens do sistema nervoso central e doenças pulmonares.[11] Além disso, estas células são também uma promessa para osteogênese imperfeira, lesões de medula espinhal e Parkinsonismo.[12]

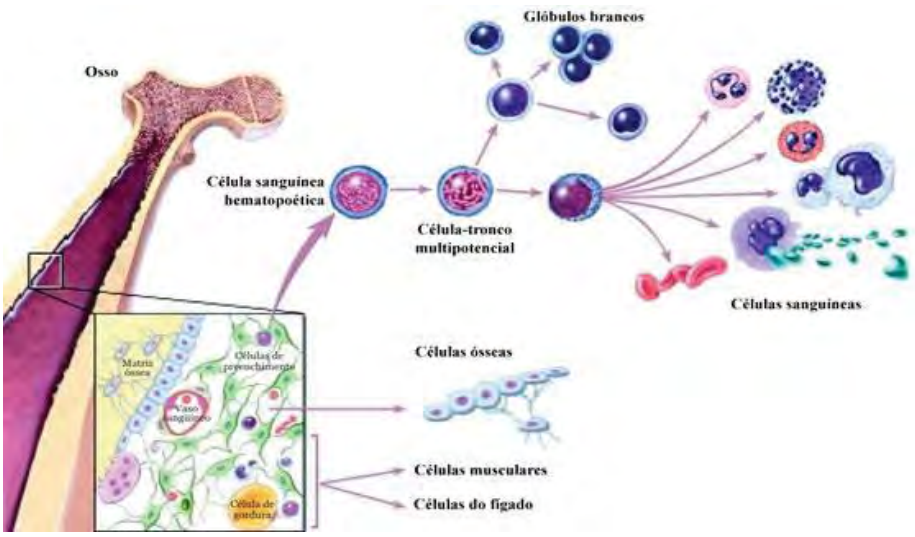
As CTMs podem ser obtidas de diferentes fontes: sangue de cordão umbilical, veia umbilical, veia safena, sangue periférico, parede de artérias, fígado e pâncreas fetais, placenta, polpa dentária, tecido adiposo e medula óssea.[13,14]

## 1.4 Medula Óssea

A medula óssea é um tecido gelatinoso que preenche a cavidade interna dos ossos. A função desse tecido é produzir os componentes do sangue, sendo, portanto, um órgão hematopoiético.

Este tecido contém uma população de células heterogêneas, entre elas células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e células-tronco não hematopoiéticas (CTNH), tais como: células progenitoras endoteliais (CPEs), células-tronco mesenquimais (CTMs), células progenitoras adultas multipotentes (MAPCs) e células muito pequenas semelhantes às embrionárias (VSELs).[15, 16]

Entre estas células, destacam-se as CTHs e CTMs, amplamente utilizadas na terapia celular. As CTHs possuem capacidade de auto-renovação e diferenciação em todas as linhagens hematopoiéticas, originando células maduras diferenciadas em uma ou mais linhagens **(Figura 3)**. Essas células foram as primeiras a ser descritas e seu aspecto morfológico e potencial terapêutico são bastante conhecidos. Além disso, as CTH são as mais amplamente utilizadas na terapia celular.[3]




From: http://www.quadrante.com.br/Jpgs/especiais/031005/02_01.jpg

**Figura 3 -** Diferenciação das células-tronco hematopoiéticas

A medula óssea é o tecido mais utilizado para obtenção de CTMs. Entretanto, novos meios para obter estas células são estudadas, visando a obtenção de células viáveis por meio de técnicas menos invasivas e dolorosas. Nos últimos 20 anos, terapias com células-tronco de cordão umbilical têm sido realizadas em pacientes com disfunções de medula óssea.[17] O sangue de cordão umbilical oferece vantagens em relação à medula óssea, pois não requer compatibilidade rigorosa entre os antígenos leucocitários humanos (HLAs) do doador e do paciente. Além disso, este tecido mostra baixa incidência de rejeição.

Outra alternativa para obtenção de CTMs é o tecido adiposo, que tem se mostrado favorável para uso em medicina regenerativa.[17]

## 1.5 Tecido Adiposo

O tecido adiposo é uma importante fonte de CTMs que, segundo diversos estudos, apresentam alto potencial de uso na terapia celular por apresentar capacidade de auto-renovação e habilidade de se diferenciar em variados tipos celulares, tais como: tecido adiposo, osso, cartilagem, células neuronais, hepatócitos, células hematopoiéticas, células musculares cardíaca e esquelética.[18] A facilidade de obtenção de tecido adiposo por um procedimento cirúrgico simples, além da superioridade destas células em comparação às de medula óssea quanto à capacidade de diferenciação,

freqüência de colônias obtidas e morfologia, permitem o uso das CTMs derivadas do tecido adiposo em medicina regenerativa.[19]

Outra vantagem do tecido adiposo é sua característica não-vital que facilita o seu uso, viabilizando a retirada de uma quantidade razoável de tecido para o estabelecimento das culturas celulares iniciais. Esta característica é importante, visto que há um pequeno número de células-tronco adultas em cada tecido, as quais residem em áreas específicas onde se encontram quiescentes (não há divisão celular) por muitos anos, até serem ativadas em casos de doenças e lesões.[20] Deste modo, o tecido adiposo mostra-se bastante eficiente por ser uma fonte abundante de CTMs, de fácil acesso para coleta e pouco desconforto para o paciente.[21]

As clínicas de cirurgia plástica lidam diariamente com a retirada de tecido adiposo por questões estéticas e a maior parte deste material de alto valor biológico é descartado. Com a evidência do sucesso do uso das CTMs derivadas do tecido adiposo na terapia celular, tem-se aproveitado mais os produtos destas cirurgias.

Por ser uma fonte abundante e acessível de CTMs, o tecido adiposo retirado em clínicas de cirurgia plástica é bastante visado para a reconstrução de tecidos e biotecnologia.[22]

A perda de tecidos de origem mesenquimal, tais como adiposo, cartilaginoso, muscular e ósseo, devido a traumas, tumores e perda de vasos sanguíneos, representa um significante problema clínico. A terapia celular com o uso de CTMs a partir de tecido adiposo pode ser útil para o tratamento destas enfermidades nas quais há perda ou disfunção de tecido.

### 1.6 Medicina Regenerativa em Animais

As CTMs são também descritas em tecidos de diversas outras espécies, podendo ser obtidas a partir de diferentes tecidos, incluindo medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, músculo esquelético e cérebro.[23, 24]

Devido ao alto potencial das CTMs, a capacidade terapêutica dessas células tem sido investigada não apenas em medicina humana, mas também em medicina veterinária para o tratamento de doenças.

CTMs obtidas de medula óssea e tecido adiposo de cavalo são as duas fontes mais comumente utilizadas para reparo de tecidos desses animais. Ambas as fontes são acessíveis para isolamento e expansão dessas células.

Nesses animais, CTMs obtidas de medula óssea são isoladas, caracterizadas e possuem potencial de diferenciação para diversas linhagens celulares: adipócitos, condrócitos e osteócitos. Lesões tendíneas em cavalos já foram tratadas com células-tronco de medula óssea.[25]

Resultados satisfatórios têm sido encontrados também em tecido adiposo obtido de cavalo, sendo uma fonte acessível de grande quantidade de CTMs, além de alto potencial na medicina regenerativa. Estudos compararam CTMs de tecido adiposo e medula óssea e concluíram que as células obtidas por ambas as fontes podem ser expandidas e capazes de se diferenciar, *in vitro*, em tecidos de origem mesenquimal.[26]

## 2. JUSTIFICATIVA

Este estudo visou avaliar as possíveis reações cruzadas entre células-tronco de diferentes espécies para que se possa otimizar reagentes de imunofenotipagem das mesmas, uma vez que inexiste no mercado marcadores disponíveis para todas as espécies animais. Para tanto, caracterizamos fenotipicamente as células-tronco de diferentes espécies. Com isto, será possível determinar as semelhanças e diferenças entre células-tronco originadas de diferentes espécies e diferentes fontes: tecido adiposo e medula óssea.

# 3. OBJETIVOS

## 3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar reações cruzadas inter-espécies utilizando anticorpos monoclonais comerciais dirigidos contra antígenos de superfície de células-tronco de diferentes espécies: camundongo, cavalo, coelho, macaco e humano.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a cultura e expansão de células tronco aderentes de diferentes espécies obtidas de tecido adiposo e medula óssea.

- Comparar dois métodos de obtenção de CTMs de tecido adiposo: dissociação mecânica *versus* digestão enzimática nas espécies humana e leporina.

- Estabelecer parâmetro temporal entre plaqueamento e confluência ≥80% nas células obtidas pelos métodos de digestão enzimática e dissociação mecânica na espécie leporina.

- Iniciar a padronização do ensaio cometa a fim de observar danos no DNA em CTMs obtidas pelas técnicas digestão enzimática e dissociação mecânica.

- Avaliar o perfil fenotípico das células aderentes por citometria de fluxo.

# 4. MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Técnicas de Obtenção de CTMs do Tecido Adiposo

### 4.1.1 Digestão Enzimática (DE)

Após retirada do tecido adiposo por técnica de microcirurgia, com uso de anestésico local, sucessivas lavagens são realizadas com meio HEPES, com o intuito de retirar o sangue proveniente da coleta. Em seguida, a amostra é pesada e dissociada em pequenos pedaços com lâmina de bisturi, a fim de aumentar a área de contato entre o tecido e a enzima colagenase tipo I, responsável pela digestão do tecido, aumentando a eficiência da DE. Em seguida, é preparada solução contendo enzima colagenase tipo I e meio HEPES, sendo a concentração da mesma de 2mg/mL. Para cada 1g de tecido, é colocado 2 mL de meio HEPES e 4 mg de colagenase.

O tecido adiposo, juntamente com a solução, é mantido durante 15 horas em estufa de $CO_2$ a 37º C com umidade controlada. Posteriormente, a solução contendo o tecido adiposo digerido é transferida para tubo Falcon®, no qual é acrescentado meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino para neutralização da ação enzimática. O tubo é submetido à centrifugação por 10 minutos, 1200 rpm, à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante é retirado e meio HEPES é acrescentado para lavagem do *pellet*. A amostra é centrifugada novamente. Este procedimento de lavagem com meio HEPES é repetido duas vezes. O sobrenadante é removido e 1 mL de meio de cultura DMEM F12 contendo 10% de soro fetal bovino, L-glutamina, aminoácidos essenciais, aminoácidos não essenciais, antibiótico-antimicótico é adicionado para homogeneização do *pellet.* Uma alíquota de 30 microlitros é retirada para contagem das células em câmara de Neubauer e análise da viabilidade celular por azul de tripano. As células são plaqueadas em frascos de 25 $cm^2$ e mantidas em estufa de $CO_2$ a 37º C. O meio de cultura é trocado a cada 48 horas e a visualização das células é realizada em microscópio invertido com contraste de fase utilizando o equipamento Axiovert 200 da Zeiss® **(Figura 4).**

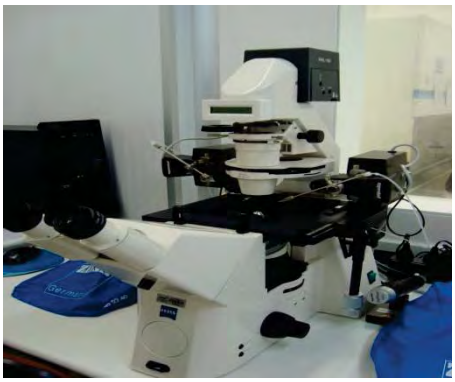


Foto: Renan Padron, 2010

**Figura 4 -** Microscópio invertido com contraste de fase Axiovert 200 - Zeiss®

### 4.1.2 Dissociação Mecânica (DM)

Após a retirada do tecido adiposo, a amostra é colocada em placa de Petri contendo meio HEPES. Em seguida, a amostra é submetida à dissociação mecânica por meio da raspagem do tecido com *cell scraper* **(Figura 5)**. As células, juntamente com o meio HEPES, são sugadas com seringa de 20 mL, a qual é mantida na posição vertical com o bisel para baixo durante 10 minutos para a separação de debris. Posteriormente, o líquido contendo as células é transferido para tubo Falcon® de 15 mL para centrifugação por 10 minutos, 1200 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante é retirado, acrescenta-se 1 mL de meio de cultura DMEM F12 contendo 10% de soro fetal bovino e aditivos, e é realizada a homogeneização do conteúdo do frasco. Uma alíquota de 30 microlitros é retirada para contagem das células em câmara de Neubauer e análise da viabilidade celular por azul de tripano. Em seguida as células são plaqueadas em frascos de 25 $cm^2$ e mantidas em estufa de $CO_2$ a 37º C. O meio de cultura é trocado a cada 48 horas e a visualização das células é realizada em microscópio invertido com contraste de fase.

Foto: Juliana Ravelli , 2010

**Figura 5** - Dissociação mecânica com *cell scraper*

## 4.2 Obtenção de Tecido Adiposo Humano

O uso das amostras dos seres humanos deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo nº 783.

As amostras de tecido adiposo foram obtidas através de processo cirúrgico, em que pacientes foram submetidos à cirurgia plástica. Estes pacientes foram convidados a doar parte do material que seria descartado na cirurgia. Apenas os pacientes que estiveram de acordo e assinaram o Termo de Consentimento de Descarte Consentido foram incluídos na pesquisa.

A primeira amostra foi retirada da região mamária. Entretanto, não foi possível estabelecer cultura de CTMs desta amostra. A segunda amostra foi obtida da região abdominal e após a retirada do tecido adiposo no Centro Cirúrgico o mesmo foi transportado ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu em tubo Falcon® contendo meio HEPES. Em seguida, foi lavada com solução fisiológica corrente **(Figura 6).**

Foto: Aline Aun, 2010

**Figura 6 -** Lavagem do tecido adiposo humano

O tecido adiposo foi dividido em duas partes, sendo que em uma delas foi realizada DM e na outra, DE. As células foram plaqueadas em frascos de 25 $cm^2$ , os que foram mantidos em estufa de $CO_2$. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram monitoradas em microscópio invertido com contraste de fase.

### 4.3 Obtenção de Tecido Adiposo dos Animais

O uso das amostras dos animais deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, protocolo número 3455-2010. Foram coletados tecidos adiposos de cavalos e coelhos.

#### 4.3.1 Cavalos

Esta etapa do trabalho foi realizada em parceria com a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Botucatu, disciplina de Cirurgia de Grandes Animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Ana Liz Garcia Alves e do médico veterinário Armando de Mattos Carvalho. Os animais foram sedados com xilazina 10% na dose de 0,5 mg/Kg por via intravenosa. Para anestesia local, foi aplicado 15 mL de lidocaína pela via intramuscular. Após tricotomia local, o tecido adiposo foi coletado da região glútea dos animais, próximo à cauda, por meio de incisão cirúrgica **(Figura 7).** A amostra foi transportada ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de

Botucatu em tubo Falcon® contendo meio HEPES. A técnica utilizada para obtenção de CTMs foi a DE. As células foram plaqueadas e mantidas em estufa de $CO_2$. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram monitoradas em microscópio invertido com contraste de fase.

Foto: Gabriel Alves, 2010

**Figura 7** - Detalhe da abertura da pele para a retirada de tecido adiposo de cavalo

### 4.3.2 Coelhos

O tecido adiposo foi coletado de animais da raça North Folk da linhagem Botucatu. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30mg/Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Em seguida, foi realizada a eutanásia, administrando dose anestésica excessiva de pentobarbital sódico.

As amostras foram coletadas da região dorsal dos animais por meio de incisão cirúrgica e foram transportadas ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu em tubos Falcon® contendo meio HEPES. Para a eliminação de pêlos das amostras, prováveis fontes de contaminação, foi realizada a lavagem das mesmas com solução fisiológica corrente.

Em seguida, cada amostra foi separada em dois fragmentos, a fim de comparar duas diferentes técnicas: DM e DE.

## 4.4 Comparação dos Métodos de Obtenção de CTMs de Tecido Adiposo: Dissociação Mecânica *versus* Digestão Enzimática

Diversos estudos descrevem que a melhor forma de obtenção de tecido adiposo é por meio da DE. Entretanto, buscou-se observar a eficiência de outra metodologia para

obtenção de CTMs de tecido adiposo, a DM. Este método apresenta vantagens pelo seu baixo custo e rapidez no procedimento, visto que as células obtidas por DE precisam ser mantidas em estufa durante 15 horas antes do plaqueamento das mesmas e a células obtidas por DM são plaqueadas no mesmo dia do procedimento.

A comparação entre os métodos foi realizada nas CTMs humanas e CTMs de coelhos.

Para a comparação das técnicas de digestão enzimática com o uso de colagenase tipo I e dissociação mecânica por meio de *cell scrapper*, foram coletadas amostras de tecido adiposo e cada amostra foi dividida em duas partes equivalentes, levando-se em cconsideração a pesagem das mesmas. Em seguida, uma das partes foi tratada com DE e a outra com DM, sendo que ambas foram plaqueadas em frascos de 25 $cm^2$ em meio de cultura DMEM F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino e aditivos. As células foram mantidas em estufa de $CO_2$ à 37º CO e observadas em microscópio invertido com contraste de fase. O primeiro dia a ser considerado foi o 7º dia após o plaqueamento, dia em que se pôde observar confluência considerável para o início da comparação entre as técnicas.

### 4.5 Obtenção de Medula Óssea de Animais

Foram coletadas medulas ósseas de camundongos, cavalos, coelhos e macacos.

#### 4.5.1 Camundongos

Camundongos da linhagem Balb/c foram sacrificados com dose letal de anestésico tiopental sódico **(Figura 8)**. Ambos os fêmures foram retirados de cada animal e a medula óssea foi lavada com a introdução de uma agulha, acoplada à seringa, no canal medular. A lavagem foi realizada com fluxo constante de meio de cultura DMEM Knockout contendo 10% de soro fetal bovino e aditivos. As células foram plaqueadas em placa de 6 wells e mantidas em estufa de $CO_2$. A troca de meio de cultura foi realizada a cada 48 horas e as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase.

**Figura 8** - Camundongo Balb/c utilizado na experimentação

### 4.5.2 Cavalos

Inicialmente foi realizada tricotomia na região do esterno dos animais. Em seguida, os animais foram sedados com xilazina 10% na dose de 0,5 mg/Kg por via intravenosa. Para anestesia local, foi aplicado 15 mL de lidocaína pela via intramuscular. Após a sedação e anestesia, foi realizada a punção da medula óssea com a introdução de agulha no sentido perpendicular à pele. A aspiração da medula óssea foi feita com seringa de 20 mL, sendo que o anti-coagulante utilizado foi heparina sódica (5000 UI/mL).

Em seguida, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. Foi realizada diluição da amostra com meio HEPES, seguida da filtação em equipo de transfusão para retirada de coágulos. A medula óssea foi transferida cuidadosamente para tubo Falcon® contendo Histopaque®. A centrifugação foi realizada por 30 minutos, 500g à temperatura ambiente. Após esta etapa, formou-se um halo esbranquiçado de células linfomononucleares, o qual foi retirado e transferido pra outro tubo Falcon®, onde foi lavado duas vezes com meio HEPES por meio de centrifugação por 10 minutos, 1200 rpm à temperatura ambiente.

As células foram plaqueadas em frasco de 25cm$^2$ e mantidas em estufa de $CO_2$. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase. .

### 4.5.3 Coelhos

A medula óssea foi coletada de animas da raça North Folk da linhagem Botucatu. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (30mg/Kg) administrado nas veias central ou marginal da orelha. Em seguida, foi realizada a eutanásia, administrando dose anestésica excessiva de pentobarbital sódico. A coleta

da medula óssea foi realizada por meio de punção da crista ilíaca utilizando seringa de 20 mL contendo 1 mL de heparina sódica (5000UI/mL), acoplada à agulha intra-óssea. Em seguida, o material foi transportado para o Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu. As células foram plaqueads em frascos de 25 $cm^2$ e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Utilizou-se microscópio invertido com contraste de fase para monitoramento das células.

### 4.5.4 Macacos

Foram utilizados macacos-prego (C*ebus apella*) jovens, previstos para sacrifício depois de serem utilizados em protocolos de pesquisa da Faculdade de Odontologia (FO) de Araçatuba **(Figura 9)**. Após anestesia geral e retirada das mandíbulas, foco do projeto de doutorado aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FO de Araçatuba, foi realizada a punção do fêmur com agulha Jamshid calibre 13 gauge e comprimento de 3” com aspiração do conteúdo medular para seringa de 20mL. As amostras foram deixadas em geladeira (4-8 ºC) *overnight* para posterior realização do explante celular.

A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuspendido em 15 mL de meio DMEM Knockout contendo 10% de soro fetal bovino e aditivos. As células foram plaqueadas em frasco de 25 $cm^2$ e mantidas em estufa de $CO_2$ a 37º C. O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas e as células foram observadas em microscópio invertido com contraste de fase.

Foto: http://farm4.static.flickr.com/3047/2424043554_55ee3ba454_m.jpg

**Figura 9** - Aspecto do macaco prego – *Cebus apella*

## 4.6 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que utiliza feixe de laser e detector de luz para contar as células em suspensão, levando em consideração tamanho e granulosidade. Sempre que uma célula passa pelo feixe de laser, a luz do laser é deflexionada a partir do detector e esta interrupção do sinal do laser é registrada. Aquelas células que possuem um anticorpo marcado com fluorescência, ligado a seu antígeno de superfície celular, são excitadas pelo laser e emitem uma luz que é registrada por um segundo sistema de detecção localizado em um ângulo reto em relação ao feixe de laser **(Figura 10)**.[27]

From: http://flowlab-childrens-harvard.com/yahoo_site_admin/assets/images/facscalibur.29471638_std.jpg

**Figura 10 -** Aspecto do equipamento de citometria de fluxo, modelo FACSCalibur BD®

Neste estudo, foram utilizados como sondas anticorpos marcados com fluorocromo específico para molécula de CTM. São eles: CD 44 e CD 90, os quais são marcadores de superfície celular presente em CTMs. Foram utilizados também os anticorpos CD 34 e CD 45, marcadores negativos de CTM **(Quadro1)**.

Embora não existam anticorpos exclusivos para as CTMs, a análise com conjunto de anticorpos mais expressos nestas células permite determinar um perfil imunofenotípico das CTMs expandidas em cultura.

| POSITIVO | NEGATIVO |
|---|---|
| CD 44 | CD 34 |
| CD 90 | CD 45 |

**Quadro 1:** Marcadores de superfície positivos e negativos de CTMs

CTMs obtidas de diferentes espécies não expressam as mesmas moléculas de superfície. Embora alguns trabalhos demonstrem que células humanas e de ratos são CD 34 negativas, alguns artigos mostram que existem variáveis expressões de CD 34 em células de camundongos.[9, 28]

Para cada espécie foram utilizados os seguintes marcadores de superfície celular **(Quadro 2)**:

| | |
|---|---|
| COELHO | **MO:** CD 34 anti-humano, CD 90 anti-humano |
| | **TA:** CD 90 anti-humano, A 69 |
| CAVALO | **MO:** CD 90 anti-humano, CD 44 anti-cavalo, A69 |
| | **TA:** CD 34 anti-humano, CD 90 anti-humano, CD 44 anti-cavalo, A69 |
| HUMANO | **TA:** CD 34 anti-humano, CD 45 anti-humano, CD 90 anti-humano |
| CAMUNDONGO | **MO:** CD 34 anti-humano, CD 90 anti-humano, A 69 |
| MACACO | **MO:** CD 34 anti-humano, CD 45 anti-humano, CD 90 anti-rato |

**Quadro 2:** Marcadores utilizados para cada espécie. MO: Medula Óssea; TA: Tecido Adiposo

### 4.7 Teste do Cometa

Neste estudo iniciamos a padronização do ensaio cometa a fim de observar danos no DNA em CTMs obtidas pelas técnicas DE e DM. Neste ensaio analisamos o comportamento da lise celular nas células obtidas por DE e DM utilizando a proteinase K como base de solução de lise das células (a proteinase K é utilizada como fonte de lise da membrana celular) para exposição do material nuclear.

O teste do cometa, também denominado eletroforese em microgel, foi primeiro introduzido por Õstiing e Johanson em 1984 como uma técnica eletroforética para a direta visualização do dano no DNA em nível de células individuais.[29]

Quando as células são submetidas a um campo elétrico, os fragmentos danificados de DNA migram para o ânodo adquirindo a aparência de um cometa. A região nuclear dá origem à cabeça do cometa, enquanto que os fragmentos dão origem às caudas, cuja extensão está intimamente relacionada com a intensidade do dano.[30, 31]

O teste do cometa é utilizado em diversos trabalhos, como por exemplo para estudos de reparo de DNA e genotoxicidade. Neste estudo, o teste foi realizado para avaliar possíveis danos causados pelas técnicas de digestão enzimática e dissociação mecânica ao DNA celular.

**Protocolo do Teste do Cometa:**

**Preparo da Solução e Reagentes para o Teste do Cometa**

**Preparo de Soluções:**

**Soulução de Lise (estoque)**

2,5 M-NaCl ---------- 146,1g

100 mM – EDTA ---------- 37,2g

10 mM – Tris ---------- 1,2g

Obs* Ajustar o pH para 10 antes de colocar o N-Lauroyl – Sarcosine. Completar para 1.000 ml com H2O destilada.

**N-lauroyl- Sarcosine a 1% - 10g**

Conservação: Temperatura ambiente, abrigada da luz.

**Solução de Lise (uso)**

Triton X – 100 ---------- 1 ml

DMSO ---------- 10 ml

Completar para 100ml com solução de Lise estoque.

Obs* Essa solução deve ser feita na hora do uso. Deve ser colocada na geladeira até atingir 4°C, aproximadamente 2 horas antes do uso.

**Solução de EDTA (A)**

EDTA ---------- 14,89g

H2O destilada ---------- 200 ml

Obs* O pH deve ser ajustado para 10.

Conservação: Temperatura ambiente.

**Solução de NaOH (B)**

NaOH ---------- 200g

H2O destilada ---------- 500 ml

Conservação: Temperatura ambiente.

**Solução de Eletroforese**

Deve-se fazer separadas as soluções A (EDTA) e B (NaOH). Reagir cinco (5) ml de solução A e trinta (30) ml de solução B, completando para 1000 ml com H2O destilada. O pH deve ser ajustado para 13.

**Solução de Neutralização**

0,4 M – Tris ---------- 48,5g

Completar para 1.000 ml de H2O destilada.

Obs* O pH deve ser ajustado para 7,5.

Conservação: Temperatura ambiente ou geladeira, abrigada da luz.

**Solução de coloração (Solução estoque)**

Brometo de Etídio ---------- 10mg

H2O destilada ---------- 50 ml

Conservação: Temperatura ambiente abrigada da luz.

**Solução de coloração (Solução de uso)**

Fazer diluição da solução de uso 1 para 10.

1 ml Solução Coloração estoque ---------- 9 ml H2O destilada

Conservação: TA abrigada da luz.

**Agarose – Ponto de fusão normal**

Agarose PFN ---------- 300mg (0,3g)

PBS (Livre de Ca++ e Mg++) ---------- 20 ml (20 ml)

Agarose – Low Metting Point (baixo ponto de fusão)

Agarose LMP ---------- 100 mg (0,1 g)

PBS (Livre de Ca++ e Mg++) ---------- 20 ml (20 ml)

**Preparação das lâminas – Gel primeira camada:**

**01)** Lavar as lâminas
**02)** Diluir a agarose ponto de fusão normal, deixando-a ferver de duas a três vezes no microondas.
**03)** Colocar o gel já diluído no banho – maria a 60°C.
**04)** Com o auxílio de uma pinça, mergulhar as lâminas limpas no gel sem deixar escorrer.
**05)** Colocá-las na posição horizontal em frente a um aquecedor, deixando-a secar por algumas horas.
Conservação: Geladeira a 4°C ou temperatura ambiente.

**Teste do Cometa**

**01)** Preparar a solução de lise (uso), 2h antes do uso ou até chegar a 4°C.
**02)** Diluir a agarose baixo ponto de fusão.
**03)** Aquecê-la no micro sem deixar ferver
**04)** Transferi-la para banho- maria a 37°C
**05)** Apagar todas as luzes do laboratório
**06)** Coletar 5µl (20µl das células) e transferi-las para eppendorf ®.
**07)** Coletar 100µl de agarose (homogeneizar com as células).
**08)** Pingar lentamente a mistura feita sobre as lâminas preparadas com agarose ponto de fusão normal.
**09)** Colocar uma lamínula grande (24x60), soltando lentamente sobre a lâmina.
**10)** Deixar na geladeira por 5 minutos.
**11)** Retirar cuidadosamente a lamínula.
**12)** Mergulhar a lâmina na solução de lise (uso) recém preparada.
Obs* A cuba com solução de lise deve estar coberta com papel alumínio para proteger da luz.

**Eletroforese**

**01)** Preparar a solução tampão de eletroforese, esperar chegar a 4°C.
**02)** Envolver a cuba de eletroforese num banho de gelo, mantendo a 4°C.
**03)** Retirar as lâminas da solução de lise, lavá-las com PBS e colocá-las na cuba de eletroforese.
**04)** Colocar a solução tampão de eletroforese até cobrir as lâminas.
**05)** Deixar as lâminas na cuba descansando por 20 minutos.
**06)** Programar a fonte de eletroforese com:
- 25v

- 20m
- manter a mili amperagem – 300

**07)** Retirar cuidadosamente as lâminas da cuba e colocá-las em um trilho de coloração.
**08)** Lavá-las cuidadosamente com solução de neutralização, 3 vezes de 5 minutos (15 minutos).
**09)** Mergulhar as lâminas em Etanol 100% para fixação.
**10)** Deixar secar a temperatura ambiente.
Obs* A mili amperagem e a potência serão reguladas com a quantidade de solução de eletroforese colocadas na cuba. Padronizar qual lado será deixado para o pólo negativo para que os cometas não corram de lados opostos. Só lâminas podem ser conservadas em temperatura ambiente ou em geladeira.

**Coloração**

**01)** Para coloração das lâminas, utilizar 50µL de solução de brometo de etídio (uso).
**02)** Cobrir com uma lamínula grande (24x60).
**03)** As lâminas devem ser lisadas imediatamente após a coloração.
**04)** Ao retirar as lamínulas da lâmina, mergulhá-las em etanol 100%.
Obs* Se for preciso, analisar novamente a lâmina. Pode ser repetido o procedimento de coloração, sem perder a qualidade da análise.

**Análise das lâminas**

As lâminas são analisadas com 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. As células foram classificadas em cinco categorias (0 – 4) correspondentes às seguintes quantidades de danos na cauda do DNA.

0 – sem danos (< 5%)

1 – baixo nível de danos (5 – 20%)

2 – médio nível de danos (20 – 40%)

3 – alto nível de danos (40 – 95%)

4 – dano total (> 95%)

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Morfologia das Células em Cultura - Coelhos

Os métodos de digestão enzimática e dissociação mecânica mostraram-se eficientes para a obtenção de CTMs de tecido adiposo de coelhos com relação à morfologia das células obtidas por estes métodos, pois por ambos os procedimentos, pôde-se obter células fibroblastóides, o que é característico de CTMs.

### 5.1.2 Células Obtidas Pelo Método DE

Após a obtenção das células, as mesmas foram plaqueadas e monitoradas por microscopia invertida em contraste de fase durante 15 dias de cultura. As fotos da **figura 11** registram as CTMs de tecido adiposo de coelho com seu aspecto fibroblastóide, aderidas ao plástico e formando *clusters* de células. No 7º dia após o plaqueamento as células apresentavam confluência importante, como pode ser observado no aumento de 5X. Em áreas menos confluentes, o detalhamento da junção dos prolongamentos celulares é mais evidentes (10X e 20X).

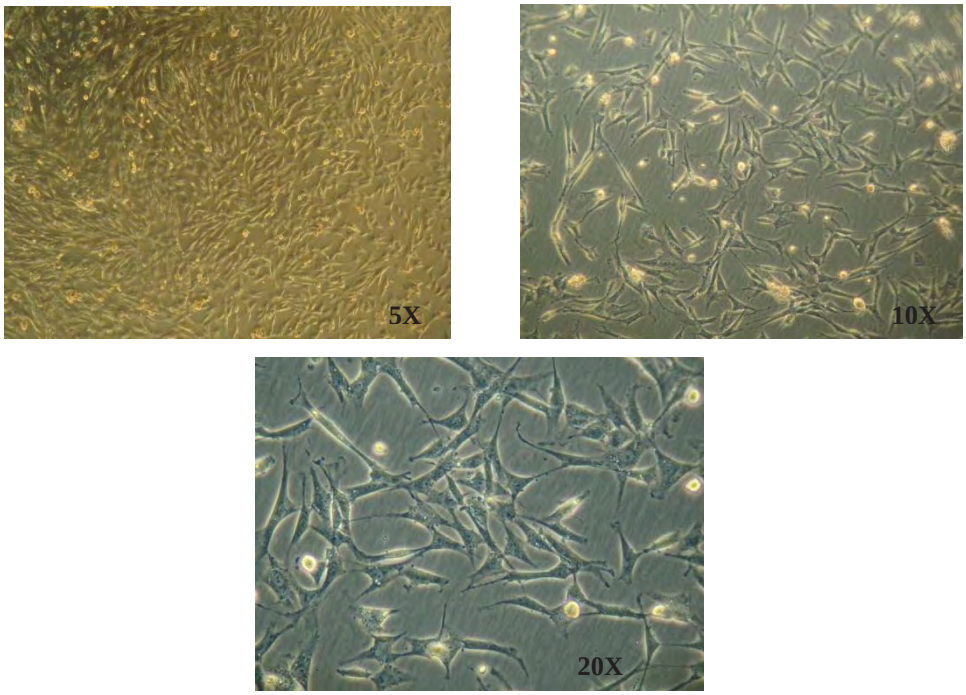



**Figura 11:** CTMs de tecido adiposo de coelho obtidas por **DE** após 7 dias de cultura.

### 5.1.3 Células Obtidas Pelo Método DM

As CTMs obtidas por DM aderem ao plástico mais lentamente nas fases iniciais da cultura **(Figura 13).**

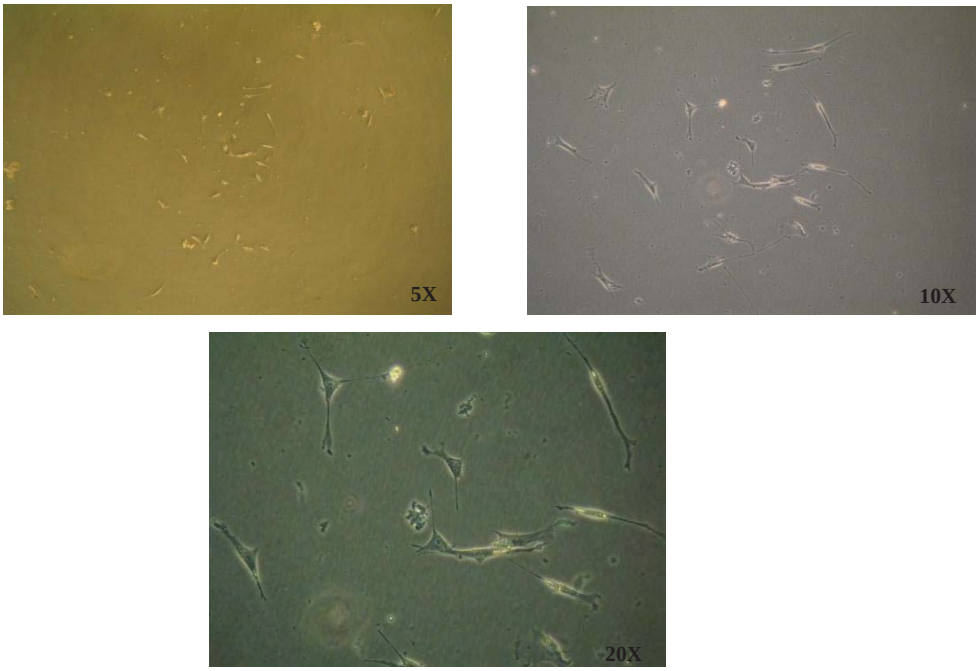



**Figura 12:** CTMs de tecido adiposo de coelho obtidas por **DM** após 7 dias de cultura.

### 5.1.4 Comparação dos Métodos DE e DM

Interpretando-se os gráficos das amostras 1 a 10 de tecido adiposo de coelhos **(Figuras 14 e 14A; Quadro 3)**, que apresentam o desempenho da porcentagem de confluência das células após 7, 9, 11, 13 e, para algumas amostras, 15 dias após plaqueamento das células, pode-se fazer algumas observações.

A técnica de DE foi equivalente à de DM para 5 amostras no 7º dia de observação, 3 amostras no 9º dia, 2 amostras no 11º dia, 3 amostras no 13º dia e 2 amostras no 15º dia.

Avaliando-se a superioridade de DE em relação à DM, observou-se 4 amostras no 7º dia, 5 amostras no 9º dia, 4 amostras no 11º dia, 3 amostras no 13º e 1 amostra no 15º dia.

A DE apresentou percentual de confluência desfavorável em relação à DM para 1 amostra no 7º dia, 2 amostras no 9º dia, 4 amostras no 11º dia, 4 amostras no 13º dia e 4 amostras no 15º dia.

Para as amostras 7, 8 e 10, a DE mostrou-se mais eficiente, visto que as células atingiram alta porcentagem de confluência mais rapidamente quando comparadas com as células obtidas por DM.

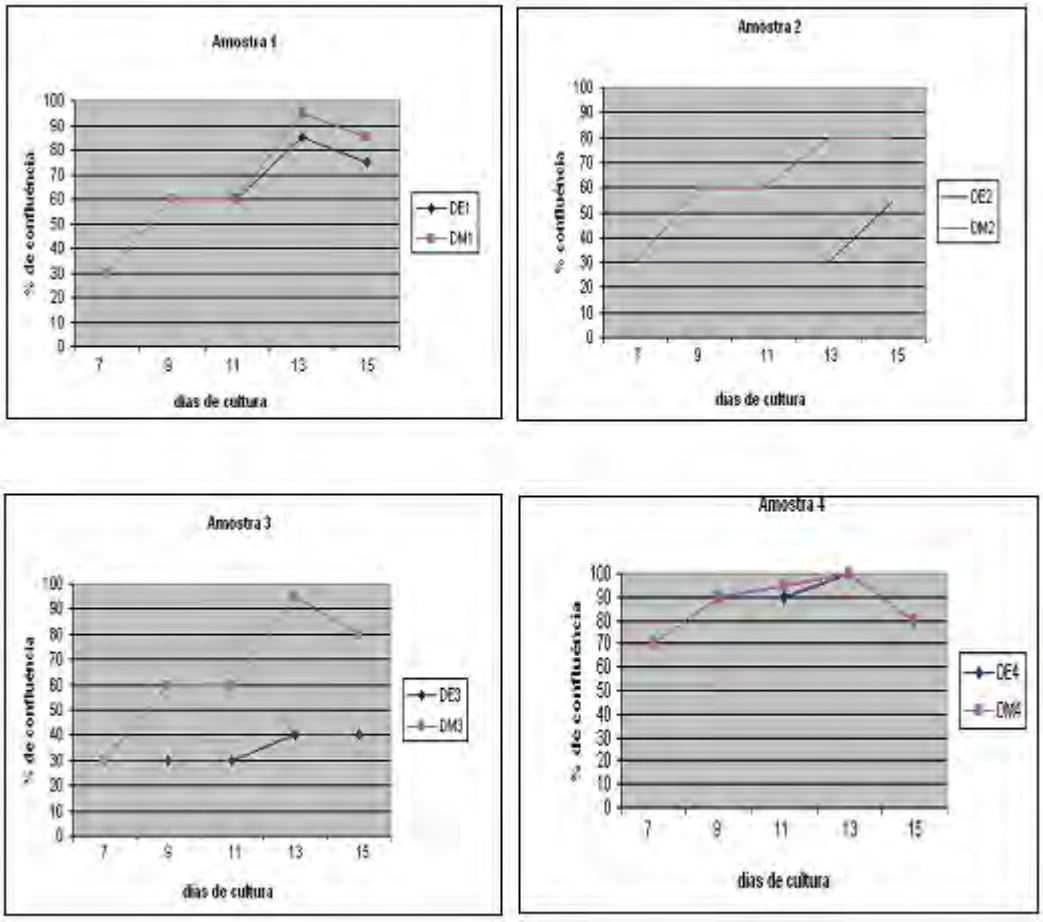



**Figura 13** – Gráficos do desempenho da % de confluência das amostras 1, 2, 3 e 4 nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento.

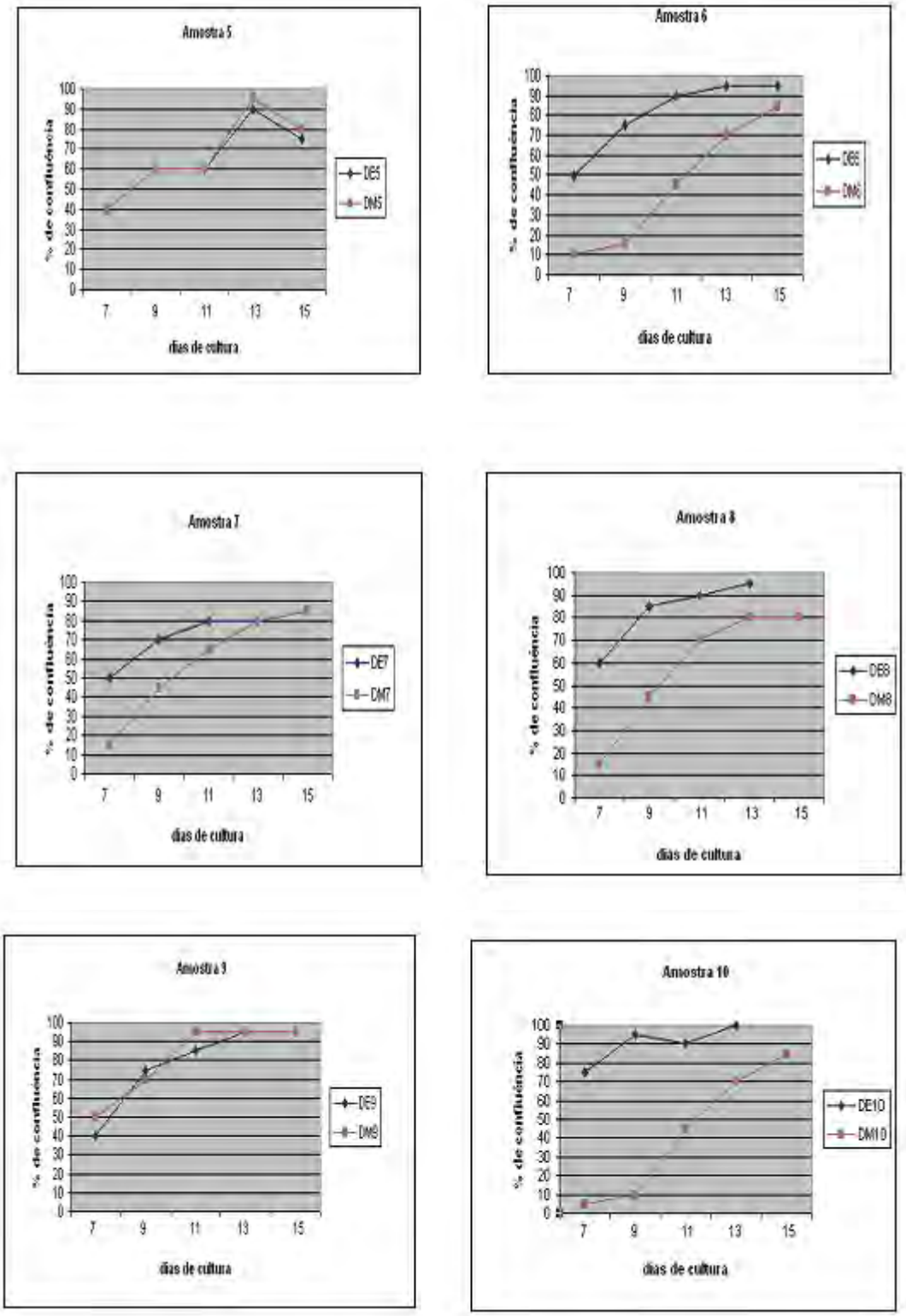



**Figura 13A:** Gráficos do desempenho da % de confluência das amostras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento.

| | D7 | D9 | D11 | D13 | D15 |
|---|---|---|---|---|---|
| **DM igual à DE** | 5 | 3 | 2 | 3 | 2 |
| **DM superior à DE** | 1 | 2 | 4 | 4 | 4 |
| **DM inferior à DE** | 4 | 5 | 4 | 3 | 1 |

**Quadro 3 :** Desempenho dos métodos DM e DE nos dias (D) 7, 9, 11, 13 e 15 de observação.

Sendo assim, após 15 dias de cultura, as células obtidas por DM passam a crescer mais rapidamente, demonstrando que DE é a técnica mais eficiente nos primeiros dias de cultura e DM se mostra superior a partir de aproximadamente duas semanas de plaqueamento.

O desempenho percentual da taxa de confluência das células tronco aderentes ao plástico está representado no **gráfico 1**. As observações são realizadas diariamente e registradas em datas específicas, através de microscopia invertida de contraste de fase.

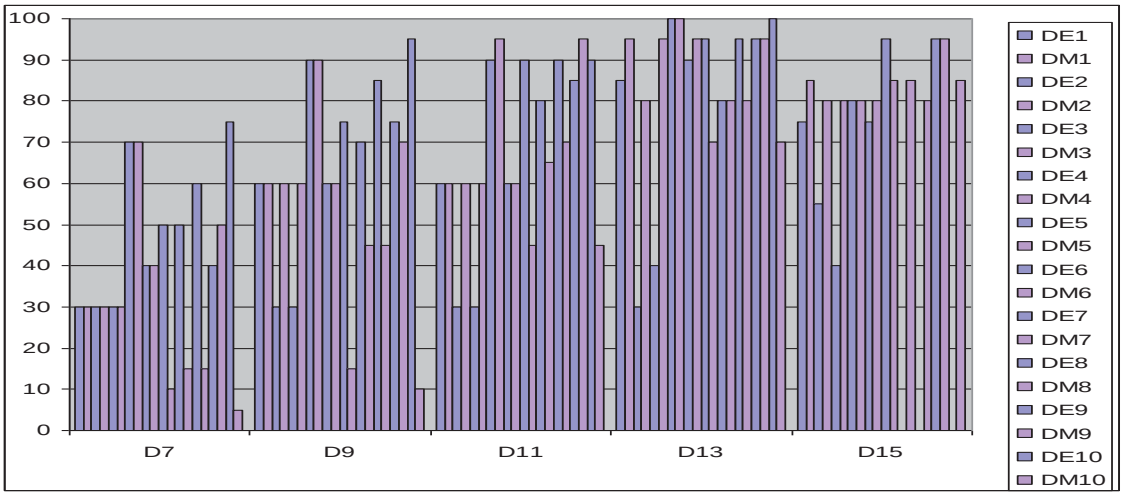



**Gráfico 1** - Desempenho do percentual de confluência comparando as técnicas DM e DE em diferentes dias de observação após plaqueamento.

### 5.2 Morfologia das Células em Cultura - Humano

Após 15 dias de plaqueamento as CTMs de tecido adiposo humano obtidas pelo processo de DM mostram-se com menor confluência quando comparadas às células

obtidas por DE. As CTMs mostraram confluência formando verdadeiros “tecidos” no fundo da placa como pode ser observado no aumento de 20X por microscopia invertida em contraste de fase **(Figura 15)**.

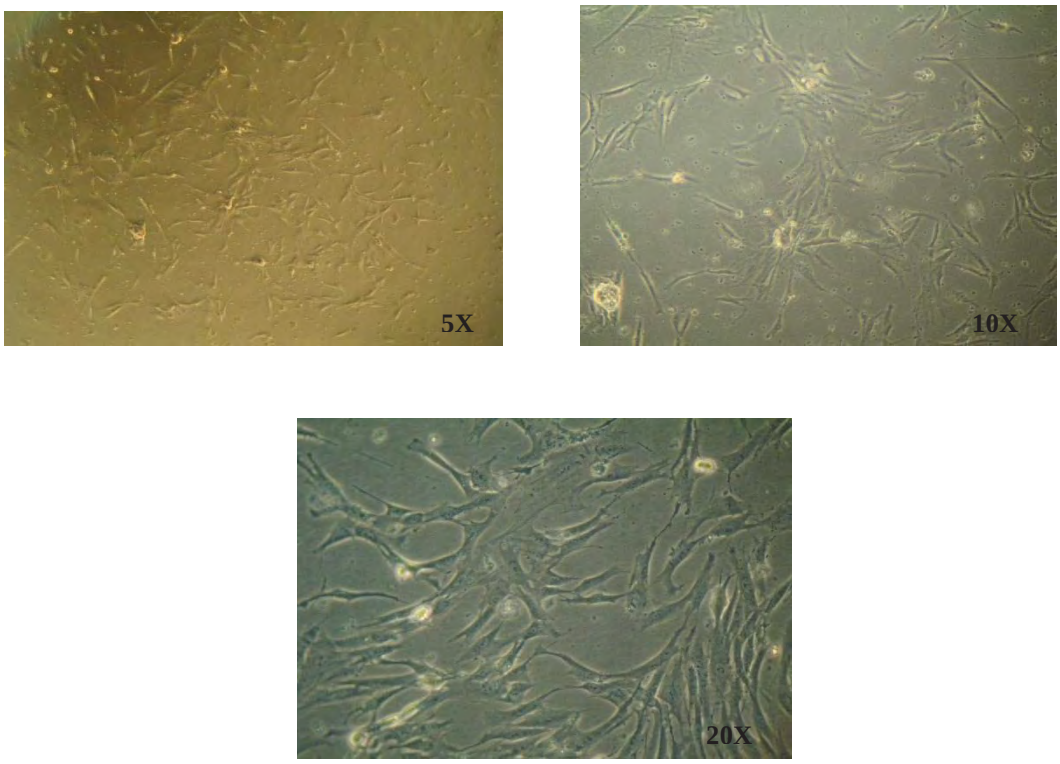



**Figura 14** – CTMs de tecido adiposo humano processadas por DM 15 dias após o plaqueamento.

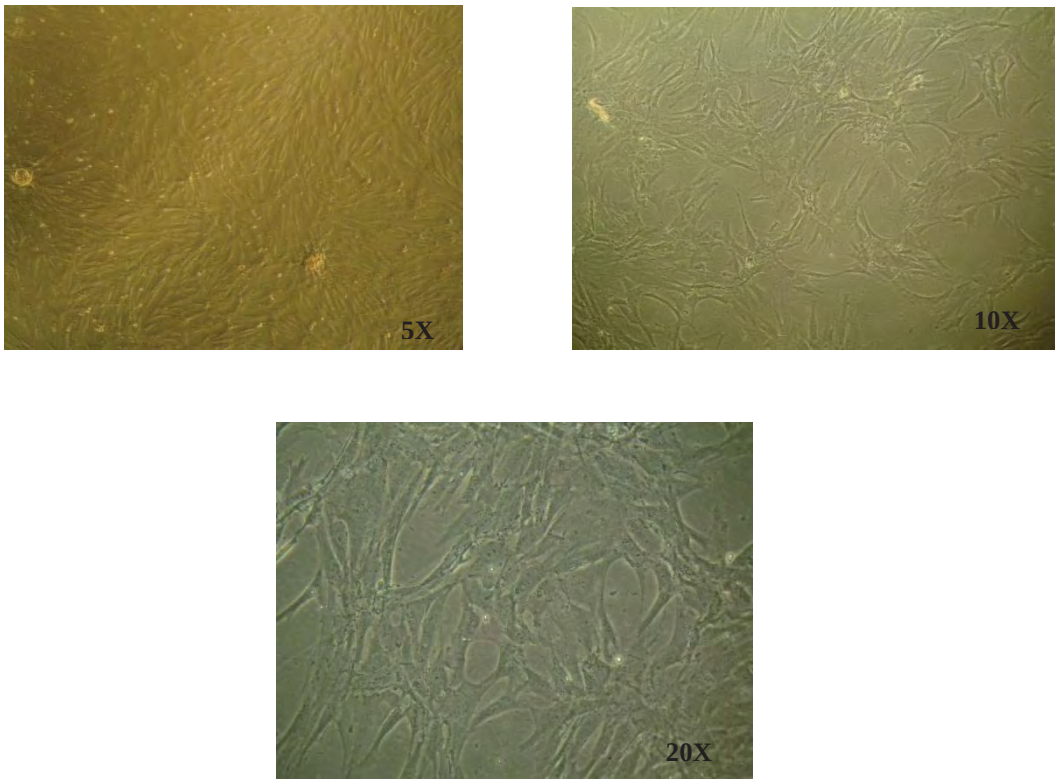



**Figura 15 –** CTMs de tecido adiposo humano processadas por DE 15 dias após o plaqueamento.

Ao se comparar as CTMs de tecido adiposo obtidas por DM de coelhos e humanos, observou-se que as células de coelhos crescem mais rapidamente em relação às células humanas.

### 5.3 Teste do Cometa

Foram utilizadas CTMs, com o intuito de padronizar o ensaio de cometa. Para tanto, utilizamos um indutor de dano no DNA nestas células para estabelecermos um controle positivo e conhecer qual o perfil de resposta desta célula em presença deste indutor. Para cada técnica, DE e DM, observamos 50 caudas do nucleossomo sendo o resultado considerado o valor da intensidade de fluorescência da cauda. Quanto maior o valor da intensidade da cauda, maior o dano no DNA celular, sendo **10** o escore considerado limite máximo aceitável. Pode-se observar que nas 50 caudas das técnicas avaliadas, encontrou-se 17/50 com escores ≥ 10 para a técnica DE (34%) enquanto que para a dissociação mecânica registrou-se apenas 5 caudas com escore ≥ 10 (10%).

Estes resultados preliminares ainda precisam ser reproduzidos e só serão viáveis a partir de análises confirmatórias com maior quantidade de amostras e padronização dos controles positivos e negativos (sendo necessário utilizar uma concentração ideal da droga indutora de dano no DNA para se obter padrões de controle positivos confiáveis).

### 5.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do teste ***t*** não pareado, sendo que o valor de p encontrado foi de 0,7917. Para que exista diferença estatística significativa, o valor de p deve ser menor que 0,05. Portanto, não houve diferença significativa entre as médias de porcentagem de confluência nos métodos de DE e DM.

De acordo com o **gráfico 3**, podemos observar que a DE mostra-se mais eficiente nos primeiros dias de cultura. No 7º dia após o plaqueamento das células, a média das porcentagens de confluência das 10 amostras de DE é 45 e a média obtida das 10 amostras por DM é 30. No 9º , 11º, e 13º dias, a DE também se sobrepôs à DM, sendo que no 9º dia a média para DE foi de 72,2 e a média para DM foi de 60; no 11º dia a média para DE foi 70 e para DM 60 e no 13º dia a média para DE foi de 90 e 87,5 para DM. A partir do 15º dia de observação, a DM passa a se sobrepor em relação à DE de forma significativa: a média encontrada para DE foi de 47,5 e a média de DM foi de 85.

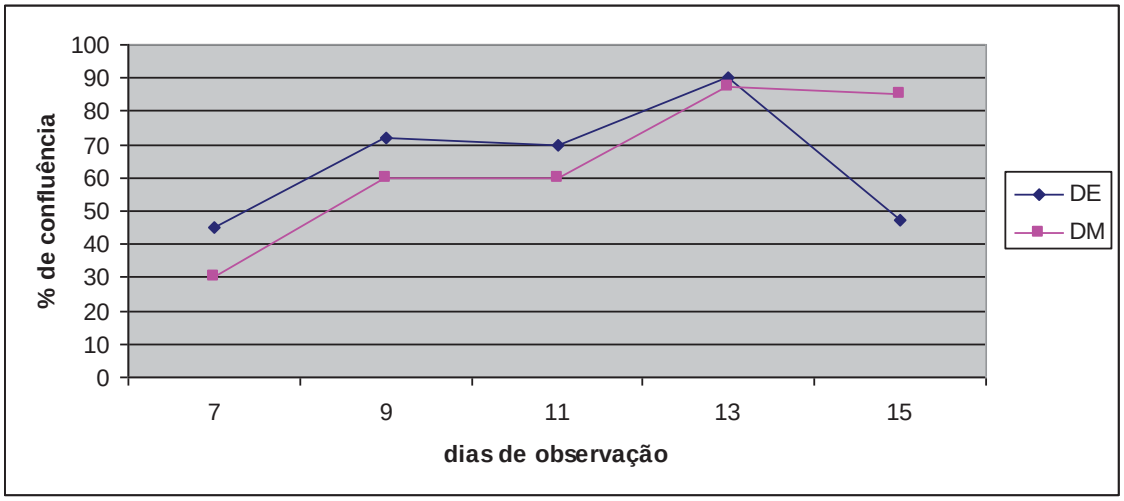



**Gráfico 2:** Média das porcentagens de confluência das células obtidas por digestão enzimática e dissociação mecânica nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento

Observando-se estes dados juntamente com os resultados do teste do cometa, podemos concluir que o método de DM causa menos danos às células, fazendo com que as mesmas sejam mais estáveis em cultura. As colunas do **gráfico 4** indicam que a confluência das células obtidas por DM crescem de forma linear.

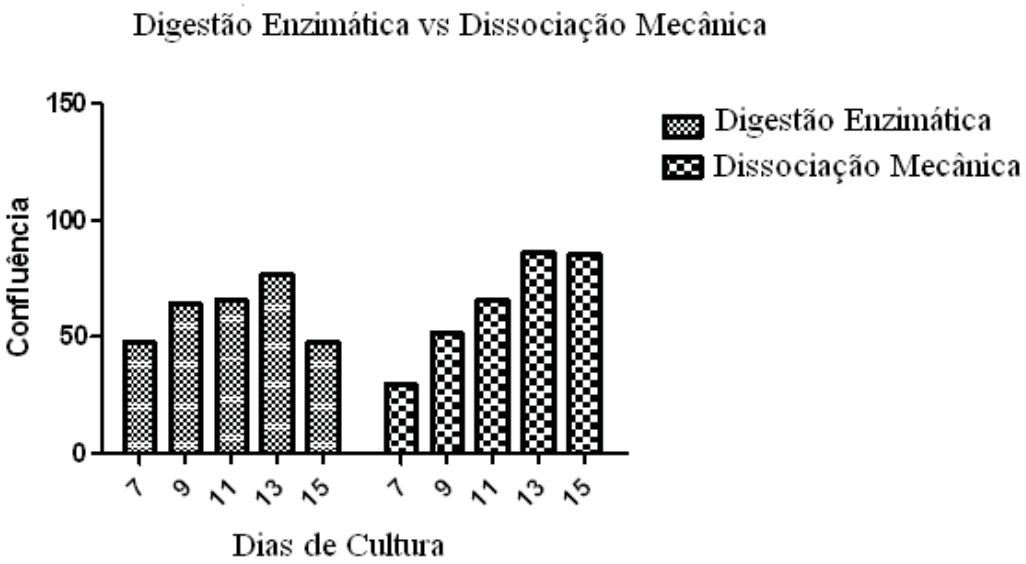



**Gráfico 3:** Porcentagem da confluência das células obtidas por DE e DM nos dias 7, 9, 11, 13 e 15 após plaqueamento

## 5.5 Expressão Fenotípica das Células das Diferentes Espécies Obtida por Citometria de Fluxo

As amostras de coelho foram testadas, tanto na obtenção das CTMs de medula óssea como de tecido adiposo. Para este último tecido, os marcadores ainda avaliam o desempenho das duas diferentes técnicas: DM ou DE, em primeira e segunda passagens. Em primeira passagem, a média de fluorescência das CTMs de MO de coelho frente ao marcador **CD34** foi de 0,93% enquanto que para as amostras obtidas de tecido adiposo humano a média foi de 47%. Estes dados estão de acordo com a literatura especializada. No entanto, as CTMs de tecido adiposo de eqüinos tiveram um desempenho bastante diferente, cuja média ficou em 0,46% , enquanto que o desempenho do marcador CD 34 com CTMs de medula óssea de camundongos foi de 0,57%. Estes resultados

evidenciam que o marcador utilizado, anti CTMs humanas, teve uma reação cruzada, levando a resultado falso-positivo em eqüinos. Estas amostras não puderam ser analisadas com marcadores espécie-específicos, pois estes inexistem no mercado. Em segunda passagem, observou-se aumento expressivo da fluorescência frente ao CD34, apontando para aumento da reação cruzada inespecífica (CD34 de medula óssea de coelhos foi para 17,9%), já que este marcador, à medida que ocorrem as passagens, deve naturalmente decrescer **(Quadro 4)**.

| | % fluorescência – 1ª passagem | | | | | % fluorescência 2ª passagem | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **MARCADOR** / **AMOSTRA** | **CD45** | **CD34** | **CD90** | **CD44** | **A69** | **CD45** | **CD34** | **CD90** | **CD44** | **A69** |
| **MO Coelho** | | | | | | | | | | |
| amostra 1 | NR | 0.96 | 6.91 | NR | NR | NR | 22.82 | 80.44 | NR | NR |
| amostra 2 | NR | 1.77 | 1.69 | NR | NR | NR | 15.28 | 68.63 | NR | NR |
| Amostra 3 | NR | 0.08 | 9.44 | NR | NR | NR | 15.43 | 66.59 | NR | NR |
| **TA Coelho** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 DM | NR | NR | 3.82 | NR | 15.03 | NR | NR | 6.21 | NR | 80.57 |
| Amostra 2 DM | NR | NR | 3.06 | NR | 16.54 | NR | NR | 1.09 | NR | 74.07 |
| Amostra 3 DM | NR | NR | 0.31 | NR | 5.57 | NR | NR | 0.27 | NR | 25.21 |
| **TA Coelho** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 DE | NR | NR | 9.33 | NR | 83.16 | NR | NR | 27.99 | NR | 43.40 |
| Amostra 2 DE | NR | NR | 0.80 | NR | 33.43 | NR | NR | 3.25 | NR | 79.12 |
| Amostra 3 DE | NR | NR | 2.18 | NR | 26.74 | NR | NR | 2.34 | NR | 35.36 |
| Amostra 4 DE | NR | NR | 1.53 | NR | 79.27 | NR | NR | 1.06 | NR | 23.35 |
| **Humano** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 DE | 37.18 | 27.54 | 21.88 | NR | NR | 18.32 | 35.85 | 9.36 | NR | NR |
| Amostra 1 DM | 43.57 | 66.51 | 24.47 | NR | NR | 19.16 | 40.38 | 16.46 | NR | NR |
| **MO Cavalo** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 | NR | NR | 30.92 | 62.75 | NC | NR | NR | 68.93 | 41.03 | 85 |
| Amostra 2 | NR | NR | 30.17 | 42.28 | 75 | NR | NR | 38.69 | 1.76 | 79.10 |
| Amostra 3 | NR | NR | 25.77 | 41.22 | 85.67 | NR | NR | 57.05 | 11.84 | 89.74 |
| Amostra 4 | NR | NR | 52.66 | 53.19 | 95.37 | NR | NR | 57.53 | 50 | 0.04 |
| **TA Cavalo** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 | NR | 0.51 | 0.50 | 53.24 | NR | NR | 0.24 | 98 | 93 | NR |
| Amostra 2 | NR | 0.42 | 0.39 | 59.82 | NR | NR | 0.09 | 90 | 84.66 | NR |
| **MO Camundongo** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 | NR | 0.63 | 22.55 | NR | 55.68 | NR | 0.48 | 8.05 | NR | NR |
| Amostra 2 | NR | 0.44 | 6.74 | NR | 71.22 | NR | 0.46 | 7.15 | NR | NR |
| Amostra 3 | NR | 0.57 | 9.38 | NR | 76.22 | NR | 0.49 | 11.36 | NR | NR |
| Amostra 4 | NR | 0.63 | 10.32 | NR | 65.81 | NR | 0.59 | 6.80 | NR | NR |
| **MO Macaco** | | | | | | | | | | |
| Amostra 1 | 0 | 84,97 | 0,18 | NR | NR | NR | NR | NR | NR | NR |

MO : medula óssea; TA : tecido adiposo; NR: não realizado

**Quadro 4** – Desempenho dos diferentes marcadores analisados por citometria de fluxo em amostras de medula óssea ou tecido adiposo dissociado mecanicamente ou por enzimas.

O marcador **CD45** mostrou desempenho médio esperado para o reagente em células humanas (média de 40,3% em CTMs de tecido adiposo). Este marcador teve seu valor diminuído na segunda passagem, como esperado, pois as células receberam meio de cultura indutora de células tronco. Quando se analisa o desempenho do **CD34** com tecido adiposo humano, este índice de fluorescência cai, como é desejado: 47% na primeira passagem para uma média de 38% na segunda passagem. Apesar da fraca resposta com amostras de tecido adiposo de cavalo, o decréscimo foi identificado. Nas amostras de camundongo o marcador não se altera de forma significativa.

Quanto ao marcador **CD90,** espera-se que o desempenho aumente com o número de passagens. No entanto, este fato não foi observado na amostra humana para o qual o reagente é comercializado, mas sim, nas amostras de medula óssea de coelhos, cavalos e tecido adiposo de eqüinos, cujas médias foram superiores a 55%, enquanto que para tecido adiposo de humanos a média foi de 13% e de camundongos 8,34%. Estes resultados podem apontar reagente comercial sem estudo de especificidade adequadamente conduzido.

O marcador **CD44** é um reagente específico para CTMs de cavalos. O desempenho do mesmo foi adequado e mostrou índices de fluorescências maiores entre 1º e 2º passagens.

O anticorpo denominado **A69** faz parte de clones de anticorpos monoclonais murinos produzidos contra antígenos expressos em células-tronco de coelho, no Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu conduzido pelo trabalho de término de Curso de Renan Padron Almeida. Trata-se de uma IgG1κ, na concentração de 25mg/ml. No experimento conduzido em 2009, este anticorpo reconheceu as CTMs de medula óssea de coelhos com percentual de 57,34 e seu reconhecimento para tecido adiposo foi melhor, 78,83% **(Quadro 5)**.

Dados relevantes foram registrados neste segundo experimento. As três amostras processadas pelo método de DM tiveram uma média de fluorescência de 12,4% na primeira passagem e 60% na segunda passagem. Já as amostras processadas por DE tiveram um desempenho de 55,7% na primeira passagem e 45% na segunda passagem apontando para uma eventual remoção mais eficaz de CTMs do tecido, mas cuja cultura se compromete, provavelmente pelas lesões de DNA que o teste cometa apresentou. Em medula óssea de cavalo, o reconhecimento foi em média de 85% na primeira passagem decrescendo para 56% na segunda passagem.

| Amostra | 1ª passagem | 2ª passagem |
|---|---|---|
| MO coelho | 57,34* | NR |
| TA coelho | 78,83* | 60% (DM) 45% (DE) |
| TA humano | 16,96* | NR |
| MO cavalo | 85% | 56% |
| TA cavalo | NR | NR |
| MO camundongo | 67,23 | NR |

**NR: não realizado;** * Dados do trabalho de Renan Padron Almeida, 2009

**Quadro 5** – Média de fluorescência do anticorpo A69 analisado por citometria de fluxo em amostras de medula óssea ou tecido adiposo dissociado mecanicamente ou por enzimas.

Novos procedimentos deverão ser realizados para se concluir a aplicabilidade do anticorpo monoclonal obtido, visto que o mesmo não foi testado com todos os tipos celulares. No entanto, este anticorpo apresenta especificidade dirigida contra CTMs de medula óssea e tecido adiposo, com melhor desempenho em tecido adiposo. Seu desempenho em amostra humana manteve-se, para primeira passagem, como nos dados obtidos por Almeida, RP. Este marcador pode ser usado na pesquisa com células-tronco de medula óssea eqüinas e murinas.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível identificar reação cruzada inter-espécies entre o anticorpo monoclonal murino (A69) dirigido contra célula-tronco de coelho produzida pelo Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu, evidenciando que este reagente pode ser utilizado em medicina veterinária, em especial para pesquisa envolvendo eqüinos.

- ✓ Foram estabelecidos protocolos para cultura de CTMs de medula óssea e tecido adiposo de diferentes espécies, evidenciando que o procedimento é reprodutível.

- ✓ A comparação dos métodos de obtenção de células-tronco tecido específico através da DE e DM mostrou superioridade da DM em relação ao uso de enzima.

- ✓ Quanto ao parâmetro temporal, células obtidas por DE atingem a confluência de 80% mais rapidamente, mas regride, fato este não observado nas células obtidas por DM.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1 – Grannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cells Research & Therapy. 2010; 1:2

2 – Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. Blood. 2003; 102: 3483-3493

3 – Zago MA, Covas DT. Células-tronco: A Nova Fronteira da Medicina. São Paulo: Atheneu; 2007.

4 - Moraes A., Augusto EFP, Castilho LR. Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos à Terapia Celular. São Paulo: Roca; 2007. Cap. 1

5 - Moraes A., Augusto EFP, Castilho LR. Tecnologia do Cultivo de Células Animais de Biofármacos a Terapia Celular. São Paulo: Roca; 2007. Cap. 2

6 - Nardi NB, Meirelles LS. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. 2006; 174: 249-282

7 - Mitchell JB, Mcintosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd E, Kloster A, Halvorsen YD, Storms RW, Goh B, Kilrov G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. Stem Cells. 2006; 24: 376-385

8 – Meirelles LS, Nardi NB. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. Frontiers in Bioscience. 2009; 14:4281-4298

9 - Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. Stem Cells. 2007 Jul 26.

10 - Rozemuller H, Prins HJ, Naaijkens B, Staal J, Bühring HJ, Martens AC. Prospective isolation of mesenchymal stem cells from multiple mammalian species using cross-reacting anti human monoclonal antibodies. 2009

11 - Meirelles LS, Caplan AI, Nardi NB. In seach of the in vivo identify of mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2008; 26: 2287-2299

12 - Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. Int. J. Biol. 2007; 51: 723-729

13 - Wang X, Moutsoglou D. Osteogenic and adipogenic differentiation potential of an immortalized fibroblast-like cell line derived from porcine peripheral blood. In vitro Cell. Dev. Biol. – Animal. 2009; 45:584-591

14 - Carvalho AM, Alves ALG, Golim MA, Moroz A, Hussni CA, Oliveira PGG, Deffune E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. Vet. Immun. Imunopath. 2009

15 – Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Machalinski B, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: Purification from adult organs, characterization and biological significance. Stem Cells Rev. 2008 May 6; 4: 89-99

16 – Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Shin DM, Ratajczak J, Kucia M. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. Experimental Gerontology. 2008; 43: 1009-1017

17 - Mazzetti MPV, Oliveira IS, Miranda-Ferreira R, Fauaz G, Ribeiro CN, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, Eça LP. Qualitative and quantitative analysis of rabbit´s fat mesenchymal stem cells. 2010 Jan-Feb; 25(1)

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

19 - Katz AJ, Llull R, Hedrick MH Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. Clin Plast Surg. 1999; 26:587-603

20 - Eça LP, Ramalho RB, Oliveira IS, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, Mazzetti MPV. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. Acta Cir Bras. 2009 Sept-Oct; 24 (5)

21 - Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. J Nippon Med Sch. 2003; 70(4): 300-306

22 - Vermette M, Trottier V, Ménard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. Biomaterials. 2007; 28: 2850-2860

23 - Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. Vet Res Commun. 2009; 33:811-821

24 - Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2006 24:1613-1619

25 - Giovannini S, Brehm W, Mainil-Varlet P, Nesic D. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. Diferentiation. 2008; 76:118-129

26 - Vidal MA, Robinson SO, Lopez MJ, Paulsen DB, Borkhsenious O, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal

stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. Veterinary Surgery. 2008; 37: 713-724

27 - Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. Imunologia de Kuby. 6th ed. Artmed; 2007

28 - Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Experimental Hematology. 2004; 32: 414-425

29 - McKelvey-Martin, VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool Zobel BL, De Meo MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Research. 1993; 288: 47-63

30 - Östiling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophsys Res. Commun. 123: 291-298

31 - Fairbairn DW, Olive PL, O´Neil KL. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research. 1995; 339: 37-59