

MARTA APARECIDA SANTOS SOUZA

Emprego de um sistema semiautomatizado para o
isolamento e proliferação de células estromais
mesenquimais de tecido adiposo humano

ASSIS

2020

MARTA APARECIDA SANTOS SOUZA

Emprego de um sistema semiautomatizado para o
isolamento e proliferação de células estromais
mesenquimais de tecido adiposo humano

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

Orientador: João Tadeu Ribeiro Paes - MD, PhD

ASSIS

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Laura Akie Saito Inafuko - CRB 8/9116

S729e Souza, Marta Aparecida dos Santos
Emprego de um sistema semiautomatizado para o
isolamento e proliferação de células estromais mesenquimais
de tecido adiposo humano / Marta Aparecida dos Santos
Souza. Assis, 2020.
82 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis
Orientador: Dr. João Tadeu Ribeiro Paes

1. Células-tronco. 2. Imunofenotipagem. 3. Citometria
de fluxo. I. Título.

CDD 576



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Assis



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EMPREGO DE UM SISTEMA SEMIAUTOMATIZADO PARA O ISOLAMENTO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

AUTORA: MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA

ORIENTADOR: JOÃO TADEU RIBEIRO PAES



Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS, área: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOÃO TADEU RIBEIRO PAES
Depto. de Biotecnologia / UNESP/Assis

Profa. Dra. ANELISA RAMAO
UENP / Jacarezinho/PR

Prof. Dr. MURILO RACY SOARES
Ribeirão Preto/SP

Assis, 18 de março de 2019

Aos meus pais, Antônio Augusto dos Santos e Terezinha Leite dos Santos, pelo exemplo de vida, incentivo e coragem que são para mim, e a minha filha Julia Santos Souza, por estar sempre ao meu lado.

Agradecimentos

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, à Faculdade de Ciências e Letras do Campus de Assis, ao Departamento de Biotecnologia e ao Programa de Pós-Graduação em Biociências pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. João Tadeu Ribeiro Paes pela amizade, oportunidade, orientação e confiança depositada em mim durante todos esses anos.

À Keai Bioreserarch Inc., Canadá, nas pessoas do Dr. Maurício Browne de Paula e Dr. Marcos Ishii pela confiança e oportunidade no uso do aparato em minha pesquisa.

Aos membros titulares e suplentes da comissão examinadora pela colaboração e contribuição para a melhoria da redação final.

Ao Prof. Dr. Darío Abel Palmieri e Prof. Dr. Fernando Frei pela disponibilidade e pelos esclarecimentos de dúvidas.

A Clínica Maison das Flores pela colaboração e doação do material biológico.

Aos doadores voluntários que se disponibilizaram a colaborar com este trabalho, sendo imprescindíveis para que o mesmo pudesse ser desenvolvido.

À equipe do Laboratório GenTe Cel, pela parceria durante todos esses anos, especialmente ao Ms. Leandro Tarosso pela atenção e a Ms. Laís Marques pelo apoio, disposição em ajudar, convivência e a amizade, que ficará para nossas vidas.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências e Letras e do Programa de Pós-graduação em Biociências que, direta ou indiretamente, contribuíram com a minha formação.

E ao José Gilberto Milani e ao Allan Chiea de Souza pela amizade, atenção e suporte técnico oferecido.

As minhas queridas amigas que estiveram ao meu lado durante todo esse tempo: Angélica Santos, Kátia Regina Santos Pires e Laís Marques. Obrigada pelas experiências, pela paciência, pelos sorrisos e abraços e por todas as vezes que não hesitaram em me ajudar.

À minha família Fábio Roberto de Souza, Julia Santos e Sra. Lourdes de Oliveira pela ajuda, apoio e compreensão em todos os momentos.

E a Deus e Nossa Senhora que me proporcionaram vida e fé para chegar até aqui.

Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar. Não apenas planejar, mas também acreditar.

(Anônimo)

SANTOS-SOUZA, Marta Aparecida dos. **Emprego de um sistema semiautomatizado para o isolamento e proliferação de células estromais mesenquimais de tecido adiposo humano**. 2019. f. 89. Dissertação (Mestrado em Biociências). Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, 2019.

RESUMO

O emprego de células estromais mesenquimais (MSC) tem sido considerado como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. Neste contexto, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes de MSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de MSC, entre as quais vale ressaltar a abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e diferenciação multipotencial (osteócitos, condrócitos e adipócitos). Em função destes aspectos, as células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) têm adquirido um papel relevante para a medicina regenerativa e translacional. Ao longo dos anos um grande número de variantes metodológicas têm sido propostas para isolamento e proliferação de ADSC. Mais recentemente têm sido testados diversos sistemas automatizados e semiautomatizados de diferentes fabricantes para isolamento da SVF e posterior proliferação das ADSC. Neste contexto, pretendeu-se com este projeto realizar uma análise comparativa quanto à eficiência e capacidade proliferativa de ADSC, empregando-se a metodologia convencional ou clássica e metodologia semiautomatizada usando o aparato Kiso Processor, (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá). Foram, também, realizadas análises comparativas quanto á viabilidade, proliferação celular e manutenção dos atributos celulares das ADSC resultantes dos procedimentos de obtenção por convencional e semiautomatizada. Além disso, foram feitas análises qualitativas quanto à capacidade de diferenciação das ADSC *in vitro*, bem como, empregou-se, também, citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica, para determinação quantitativa de marcadores antigênicos de superfície (CD) nas células cultivadas até a 5ª passagem. Os

resultados permitiram estabelecer um protocolo eficiente e reprodutível para extração e proliferação de ADSC para o método semiautomatizado. Este sistema também apresentou, em relação à metodologia convencional, uma redução significativa no tempo de isolamento da fração estromal vascular, bem como menor manipulação das amostras, por ser um sistema fechado e, conseqüentemente, apresenta, potencialmente, menos risco de contaminação das amostras. Tanto nos sistema convencional quanto no semiautomatizado foram mantidos os atributos celulares, como marcadores de superfície característicos de MSC e capacidade de diferenciação in vitro, permitindo a validação da natureza mesenquimal das células obtidas pelos dois métodos de isolamento. Não se obteve, no entanto, diferença quanto á viabilidade e capacidade proliferativa das ADSC entre convencional e semiautomatizado. Apesar das citadas vantagens apresentadas pelo sistema semiautomatizado, a partir dos resultados obtidos não foi possível validar a hipótese formulada e que orientou o desenvolvimento deste projeto, qual seja, que o sistema semiautomatizado (Kiso), representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional no que concerne a maior viabilidade e potencial proliferativo das ADSC.

Palavras-chave: células-tronco, metodologia, cultivo, imunofenotipagem, citometria de fluxo, diferenciação.

SANTOS-SOUZA, Marta Aparecida dos. **Use of a semi-automated system for the isolation and proliferation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue.** 2019. f. 89. Dissertation (Master in Biosciences). São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2019.

ABSTRACT

The use of mesenchymal stromal cells (MSC) has been considered as a promising therapeutic alternative in several preclinical and clinical studies. In the context, the adipose tissue has emerged as one of the most important sources of MSC. There are a number of properties that make adipose tissue a highly feasible and efficient alternative for obtaining, isolating and proliferating MSC. Among these properties, it is worth mentioning the abundance of available material, which can be obtained from the patient (autologous), in non-invasive procedures, high proliferative capacity and differentiation in osteocytes, chondrocytes and adipocytes. Due to these aspects, adipose-derived mesenchymal stromal cells (ADSC) have acquired a prominent role for regenerative and translational medicine. In this context, it was intended with this project to perform a comparative analysis regarding the efficiency and proliferative capacity of ADSC, using two methods for isolation of the vascular stromal fraction (FEV) and subsequent proliferation of ADSC: the classical or conventional methodology and the semi-automated method using the Kiso Processor (Keai Bioreserarch Inc. Vancouver, Canada). In both procedures human adipose tissue was obtained by human liposuction procedures. The results allowed to establish a viable and reproducible protocol for extraction and proliferation of ADSC for the semiautomated methodology. In addition, comparative analyzes were carried out on the proliferation capacity and viability of the ADSC between the two methods. Analyzes were also performed for the adipogenic differentiation capacity and in vitro and immunophenotyping by flow cytometry, quantitatively evaluating the antigenic markers the cells cultured until the 5th passage. The results obtained allow us to conclude that it was not possible to elaborate more consistent propositions regarding the hypothesis that

guided the objectives of this project, that is, that the semiautomated system (Kiso) would represent an advantageous alternative to the conventional method, handling of the process, reduction of the stromal fraction isolation time and, consequently, lower risk of biological contamination.

Key words: stem cells, methodology, culture, immunophenotyping, flow cytometry, differentiation

Lista de Ilustrações

Figura 1. Diferenças fenotípicas, ao longo do cultivo, entre as células da SVF e ADSC expandidas em cultura. ADSC (ASC).

Figura 2. Diferentes sistemas Automatizados e Semiautomatizados.

Figura 3. Etapas de isolamento convencional (clássico) e cultivo de ADSC.

Figura 4. Etapas de isolamento de ADSC semiautomatizado Sistema Kiso.

Figura 5. Precipitado (pellet) após centrifugação da SVF da paciente 4.

Figura 6. Célula estromal mesenquimal derivada do tecido adiposo (ADSC).

Figura 7. Rendimento celular na extração entre os métodos convencional e Automatizado na obtenção de ADSC para a Paciente 3.

Figura 8. Rendimento celular na extração entre os métodos convencional e semiautomatizado na obtenção de ADSC para a Paciente 4.

Figura 9. Cultura celular de ADSC provenientes do paciente 4 - metodologia convencional: A: células no 7^o dia de cultivo. B: células aos 12 dias de cultivo.

Figura 10. Cultura celular de ADSC da paciente 4, obtidas a partir do processamento semiautomatizado, sendo em: A: células no 7^o dia de cultivo. B: células no 12^o dia de cultivo, com uma área de confluência de 70 a 80%.

Figura 11. Diferenciação Adipogênica de ADSC da paciente 4.

Figura 12. Proliferação das ADSC da paciente 4 a partir do isolamento pelo método convencional e semiautomatizado.

Figura 13. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método semiautomatizado.

Figura 14. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método convencional.

Figura 15. Comparação da análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo (% of vis), a partir do isolamento das células pelo método semiautomatizado (amostras 8marA) e convencional (amostras 8marA).

Lista de Tabelas

Tabela 1: Componentes da SVF e marcadores de superfície.

Tabela 2. Diferentes sistemas automatizados e semiautomatizados para isolamento de ADSC.

Tabela 3. Pacientes submetidos à abdominoplastia quanto ao gênero e idade.

Tabela 4. Determinação de células viáveis, por meio da metodologia de azul de Trypan, para o paciente 3, imediatamente após processamento do lipoaspirado e nas passagens 2 e 5.

Tabela 5. Determinação de células viáveis, por meio da metodologia de azul de Trypan, para a paciente 4, imediatamente após processamento do lipoaspirado e nas passagens 2 e 5.

Tabela 6. Marcadores de Superfície CD para metodologia semiautomatizada.

Tabela 7. Marcadores de Superfície CD para metodologia convencional.

Abreviaturas e Siglas

MSC – Células-tronco mesenquimais

ADSC – Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo

ESC – Células-tronco embrionárias

ASC – Células-tronco adultas

HSC – Células-tronco hematopoiéticas

CFU – F – Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (Colony forming unit fibrosblast)

ISTC – Sociedade Internacional para Terapia celular

SVF – Fração vascular estromal

FEV - Vascular stromal fraction

EPC – Células precursoras endoteliais

EC – Células endoteliais

CD – Cluster of differentiation

CAL – “Cell-assisted lipotransfer”

PBS – Tampão fosfato

SBF – Soro fetal bovino

TERM – Engenharia de tecidos/Medicina regenerativa

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Células-tronco.....	11
1.2. Células-tronco Hematopoiéticas (HSC)	12
1.3. Células estromais mesenquimais (MSC)	13
1.4. Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) 15	
1.5. Fração Vascular Estromal (SVF).....	18
1.6 – Métodos de Extração de células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)	20
2.1. Objetivo Geral.....	27
2.2. Objetivos Específicos	27
CAPÍTULO ÚNICO.....	35
MÉTODOS.....	43
Fluxograma.....	28
Obtenção do tecido adiposo	43
Isolamento de células estromais mesenquimais oriundas de tecido adiposo humano (ADSC) empregando-se o método convencional (clássico)	43
Isolamento de ADSC por Método	45
Teste de Viabilidade Celular: Proliferação Celular.....	46
Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	46
Verificação do potencial de diferenciação das ADSC: Diferenciação Adipogênica	47
ASPECTOS ÉTICOS	47
RESULTADOS	48
Padronização da Metodologia para Isolamento de ADSC por Método Semiautomatizado	48
Cultura e Caracterização das Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)	49
Teste de Viabilidade Celular: proliferação Celular	50
Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	51
REFERÊNCIAS	58
TABELAS E FIGURAS.....	60
ANEXOS.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco

As Células-tronco podem ser definidas como células indiferenciadas com capacidade de autoduplicação e de dar origem a células diferenciadas (NIH, 2001). Segundo Melton e Cowan (2004) uma célula-tronco é um tipo especial de célula, que tem a capacidade peculiar de autorrenovação e dar origem a tipos celulares especializados. Apesar das variações conceituais, há duas propriedades fundamentais que caracterizam as células-tronco: autorrenovação e diferenciação (NIH, 2001; MELTON; COWAN, 2004; RIBEIRO-PAES, 2009; YARAK; OKAMOTO, 2010; ERIDANI, 2014; ORGUN; MIZUNO, 2017). De acordo com os tecidos de origem, podem ser classificadas em dois grandes grupos: Células-tronco embrionárias (ESC) e as Células-tronco adultas (ASC) (NIH, 2001; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005; ROOBROUCK et al., 2008; BRUNT et al., 2012; ROCHA et al., 2012).

As Células-tronco embrionárias (ESC) são derivadas da massa celular interna do blastocisto (4 a 5 dias após a fecundação). Estabelecem linhagens de células pluripotentes, com grande potencial de diferenciação, podendo dar origem a todos os diferentes tipos celulares, derivados dos três folhetos embrionários (NIH, 2001; AMORIN et al., 2012; ERIDANI, 2014; FUOCO et al., 2016). As ESC foram, pioneiramente, isoladas em 1981, por dois grupos independentes de pesquisadores. O grupo da Universidade de Cambridge (Reino Unido) liderado por Martin J. Evans, que, em colaboração com Mathew Kaufman, estabeleceram a primeira cultura de células-tronco de embriões de ratos. O grupo liderado por Gail R. Martin, pesquisadora da Universidade da Califórnia (USA) que obteve uma linhagem de células pluripotentes a partir da massa celular interna de blastocistos de camundongos (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981).

As Células-tronco adultas (ASC) podem ser definidas, como um tipo celular que apresenta o potencial de autorrenovação, por longos períodos de tempo e capacidade de originar todos os tipos celulares especializados do

tecido do qual se originaram (NIH, 2001; MERCIER et al., 2012). São encontradas em diversos tecidos diferenciados e são fundamentais nos processos de renovação tecidual e regeneração em processos degenerativos e traumas. Dessa forma desempenham papel fundamental na manutenção da homeostasia e integridade tecidual (NIH, 2001; HORWITZ, 2003; FUOCO et al., 2016).

Em função do seu potencial as ASC podem, por sua vez, ser subdivididas em dois grupos gerais: Células-tronco hematopoiéticas (HSC) e as Células-tronco mesenquimais (MSC) (NIH, 2001; GIMBLE, 2003; BIANCO et al., 2008; BUNNELL et al., 2008; ERIDANI, 2014).

1.2. Células-tronco Hematopoiéticas (HSC)

O conceito de célula-tronco foi estabelecido a partir dos trabalhos pioneiros de Till e McCulloch, no início dos anos 60 do século passado (TILL; MCCULLOG, 1961). Foi observado, pelos autores, a reconstituição do sistema hematopoiético de animais submetidos a doses letais de radiação após o transplante de medula óssea proveniente de animais saudáveis e singênicos. Verificou-se, posteriormente, que essas células eram oriundas de células fenotipicamente distintas, capazes de repovoar o sistema hematopoiético por longo período (ABRAMSON, et al., 1977).

Em indivíduos adultos, estas células estariam quiescentes na maior parte do tempo e seriam responsáveis por manter a população de células progenitoras do tecido hematopoiético durante a vida do indivíduo. Receberam, assim, a denominação de células-tronco hematopoiéticas (HSC) (EAVES, 2015). Esses resultados abriram novas perspectivas de estudo e o avanço no conhecimento das propriedades de autorrenovação e diferenciação das HSC.

As HSC têm sido utilizadas com sucesso em pacientes com falência medular ou leucemia (HIRAO et al., 2004; WILSON et al., 2006).

Funcionalmente as HSC têm a capacidade de reconstituir o sistema hematopoiético em animais imunodeficientes ou de iniciar e sustentar por longo

período e hematopoese em cultura. Fenotipicamente, são caracterizadas pela presença dos marcadores (antígenos) de superfície CD34, CD49f, CD90, CD117, CD133, e são desprovidas de marcadores específicos para células de linhagens negativas (Lineage-negative cells - Lin) (FLORES-GUZMÁN, et al., 2013).

Após a identificação das HSC, foi isolado outro tipo de célula tronco adulta de origem não hematopoiética, as células estromais mesenquimais multipotentes ou células-tronco mesenquimais. Receberam essa denominação, porque derivavam do folheto embrionário intermediário, o mesoderma, que é responsável pela formação dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (SINGER et al., 2011).

1.3. Células estromais mesenquimais (MSC)

As Células estromais mesenquimais (MSC) foram, pioneiramente, identificadas por Friedenstein e colaboradores na década de 60. Os autores verificaram a presença de um pequeno grupo celular oriundo da medula óssea, composto por células aderentes à superfície plástica, com formato fusiforme, formadoras de colônias e com capacidade de diferenciação em osso e cartilagem (FRIEDENSTEIN et al., 1968). Inicialmente, estas células foram denominadas de Unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, colony forming unit fibroblast) (FRIEDENSTEIN et al., 1968; FRIEDENSTEIN et al., 1976). A partir dos trabalhos de Friedenstein vários estudos foram realizados com a finalidade de caracterizar e identificar o grupo de células aderentes de origem mesenquimal.

Ao longo dos anos receberam diferentes denominações. Em 1988, Maureen Owen, propôs a denominação de células-tronco estromais da medula e aventou a possibilidade de que o sistema estromal da medula seria parte de um sistema de células estromais. Investigações preliminares in vitro, também corroboram a hipótese e mostraram que a CFU-F é uma população heterogênea de células-tronco e progenitoras.

Em 1991, Arnold Caplan propôs a denominação Células-tronco Mesenquimais (Mesenchymal Stem Cells), referindo-se às células que formavam tecido ósseo e cartilaginoso no embrião e o reparo e renovação no adulto. A progênie tornava-se comprometida com uma via fenotípica específica e distinta, uma linhagem com etapas discretas e, finalmente, células de estágio final, envolvidas com a fabricação de um tipo de tecido único (CAPLAN, 1991). Darwin J. Prockop, em 1997, propõem a denominação de células estromais da medula, que poderiam ser isoladas de outras células na medula, pois possuíam a tendência em aderir ao plástico de cultura. Além disso, apresentavam muitas das características das células-tronco, que as definiam como mesenquimais, como a diferenciação em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e até mioblastos. Portanto, as células estromais da medula óssea apresentavam várias características que os tornavam potencialmente caracterizadas e úteis para terapia celular e genética (PROCKOP, 1997).

Em 2005, a Sociedade Internacional para Terapia Celular - ISCT (International Society for Cellular Therapy) propôs a denominação Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) para designar a população de células não hematopoiéticas, fibroblastóides, isoladas dos mais diversos tecidos, que aderem à superfície plástica e apresentam capacidade de diferenciação multipotencial *in vitro*. A ISCT recomendou, no entanto, que mantivesse o acrônimo MSC para se referir às células estromais mesenquimais multipotentes (HORWITZ et al., 2005).

Em 2006, a ISCT estabeleceu critérios mínimos para definição e caracterização das MSC. Assim, para que uma célula seja definida como tal (MSC), devem apresentar aderência à superfície plástica dos frascos de cultura, presença ($\geq 95\%$) de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência (≤ 2) dos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA classe II. Além disso, deveriam apresentar potencial de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo sob determinadas condições de indução *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

Em um artigo publicado em 2017, Caplan propôs a mudança da nomenclatura das células-tronco mesenquimais, proposta pelo próprio autor em 1991 (CAPLAN, 1991), para “*Medicinal Signaling Cells*” (Células de Sinalização

Medicinais), argumentando que essas células localizavam-se nos locais de lesão ou doença e secretavam fatores bioativos que são imunomoduladores e tróficos (regenerativos), o que significa que essas células produzem drogas terapêuticas *in situ*, que são medicinais (CAPLAN, 2017).

Embora a medula óssea tenha sido a primeira e, ainda, representa a mais clássica fonte de obtenção de MSC, uma série de outros tecidos têm sido utilizados, com excelentes resultados, como fontes de MSC, tais como: cordão umbilical, placenta, polpa de dente, pele, músculo esquelético, líquido amniótico, feto, baço, pulmão, pâncreas, rins e, em especial, o tecido adiposo, que representa uma abundante fonte em seres humanos (LINDROOS et al., 2011; BOURIN et al., 2013; GALIPEAU et al., 2016; ORGUN; MIZUNO, 2017; NAJI et al., 2017; GALIPEAU; SENSEBE, 2018; NAJI et al., 2019).

1.4. Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)

Os métodos de isolamento de tecido adiposo foram descritos por Martin Rodbell e colaboradores em 1960. Os autores propuseram o método de isolamento *in vitro* de adipócitos maduros e progenitores adipogênicos do tecido adiposo de ratos (RODBELL et al., 1966).

A metodologia para o emprego do tecido adiposo como fonte de ADSC foi pioneiramente estabelecido por Zuk e colaboradores, em 2001 (ZUK et al., 2001). Desde então, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes para isolamento e proliferação de ADSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de ADSC. Entre as quais, vale ressaltar: a abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e, além disso, as ADSC apresentam grande capacidade proliferativa e diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos (GIMBLE et al., 2007; BUNNELL et al., 2008; ZUK et al., 2010; BOURIN et al., 2013; ORGUN; MIZUNO, 2017).

Em função destes aspectos, as ADSC têm adquirido um papel de destaque no contexto da engenharia de tecidos e medicina regenerativa

(TERM). Como decorrência, há uma vasta literatura quanto ao emprego das ADSC em modelos experimentais pré-clínicos e protocolos clínicos em diferentes tipos de doenças agudas ou crônico-degenerativas em pacientes humanos (GIMBLE et al., 2007; ZUK, 2010; RIBEIRO-PAES et al., 2011; MIZUNO et al., 2012; STESSUK et al., 2013; DE FRANCESCO et al., 2015; MARCELINO et al., 2015; FELIX et al., 2016; ORGUN; MIZUNO, 2017; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2018).

Entre os diferentes procedimentos para isolamento de ADSC, vale destacar a obtenção de fragmentos de tecido adiposo ou a lipoaspiração. O procedimento de lipoaspiração pode ser realizado para obter quantidades significativas de ADSC. O lipoaspirado é digerido com a enzima colagenase, resultando em uma mistura de células heterogêneas que é referido como fração vascular estromal (SVF) (ORGUN; MIZUNO, 2017).

As células que compõem a SVF são identificadas como sendo negativas para CD235a e com menor frequência, CD31, mas positivas para CD34 ou CD45. Ao longo do cultivo celular, o imunofenótipo celular é alterado, em função da ausência de células hematopoiéticas e a população celular da SVF será constituída, principalmente, de ADSC (ORGUN; MIZUNO, 2017). As culturas expandidas ADSC, após as passagens, são positivas para CD34, CD44, CD73, CD90 e CD105 como outras MSC e negativas para CD31 e CD45, conforme demonstrado na figura 1 (MINTEER et al., 2015; BAJEK et al., 2016).

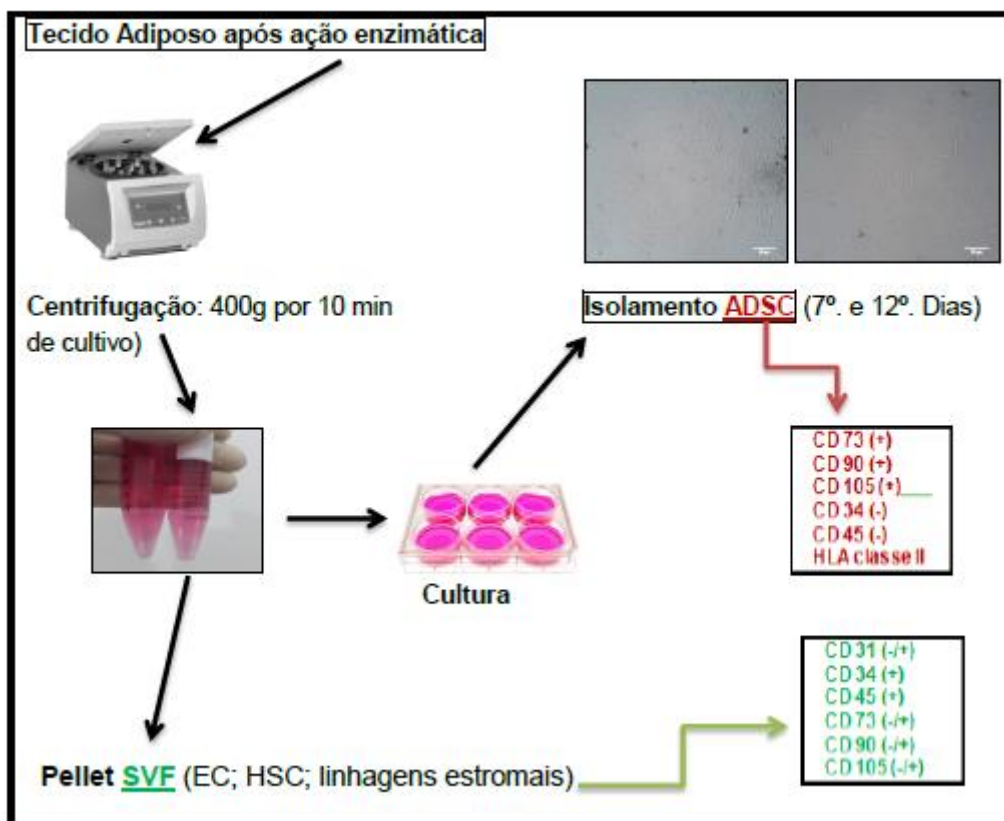


Figura 1. Diferenças fenotípicas, ao longo do cultivo, entre as células da SVF e ADSC expandidas em cultura. ADSC (ASC): Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo; SVF: fração vascular do estromal
Fonte: próprio autor.

O lipoaspirado tem sido empregado em grande número de trabalhos para a obtenção da Fração Estromal Vascular e posterior isolamento e cultivo de ADSC. Há ensaios clínicos que investigaram os efeitos da administração das ADSC ou SVF em diversas patologias e projeta-se, ainda, um grande potencial de aplicabilidade no que concerne ao emprego da SVF ou ADSC cultivadas na engenharia de tecidos e medicina regenerativa (ORGUN; MIZUNO, 2017).

Neste contexto, há um grande interesse na adequação de novas metodologias que permitam associar facilidade de obtenção, bem como reprodutibilidade, viabilidade e boa capacidade proliferativas das células obtidas a partir de fragmentos de tecido adiposo ou lipoaspirado.

1.5. Fração Vascular Estromal (SVF)

As ADSC podem ser isoladas da fração vascular estromal (SVF) do tecido adiposo lipoaspirado. A SVF é composta por ADSC, células precursoras endoteliais (EPC), células endoteliais (EC), macrófagos, células musculares lisas, linfócitos, pericitos e pré-adipócitos, entre outros (MI et al., 2006; CASTEILLA, 2011).

O isolamento de SVF a partir de lipoaspirado é realizado por digestão da porção gordurosa com colagenase, separando, após centrifugação ou decantação, o conteúdo em duas fases distintas: a fração de adipócitos maduros do sobrenadante e os outros tipos celulares situados na fase inferior (ZUK et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2006). Esta separação é mais eficiente por centrifugação, porém todas as células sofrerão sedimentação.

Pode ser obtida, também, por fases, baseada em gravidade e filtração, que permite separar as células com base no tamanho, enriquecendo assim, o coquetel celular específico. A centrifugação da SVF produz um *pellet* que contém vários tipos celulares, como as ADSC e os eritrócitos. Os eritrócitos são um dos principais contaminantes presentes na SVF e podem ser lisados para isolar uma população mais pura de células ADSC e / ou SVF (BUNNELL et al., 2012; SUNDARRAJ et al., 2015; BORA; MAJUMDAR, 2017).

Para caracterizar o conteúdo celular da SVF são utilizadas combinações de antígenos de superfície (cluster of differentiation - CD). Trata-se de um tema controverso e ainda não bem definido quando á caracterização imunofenotípica dos diferentes tipos celulares presentes na SVF, considerando que há diferenças metodológicas entre diferentes laboratórios e grupos de pesquisa. Uma lista de marcadores positivos e negativos, comumente usados, identificam diferentes populações celulares da SVF (ZUK et.al., 2001; BOURIN et.al., 2013; SUNDARRAJ et. al., 2015), conforme apresentado na tabela 1, citada em BORA; MAJUMDAR, 2017, com modificações.

Tabela 1: Componentes da SVF e marcadores de superfície celular modificada de BORA; MAJUMDAR, 2017.

Componentes celulares SVF	Tamanhos celulares (µm)	Marcadores moleculares	
		Positivos	Negativos
ADSC	~10-25 µm	CD34, CD73, CD90, CD105	CD31, CD45, CD144
EPC	~7-8 µm	CD34, CD31, CD133, CD146	CD45
EC	~10-30 µm	CD31, FVIII	CD34
MACROFAGOS	~20 µm	CD45, CD14, CD34, CD206	-
PERICITOS	Até ~70 µm	CD146, CD90, CD73, CD44, CD29, CD13	CD34, CD45, CD56

Entre os marcadores estudados, o CD34 é destacado, pois ainda é amplamente considerado um marcador de HSC, devido à sua associação histórica com o enriquecimento de tais células para transplante de medula óssea e de sangue de cordão umbilical. A hipótese pericítica relacionada à MSC e ADSC apresenta diferentes investigações (SZÖKE; BRINCHMANN, 2012). Enquanto Crisan e colaboradores caracterizam o CD34– dos pericitos, como sendo os progenitores das células do estroma (CRISAN et al., 2008), Traktuev e colaboradores demonstraram uma identidade pericítica CD34+ para ADSC (TRAKTUEV et al., 2008). Maumus et al. em 2011, investigaram que CD34+ das ADSC não exibiam marcadores pericíticos *in vivo*, mas foram observados ao longo do processo de cultivo celular.

Dados comparativos em diferentes métodos de isolamento, como o método convencional, que são os procedimentos de isolamento de ADSC executados por manipulação do técnico ou pesquisador, sem uso de aparatos desenhados especificamente para isolamento das ADSC. Os métodos automatizados ou semiautomatizados são procedimentos de isolamento com o uso de aparatos específicos para o isolamento das ADSC. Pelo aparato Stempeutron (Bangalore, Índia) mostraram que SVF contém uma população pericítica CD146+ que é majoritariamente (> 90%), sugerindo que a SVF recém-isolada contenha uma população pericítica que não expressam os marcadores CD34 e CD31 (SUNDARRAJ et al., 2015).

A partir de uma análise comparativa sobre vantagens e desvantagens quanto ao emprego da SVF e ADSC, no que concerne aos atributos celulares e capacidade de estimulação da regeneração celular não se estabeleceu até os dias atuais uma posição consensual entre diferentes grupos de pesquisa. São

atribuídas duas vantagens da SVF sobre ADSC. Em primeiro lugar, embora semelhante em propriedades como imunomodulação, anti-inflamatória e angiogênese, a composição celular distinta e heterogênea da SVF pode ser responsável pelo melhor resultado terapêutico observado em estudos animais comparativos (VAN DIJK et al., 2011; YOU et al., 2015). Em segundo lugar, diferentemente das ADSC, a SVF é muito mais facilmente obtida, sem a necessidade de qualquer separação e, posterior cultivo celular. Assim, o produto celular terapêutico é obtido instantaneamente, com manipulação mínima com os reagentes, tornando-o comparativamente mais seguro (BORA; MAJUMDAR, 2017). Por outro lado deve-se considerar, que, enquanto as ADSC podem ser utilizadas em tratamentos alogênicos e autólogos, a SVF, devido à presença de vários tipos celulares e, portanto, com diferentes propriedades antigênicas podem desencadear respostas imunológicas. É indicada, apenas, para tratamentos autólogos.

1.6 – Métodos de Extração de células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)

Ao longo dos anos, vários métodos têm sido propostos para o isolamento e proliferação de ADSC. Metodologias para a extração celular sem a presença de enzimas digestivas ou com enzimas digestivas; o uso de técnicas convencionais ou com aparatos automatizados e semiautomatizados. Abordagens metodológicas propostas para aumentar a eficiência dos procedimentos e, como consequência, ampliar as alternativas das terapias celulares no contexto da medicina regenerativa e translacional.

Francis, et al., 2010 e Sach et al., 2012 realizaram o isolamento de ADSC de material lipoaspirado na ausência da enzima colagenase. O resultado foi um número menor de células quando comparado à extração na presença da enzima. Uma das hipóteses, o rendimento celular a partir de procedimentos mecânicos é muito menor em comparação com os métodos enzimáticos, já que as células do tecido adiposo, firmemente ligadas pelo colágeno, não serão facilmente liberadas pela ação mecânica isolada (ARONOWITZ et al., 2015).

Em 2013, um novo método de agitação mecânica foi proposto por Tonnard e colaboradores. O produto, denominado “*nanofat*”, foi obtido por emulsificação e filtração do lipoaspirado. Embora denominado como enxerto de “*nanofat*”, de fato nenhuma célula adiposa viável sobreviveu ao processo de emulsificação, mas, este, era rico em CD34+ ADSC (TONNARD et al., 2013).

Schipper et al., 2008 investigaram se a região de origem do tecido ou a idade do doador teriam efeito nas funções que poderiam interferir nos mecanismos de ação das ADSC. Os resultados desse estudo mostraram que houve variabilidade em função de ADSC nas regiões coletadas. Além disso, foram identificadas mudanças relacionadas à idade na função das ADSC. Estes dados ajudarão a selecionar pacientes e locais de coleta de células mais adequados para engenharia de tecidos e terapias celulares.

Gnanasegaran et al., 2014 realizaram um estudo para comparar e contrastar a produção das ADSC coletadas em relação a- usar crase - cinética de crescimento, capacidade de diferenciação *in vitro* e perfil de expressão gênica. Concluiu-se que as células coletadas de material lipoaspirado teriam propensão para dar origem a tecidos da camada endodérmica, enquanto que células coletadas de material proveniente de fragmentos teriam propensão para linhagens mesodérmicas e ectodérmicas.

Um método inovador “cell-assisted lipotransfer” (CAL), introduzido por Matsumoto et al., em 2006, propõe aumentar a relação ADSC/adipócitos combinando o transplante de gordura aspirada e extirpada com ADSC isoladas enzimaticamente. Neste procedimento os autores constataram, ao isolar a SVF na mesma quantidade de tecido adiposo aspirado e extirpado, que o número de ADSC aderentes após o cultivo por uma semana da SVF, foi maior na gordura extirpada do que na gordura aspirada.

No entanto, deve-se salientar que o uso de enzimas como colagenase, tripsina ou dispase, implica em altos custos e pode impactar na segurança e na eficácia da extração. Desta forma, três métodos não enzimáticos, foram propostos por Bellei et al., 2017, para melhorar a relação ADSC/adipócitos: decantação (sedimentação por gravidade), centrifugação e filtração.

Outros métodos foram propostos, como alternativa, para evitar a digestão enzimática, como a dissociação mecânica de tecido em um sistema fechado para reduzir o volume dos lipoaspirados (BIANCHI et al., 2012; REINHARDT et al., 2015) e um método simples de lavagem do tecido adiposo para isolar e caracterizar as células, que tem sido denominado lavagem lipoaspirada (SHAH et al., 2013). No entanto, ambos os métodos propostos requerem grandes quantidades de lipoaspirados e, mesmo que esses sistemas extraiam uma porção significativa de ADSC, há dados da literatura que sustentam que a eficácia é significativamente menor do que aquela obtida em protocolos enzimáticos. Além disso, a aplicação de uma força externa, como proposta no caso de dispositivos mecânicos, poderia ser muito traumática para as células (BELLEI et al., 2017).

Visando a eficiência no processo de isolamento da SVF e posterior extração de ADSC, métodos automatizados e semiautomatizados, têm sido propostos. Estudos realizados com diversos modelos de aparatos buscam melhorar a eficiência na recuperação celular, diminuição no tempo do processo, a facilidade de uso e configuração do sistema. Dos pontos analisados, os mais relevantes são a viabilidade celular e a resposta do sistema na extração de ADSC a partir da SVF, sem danos às células. Este é um fator importante, visto que, para a terapia celular é necessário, não somente um grande número de células, mas, também, a manutenção da integridade genética e funcional, para que se possa otimizar os resultados terapêuticos.

As diferentes etapas de isolamento da fração estromal vascular e POSTERIOR cultivo das células estromais, a partir do tecido adiposo (fragmento ou lipoaspirado), têm sido classicamente conduzidas, desde o trabalho pioneiro de Zuk e colaboradores (2001), conforme esquematicamente apresentado na Figura 1, que serão aqui denominados de procedimento convencional ou clássico. Há, no entanto, diferentes empresas que têm apresentado ao mercado novas opções para isolamento da SVF com emprego de sistemas automatizados ou semiautomatizados (Tabela 2), mas há ainda poucos centros de pesquisa e unidades clínicas, que dispõem de equipamentos automatizados ou semiautomatizados.

Tais sistemas estão em desenvolvimento há algum tempo, embora a maioria ainda esteja em fase de testes. O Celution da Cytori (San Diego, EUA) foi pioneiro em aparato como sistema de automação para isolamento da SVF (FRASER et al., 2014). Atualmente, cerca de 30 sistemas automatizados e semiautomatizados diferentes estão em desenvolvimento (OBERBAUER et al., 2015). As tecnologias e metodologias utilizadas variam entre os diferentes equipamentos. A Stempeutics (Bangalore, Índia) desenvolveu um desses sistemas, o Stempeutron, cuja prova de conceito foi relatada em SundarRaj e colaboradores (SUNDARAJ et al., 2015). O Stempeutron utiliza o método de digestão enzimática convencional e a separação ativada por gravidade da fração gordurosa e aquosa, seguida por filtração da fração aquosa para obter isolamento de SVF.

Outros sistemas disponíveis comercialmente foram testados. O Multi Station (PNC International, Gyeonggido, República da Coreia), um sistema de processamento manual aberto que inclui agitador, aquecedor e centrífuga de alta capacidade incorporada sob um capô de biossegurança com filtragem de ar particulada de alta eficiência e luz ultravioleta. Há ainda, o Cha-Station, (CHA Biotech, Kangnamgu, República da Coreia), um sistema fechado de processamento semiautomatizado e o Lipokit com MaxStem (Medi-Khan, West Hollywood, Califórnia), um sistema fechado de processamento semiautomatizado (ARONOWITZ; ELLENHORN, 2013).

Rodriguez et al., 2017 descreveram três sistemas semiautomatizados que buscam diminuir a manipulação e, como decorrência, a contaminação do material utilizado. O aparato GID SVF 1 (GID Europe LTD, Londres, Inglaterra) foi projetado para isolar as células SVF do lipoaspirado humano em até 350 g de tecido adiposo seco (livre de fluidos). Permite a colheita do lipoaspirado do paciente diretamente no dispositivo, em um sistema estéril fechado e seguro. Faz uso de uma mistura de colagenase otimizada para dissociar a tecido adiposo. Um outro, Puregraft 250 (GC Aesthetics, Irlanda) é uma bolsa de gordura purificadora projetada para lavar e filtrar a gordura antes de ser injetada. Há ainda, Stem.pras com Duografter II (Proteal, Espanha) que utiliza um kit que permite a coleta do tecido adiposo e o isolamento de células SVF

diretamente no paciente. Este dispositivo é um protótipo em desenvolvimento e não está disponível comercialmente.

Alguns autores, como Aronowitz et al., 2013 e Fraser et al., 2014 realizaram análises comparativas entre sistemas semiautomatizados, sendo que, entre os diferentes aparatos analisados, o Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá) forneceu os melhores e mais consistentes dados na extração e recuperação de ADSC. Dados comparativos entre quatro equipamentos, em relação ao número de células viáveis e a recuperação de ADSC, após a extração da Fração Vascular Estromal (SVF), mostraram melhores resultados quando empregado o Sistema Kiso.

Considerando a necessidade de otimização do processo de isolamento e proliferação de ADSC a fim de que se possam obter resultados mais efetivos e consistentes nos procedimentos de terapia celular e medicina translacional com ADSC, buscou-se, com este projeto, realizar uma análise comparativa entre dois métodos de isolamento, para posterior cultivo e proliferação de ADSC a partir de material obtido da Fração Estromal Vascular de mulheres em bom estado geral de saúde, submetidas a procedimentos de lipoaspiração estética.

Foram comparados os métodos de isolamento convencional (ou clássico) e o método semiautomatizado Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá). Foram, também, realizadas análises comparativas quanto à eficiência, viabilidade, proliferação celular e manutenção dos atributos celulares das ADSC resultantes dos procedimentos de obtenção pela metodologia convencional (clássica) e pelo método semiautomatizado.

Tabela 2. Diferentes sistemas automatizados e semiautomatizados para isolamento de ADSC.

Aparato	Fabricante/ Pais	Processo	Referência
Celution	Cytori, San Diogo, EUA	Automatizado	Fraser et al., 2014
Stempeutron	Stempeutron, Bangalore, Índia	Automatizado	Sundaraj et al., 2015
Multi Station	PNC International, República da Coreia	Semiautomatizado	Aronowitz et al., 2013
Cha-Station	Cha Biotech, República da Coreia	Semiautomatizado	Aronowitz; Ellenhorn, 2013
Lipokit / MaxStem	Medi-Khan, West Hollywood, Califórnia	Semiautomatizado	Aronowitz; Ellenhorn, 2013
Gid SVF 1	Gid Europe LTD, Londres	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Puregraft 250	GC Aesthetics, Irlanda	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Stem.pras / Duografter II	Proteal, Espanha	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Sistema Kiso	Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá	Semiautomatizado	Aronowitz et al., 2013; Fraser et al., 2014

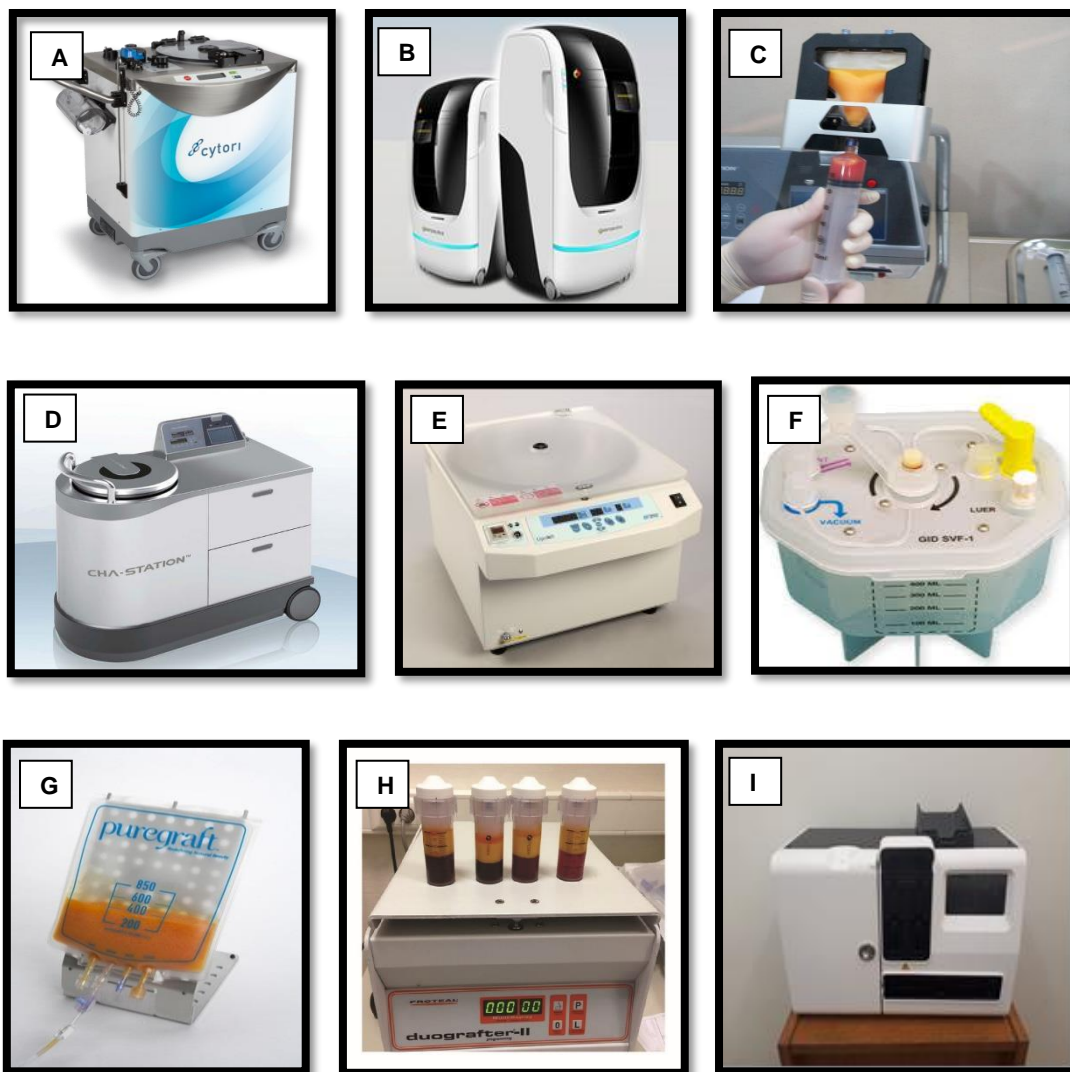


Figura 2. Diferentes sistemas Automatizados e Semiautomatizados:

(A) Celution (Cytori, San Diego, EUA); **(B)** Stempeutron (Stempeutron, Bangalore, Índia); **(C)** Multi Station (PNC International, República da Coreia); **(D)** Cha-Station (Cha Biotech, República da Coreia); **(E)** Lipokit/ MaxStem (Medi-Khan, West Hollywood, Califórnia) ; **(F)** Gid SVF 1 (Gid Europe LTD, Londres, Inglaterra); **(G)** Puregraft 250 (GC Aesthetics, Irlanda) ; **(H)** Stem.pras / Duografter II (Proteal, Espanha); **(I)** Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá) .

2. OBJETIVOS

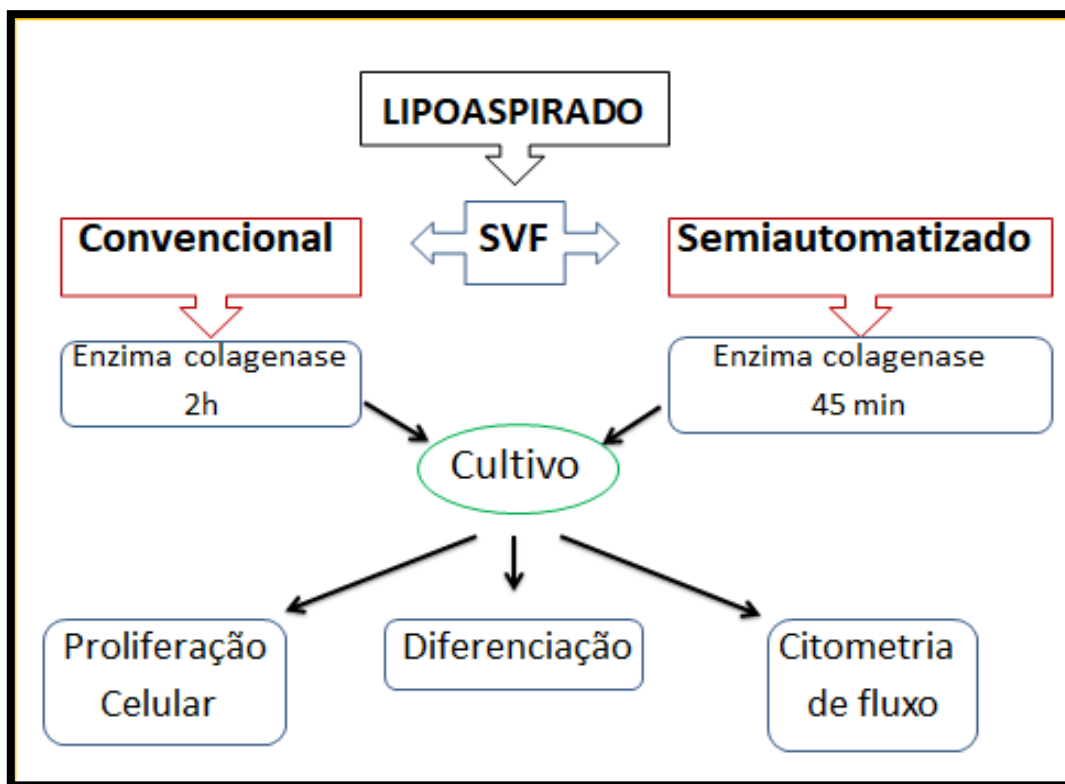
2.1. Objetivo Geral

Pretendeu-se com este projeto analisar a eficiência de isolamento da SVF, e posterior, capacidade proliferativa e viabilidade das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC), empregando-se a metodologia convencional (clássica) e, comparativamente, um procedimento de isolamento semiautomatizado - Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá).

2.2. Objetivos Específicos

- Adequar, às condições do laboratório, um protocolo para isolamento da fração estromal vascular (SVF) e posterior cultivo e proliferação das ADSC obtidas a partir de procedimentos de lipoaspiração, empregando-se um processo semiautomatizado - Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá).
- Realizar análises comparativas quanto à capacidade de proliferação e viabilidade das ADSC obtidas a partir da metodologia convencional (clássica) e pelo processo semiautomatizado.
- Avaliar, qualitativamente, a capacidade de diferenciação induzida *in vitro* das ADSC cultivadas a partir isolamento pelo procedimento convencional (clássico) e semiautomatizado.
- Realizar imunofenotipagem por citometria de fluxo e avaliar, quantitativamente, marcadores antigênicos de superfície nas células cultivadas até a 5ª passagem, obtidas a partir do procedimento convencional (clássico) e sistema semiautomatizado.

3. FLUXOGRAMA



4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMSON, S.; MILLER, R. G.; PHILLIPS, R. A. The identification in adult bone marrow of pluripotent and restricted stem cells of the myeloid and lymphoid systems. *Journal of Experimental Medicine*. v. 145, n. 6, p. 1567-1579, 1977.

AMORIN, B. et al. Immunological Properties and Clinical Applications. *Revista HCPA*, v. 32, n. 1, 2012.

ARONOWITZ, J. A.; ELLENHORN, J. D. I. Adipose stromal vascular fraction isolation: A head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 132, n. 6, 2013.

ARONOWITZ, J. A.; LOCKHART, R. A.; HAKAKIAN, C. S. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*, 4(1), 713,2015.

BAJEK, A. et al. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 64, n. 6, p. 443–454, 2016.

BELLEI, B. et al. Maximizing non-enzymatic methods for harvesting adipose-derived stem from lipoaspirate: Technical considerations and clinical implications for regenerative surgery. *Scientific reports*, 7(1), 10015, 2018.

BIANCHI, F. et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivate highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant* 22, 2063–77, 2012.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. v. 2, p. 313 - 9, 2008.

BORA, P.; MAJUMDAR, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem cell research & therapy*, v. 8, n. 1, p. 145, 2017.

BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, v. 15, p.641–448, 2003.

BUNNELL, B. A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115-120, 2008.

CAPLAN A. I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. Sep 1;9(5):641–50, 1991.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 2017.

CASTEILLA, L. et al. Adipose-derived stromal cells : Their identity and uses in clinical trials , an update WHAT ARE ADSCS AND WHAT THEY. v. 3, n. 4, p. 25–33, 2011a.

CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, v. 3, n. 3, p. 301-313, 2008.

DE FRANCESCO, M. D. et al. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Beside. *Tissue Engineering: Part B*, 21: 572 – 584, 2015.

DOMINICI M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy.*; 8(4): 315 -7, 2006.

EAVES, C. J. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605-2613, 2015.

ERIDANI, S. Types of Human Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cell Discovery*, v. 04, n. 02, p. 13–26, 2014.

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

FELIX, R. G. et al. Rat Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue Reduce Bleomycin-Induced Lung Remodeling in Late Stage. *Stem Cell Discovery*, 6: 24-38, 2016.

FLORES-GUZMÁN, P.; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, V.; MAYANI, H. Concise Review: Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem and Progenitor Cells: Basic Principles, Experimental Approaches, and Impact in Regenerative Medicine. *Stem cells translational medicine*, 2(11), 830-838, 2013.

FRANCIS M. P. et al. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *Organogenesis*. v. 6, p. 11-4, 2010.

FRASER, J. K. et al. The Celution ® System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System . *Advances in Wound Care*, v. 3, n. 1, 2014.

FRIEDENSTEIN A. J. et al. Heterotopic of boné marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*; 6: 230-47, 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. v. 4, n. 5, p. 267-74, 1976.

FUOCO, N. L., et al. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. *Rev. Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. v. 8, p. 7-14, 2016.

GALIPEAU, J. et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy*, v. 18, n. 2, p. 151-159, 2016.

GALIPEAU, J.; SENSÉBÉ, L. Mesenchymal stromal cells: clinical challenges and therapeutic opportunities. *Cell Stem Cell*, v. 22, n. 6, p. 824-833, 2018.

GIMBLE, J. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potencial. 2003.

GNANASEGARAN, N. et al. Different isolation methods alter the gene expression profiling of adipose derived stem cells. *International journal of medical sciences*, v. 11, n. 4, p. 391, 2014.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. p. 1–14, 2011.

HIRAO A.; ARAI F.; SUDA T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*. 3(12):1481-3, 2004.

HORWITZ, E. M. Stem cell plasticity: a new image of de the bone marrow stem cell. *Curr Opin Pediatr*. 15(1): 32-7, 2003.

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

LONGHINI-DOS-SANTOS, N. et al. Cell Therapy Decreases Inflammation and Improves the Morphology of the Lung Parenchyma in a Murine Model of Cigarette Smoke-Induced Emphysema. *International Journal of New Technology and Research*, v. 4, p. 58-65, 2018.

MARCELINO, M. Y. et al. Cell therapy in experimental model of inflammatory bowel disease. *Journal of Coloproctology*, v. 35, p. 20-27, 2015.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MATSUMOTO, D. et al. Cell-Assisted Lipotransfer : Supportive Use of Human Adipose-Derived Cells for Soft Tissue Augmentation. v. 12, n. 12, 2006.

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

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

Mi HM, Sun YK, Yeon JK, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem*. v. 12, n. 1, p. 49, 2012.

MINTEER D. M.; MARRA K. G.; RUBIN J. P. Adipose stem cells: biology, safety, regulation, and regenerative potential. *Clin Plast Surg*; 42:169-79, 2015.

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

NAJI, A. et al. Rationale for determining the functional potency of mesenchymal stem cells in preventing regulated cell death for therapeutic use. *Stem cells translational medicine*, v. 6, n. 3, p. 713-719, 2017.

NAJI, A. et al. Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, p. 1-26, 2019.

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

OBERBAUER, E. et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells : current state of the art. *Cell Regeneration*, p. 1–14, 2015.

ORGUN D.; MIZUNO H. Multipotency and secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of adipose-derived stem cells. *Plastic and Aesthetic Research*. v. 4, p. 32-40, 2017.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl*. v. 10, p. 63 - 76, 1988.
Profiling of Adipose Derived Stem Cells. v. 11, 2014.

REINHARDT, M.; BADER, A.; GIRI, S. Devices for stem cell isolation and delivery: current need for drug discovery and cell therapy. *Expert Rev Med Devices*. v.12, p. 353–64, 2015.

RIBEIRO-PAES, J. T. et al. Unicentric study of cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease/pulmonary emphysema. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*. v. 6, p. 63, 2011.

ROCHA, A. S. et al. Considerações sobre células-tronco embrionárias. *Vet Zootec*. v. 19, n. 3, p. 303-13, 2012.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, v. 241, n. 1, p. 130-139, 1966.

SACHS P. C. et al. Defining essential stem cell characteristics in adipose-derived stromal cells extracted from distinct anatomical sites. *Cell Tissue Res*. v. 349, p. 505-15, 2012.

SCHIPPER, B. M. et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. v. 60, p. 538-44, 2008.

SHAH, F. S. et al. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy*. v. 15, p. 979–85, 2013.

SINGER N. G.; CAPLAN A. I. Mesenchymal Stem Cells: Mechanisms of Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. v. 6, p. 457-478, 2011.

STESSUK, T. et al. Phase I clinical trial of cell therapy in patients with advanced chronic obstructive pulmonary disease: follow-up of up to 3 years. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, v. 35, n. 5, p. 352-357, 2013.

SUNDARRAJ S. et al. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate. *Stem Cells Int.* p. 1–11, 2015.

SZÖKE, K.; BECKSTRØM, K. J. ; BRINCHMANN, J. E. Human adipose tissue as a source of cells with angiogenic potential. *Cell transplantation*, v. 21, n. 1, p. 235-250, 2012.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research.* v. 14 p. 213-222, 1961.

TONNARD P. et al. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg.* v. 132, p. 1017–26, 2013.

TRAKTUEV, D. O. et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circulation Research*, v. 102, n. 1, p. 77–85, 2008.

VAN DIJK, Teun A. (Ed.). *Discourse and communication: New approaches to the analysis of mass media discourse and communication.* Walter de Gruyter, 2011.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology.* v. 6, p. 93, 2006.

YOU D. M. et al. Comparative study of autologous stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells for erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 4, n. 4, p.351-358, 2015.

ZUK P. A. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Mol Biol Cell.* v. 21, p. 1783–87, 2010.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

CAPÍTULO ÚNICO

Emprego de um sistema semiautomatizado para o isolamento e proliferação de células estromais mesenquimais de tecido adiposo humano

Marta Aparecida dos Santos Souza, João Tadeu Ribeiro-Paes

Manuscrito elaborado para submissão aos Anais Brasileiros de Dermatologia
Print ISSN: 0365-0596; OCLC: 60628551. Fator de impacto: 0.63

Emprego de um sistema semiautomatizado para o
isolamento e proliferação de células estromais
mesenquimais de tecido adiposo humano

Marta Aparecida dos Santos Souza¹, João Tadeu Ribeiro-Paes¹

*¹Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências e Letras,
Departamento de Biotecnologia. Assis, São Paulo, Brasil.*

***Endereço para correspondência: João Tadeu Ribeiro-Paes
Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências e Letras,
Departamento de Biotecnologia. 19806-900, Assis, SP, Brasil.
Tel.: +55 18-3302 5856
E-mail: jtrpaes@unesp.br**

RESUMO

O emprego de células estromais mesenquimais (MSC) tem sido considerado como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. Neste contexto, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes de MSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de MSC, entre as quais vale ressaltar a abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e diferenciação multipotencial (osteócitos, condrócitos e adipócitos). Em função destes aspectos, as células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC) têm adquirido um papel relevante para a medicina regenerativa e translacional. Ao longo dos anos um grande número de variantes metodológicas têm sido propostas para isolamento e proliferação de ADSC. Mais recentemente têm sido testados diversos sistemas automatizados e semiautomatizados de diferentes fabricantes para isolamento da SVF e posterior proliferação das ADSC. Neste contexto, pretendeu-se com este projeto realizar uma análise comparativa quanto à eficiência e capacidade proliferativa de ADSC, empregando-se a metodologia convencional ou clássica e metodologia semiautomatizada usando o aparato Kiso Processor, (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá). Foram, também, realizadas análises comparativas quanto à viabilidade, proliferação celular e manutenção dos atributos celulares das ADSC resultantes dos procedimentos de obtenção por convencional e semiautomatizada. Além disso, foram feitas análises qualitativas quanto à capacidade de diferenciação das ADSC *in vitro*, bem como, empregou-se, também, citometria de fluxo para caracterização imunofenotípica, para determinação quantitativa de marcadores antigênicos de superfície (CD) nas células cultivadas até a 5ª passagem. Os resultados permitiram estabelecer um protocolo eficiente e reprodutível para extração e proliferação de ADSC para o método semiautomatizado. Este sistema também apresentou, em relação à metodologia convencional, uma redução significativa no tempo de isolamento da fração estromal vascular, bem como menor manipulação das amostras, por ser um sistema fechado e, conseqüentemente, apresenta, potencialmente, menos risco de contaminação

das amostras. Tanto nos sistema convencional quanto no semiautomatizado foram mantidos os atributos celulares, como marcadores de superfície característicos de MSC e capacidade de diferenciação in vitro, permitindo a validação da natureza mesenquimal das células obtidas pelos dois métodos de isolamento. Não se obteve, no entanto, diferença quanto á viabilidade e capacidade proliferativa das ADSC entre convencional e semiautomatizado. Apesar das citadas vantagens apresentadas pelo sistema semiautomatizado, a partir dos resultados obtidos não foi possível validar a hipótese formulada e que orientou o desenvolvimento deste projeto, qual seja, que o sistema semiautomatizado (Kiso), representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional no que concerne a maior viabilidade e potencial proliferativo das ADSC.

Palavras-chave: células-tronco, metodologia, cultivo, imunofenotipagem, citometria de fluxo, diferenciação.

ABSTRACT

The use of mesenchymal stromal cells (MSC) has been considered as a promising therapeutic alternative in several preclinical and clinical studies. In the context, the adipose tissue has emerged as one of the most important sources of MSC. There are a number of properties that make adipose tissue a highly feasible and efficient alternative for obtaining, isolating and proliferating MSC. Among these properties, it is worth mentioning the abundance of available material, which can be obtained from the patient (autologous), in non-invasive procedures, high proliferative capacity and differentiation in osteocytes, chondrocytes and adipocytes. Due to these aspects, adipose-derived mesenchymal stromal cells (ADSC) have acquired a prominent role for regenerative and translational medicine. In this context, it was intended with this project to perform a comparative analysis regarding the efficiency and proliferative capacity of ADSC, using two methods for isolation of the vascular stromal fraction (FEV) and subsequent proliferation of ADSC: the classical or conventional methodology and the semi-automated method using the Kiso Processor (Keai Bioreserarch Inc. Vancouver, Canada). In both procedures human adipose tissue was obtained by human liposuction procedures. The results allowed to establish a viable and reproducible protocol for extraction and proliferation of ADSC for the semiautomated methodology. In addition, comparative analyzes were carried out on the proliferation capacity and viability of the ADSC between the two methods. Analyzes were also performed for the adipogenic differentiation capacity and in vitro and immunophenotyping by flow cytometry, quantitatively evaluating the antigenic markers the cells cultured until the 5th passage. The results obtained allow us to conclude that it was not possible to elaborate more consistent propositions regarding the hypothesis that guided the objectives of this project, that is, that the semiautomated system (Kiso) would represent an advantageous alternative to the conventional method, handling of the process, reduction of the stromal fraction isolation time and, consequently, lower risk of biological contamination.

Key words: stem cells, methodology, culture, immunophenotyping, flow cytometry, differentiation

INTRODUÇÃO

As Células estromais mesenquimais ou células-tronco mesenquimais (MSC) foram, pioneiramente, identificadas por Friedenstein e colaboradores na década de 60. Os autores verificaram a presença de um pequeno grupo celular oriundo da medula óssea, composto por células aderentes á superfície plástica de formato fusiforme, formadoras de colônias e com capacidade de diferenciação em osso e cartilagem. Inicialmente, estas células foram denominadas de unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F, colony forming unit fibroblast) ^{1, 2} e ao longo dos anos receberam diferentes denominações. Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs a denominação células estromais mesenquimais, mantendo o acrônimo MSC ^{3, 4}.

Embora a medula óssea tenha sido a primeira e, ainda, representa a mais clássica fonte de obtenção de MSC, uma série de outros tecidos têm sido utilizados, com excelentes resultados, como fontes de MSC, entre os quais vale citar: cordão umbilical, placenta, polpa de dente, pele, músculo esquelético, líquido amniótico, feto, baço, pulmão, pâncreas, rins e, em especial o tecido adiposo ^{4, 5, 6}.

O emprego do tecido adiposo como fonte de MSC foi pioneiramente proposto por Zuk e colaboradores, em 2001 ¹⁵. Desde então, o tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes para isolamento e proliferação de MSC. Há uma série de propriedades que fazem do tecido adiposo uma alternativa altamente exequível e eficiente para obtenção, isolamento e proliferação de ADSC. Entre as quais, vale ressaltar: abundância de material disponível, que pode ser obtido do próprio paciente (autólogo), em procedimentos pouco invasivos e, além disso, as ADSC apresentam grande capacidade proliferativa e diferenciação em osteócitos, condrócitos e adipócitos ^{4, 5, 6, 8, 9}.

Ao longo dos anos, vários métodos têm sido propostos para o isolamento e proliferação das células estromais mesenquimais do tecido adiposo ^{4, 21, 9}. Visando melhorar a qualidade na extração e maior viabilidade celular, métodos automatizados e semiautomatizados, têm sido propostos para aumentar a eficiência do processo de extração da SVF e posterior extração de

ADSC. Estudos realizados com diversos modelos de aparatos, como Celution (Cytori, San Diogo, EUA), Gid SVF (Gid Europe LTD, Londres, Inglaterra), Puregraft 250 (GC Aesthetics, Irlanda), Stem.pras / Duografter II (Proteal, Espanha) e Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá) ^{14, 11, 10} buscam melhorar a eficiência na recuperação celular, diminuição no tempo do processo, a facilidade de uso e configuração do sistema. A manutenção da viabilidade celular, bem como a efetividade do processo na obtenção da fração estromal vascular (SVF) do tecido adiposo, seguido do cultivo e proliferação das ADSC são atributos fundamentais para os procedimentos de terapia celular, visto que não só um grande número, mas, também, que as células mantenham a integridade genética e funcional para que se possa otimizar os resultados terapêuticos.

A partir de dados prévios da literatura acerca da eficiência e exequibilidade de procedimentos semiautomatizados para isolamento de SVF e posterior extração e proliferação de ADSC ^{10, 11, 12, 13, 14} formulou-se a hipótese que o emprego de um método semiautomatizado seria vantajoso em termos de eficiência e viabilidade celular comparativamente à metodologia clássica ou método convencional. Entendendo-se aqui como método convencional, os métodos apresentados em trabalhos clássicos da literatura ^{7, 6, 15}.

A fim de testar essa hipótese, buscou-se, neste trabalho, realizar uma análise comparativa entre a metodologia convencional (clássica) e o emprego de um processo semiautomatizado para o isolamento das ADSC a partir da fração estromal vascular, oriunda do tecido adiposo de mulheres submetidas ao procedimento de lipoaspiração estética da região abdominal. A partir de uma serie de adequações metodológicas para obtenção da Fração Estromal Vascular (SVF), para posterior cultivo e proliferação das ADSC, foi possível estabelecer, às condições operacionais do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP), um protocolo para extração de ADSC empregando-se o sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc.), que consiste numa plataforma semiautomatizada para isolamento de SVF.

Como referido acima, para estabelecer o protocolo semiautomatizado foram testados diferentes parâmetros experimentais, entre os quais, ressaltou-se, a concentração da enzima colagenase. Estabelecido um protocolo

reprodutível para o processo semiautomatizado, foram analisados, de forma comparativa entre os dois métodos (convencional e semiautomatizado), diferentes parâmetros, como viabilidade celular e parâmetros de validação de células estromais mesenquimais (MSC), como imunofenotipagem por citometria de fluxo e potencial de diferenciação celular *in vitro*.

Os resultados de proliferação celular, analisados comparativamente para os dois procedimentos (convencional e semiautomatizado) dentro de uma perspectiva descritiva analítica, mostram semelhança e sobreposição em alguns segmentos da curva de proliferação ao longo do tempo. Não foi possível o emprego de nenhum teste estatístico inferencial em uma única amostra.

Os resultados referentes à cultura e caracterização das ADSC mostram que, tanto para as células obtidas pela metodologia convencional, quanto pelo sistema Kiso - semiautomatizada, as células apresentaram os três critérios mínimos definidos, pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT, quais sejam aderência à superfície plástica dos frascos de cultura, presença ($\geq 95\%$) de marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência (≤ 2) dos CD45, CD34 e HLA classe II e apresentaram potencial de diferenciação em osteócitos sob determinadas condições de indução *in vitro*^{4,7}.

Em síntese, apesar da limitação da amostragem, os resultados disponíveis sugerem que o emprego do sistema semiautomatizado, no caso o sistema Kiso, representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional, sobretudo quanto à menor manipulação do processo, diminuição do tempo de isolamento da fração estromal e, conseqüentemente, menor risco de contaminação biológica.

MÉTODOS

Obtenção do tecido adiposo

As ADSC foram obtidas de tecido adiposo humano proveniente de quatro indivíduos do sexo feminino (n=4), a partir de procedimentos de lipoaspiração (abdominoplastia) executados na clínica de cirurgia estética Maison das Flores da cidade de Assis, SP. O material foi proveniente de procedimentos eletivos de lipoaspiração, em mulheres, com idade entre 30 e 60 anos (Tabela 3), mediante concordância das doadoras e autorização de uso do material biológico por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (CAAE: 09531618.4.0000.5401/ Parecer: 3.520.931).

Após o procedimento cirúrgico, o material biológico foi acondicionado em frasco estéril tubo Falcon (BD, Nova Jersey, EUA) e imediatamente transportado à temperatura ambiente para o Laboratório de Genética e Terapia Celular da UNESP – Campus Assis, para a realização do isolamento celular convencional e semiautomatizado.

Isolamento de células estromais mesenquimais oriundas de tecido adiposo humano (ADSC) empregando-se o método convencional (clássico)

O isolamento das ADSC foi realizado conforme o método descrito por Zuk e colaboradores (2001), com pequenas modificações, pelo Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP – Campus de Assis). A coleta de tecido adiposo foi realizada por meio de procedimento cirúrgico de lipoaspiração abdominal. Aproximadamente, 50 mL de material lipoaspirado foram transferidos para dois tubos Falcon de 50 mL (BD, Nova Jersey, EUA), contendo em cada tubo 25 mL do material lipoaspirado. Adicionou-se, para digestão do tecido adiposo, colagenase tipo I a 0,075% (Gibco, New York, USA), cerca de 6 mL, para cada 25 mL de material lipoaspirado, mantendo-se o processo de digestão enzimática por 2 horas em banho-maria à 37°C, com agitação manual constante, para homogeneização.

Após essa etapa, adicionou-se 6 mL de tampão fosfato (phosphate-buffered saline – PBS 1X - LGC Biotecnologia, Brasil). O material contido nos

tubos foi centrifugado por 10 minutos a 400g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado. O precipitado dos diferentes tubos foi reunido em um único Falcon (BD, Nova Jersey, EUA). Foram adicionados 10 mL de solução de lise (NH_4Cl), por 10 minutos em temperatura ambiente. Após este período, o material foi inativado, acrescentando-se PBS (1x) e 10% Soro Fetal Bovino - SBF (LGC Biotecnologica, Brasil), e novamente, centrifugado por 10 minutos a 400 g.

Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão em 4 mL de meio Alpha MEM (LGC Biotecnologica, Brasil) e filtrado em uma malha de 70 μm (Cell Strainer – BD, New Jersey, USA). No volume final, contendo as células, foi adicionado meio Alpha MEM (LGC Biotecnologica, Brasil) suplementado com 1% de antibiótico penicilina (Gibco, New York, USA), 1% de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 1% de anfotericina β 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), e cultivadas, inicialmente, em frascos de cultura T25 (BD, New Jersey, USA). A concentração celular foi mantida em estufa de CO_2 a 5% e 37°C. A primeira troca de meio de cultura (50% do meio) foi feita após 72 horas e as trocas seguintes, a cada 48 horas ou quando necessário até atingir 80% a 100% de confluência em relação à superfície dos frascos de cultura. Com a utilização de Tripsina (Gibco, Nova Iorque, EUA) as células sofreram desprendimento da placa de cultura (Biofil, Ribeirão Preto, Brasil) e foram transferidas para um novo frasco T25 (BD, Nova Jersey, EUA), e cultivadas, assim, até a quinta passagem (Figura 3).

Avaliação da viabilidade celular

Para averiguar o percentual de células viáveis nas culturas, foi retirada uma alíquota de 10 μL para contagem de células viáveis no início da proliferação celular e a cada passagem, empregando o método de coloração com Azul de Trypan. A contagem de células com incorporação ou exclusão do corante foi realizada em modelo câmara de Neubauer, em microscópio ótico (Olympus CX 31, Olympus Corporation, Tokyo, Japão).

Isolamento de fração estromal vascular (SVF) e cultivo e proliferação de células estromais mesenquimais oriundas de tecido adiposo humano (ADSC) empregando-se o Método Semiautomatizado

Para o isolamento de SVF, pelo processo semiautomatizado, foi empregado o protocolo proposto pelo fabricante Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá), com pequenas modificações¹⁷. Após a coleta do tecido adiposo, o material lipoaspirado foi acondicionado em dois tubos Falcon de 50 mL. Cerca de 60 mL deste tecido foi aspirado por uma seringa modelo cateter (BD, Nova Jersey, EUA) e reservada.

Conectou-se à bolsa uma Solução de Ringer Lactato (Solução de cloreto de cálcio 2H₂O a 0,02%, cloreto de potássio a 0,03%, cloreto de sódio a 0,6%, JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, Brasil) de 500 mL na Bandeja Buffer, compartimento superior que aloja a bolsa de Solução de Ringer Lactato.

A bolsa processadora Kiso (Keai Bioreserarch) foi conectada ao aparato. Duas seringas foram encaixadas em seus respectivos lugares, uma com 6 mL da enzima colagenase tipo I a 0,15% (Gibco, Nova Iorque, EUA) e uma outra para sucção da solução de Ringer Lactato durante o processamento.

A amostra de 50 mL de tecido adiposo, previamente reservada, foi injetada na bolsa de processamento, lentamente. O processamento de extração da SVF teve a duração de aproximadamente 50 minutos. Após término do processo, o volume final, cerca de 60 mL de SVF, foi dividida em dois tubos Falcon de 50 mL e adicionada solução lise (NH₄Cl) por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Em seguida, o material foi inativado, acrescentando PBS (1x) e 10% Soro Fetal Bovino - SBF (LGC Biotecnologica) e novamente, centrifugado por 10 minutos a 400 g. O sobrenadante descartado.

Adicionou-se 1 mL de meio Alpha MEM (LGC Biotecnologica) suplementado com 1% de antibiótico penicilina / antimicótico estreptomicina (AA) (Gibco, New York, USA), 1% de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 1% de anfotericina β 2,5 µg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) ao pellet para ser homogeneizado e plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² (T25) (BD, Nova Jersey, EUA).

As células foram dissociadas ao atingir de 80% a 100% de confluência, com a utilização de tripsina (Gibco) e transferidas para um frasco T25 (BD, New Jersey, USA), e cultivadas, assim, até a quinta passagem. A primeira troca do meio de cultura (50% do meio) foi feito após 72 horas e as trocas seguintes, a cada 48 horas (Figura 4).

Para averiguar o percentual de células viáveis nas culturas, foi retirada uma alíquota de 10 μL para contagem de células viáveis, vivas e mortas, no início da proliferação celular e a cada passagem, empregando o método de coloração com Azul de Trypan. A contagem de células com incorporação ou exclusão do corante foi realizada em modelo câmara de Neubauer, em microscópio ótico (Olympus CX 31, Olympus Corporation, Tokyo, Japão).

Teste de Viabilidade Celular: Proliferação Celular

A partir da contagem das MSC foi determinada a concentração celular de $1 \times 10^3/\text{cm}^2$ e semeadas em placas de 32 poços (Biofil, Ribeirão Preto, Brasil) em triplicatas e feita a contagem celular diariamente durante 10 dias. As células foram tripsinizadas e a contagem das células vivas e mortas foi realizada em modelo câmara de Neubauer, coradas com Azul de Trypan.

Com o conjunto de dados gerados foi realizada a construção da curva de crescimento, para efeito comparativo do perfil observado para os três conjuntos de amostras.

A equação, abaixo representada, foi aplicada para contagem das células onde, **fd** representa o fator de diluição da amostra:

$$\Sigma \text{ células / mL} = \text{total de células} / n^\circ \text{ de quadrantes contados} \times \text{fd} \times 10^4$$

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Foram realizados ensaios com o objetivo de caracterizar fenotipicamente as subpopulações celulares presentes na cultura das ADSC. As células foram analisadas por citometria de fluxo em FACS Calibur (Becton Dickinson, Nova Jersey, EUA) usando os anticorpos contra os marcadores de superfície CD73, CD90, CD105, CD34, CD45 e o antígeno leucocitário humano (HLA)-DR

(Becton Dickinson Pharmigen, Nova Jersey, EUA) ¹⁶.

As células foram incubadas com os anticorpos monoclonais seguindo recomendação do protocolo do fabricante. Foram analisados 10.000 eventos para cada amostra.

Análise do potencial de diferenciação das ADSC

Diferenciação Adipogênica

Com o propósito da diferenciação adipogênica, as ADSC foram semeadas a uma concentração 1×10^4 células/cm² e cultivadas em meio Alpha MEM (LGC Biotecnologica) suplementado com 1% do antibiótico penicilina / antimicótico estreptomicina (AA) (Gibco, New York, USA), 1% de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e 1% anfotericina β 2,5 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Após 24 horas de cultivo, o meio foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato (phosphate-buffered saline – PBS 1X - LGC Biotecnologia) e cultivadas durante oito dias na presença do meio de indução de diferenciação adipogênica StemPro (Gibco, Nova York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante.

A presença de adipócitos foi confirmada mediante coloração das células com Oil Red O (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP, e registrado pela Plataforma Brasil (CAAE: 09531618.4.0000.5401/ Parecer: 3.520.931).

O experimento foi conduzido de acordo com os parâmetros legais, definidos na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde.

Após informações sobre a pesquisa os doadores voluntários assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), anexado a este projeto.

RESULTADOS

Padronização do Isolamento das ADSC pelo Método Semiautomatizado

Sendo, o processador Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá) semiautomatizado, o único encontrado no Brasil, foi necessário à padronização de um protocolo para o isolamento das ADSC oriundas de tecido adiposo, adequando-se às condições do laboratório.

Para comprovar, a eficiência de extração pelo processador Kiso, realizou-se a extração celular do material de descarte lipoaspirado de quatro pacientes do sexo feminino com idade entre 30 e 60 anos (Tabela 3).

Inicialmente, foi utilizada a enzima colagenase tipo I (Gibco, New York, USA) a uma concentração de 0,075%, a mesma concentração utilizada no protocolo para extração no método convencional. Após a realização de testes de extrações com o processador Kiso semiautomatizado com material de descarte das pacientes 1 e 2 (Tabela 3) e semeadura do material pós-centrifugação, verificou-se que o rendimento celular com concentração enzimática adotada na metodologia convencional para as ADSC era extremamente inferior aos valores obtidos para as extrações pela metodologia convencional. Não foi observada a formação de colônias de células similares a fibroblastos, conforme padrão descrito na literatura ^{4, 5, 6, 9}.

Posteriormente, diante dos resultados, novos testes foram realizados com material de descarte das pacientes 3 e 4 (Tabela 3), porém utilizando a enzima colagenase tipo I na concentração de 0,150%, o que correspondia ao dobro da concentração enzimática do protocolo convencional.

Foi realizada a centrifugação da SVF (Figuras 3 A, B) e semeadura do *pellet*. Após 48 horas foram observadas células aderidas à superfície plástica, e em 72 horas, a formação de colônias de células com aspecto fibroblastóide, conforme padrão descrito na literatura ⁴.

A partir desses resultados foi possível estabelecer que a concentração da enzima colagenase tipo I (Sigma), da ordem de 0,150%, foi adequada para isolamento e posterior cultivo das ADSC a partir do processamento semiautomatizado adotado neste trabalho, o Sistema kiso (Figura 4).

Imediatamente após o isolamento e a cada passagem foi realizada a determinação do número de células viáveis, em câmara de Neubauer, empregando-se, como descrito em material e métodos, o método de exclusão de azul de Trypan. Os resultados de viabilidade celular são apresentados nas tabelas 4 e 5 e figuras 7 e 8.

Os resultados obtidos, em termos de rendimento, conforme apresentados na tabela 4 e figura 7 (paciente 3) mostraram que o isolamento pelo método convencional apresentou maior eficiência quanto ao número de células viáveis, relativamente ao método semiautomatizado.

Conforme apresentado na tabela 4 e figura 8 (paciente 4) observa-se uma discreta diferença quantitativa de células entre os métodos convencional e semiautomatizado.

Em função de um número pequeno de amostras, não foi possível aplicar nenhum teste estatístico, mas apenas realizar, por ora, uma análise descritiva dos resultados, discutindo como as variáveis (amostras das pacientes) se comportaram.

Caracterização das Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSC)

A fim de validar se as células empregadas para análise comparativa dos diferentes parâmetros entre o método convencional e semiautomatizado, eram realmente células estromais mesenquimais, foram aplicados os critérios preconizados pela associação internacional de terapia celular (ISCT), conforme publicado por Dominici et al., (2006) ¹⁶, capacidade de adesão á superfície plástica das garrafas de cultura, potencial de diferenciação e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

As cultura primárias de ADSC foram semeadas a uma densidade de 1×10^5 células/cm². Após 48 horas foi verificada a aderência celular na superfície das culturas. A partir de 72 horas, foi possível observar a presença de colônias celulares com morfologia fusiforme. Estas características foram verificadas para as culturas oriundas das extrações convencional e semiautomatizada.

Conforme apresentado na figura 9, para metodologia convencional, em A, no 7º dia de cultivo, foram observadas células com morfologia fusiforme, semelhante a fibroblastos. Em B, após 12 dias do início do cultivo, verifica-se uma confluência de 80% a 90%.

Na figura 10, que apresenta células cultivadas após o processamento pelo método semiautomatizado, pode-se verificar que as células no 7º dia de cultivo, em A, apresentam aspecto fibroblastóide. Em B, no 12º dia de cultivo é mantido o aspecto fibroblastóide, e uma área de confluência de, aproximadamente 70 a 80 %.

Para verificar se as células isoladas do tecido adiposo se adequavam aos requisitos preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para validação das MSC ¹⁶, foram realizados testes de diferenciação *in vitro* das MSC para obtenção de adipócitos.

É possível observar na figura 11, para metodologia convencional (A) e para metodologia semiautomatizada (B), a ocorrência de vacúolos lipídicos corados, em vermelho, com Oil Red, indicando a diferenciação das ADSC em adipócitos.

Teste de Viabilidade Celular e proliferação Celular

A proliferação celular entre os métodos convencional e semiautomatizado foram realizados e os resultados utilizados para comparar o potencial de proliferação entre as culturas.

A proliferação celular a partir do método convencional revelou um crescimento inicial lento (fase lag) nos primeiros cinco dias de cultivo, o que representa o período de adaptação metabólica das células após a sementeira. Após o sexto dia, as células apresentaram uma fase de crescimento exponencial (fase log), tendo o pico de crescimento no 7º dia de cultivo. Após esse período o crescimento teve um decréscimo significativo. Comparando ao método semiautomatizado, a proliferação demonstrou um crescimento lento (fase lag) nos primeiros cinco dias de cultivo, igualmente como visto no convencional, o que representa o período de adaptação metabólica das células após a sementeira. Posteriormente, no sexto dia, as células apresentaram uma

fase de crescimento exponencial (fase log), tendo o pico de crescimento no 8º dia de cultivo, um dia depois, do visto na convencional. Após esse período o crescimento teve um decréscimo significativo (Figura 12).

Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo confirmou a caracterização da população celular composta por células mesenquimais. A estratégia de distribuição foi projetada para excluir detritos e agregados.

Para metodologia semiautomatizada, amostras 8marC (001, 002, 003), os marcadores de superfície (CD) apresentaram valores positivos acima de 90% para CD 73 (99.58%), CD 90 (99.98%) e CD 105 (92.96%) e negativos para CD 34 (0.06%), CD 45 (3.33%) e HLA classe II (0.27%), conforme apresentado na tabela 6 e figura 15. Estes dados são compatíveis com os critérios de validação para células estromais mesenquimais, conforme preconizado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular ⁶. Os gráficos da figura 14 mostram as porcentagens, citadas na Tabela 6, para metodologia semiautomatizada, referentes aos marcadores de superfície.

Para metodologia convencional, foi confirmada nas amostras 8marA (001, 002, 003) a caracterização da população celular composta por células mesenquimais, apresentando marcadores de superfície positivos para CD 73 (96.58%), CD 90 (88.96%) /e CD 105 (37.42%) e negativos para CD 34 (0.27%), CD 45 (11.94%) e HLA classe II (0.31%), conforme a tabela 7 e figura 15. Os gráficos da figura 14 mostram as porcentagens, citadas na Tabela 7, para metodologia convencional, referentes aos marcadores de superfície.

DISCUSSÃO

Desde os trabalhos pioneiros de Zuk e colaboradores ^{1,2}, grande número de artigos têm sido publicados com diferentes proposições metodológicas para isolamento e proliferação de células estromais mesenquimais de tecido adiposo - ADSC ^{4, 5, 6, 18}.

Ainda, a partir de dados prévios da literatura acerca da eficiência e exequibilidade de procedimentos semiautomatizados para isolamento da fração estromal vascular (SVF) e posterior proliferação de ADSC, formulou-se a hipótese que o emprego de um método semiautomatizado seria vantajoso em termos de eficiência e viabilidade celular, comparativamente à metodologia clássica ou método convencional. Entendendo-se aqui, como método convencional ou clássico, o conjunto de procedimentos que correspondem a padrões metodológicos bem estabelecidos, aplicados ao isolamento de ADSC, para posterior proliferação, executados por meio de manipulação das amostras e controlados diretamente pelo próprio pesquisador ou técnico, seguindo, em linhas gerais, o conjunto de procedimentos estandarizados e incorporados à rotina de isolamento das ADSC, conforme trabalhos clássicos publicados previamente ^{7, 6, 15}.

A fim de testar essa hipótese, buscou-se, neste trabalho, realizar uma análise comparativa entre a metodologia convencional (clássica) e o emprego de um processo semiautomatizado para o isolamento de fração estromal vascular e posterior proliferação das ADSC, oriunda do tecido adiposo, de mulheres submetidas ao procedimento de lipoaspiração estética da região abdominal.

A partir de uma série de adequações metodológicas para obtenção da fração estromal vascular, para posterior cultivo e proliferação das ADSC, foi possível estabelecer, às condições operacionais do Laboratório de Genética e Terapia Celular – GenTe Cel (UNESP), um protocolo eficiente e reprodutível para extração de SVF empregando-se o sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc.), que consiste numa plataforma semiautomatizada para isolamento de SVF. Como referido acima, para estabelecer o protocolo semiautomatizado foram testados diferentes parâmetros experimentais, entre os quais, ressalte-se, a concentração da enzima colagenase.

Estabelecido um protocolo exequível para o processo semiautomatizado, foram analisados de forma comparativa entre os dois métodos (convencional e semiautomatizado), diferentes parâmetros, como viabilidade celular e parâmetros de validação de células estromais mesenquimais (MSC), como imunofenotipagem por citometria de fluxo e potencial de diferenciação celular *in vitro*.

No que se refere ao emprego da collagenase, a concentração de 0,075% (em PBS) tem sido classicamente adotada, desde os trabalhos pioneiros de ZUK et al, 2001/2002 e ORGUN; MIZUNO, 2017 ^{4, 15, 7}. Essa concentração enzimática não foi, no entanto, efetiva para isolamento e cultivo de ADSC a partir da SVF do lipoaspirado pelo sistema semiautomatizado. Após vários testes, com concentrações crescentes de collagenase, obteve-se proliferação celular de forma eficiente e reprodutível na concentração de 0,150% de collagenase, que corresponde ao dobro da concentração empregada no método clássico ou convencional. Entendendo-se, neste caso, por eficiente, os resultados de proliferação celular que apresentaram um perfil muito similar àquele obtida para o cultivo pelo método convencional, conforme os resultados apresentados na figura 12.

O processo de isolamento da fração estromal vascular pelo processo semiautomatizado ocorre em temperatura ambiente, ou seja, no projeto original do equipamento Kiso não foi incorporado um sistema para registro e controle de temperatura. Dessa forma pode-se aventar, entre outras hipóteses, que a manutenção do processo em uma temperatura que não corresponderia à condição ideal, ou pico de atividade enzimática da collagenase (37°C), seria um dos fatores determinantes do baixo rendimento e proliferação celular quando se empregou a mesma concentração de collagenase (0,075%), adotado na metodologia convencional, na qual a temperatura é mantida constante a 37°C, durante o processo de digestão enzimática, por um período que varia, entre diferentes laboratórios, numa faixa de 30 a 90 minutos ^{6, 7, 15}.

Os procedimentos adotados em outros laboratórios têm empregado a enzima Liberase (Roche Applied Science, USA) na proporção de 5mg para 60 ml de lipoaspirado. A liberase corresponde a um complexo enzimático composto por collagenase I, collagenase II altamente purificadas e thermolisina

uma protease neutra não clostridial. Esta combinação enzimática apresenta maior estabilidade térmica em relação à collagenase tipo I. Neste contexto, o emprego de outras enzimas proteolíticas, como a liberase (Roche), que apresentam maior estabilidade térmica, representaria um complexo enzimático mais adequado às condições experimentais do processador Kiso, cujo método de isolamento da SVF ocorre à temperatura ambiente. Condição que poderia acometer o sítio (ou sítios) catalítico da collagenase, afetando o mecanismo de ação da enzima e conseqüentemente, um menor rendimento no processo de isolamento e proliferação celular.

Os resultados do perfil quantitativo de proliferação celular, analisados comparativamente para os dois procedimentos (convencional e semiautomatizado) dentro de uma perspectiva descritiva analítica, mostram semelhança e sobreposição em alguns segmentos da curva de proliferação ao longo do tempo. Não foi possível o emprego de nenhum teste estatístico inferencial, considerando que o gráfico de proliferação celular, conforme apresentado na Figura 12, corresponde aos resultados de uma única amostra, proveniente de apenas uma paciente. Neste contexto, devido à limitação das amostras, os resultados disponíveis sugerem que o emprego do sistema semiautomatizado, no caso o sistema Kiso, representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional, sobretudo quanto à menor manipulação do processo, diminuição do tempo de isolamento da fração estromal e, conseqüentemente, menor risco de contaminação biológica.

Um aspecto a ser ressaltado, refere-se à emergência da terapia celular no contexto da engenharia de tecidos e medicina regenerativa, áreas que têm sido denominadas internacionalmente pelo acrônimo TERM (engenharia de tecidos e medicina regenerativa). A decorrência dessa expansão tem provocado à geração de novas alternativas e demandas na área de saúde. A expectativa é que o mercado de engenharia de tecidos e medicina regenerativa (TERM) deverá movimentar na próxima década cifras da ordem de bilhões de dólares. Neste cenário, com o propósito de aprimorar a qualidade, viabilidade celular e eficácia terapêutica, várias empresas têm se dedicado ao desenvolvimento de sistemas automatizados ou semiautomatizados para isolamento e cultivo de ADSC ¹⁹.

No final do primeiro semestre de 2016, recebemos da empresa Keai Bioreserarch Inc. (Vancouver, Canadá), fabricante do equipamento Kiso, a proposta para testar o sistema Kiso para isolamento da fração estromal vascular de tecido adiposo obtido a partir de procedimento de lipoaspiração em humanos. Em outubro do mesmo ano, recebemos o aparato vindo diretamente de Vancouver e no início de 2017 passamos a realizar os primeiros testes para adequação da metodologia de isolamento da SVF e cultivo de ADSC. O equipamento recebido em nosso laboratório, em regime de comodato, é o único em operação no Brasil. Para adequação da metodologia de isolamento da SVF, seguido do cultivo celular para proliferação das ADSC foram necessários ajustes, sobretudo quanto à adequação da concentração de colagenase, conforme comentado anteriormente. O equipamento apresentou, em duas ocasiões um problema no sistema de infusão do tampão, contendo colagenase. A correção foi resolvida seguindo instruções online da equipe técnica da Keai Bioreserarch, em Vancouver. Após esses dois episódios o aparato tem se mostrado estável e com funcionamento adequado, o que permite afirmar que se trata de um sistema robusto e que exige pouca manutenção.

Os resultados referentes à cultura e caracterização das ADSC mostram que, tanto para as células obtidas pela metodologia convencional, quanto pelo sistema Kiso - semiautomatizada, as células apresentaram os três critérios mínimos definidos, pela Sociedade Internacional de Terapia Celular – ISCT ¹⁶. As células em cultivo apresentaram aderência à superfície plástica das garrafas de cultura e morfologia fibroblastóide, conforme apresentado nas Figuras 9 e 10. Dentro dos critérios de validação, os resultados de imunofenotipagem por citometria de fluxo, mostram a ocorrência de antígenos de superfície (CD) acima 90 % para CD 73, CD 90 e CD 105 e percentagem abaixo de 2 % para CD 34 e CD 45 ^{4,16}. Os resultados mostram ainda que as células em cultivo na quinta passagem apresentaram potencial de diferenciação *in vitro* em adipócitos.

Apesar de avanços tecnológicos recentes, os sistemas automatizados ou semiautomatizados para isolamento e proliferação de ADSC não estão, ainda, amplamente incorporados e ocupam uma parcela, que podemos

considerar, ainda, incipiente na rotina dos laboratórios de pesquisa com engenharia de tecidos, medicina regenerativa e translacional. Não se dispõe, também, de uma vasta literatura relativa ao tema. Em publicações anteriores, como o trabalho de Aronowitz e colaboradores (2012) apresentado na reunião da “International Federation for Adipose Therapeutics and Science”, foram comparados quatro aparatos. Cada aparato produziu células autógenas viáveis para uso clínico em aproximadamente 120 minutos³. Há, como apresentado, na Tabela 2, várias empresas produzindo diferentes tipos de aparatos que empregam sistemas automatizados ou semiautomatizados para isolamento da fração vascular estromal. Muitos são ainda protótipos em fase de testes.

CONCLUSÃO

Os resultados disponíveis até o momento, apesar da limitação de amostras, sugerem que o emprego do sistema semiautomatizado, no caso o sistema Kiso, representaria uma alternativa vantajosa em relação ao método convencional, sobretudo quanto à menor manipulação do processo, diminuição do tempo de isolamento da fração estromal e, conseqüentemente, menor risco de contaminação biológica.

Há uma série de questões e aspectos metodológicos a serem revistos como a ampliação da amostra de tecido adiposo proveniente de maior número de doadores. Será importante a realização de culturas em triplicata, para cada tempo de análise nos experimentos de proliferação celular. Será importante, também, estabelecer, quando possível, condições experimentais pareadas ou aproximadas entre os procedimentos testados, como, por exemplo, o tempo de tratamento com a enzima colagenase. A nossa sugestão para um aprimoramento no equipamento seria a incorporação de um sistema de controle e manutenção da temperatura durante o processo de isolamento da fração estromal.

Declaração de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Friedenstein, JA, et al. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Embryol. Exp. Morph.*, 1966; 16(3): 581-390.
2. Friedenstein AJ, et al. Heterotopic of boné marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*; 1968; 6: 230-47.
3. Horwitz, EM, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005; 7(5):393-395.
4. Orgun D, Mizuno H. Multipotency and secretome: the mechanisms behind the regenerative potential of adipose-derived stem cells. *Plastic and Aesthetic Research*. 2017; 4: 32-40.
5. Bourin, P, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013; 15: 641-648.
6. Bunnell, B, et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 2008; 45(2), 115-120.
7. Zuk PA, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, 2001; (2): 211-28.
8. Gimble, J, et al. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation. Research*, 2007; 100: 1249-1260.
9. Zuk P.A. The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead. *Mol Biol Cell.*, 2010; 21:1783–87.
10. Aronowitz, JA, Ellenhorn, JD. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Sur.* 2013; 132(6): 932e-9e.

11. Fraser, JK, et al. The Celution System: Automated Processing of Adipose-Derived Regenerative Cells in a Functionally Closed System. *Adv Wound Care (New Ronchelle)*, 2014; 3(1):38-45.
12. Oberbauer, E, et al. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regeneration*, 2015; 4(1), 7.
13. Sundarraj S, et al. Development of a system and method for automated isolation of stromal vascular fraction from adipose tissue lipoaspirate. *Stem Cells Int.*, 2015; 1–11.
14. Rodriguez, J, et al. Evaluation of three devices for the isolation of the stromal vascular fraction from adipose tissue and for ASC culture: a comparative study. *Stem cells international*, 2017.
15. Zuk PA, et al. Ashjian P. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol. Biol. Cell*, 2002; 13:12.
16. Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement *Cytotherapy*, 2006; 8(4): 315-7.
17. Manual de uso do Sistema Kiso. Keai Bioresearch Inc, 2015.
18. Fuoco, NL, et al. Proposição de uma nova metodologia para isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. *Rev. Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 2016; 8: 7-14.
19. Syed, BA, Evans, J B. Stem cell therapy. *Nature Reviews*; 2013.
20. Aronowitz, JA, et al. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*, 2015; 4(1), 713.
21. Matsumoto, D. et al. Cell-Assisted Lipotransfer : Supportive Use of Human Adipose-Derived Cells for Soft Tissue Augmentation. 2006; 12(12).

TABELAS

Tabela 1: Componentes da SVF e marcadores de superfície celular modificada de BORA; MAJUMDAR, 2017.

Componentes celulares SVF	Tamanhos celulares (μm)	Marcadores moleculares	
		Positivos	Negativos
ADSC	~10-25 μm	CD34, CD73, CD90, CD105	CD31, CD45, CD144
EPC	~7-8 μm	CD34, CD31, CD133, CD146	CD45
EC	~10-30 μm	CD31, FVIII	CD34
MACROFAGOS	~20 μm	CD45, CD14, CD34, CD206	-
PERICITOS	Até ~70 μm	CD146, CD90, CD73, CD44, CD29, CD13	CD34, CD45, CD56

Tabela 2. Diferentes sistemas automatizados e semiautomatizados para extração de ADSC.

Aparato	Fabricante/ Pais	Processo	Referência
Celution	Cytori, San Diogo, EUA	Automatizado	Fraser et al., 2014
Stempeutron	Stempeutron, Bangalore, Índia	Automatizado	Sundaraj et al., 2015
Multi Station	PNC International, República da Coreia	Semiautomatizado	Aronowitz et al., 2013
Cha-Station	Cha Biotech, República da Coreia	Semiautomatizado	Aronowitz; Ellenhorn, 2013
Lipokit / MaxStem	Medi-Khan, West Hollywood, Califórnia	Semiautomatizado	Aronowitz; Ellenhorn, 2013
Gid SVF 1	Gid Europe LTD, Londres	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Puregraft 250	GC Aesthetics, Irlanda	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Stem.pras / Duografter II	Proteal, Espanha	Semiautomatizado	Rodriguez et al., 2017
Sistema Kiso	Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá	Semiautomatizado	Aronowitz et al., 2013; Fraser et al., 2014

Tabela 3. Pacientes submetidos à abdominoplastia quanto ao gênero e idade.

Paciente	Gênero	Idade (Anos)	Doença Crônica	Uso de medicamento Crônico
1	Feminino	51	-	-
2	Feminino	38	Hipertensão Hipotireoidismo	Antidepressivo Hipotireoidismo
3	Feminino	57	-	-
4	Feminino	50	-	-

Tabela 4. Determinação de células viáveis, por meio da metodologia de azul de Trypan, para o paciente 3, imediatamente após processamento do lipoaspirado e nas passagens 2 e 5.

	Isolamento	Passagem 2 (P2)	Passagem 5 (P5)
Convencional	$3,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$
Automatizada	$7,7 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$6,7 \times 10^4$

Tabela 5. Determinação de células viáveis, por meio da metodologia de azul de Trypan, para a paciente 4, imediatamente após processamento do lipoaspirado e nas passagens 2 e 5.

	Isolamento	Passagem 2 (P2)	Passagem 5 (P5)
Convencional	2,3 x 10 ⁶	2,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵
Automatizada	2,2+10 ⁶	3,9 x 10 ⁵	1,9 x 10 ⁵

Tabela 6. Marcadores de Superfície CD para metodologia semiautomatizada.

Marcadores de Superfície	CD 73	CD 90	CD 105	CD 34	CD 45	HLA Classe II
Porcentagem %	99.98%	99.98%	92.96%	0.06%	3.33%	0.27%

Tabela 7. Marcadores de Superfície CD para metodologia convencional.

Marcadores de Superfície	CD 73	CD 90	CD 105	CD 34	CD 45	HLA Classe II
Porcentagem %	96.58%	88.96%	37.42%	0.27%	11.94%	0.31%

FIGURAS

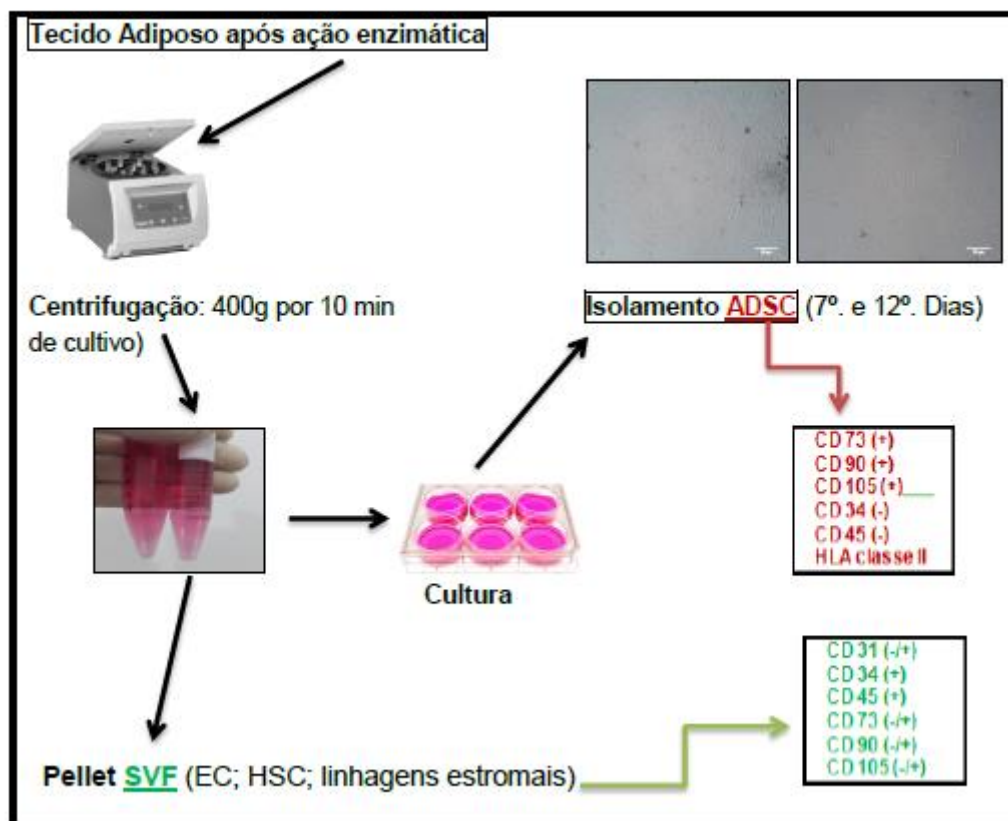


Figura 1. Diferenças fenotípicas, ao longo do cultivo, entre as células da SVF e ADSC expandidas em cultura. ADSC (ASC): Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo; SVF: fração vascular do estromal
Fonte: próprio autor.

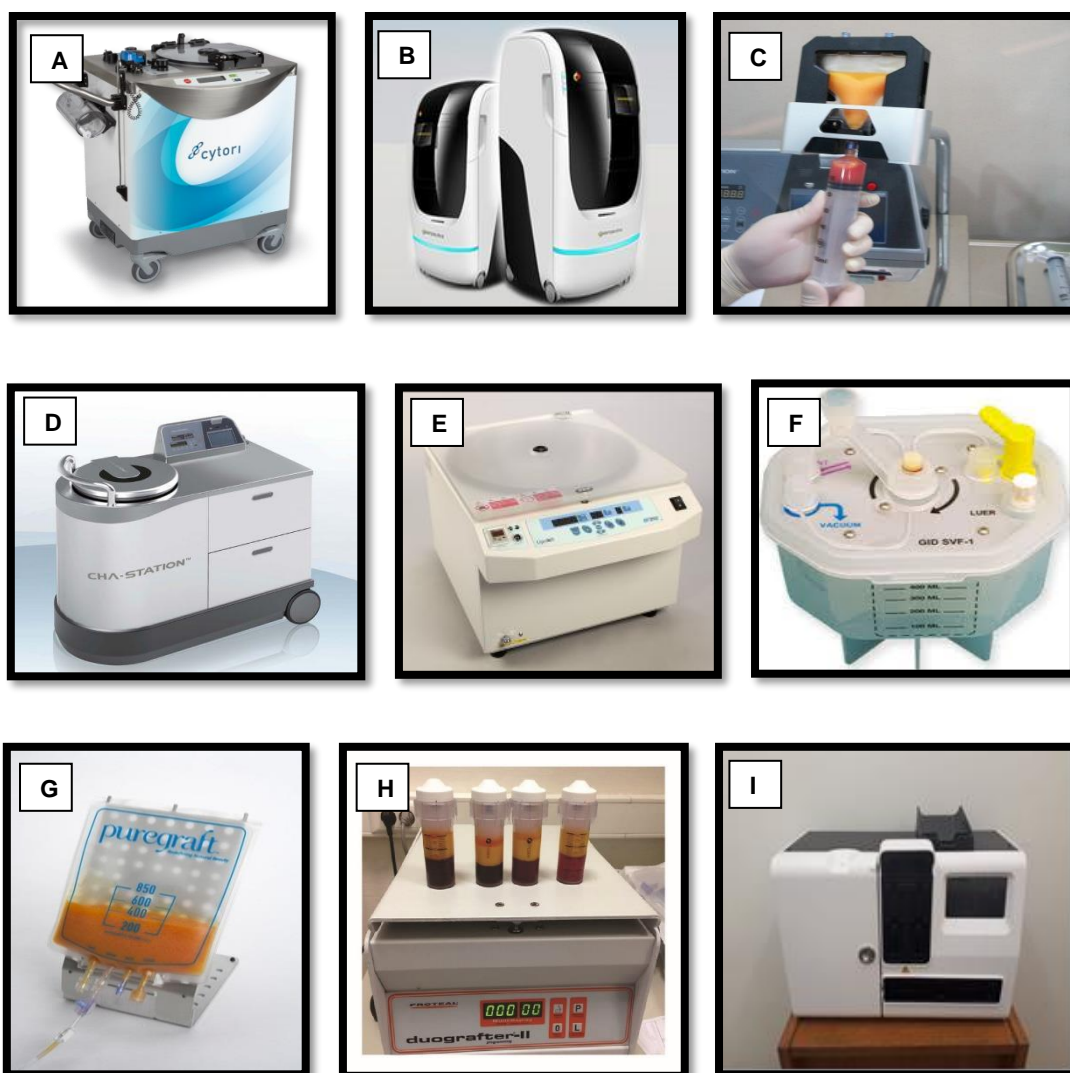


Figura 2. Diferentes sistemas Automatizados e Semiautomatizados:

(A) Celution (Cytosol, San Diego, EUA); **(B)** Stempeutron (Stempeutron, Bangalore, Índia); **(C)** Multi Station (PNC International, República da Coreia); **(D)** Cha-Station (Cha Biotech, República da Coreia); **(E)** Lipokit/ MaxStem (Medi-Khan, West Hollywood, Califórnia) ; **(F)** Gid SVF 1 (Gid Europe LTD, Londres); **(G)** Puregraft 250 (GC Aesthetics, Irlanda) ; **(H)** Stem.pras / Duografter II (Proteal, Espanha); **(I)** Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver, Canadá) .

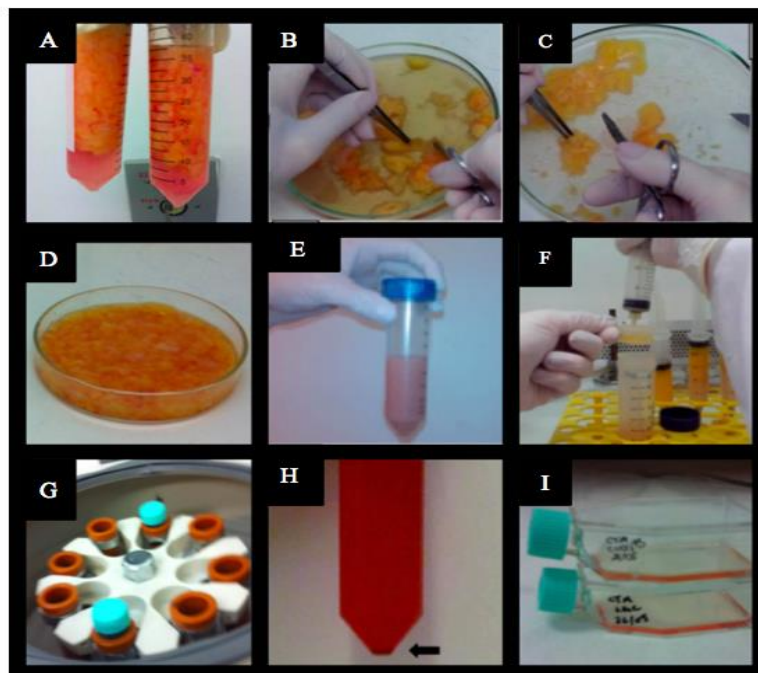


Figura 3. Etapas de isolamento convencional (clássico) e cultivo de ADSC.

A) Tecido adiposo lipoaspirado (25 mL cada tubo Falcon). B) e C) fragmentação e limpeza do tecido adiposo, D) tecido fragmentado, E) tecido adiposo submetido à digestão enzimática com colagenase, F) filtração, G) centrifugação após lise das hemácias, H) formação do precipitado e *Pellet*, I) cultivo em frascos de cultura. (Adaptado de Malagutti-Ferreira, 2016).

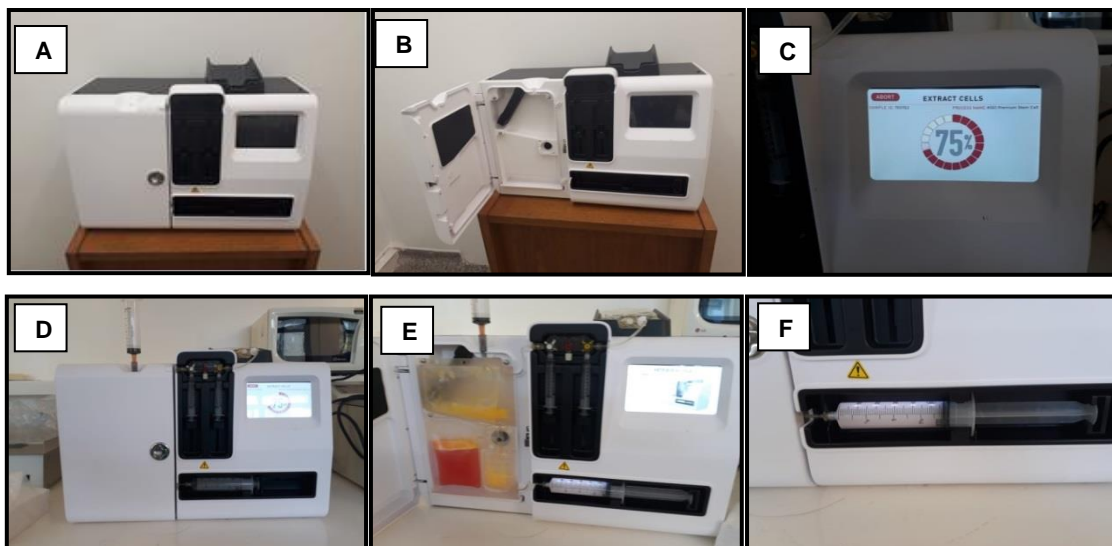


Figura 4. Etapas de isolamento de ADSC semiautomatizado Sistema Kiso (Keai Bioreserarch Inc., Vancouver - Canadá).

(A) Processador Kiso (Keai Bioreserarch Inc., do Canadá). (B) Preparação para início de processamento. (C) e (D) Andamento do processo. (E) Finalização do processo, após 50 minutos. (F) SVF extraída após termino do processo.

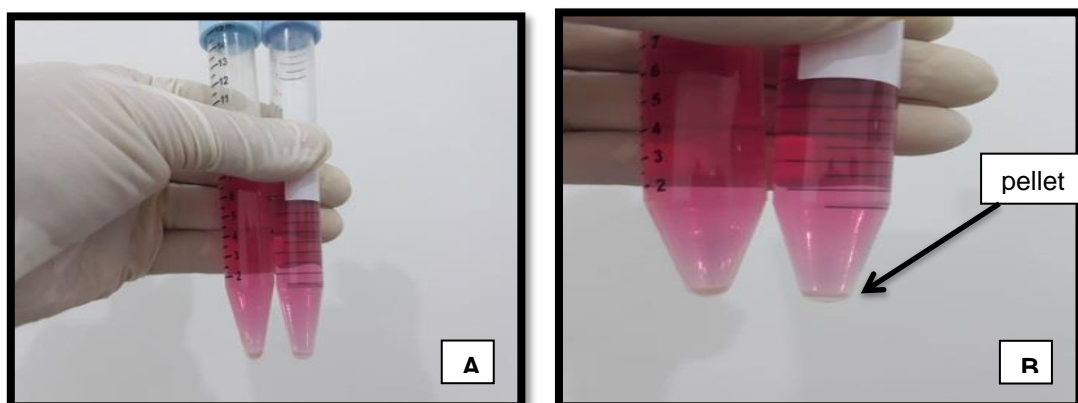


Figura 5. Precipitado (pellet) após centrifugação da SVF da paciente 4. Após centrifugação do lipoaspirado submetido ao processamento pelo método semiautomatizado - Sistema Kiso. A e B – correspondem aos mesmos frascos a partir de fotos obtidas de diferentes aproximações.

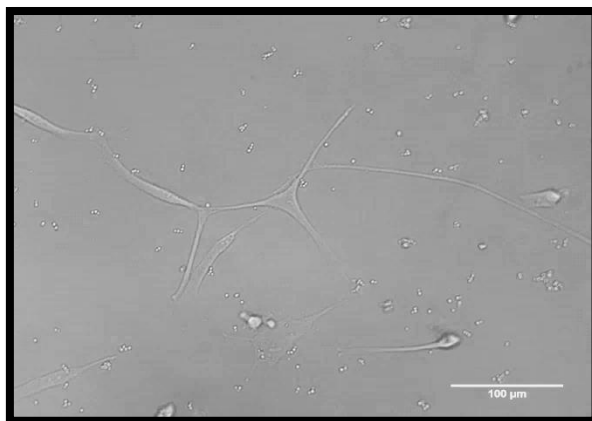
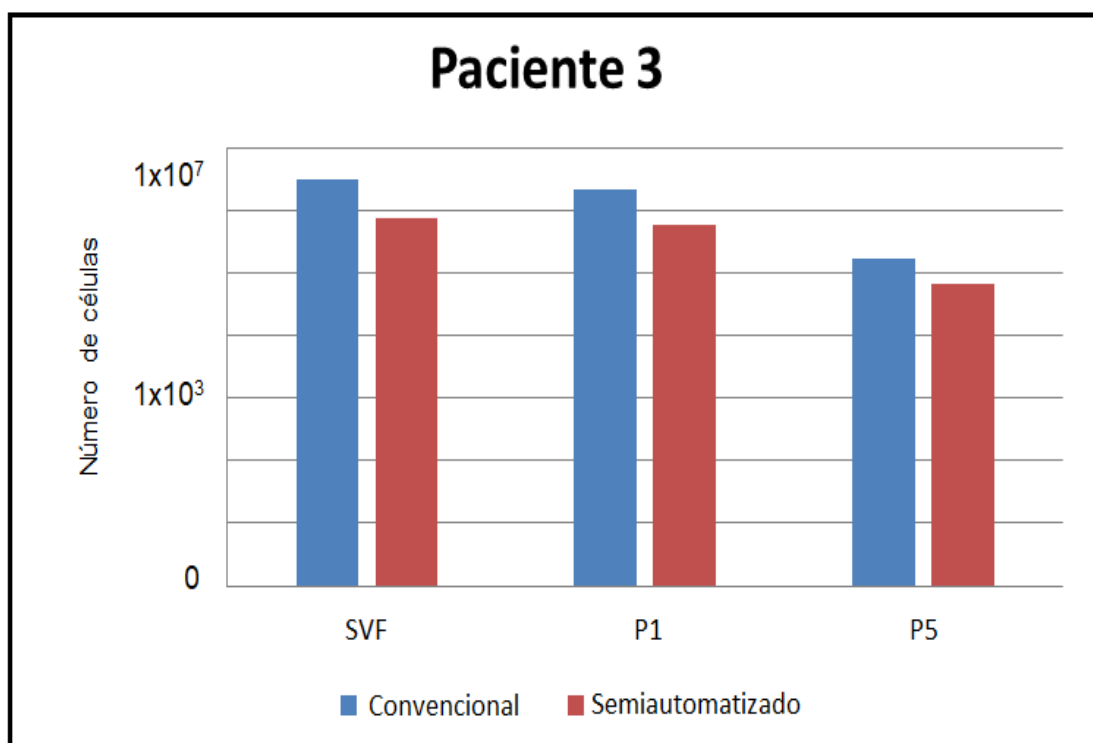


Figura 6. Célula estromal mesenquimal derivada do tecido adiposo (ADSC). Extração pelo método semiautomatizado, processador Sistema Kiso – lipoaspirado obtido da paciente 3 (Tabela 2) – Célula em 3^a. Passagem.

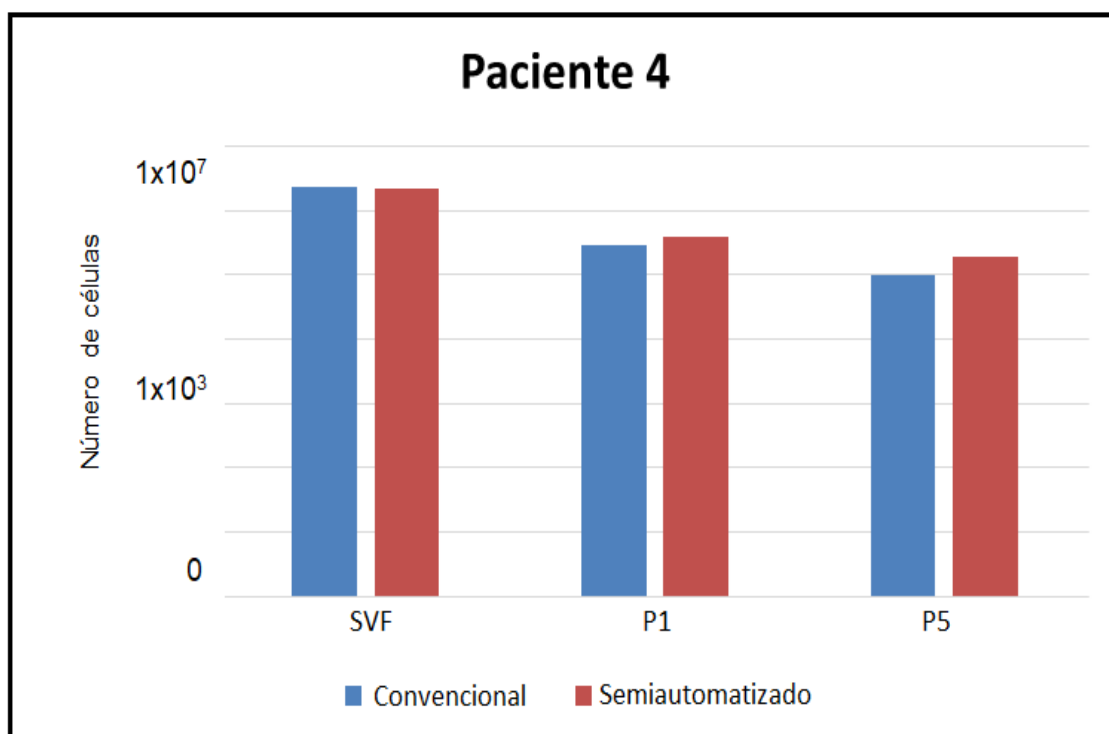


Legenda: SVF = Fração Vascular Estromal

P1 = Passagem 1

P5 = Passagem 5

Figura 7. Rendimento celular na extração entre os métodos convencional e Automatizado na obtenção de ADSC para a Paciente 3.



Legenda: SVF = Fração Vascular Estromal

P1 = Passagem 1

P5 = Passagem 5

Figura 8. Rendimento celular na extração entre os métodos convencional e semiautomatizado na obtenção de ADSC para a Paciente 4.

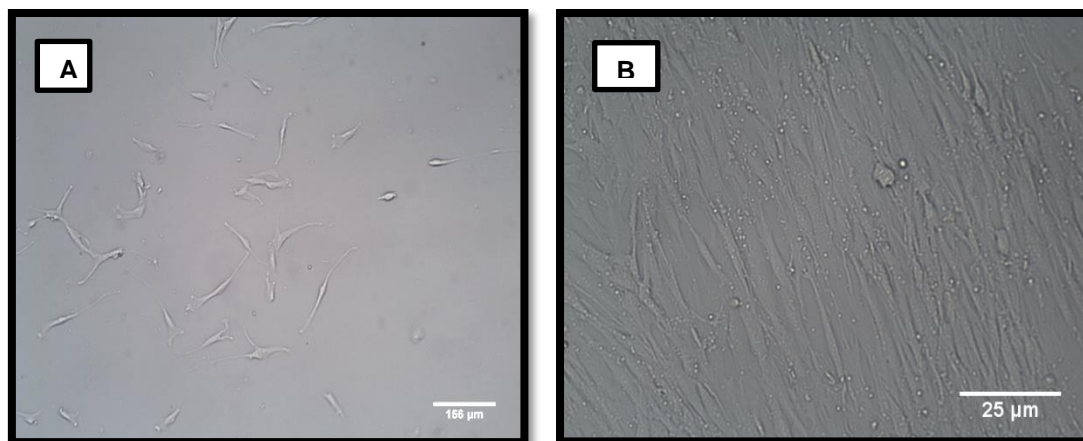


Figura 9. Cultura celular de ADSC provenientes do paciente 4 - metodologia convencional: A: células no 7^o dia de cultivo. B: células aos 12 dias de cultivo.

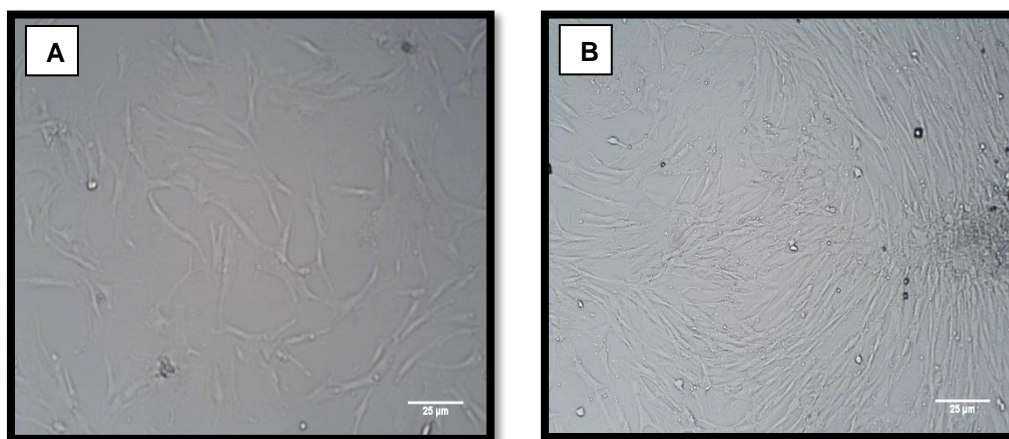


Figura 10. Cultura celular de ADSC da paciente 4, obtidas a partir do processamento semiautomatizado, sendo em: A: células no 7^o dia de cultivo. B: células no 12^o dia de cultivo, com uma área de confluência de 70 a 80%.

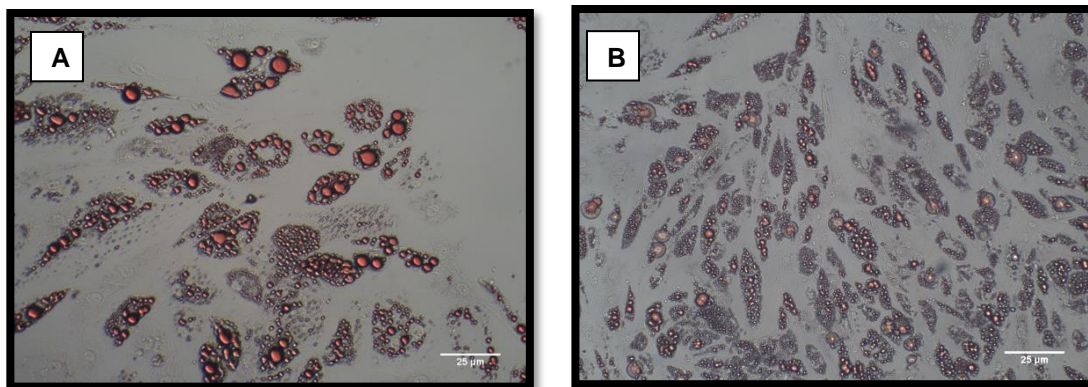


Figura 11. Diferenciação Adipogênica de ADSC da paciente 4: (A) para método convencional e (B) método semiautomatizado.

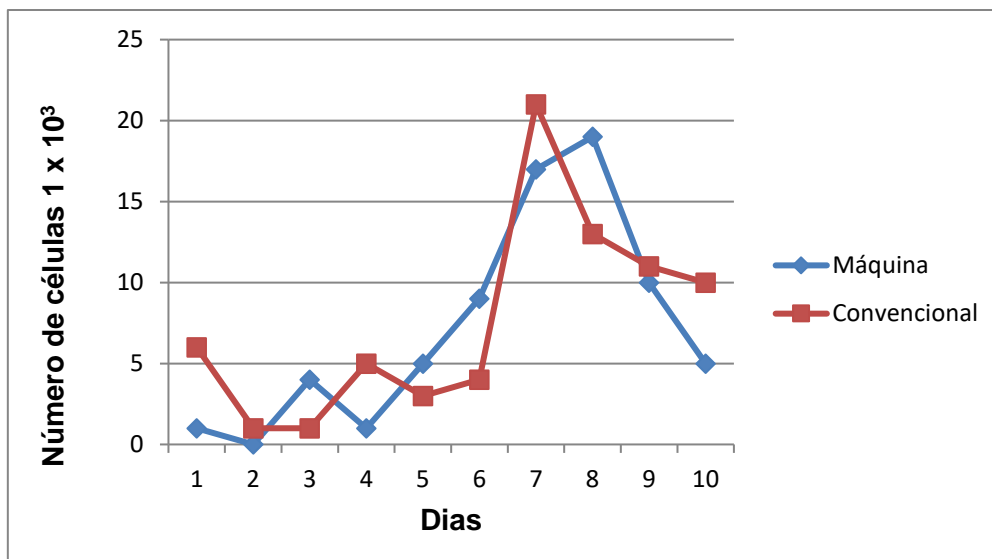


Figura 12. Proliferação das ADSC da paciente 4, a partir do isolamento pelo método convencional e semiautomatizado.

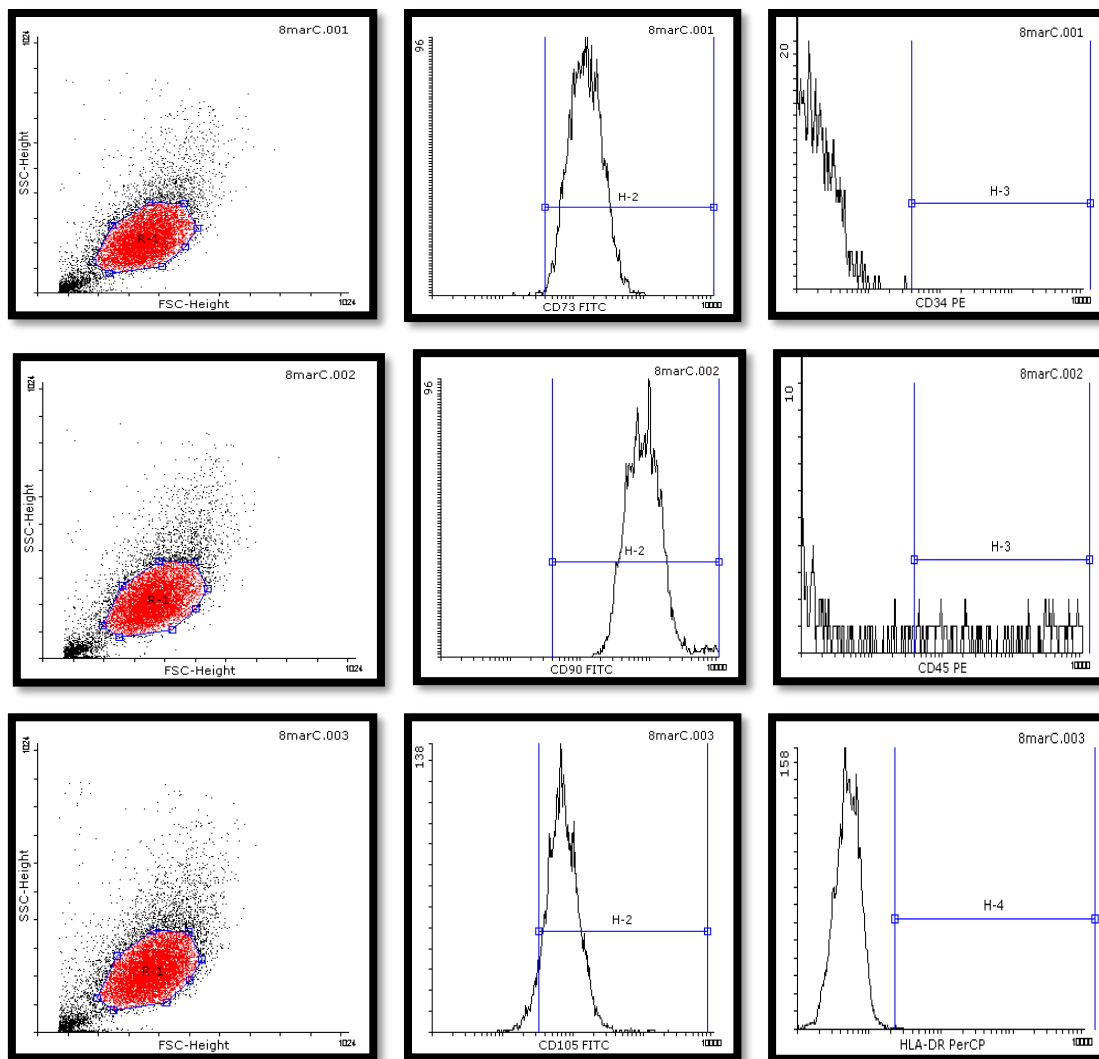


Figura 13. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método semiautomatizado.

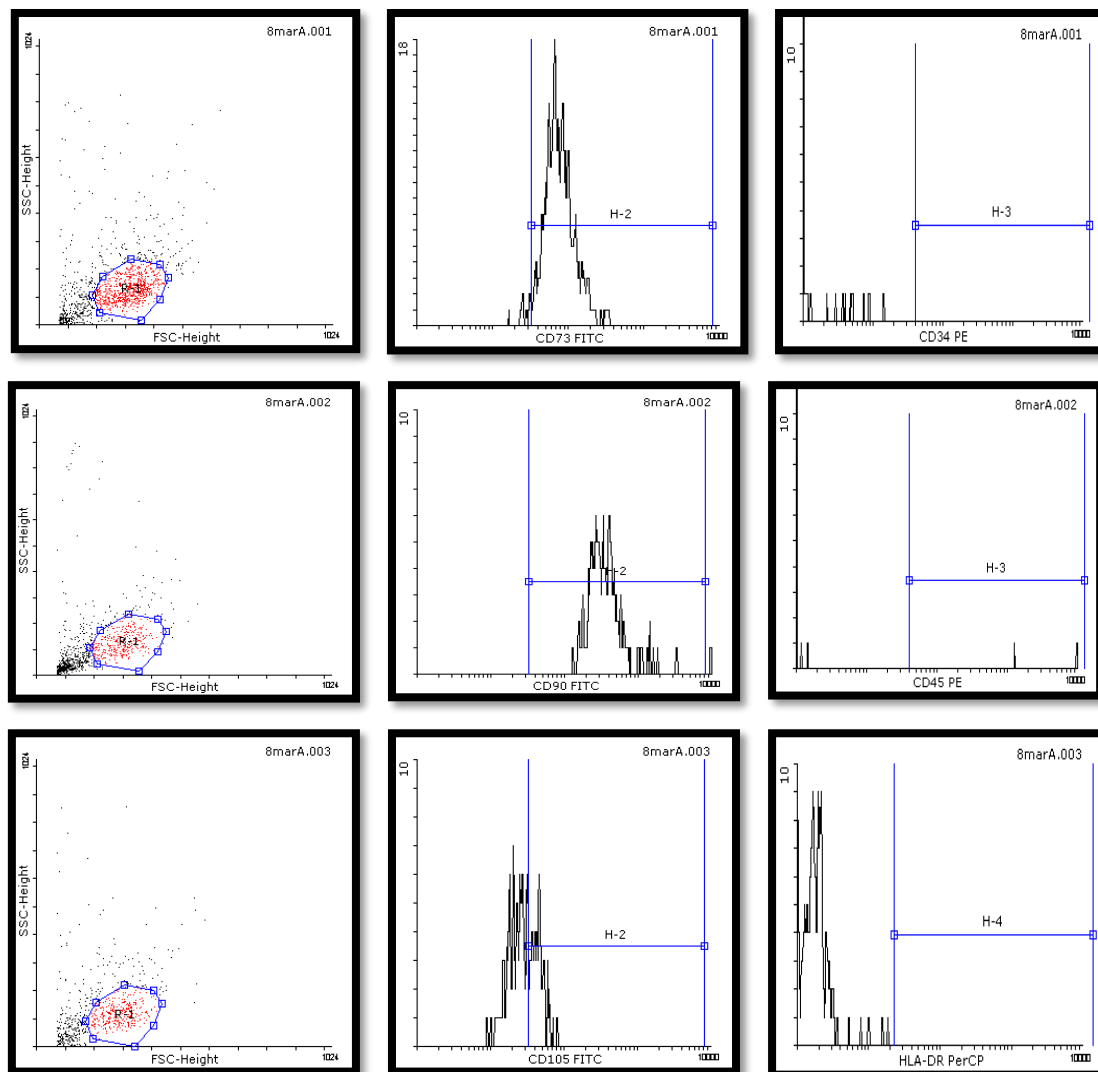


Figura 14. Análise das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo a partir do isolamento das células pelo método convencional.

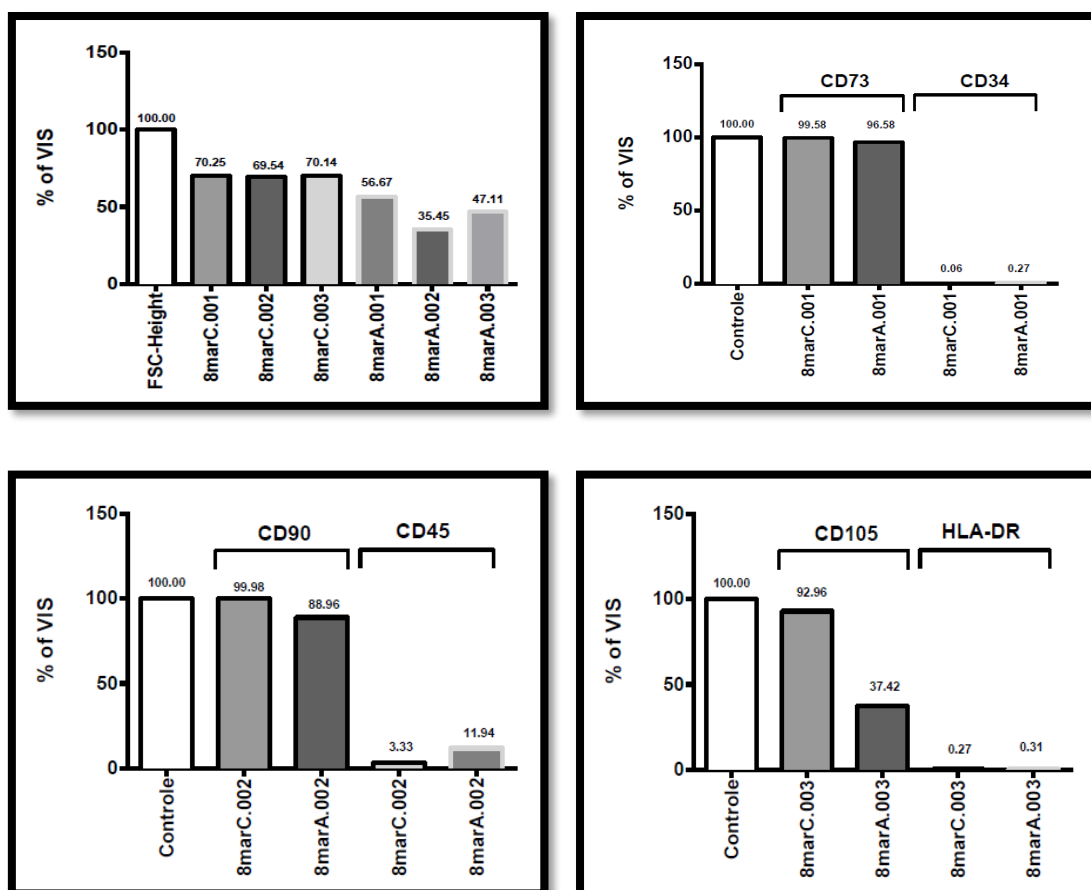




Figura 15. Análise comparativa das ADSC da paciente 4 por citometria de fluxo (% of vis), a partir do isolamento das células pelo método semiautomatizado (amostras 8marC) e convencional (amostras 8marA).

Anexos

	UNESP - FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CAMPUS DE ASSIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA		
Título da Pesquisa: Emprego de um sistema semiautomatizado para o isolamento e proliferação de Células Estromais Mesenquimais de Tecido Adiposo Humano.		
Pesquisador: MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA		
Área Temática: Genética Humana; (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte do CONEP);		
Versão: 1		
CAAE: 09531618.4.0000.5401		
Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO		
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio		
DADOS DO PARECER		
Número do Parecer: 3.520.931		
Apresentação do Projeto:		
<p>O projeto de pesquisa apresentado utilizará o emprego de células estromais mesenquimais multipotentes ou células-tronco mesenquimais (MSC), como uma alternativa terapêutica promissora em diversos estudos pré-clínicos e clínicos. O tecido adiposo tem se destacado como uma das mais importantes fontes para isolamento e proliferação de MSC. Será realizado uma análise comparativa quanto à eficiência e capacidade proliferativa de células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo por meio de metodologia clássica de extração enzimática com colagenase e por meio de um procedimento de isolamento automatizado das ADSC, empregando-se o aparato Kiso Processor, da Keal Bioreserarch Inc., Canadá. Serão realizadas análises do rendimento e viabilidade celular, bem como análises de parâmetros cinéticos, como tempo de duplicação, velocidade específica de crescimento máxima, concentração celular máxima e análise de integridade genômica, a partir das células obtidas por meio cada um dos procedimentos (método clássico e semiautomatizado).</p>		
Objetivo da Pesquisa:		
<p>Esperase que os resultados permitam definir um protocolo eficiente para isolamento de ADSC e que as células resultantes permitam a obtenção e culturas celulares com boa capacidade proliferativa e velocidade de crescimento.</p>		
<p>Endereço: Av. Dom Antônio, 2100 Bairro: Vila Tênis Clube CEP: 13.305-900 UF: SP Município: ASSIS Telefone: (18)3302-5607 Fax: (18)3302-5604 E-mail: cep@assis.unesp.br</p>		
Página 01 de 02		



UNESP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS E LETRAS -
CAMPUS DE ASSIS



Continuação do Parecer: 3.520.901

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora descreve que o risco é mínimo. O procedimento será de coleta de uma parte do tecido adiposo de mulheres que se submeteram a cirurgia plástica na clínica. Descreve riscos ex situ de contaminação da amostra (material biológico obtido). Como Benefício aponta que o método de semiautomatizado do sistema Kiso poderá proporcionar uma diminuição do tempo de isolamento das células estromais mesenquimais de Tecido Adiposo

humano com o mínimo de manipulação, reduzindo, dessa forma, o risco de contaminação, quando comparado aos métodos tradicionais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa interessante, no entanto o projeto foi submetido em 15/02/2019, mas apresenta um cronograma de execução datado ° 1 e 2º semestres de 2017 e 2018;

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Solicita alteração do cronograma.

Recomendações:

Refazer o cronograma (caso o projeto não tenha iniciado).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pendência está descrita no item Comentários e considerações da pesquisa e deverá ser esclarecida na entrega do primeiro relatório.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Regimento Interno do CEP prevê que o pesquisador apresente relatórios, de acordo com as datas estabelecidas pelo CEP. O não encaminhamento dos relatórios implicará no impedimento temporário da apresentação de novos protocolos, até que este regularize a situação pendente. O RELATÓRIO FINAL deverá ser postado na Plataforma como NOTIFICAÇÃO em formulário estabelecido pelo CEP (<http://www.assis.unesp.br/#/comite-de-etica/humanos/formularios/>) em JANEIRO/2020. No relatório Final deverá se informado como foi realizada a devolutiva aos participantes da pesquisa. **ATENÇÃO: QUALQUER ALTERAÇÃO NO PROJETO DEVE SER INFORMADA AO CEP COMO EMENDA AO PROJETO.**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100	CEP: 13.805-900
Bairro: Vila Tênis Clube	
UF: SP	Município: ASSIS
Telefone: (18)3302-5807	Fax: (18)3302-5804
	E-mail: cep@assis.unesp.br



UNESP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS E LETRAS -
CAMPUS DE ASSIS



Continuação do Parecer: 3.520.801

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1188850.pdf	15/02/2019 01:17:21		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	15/02/2019 01:15:44	MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	infraestrutura.pdf	16/10/2018 21:57:05	MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa.docx	02/09/2018 19:43:33	MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA	Aceito
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TGLE.docx	02/09/2018 19:39:59	MARTA APARECIDA DOS SANTOS SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Neecessita Apreciação da CONEP:

Não

ASSIS, 21 de Agosto de 2019

Assinado por:

CLAUDIO EDWARD DOS REIS
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dom Antônio, 2100

Bairro: Via Tênis Clube

CEP: 13.805-900

UF: SP

Município: ASSIS

Telefone: (18)3302-5807

Fax: (18)3302-5804

E-mail: cnp@assis.unesp.br

**Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo
(Capítulo IV, itens 1 a 3 da Resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)**

A Senhora está sendo convidada a participar da pesquisa "Análise comparativa sobre a eficiência e capacidade de desenvolvimento de células mesenquimais multipotentes originadas de tecido adiposo através de metodologia clássica e processo automatizado", sob a responsabilidade da pesquisadora Marta Aparecida dos Santos Souza, RG nº 23.700.751-4, da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Assis, Laboratório de Genética e Terapia Celular.

A pesquisa será realizada com células-tronco retiradas do tecido adiposo (gordura). Será utilizado apenas uma parte do material retirado da região da barriga. O restante, conforme o procedimento que a Senhora conversou com seu médico, será descartado.

A gordura coletada será levada para o nosso laboratório, que está qualificado para a separação das células-tronco. As células serão obtidas por dois métodos: um manual e outro automatizado. Estas serão cultivadas, e depois, analisadas de forma comparativa entre os métodos. Testaremos a eficiência no cultivo e possíveis danos celulares. Estas informações são importantes para que, a partir deste estudo, seja possível ou não utilizar essas células depois de extraídas e mantidas em laboratório para tratamento de algumas doenças.

O seu médico já esclareceu ao Senhora os riscos e benefícios do procedimento de retirada da gordura. Nós não participaremos desta etapa, apenas utilizaremos parte do material coletado pelo médico cirurgião. Se a Senhora concordar em doar parte da gordura retirada da barriga, não haverá risco nenhum para a sua saúde e integridade física, pois todo o estudo será feito em laboratório, após o procedimento cirúrgico. O único risco aparente pode ser de cunho psicológico, caso sinta que sua privacidade possa estar sendo invadida.

Sua identidade será mantida em sigilo pelos pesquisadores, sendo utilizados apenas o dado necessário para esta pesquisa: faixa etária. Informamos ainda que os resultados deste estudo serão publicados em uma revista científica, mas, repetindo, sua identidade será mantida em sigilo.

A Senhora pode a qualquer momento desistir da doação do material, mesmo depois de ter assinado este termo de consentimento.

A Senhora deve estar à vontade para fazer qualquer pergunta sobre este estudo, podendo entrar em contato, a qualquer momento, com a pesquisadora responsável cujo nome, telefone e endereço está abaixo colocados:

Pesquisadora responsável: Marta Aparecida dos Santos Souza
Fone (18) 33025848
Endereço: Av. Dom Antônio, 2100
Cep: 19.806-900
Assis/ SP.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, RG: _____, com idade de _____ anos, abaixo assinado, concordo em participar, como sujeito, da pesquisa: "Análise comparativa sobre a eficiência e capacidade de desenvolvimento de células mesenquimais multipotentes originadas de tecido adiposo através de metodologia clássica e processo automatizado". Fui devidamente informada e esclarecida pelo pesquisadora Marta Aparecida dos Santos Souza sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido, ainda, que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Declaro, ainda, que concordo com a publicação dos resultados desta pesquisa, ciente da garantia quanto ao sigilo das minhas informações pessoais e ao meu anonimato.

_____, ____ de _____ de 2018.

Assinatura

Eu, Marta Aparecida dos Santos Souza, pesquisadora responsável pelo estudo, obtive de forma voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido do sujeito/representante legal para a participação na pesquisa

Marta Aparecida dos Santos Souza
Mestranda

Questionário

Responda, por favor, as questões abaixo, que servirão para dados estatísticos.

1. Qual a sua idade? _____ anos.

2. Faz uso de algum medicamento crônico?

() sim () não

Quais?

() Corticoides

() Contraceptivos

() Reposição hormonal

() Antidepressivos

() Ansiolíticos

() Outros? _____

3. É portadora de alguma doença crônica?

() sim () não

Quais?

() Álcool

() Tabagismo

() Diabetes

() Hipertensão

() Outros? _____

Maison Das Flores®



Hospital de
Cirurgia Plástica
Dr. Renée Louzada

**AUTORIZAÇÃO E EXISTÊNCIA DE INFRAESTRUTURA NECESSÁRIA
PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA.**

Eu, Renée Louzada de Oliveira, CPF: 017.722.338-38 autorizo a realização da pesquisa "Análise comparativa sobre a eficiência e capacidade de desenvolvimento de células mesenquimais multipotentes originadas de tecido adiposo através de metodologia clássica e processo automatizado" nesta instituição, sob a responsabilidade da pesquisadora Marta Aparecida dos Santos Souza, RG nº 23.700.751-4, da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Assis, Laboratório de Genética e Terapia Celular.

Informo que o local dispõe de infraestrutura necessária e que esta será disponibilizada ao pesquisador para atendimento ao projeto, bem como para atender eventuais problemas dela resultantes, atendendo plenamente o Regimento do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências e Letras – UNESP/Campus de Assis e normas complementares ao mesmo.

Assis-SP, 12 de janeiro de 2018.

Av. Dr. Dória, 575
CEP 19816-230
Assis - SP
Fone/Fax (18) 3323-3000
E-mail: maisondasflores@uol.com.br


Dr. Renée Louzada de Oliveira
Cirurgia Plástica
CRM 56.203