

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Gisele Kristina dos Santos Varela

**Caracterização de células estromais mesenquimais derivadas da derme
abdominal humana**

Florianópolis

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB
DEP. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA - BEG
LAB. DE CÉLULAS TRONCO E REGENERAÇÃO TECIDUAL - LACERT

Gisele Kristina dos Santos Varela

**Caracterização de células estromais mesenquimais derivadas da derme
abdominal humana**

Trabalho apresentado como requisito para a conclusão da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (BIO 7016) do currículo do Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Msc. Helena Debiasi Zomer.

Florianópolis

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Varela, Gisele Kristina dos Santos
Caracterização de células estromais mesenquimais
derivadas da derme abdominal humana / Gisele Kristina dos
Santos Varela ; orientadora, Helena Debiazi Zomer -
Florianópolis, SC, 2016.
53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Células-tronco. 3. MSC. 4.
DSC. 5. Cultivo celular. I. Debiazi Zomer, Helena . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Ciências Biológicas. III. Título.

Gisele Kristina dos Santos Varela

Caracterização de células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas”, e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 22 de Janeiro de 2016.

Professora Dra. Maria Risoleta F. Marques
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Banca examinadora:

Msc. Helena Debiazi Zomer
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Patricia Dilenburg Pilla
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Talita Jeremias da Silva
Examinadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Msc. Diana Heck
Suplente
Universidade Federal de Santa Catarina

Á minha família por todo apoio,
carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de realizar uma graduação pública de qualidade, e por ter esta experiência única de vivenciar o ensino, a pesquisa e a extensão. Agradeço também a todos os professores da graduação, por tantos ensinamentos e aprendizagens que vou levar para o resto da minha vida.

À professora Dra. Andrea Gonçalves Trentin que me deu a oportunidade de realizar esta iniciação científica no seu laboratório, e dessa forma desenvolver meu trabalho sob sua supervisão, mesmo que bem de longe, devido ela estar na França.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ e a Pró-reitoria de Extensão da UFSC pelo apoio financeiro durante a graduação.

À minha orientadora Msc. Helena Debiazi Zomer por aceitar o meu convite, mesmo com um projeto de doutorado tão extenso teve tempo e paciência de me ensinar simplesmente tudo sobre as células-tronco mesenquimais, desde os experimentos até as análises, entre tantas dúvidas do cotidiano, se não fosse você com certeza este trabalho não estaria concluído, muito obrigado por tudo!

À professora Dra. Marisa Santos por me receber de braços abertos no seu laboratório e me ensinar tantas coisas, pelas histórias contadas no dia a dia, pelos puxões de orelha que me fizeram crescer, por todo o incentivo para que eu fosse atrás dos meus objetivos, e lá fui eu largar a anatomia vegetal e agarrar com todas as forças a oportunidade de trabalhar com a biologia celular, que neste caso acabei por trabalhar com células-tronco, o que por sinal foi um prazer imenso.

Aos colegas do LAVEG que me ensinaram tantas coisas, a Julia, Isabel, Márcia, Ana, Camila, Maiby, obrigado pela amizade de vocês!

Aos colegas da graduação Daiane, Flavia, Nagilla, Tamires, que entraram comigo, e que passamos as primeiras fases juntas tentando entrar no ritmo e aprendendo que esse negócio de graduação não é assim tão simples, muito fácil entrar, agora para sair à caminhada foi longa. Aos colegas que não entraram de fato comigo, Renan, Suziany, Rafaela, Monique, Fabiana, Joane, mas que conheci ao

longo da graduação, e que por coincidência fizemos muitas disciplinas juntos, com vocês os meus dias se tornaram mais alegres!

Aos diversos profissionais da UFSC que contribuíram para minha pesquisa e formação, pessoal da limpeza, manutenção, biblioteca, coordenação. Em especial ao pessoal do LAMEB, que me auxiliaram com a leitura de todas as citometrias.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte do LACERT, vocês foram fundamentais, obrigado por todos os momentos de descontração, pelas festas e bolos na cozinha, pelos puxões de orelha que com certeza me fizeram crescer e amadurecer. As aprendizagens foram tantas e o trabalho em equipe foi fundamental para manter a calma nos momentos difíceis.

Ao professor Dra. Ricardo Garcez, á Dra. Talita da Silva Jeremias pelos seus sábios ensinamentos e dicas preciosas no dia a dia, á Dra. Patrícia Dilenburg Pilla que chegou a tão pouco tempo e já mostrou muita competência, obrigado pelo auxílio com o teste de CFU. Aos colegas do laboratório Camila, Adriane, Gabriel, Lua, Aruana, Rafaela, Diana, Juliano e Bianca.

Em especial gostaria de agradecer a Priscilla que foi fundamental para a realização deste trabalho, obrigado pela ajuda em todas as técnicas de caracterização, e principalmente nas análises das citometrias, se não fosse você eu ainda estaria tentando aprender a analisar, agradeço por toda a paciência, conselhos e conversas, você é uma pessoa muito especial para mim. E agradeço, também, ao Diego por me auxiliar com a obtenção do controle positivo para as citometrias. Devo também um imenso obrigado a Maiara por ser sempre tão solícita, e por ter me auxiliado com os cortes histológicos da diferenciação condrogênica.

Ao Rodrigo por estar comigo desde o início, por me apoiar e me ajudar nos momentos difíceis e nunca me deixar desistir, por alegrar todos os meus dias com o seu carinho e amor, pelas jantas especiais, pelas cervejas no bar, pela companhia e por sempre me fazer olhar para frente e traçar novos objetivos. Muito obrigado por tudo!

Acima de tudo e todos, á minha família! A minha irmã Milena que me ouviu nos momentos de angustias e de felicidade e que mesmo sendo tão jovem me deu sábios conselhos, me ajudou a treinar para todos os seminários e aulas do estágio

de docência, me deu todo o apoio que ninguém se não ela faria, obrigado minha irmã preferida! Aos meus pais Anildo e Ivonete que me apoiaram e incentivaram a ser perseverante diante das dificuldades, e me ensinaram a sempre ver o lado bom das coisas, se hoje cheguei até aqui é porque vocês me deram a educação necessária. Obrigado por tudo, amo muito vocês!

“O insucesso é apenas uma oportunidade
para recomeçar de novo com mais
inteligência.”

Henry Ford

RESUMO

VARELA, G. K. S. **Caracterização de células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana.** Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

As células estromais mesenquimais (MSC) são células multipotentes encontradas em vários tecidos, desde a fase fetal até a fase adulta. Apresentam muitas vantagens, como: facilidade de obtenção e isolamento, alta capacidade de propagação em cultura e de migrar para locais de lesão, além de serem pouco imunogênicas e tumorigênicas, o que facilita a utilização destas células para aplicações terapêuticas. A derme abdominal humana consiste em uma fonte promissora de MSC, pois a cirurgia de abdominoplastia é uma das mais frequentes no Brasil e a quantidade de pele descartada é abundante. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana (DSC), com o intuito de disponibilizar uma nova linhagem de MSC para o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) e dessa forma dar continuidade a pesquisas envolvendo o reparo de lesões cutâneas. As DSC foram isoladas e caracterizadas *in vitro* por meio de análise morfológica, capacidade de formação de colônias, curva de proliferação celular, análise fenotípica e diferenciação celular para três fenótipos. Os resultados obtidos mostram que as DSC possuem aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, capacidade de formação de colônias, alto potencial proliferativo, expressão dos marcadores mesenquimais CD73 e CD90, e ausência dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, além do potencial de diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Esses resultados mostraram que as DSC possuem características semelhantes a outras MSC, consistindo em uma linhagem de células alternativa, agora disponível para novas pesquisas do LACERT.

Palavras-chave: células-tronco, MSC, DSC, cultivo celular.

ABSTRACT

VARELA, G. K. S. **Characterization of mesenchymal stromal cells derived from human abdominal dermis.** Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

Mesenchymal stromal cells (MSC) are multipotent stem cells found in various tissues from the fetal stage to the adult stage. They have many advantages, such as ease of obtaining and isolating, high capacity of propagating in culture and to migrate to sites of injury, as well as being less immunogenic, non-tumorigenic, which facilitates the use of these cells for therapeutic applications. Human abdominal dermis consists of a promising source of MSC, due to abdominoplasty surgery be one of the most frequent in Brazil and the amount of discarded skin be abundant. The objective of this study was to characterize mesenchymal stromal cells derived from human abdominal dermis (DSC), in order to provide a new MSC lineage to the Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) and thus continuing the research involving the repair of skin lesions. DSC were isolated and characterized *in vitro* by morphological analysis, colony forming ability, cell proliferation curve, flow cytometry and cell differentiation to three phenotypes. The results show that the DSC have adhesion to plastic and are fibroblastoid, have the ability to form colonies and a high proliferative potential, have the expression of mesenchymal markers CD90 and CD73, and the absence of hematopoietic markers CD45 and CD34, besides, have the potential to differentiate into adipocytes, osteocytes and chondrocytes. These results showed that DSC have characteristics similar to other MSC, consisting in an alternative cell line now available for new researches at LACERT.

Keywords: stem cells, MSC, DSC, cell culture.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação esquemática da pele..... | 18 |
| Figura 2 – Nichos de células-tronco na pele..... | 21 |
| Figura 3 – Morfologia..... | 30 |
| Figura 4 – Unidade formadora de colônias de DSC..... | 31 |
| Figura 5 – Eficiência de formação de colônias..... | 31 |
| Figura 6 – Proliferação..... | 32 |
| Figura 7 – Perfil fenotípico..... | 33 |
| Figura 8 – Expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos..... | 33 |
| Figura 9 – Diferenciação adipogênica e osteogênica..... | 34 |
| Figura 10 – Diferenciação condrogênica..... | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CEPSH** – Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos
- CONEP** – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
- DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DSC** – Células estromais mesenquimais derivadas da derme
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra- acético
- FITC** – Isotiocionato de fluoresceína
- LACERT** – Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual
- MSC** – Células estromais mesenquimais
- MTS** – [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]
- MTT** – (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico)
- PBS** – Tampão Fosfato Salina
- PE** – Ficoeritrina
- PS** – Penicilina e Estreptomicina
- SBF** – Soro Bovino Fetal
- UFC** – Unidades formadoras de colônias
- UFC-F** – Unidades formadoras de colônias de fibroblastos
- UFSC** – Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1. Estrutura da pele..... | 17 |
| 1.2. Células-tronco..... | 18 |
| 1.3. Células estromais mesenquimais..... | 19 |
| 1.4. Contextualização..... | 21 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| 3. OBJETIVOS..... | 23 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 23 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 23 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 24 |
| 4.1. Obtenção das amostras de pele humana..... | 24 |
| 4.2. Isolamento das DSC..... | 24 |
| 4.3. Cultivo das células..... | 25 |
| 4.4. Congelamento das células..... | 25 |
| 4.5. Análise morfológica..... | 26 |
| 4.6. Unidades formadoras de colônias..... | 26 |
| 4.7. Curva de proliferação celular..... | 27 |
| 4.8. Análise fenotípica..... | 27 |
| 4.8.1. Citometria de fluxo..... | 28 |
| 4.9. Diferenciação celular..... | 28 |
| 4.9.1. Adipogênica..... | 28 |
| 4.9.2. Osteogênica..... | 29 |
| 4.9.3. Condrogênica..... | 29 |
| 5. RESULTADOS..... | 30 |
| 5.1. Análise morfológica..... | 30 |
| 5.2. Análise das unidades formadoras de colônias..... | 30 |
| 5.3. Análise da proliferação celular..... | 31 |
| 5.4. Análise fenotípica..... | 32 |
| 5.4.1. Citometria de fluxo..... | 32 |
| 5.5. Diferenciação celular..... | 33 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| 6. DISCUSSÃO..... | 36 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |
| ANEXOS..... | 46 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estrutura da pele

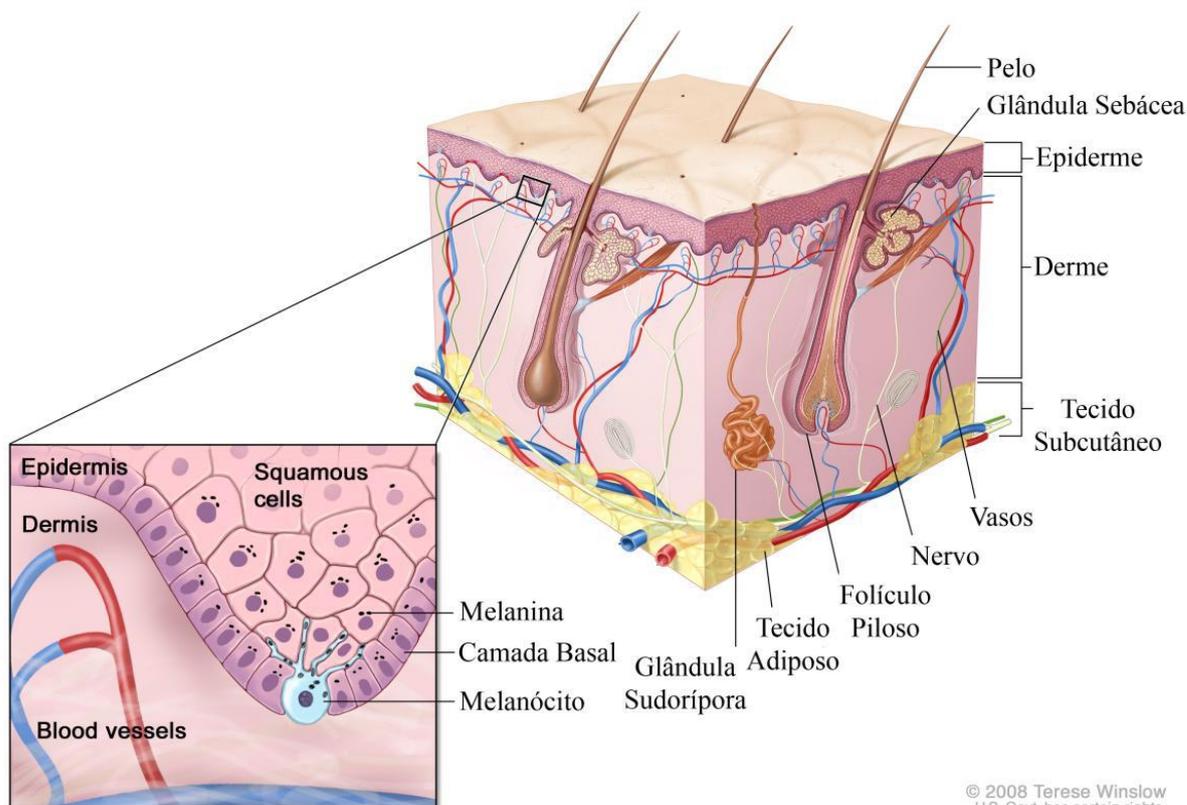
A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, atingindo cerca de 16% do peso corporal dos indivíduos. Este órgão multifuncional recobre toda a superfície do corpo, protegendo-o contra a perda de água, e contra agentes externos como micro-organismos, raios solares, ações mecânicas e químicas. Além disso, possui função termorregulatória e sensorial (ALONSO; FUCHS, 2003).

A pele é constituída pela epiderme e derme. A epiderme é a camada mais externa, de origem ectodérmica. Formada por queratinócitos que formam um fino epitélio estratificado pavimentoso, além de melanócitos e células de Langerhans e de Merkel (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Adjacente à epiderme fica a derme, que nas regiões de membros e tronco possui origem mesodérmica, e nas regiões de face e pescoço é, em sua maior parte, de origem ectodérmica proveniente da crista neural (DANI; BILLON, 2012; DHAMODARAN et al., 2014).

A derme consiste em uma camada de tecido conjuntivo, composta principalmente por fibroblastos e uma matriz extracelular formada por colágeno, glicosaminoglicanos e elastina. Muito bem vascularizada, possui células do endotélio vascular, além de células imunes. Estruturalmente a derme é dividida em duas regiões, a papilar e a reticular. A derme papilar está localizada abaixo da epiderme, possuindo sistema circulatório associado, enquanto a derme reticular é localizada próxima do tecido subcutâneo e possui uma estrutura de matriz extracelular mais densa, podendo ser avascular e acelular (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A espessura da derme, estrutura da papila e quantidade de fibras elásticas são variáveis de acordo com a região em que a pele está situada. Em geral, a idade é um dos fatores que influênciam na quantidade dos componentes da derme, que tendem a diminuir em pessoas com a idade avançada (LANGTON et al., 2012; ARDA et al., 2014; MIZUKOSHI et al., 2015). Na profundidade da derme estão os anexos epidérmicos, que são os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas (Figura 1). Subjacente à derme, há ainda tecido subcutâneo, chamado popularmente de hipoderme, responsável pelo isolamento térmico e reserva energética (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Figura 1. Representação esquemática da pele.



© 2008 Terese Winslow
U.S. Govt. has certain rights

Adaptado de: <http://www.ccsb.org/Cancer/Summary/CDR0000258037/>.

1.2. Células-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas que apresentam como características capacidade de proliferação acentuada, auto-renovação, produção de diferentes linhagens celulares, e regeneração de tecidos (SCHWINDT et al., 2005; RIEKSTINA et al., 2008; BYDLOWSKI et al., 2009).

As células-tronco embrionárias totipotentes são encontradas até o estágio de mórula, e possuem capacidade de diferenciação em todos os tecidos e anexos embrionários. As células-tronco embrionárias pluripotentes são provenientes da massa interna do blastocisto, e possuem potencial de dar origem a todos os tipos celulares do embrião (WAGERS; WEISSMAN, 2004; AMORIN et al., 2012). As células-tronco fetais e adultas são classificadas como multipotentes, e possuem potencial de se diferenciar em diversos tipos celulares, geralmente do mesmo folheto embrionário, como o tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo (WAGERS; WEISSMAN, 2004; WISLET-GENDEBIEN et al., 2005). Já as células oligopotentes e

unipotentes são denominadas células progenitoras, e possuem menor potencial de diferenciação (SCHWINDT et al., 2005).

Embora as células-tronco embrionárias possuam considerável potencial terapêutico, elas podem gerar muitos problemas, como rejeição imunológica, diferenciação em um fenótipo indesejado, e desenvolvimento de tumores. Desta forma, são consideradas menos seguras ao paciente, devido ao seu alto potencial de diferenciação e proliferação. Além de haver muitas controvérsias éticas, políticas e religiosas sobre o uso de células-tronco embrionárias (DOSS et al., 2004; ESPINOZA; PETERSON, 2012).

Conseqüentemente, muitos estudos estão sendo realizados para identificação de células-tronco em tecidos adultos, devido estas permitirem o transplante autólogo, diminuindo a chance de uma possível rejeição imunológica e o uso de imunossupressores. Além do que, as células-tronco adultas não estão relacionadas com a formação de teratomas, e não possuem problemas de questionamentos éticos (CHAGASTELLES; NARDI, 2011). Dessa forma, é possível obter o desenvolvimento de novas estratégias de regeneração e reparo tecidual, uma vez que estas células, mesmo com menor potencial de diferenciação, mantêm *in vitro* suas características de auto-renovação, proliferação e diferenciação (BAKSH et al., 2004; RABIE et al., 2007).

1.3. Células estromais mesenquimais

Em 1968, Friedestein e colaboradores isolaram células da medula óssea, que possuíam como características: morfologia fibroblastóide, capacidade de formar colônias aderentes ao plástico, e também, de formar ossos quando implantadas em regiões anatomicamente heterotópicas. Estas células foram denominadas unidades formadoras de colônias de fibroblastos (UFC-F) (FRIEDENSTEIN et al., 1968; SCHIPANI; KRONENBERG, 2008).

A partir da constatação de que as UFC-F derivavam de uma porção estromal da medula óssea, as células aderentes ao plástico passaram a ser denominadas células estromais da medula óssea, baseado na hipótese de que vários tecidos de origem mesenquimal poderiam ser gerados através destas células (FRIEDENSTEIN et al., 1968; BIANCO et al., 2008).

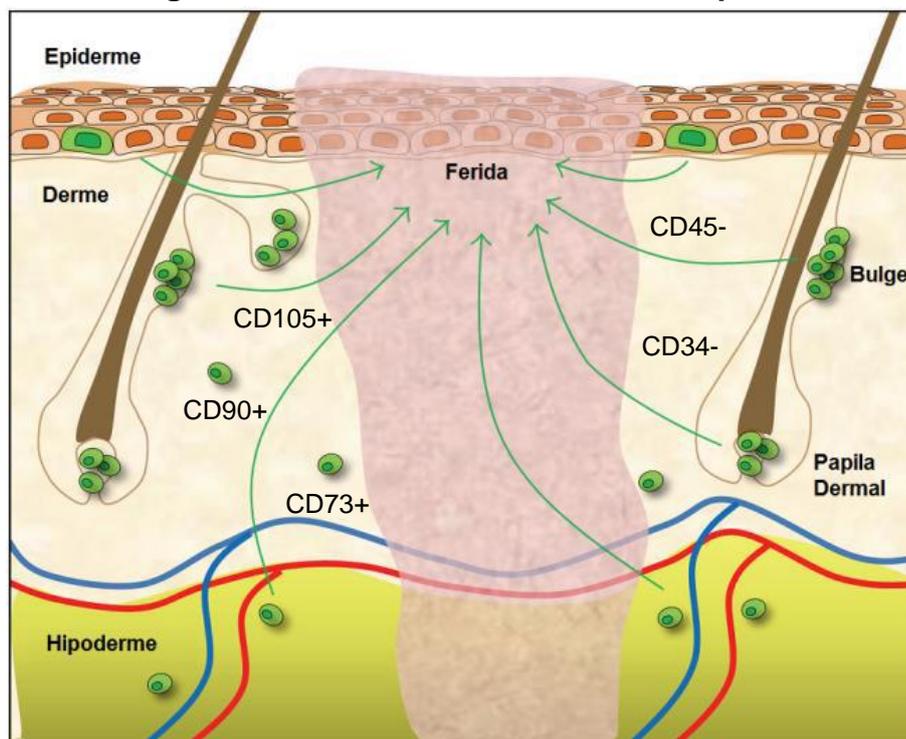
Em 1991, o conceito de células-tronco mesenquimais, foi descrito pela primeira vez por Caplan (CAPLAN, 1991). Este termo “células-tronco mesenquimais” é amplamente utilizado em literatura, entretanto, nos últimos anos tem-se proposto chamá-las de “células estromais mesenquimais multipotentes”, ou apenas “células estromais mesenquimais” (SIDNEY et al., 2014). Neste trabalho, adotaremos o termo “células estromais mesenquimais” ou MSC (do inglês *Mesenchymal Stromal Cell*).

As MSC são classificadas como multipotentes. Embora, possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, as MSC apresentam muitas vantagens na sua utilização, como a facilidade de obtenção e isolamento, alta capacidade de propagação em cultura, e de migrar para os locais da lesão, além de serem pouco imunogênicas e tumorigênicas, o que facilita a utilização destas células para aplicações terapêuticas (SATIJA et al., 2007; BYDLOWSKI et al., 2009; CHAGASTELLES; NARDI, 2011). As MSC vêm sendo amplamente estudadas, para serem utilizadas em doenças do coração, hepáticas, neurodegenerativas e diabetes (PEREIRA, 2008; SOUZA et al., 2014; HASHEMIAN et al., 2015).

Atualmente acredita-se na hipótese de que todos os tecidos adultos possuem um compartimento tronco, isto é, que as células-tronco estão distribuídas em diversos tecidos do corpo. Estas são responsáveis pela homeostase dos tecidos e podem ser recrutadas para o reparo de lesões, se diferenciando no tecido afetado ou por meio de seu efeito parácrino com a secreção de diversos fatores (HU et al., 2013; RANI et al., 2015). Essas células podem afetar a migração, proliferação e sobrevivência de outras células do local da lesão, desencadeando um melhor reparo tecidual (JACKSON; NESTI; TUAN, 2012). Na pele têm sido identificadas populações de células-tronco em vários nichos, incluindo epiderme, derme e tecido subcutâneo (hipoderme) (Figura 2).

Desta forma, as MSC apresentam uma ampla distribuição em indivíduos adultos, sendo encontradas em diferentes tecidos, incluindo a pele (CHEN et al., 2015), o músculo esquelético (TAMAKI et al., 2015), o tecido adiposo (LIN, 2012), a polpa dental (XIAO; TSUITSUI, 2013), os ossos e o fígado (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; NINCHERI et al., 2009).

Figura 2. Nichos de células-tronco na pele.



Populações de células-tronco (indicadas em verde) têm sido identificadas em vários nichos da pele: na camada basal da epiderme, no bulge e papila dermal do folículo piloso, na derme e tecido subcutâneo (hipoderme). Adaptado de: (WONG et al., 2012).

Para que uma célula seja considerada MSC, ela deve ter algumas características de acordo com os critérios propostos pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy”. Primeiro, deve ter aderência na placa de cultura celular e morfologia semelhante ao fibroblasto. Segundo, quando submetida à análise fenotípica, a MSC deve expressar os marcadores mesenquimais, como por exemplo: CD105, CD90, CD73, e ausência dos marcadores hematopoiéticos CD45, CD34. E terceiro, deve ter potencial de se diferenciar em outros tipos celulares provenientes do folheto embrionário mesodérmico, como adipócitos, osteócitos e condrócitos. (DOMINICI et al., 2006; SALEM; THIEMERMANN, 2010).

1.4. Contextualização

Células estromais mesenquimais derivadas da derme (DSC) (do inglês *Derm Stromal Cell*) facial humana foram previamente isoladas a partir de descartes de ritidoplastias e caracterizadas no Laboratório de Células Tronco e Regeneração

Tecidual (LACERT), localizado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Essas células foram cultivadas sobre biomateriais e analisadas *in vitro*, sendo observadas adesão, proliferação e migração das mesmas (JEREMIAS, 2013). Foi analisado também, o potencial terapêutico das DSC faciais *in vivo*, associadas à biomateriais, na regeneração da pele de camundongos. Como resultados, foram observados aumento no tecido de granulação, recrutamento de células inflamatórias, vascularização, depósito de colágeno e reepitelização, acelerando o reparo tecidual (JEREMIAS et al., 2013). Esses resultados sugerem que as DSC faciais são eficazes no reparo de lesões cutâneas, e abrem diversas possibilidades para novas pesquisas.

Em 2013, a International Society of Aesthetic Plastic Surgery divulgou um relatório sobre o número de cirurgias plásticas no mundo, onde o Brasil ficou em segundo lugar no ranking, perdendo apenas para os Estados Unidos. As cirurgias mais realizadas no Brasil foram lipoaspiração, seguida de mamoplastia, e abdominoplastia (SBCP, 2013). Dados estes que comprovam que as DSC abdominais se destacam pela sua facilidade de obtenção, tendo em vista que a cirurgia de abdominoplastia é mais frequente que a cirurgia de ritidoplastia. Além disso, a quantidade de pele descartada, na abdominoplastia, é muito maior.

Na literatura é descrito que a idade do doador está relacionada à viabilidade e proliferação das células-tronco em cultura, as quais são menores em pacientes mais velhos (PANEPUCCI et al., 2004; BYDLOWSKI et al., 2009; BEANE et al., 2014). A idade dos pacientes de abdominoplastia varia de quinze a setenta anos, sendo a média quarenta e quatro anos (KALUF et al., 2006), enquanto que a ritidoplastia é realizada em pacientes com idades que variam entre quarenta e setenta anos ou até mais, sendo a média cinquenta e sete anos (CASTRO et al., 2005; MENEZES et al., 2010; PITA et al., 2010). Embora as DSC faciais apresentem grande potencial terapêutico no reparo de lesões cutâneas, a sua fonte pode ser um fator limitante para sua utilização.

2. JUSTIFICATIVA

A baixa frequência de ritidoplastias dificultou dar continuidade a pesquisas com DSC faciais no LACERT. Desta forma, uma alternativa eficiente seria isolar células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana. As DSC abdominais se destacam pela sua facilidade de obtenção, tendo em vista que a cirurgia de abdominoplastia é uma das mais frequentes (SBCP, 2013). Além disso, a quantidade de pele descartada é maior e a idade dos pacientes que realizam abdominoplastia é menor que pacientes que realizam ritidoplastia, o que aumenta a viabilidade e proliferação das células em cultura (KALUF et al., 2006; PITA et al., 2010; BEANE et al., 2014).

Estudos recentes indicam que a maior parte dos tecidos da face tem origem embrionária na crista neural, enquanto que a origem da derme abdominal é mesenquimal (DANI; BILLON, 2012.; SOWA et al., 2013; CHEN et al., 2014). Desta forma, faz-se necessário, também, caracterizar as células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana no LACERT, e assim disponibilizar uma nova linhagem celular para o laboratório, que poderá ser utilizada para novas pesquisas promissoras no reparo de lesões cutâneas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar as células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar a morfologia das DSC;
- Avaliar a capacidade das DSC de formar colônias;
- Verificar o perfil de proliferação das DSC;
- Analisar fenotipicamente a expressão de marcadores de superfície característicos para as MSC;
- Verificar o potencial de diferenciação das DSC para três fenótipos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras de pele humana

As células da derme humana foram obtidas a partir de três doadores, através de cirurgias de abdominoplastia realizadas no Hospital Universitário da UFSC, e doadas com o consentimento dos pacientes por meio de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os fragmentos de pele foram coletados e armazenados a 4°C em recipiente estéril, contendo DMEM (Gibco) acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina - PS) (1U/ μ g) (Gibco) e encaminhados para o LACERT, onde foram realizados os procedimentos de cultura celular.

Os procedimentos estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tendo sido julgados e aprovados pelo Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da UFSC, sob parecer 1.076.626/2015 (Anexo 2).

4.2. Isolamento das DSC

As amostras foram manipuladas em fluxo laminar em sala de cultura celular no LACERT. Os fragmentos de pele ficaram imersos em tampão fosfato salina (PBS) 1x em placa de petri e a hipoderme foi removida com o auxílio de material cirúrgico. A epiderme e a derme foram seccionadas em fragmentos pequenos de aproximadamente 1 cm², e em seguida incubadas em dispase (Gibco) por 20 horas em geladeira a 4°C, para facilitar a dissociação do tecido. Após este período, a epiderme e os folículos pilosos foram removidos, e a derme foi seccionada em fragmentos ainda menores com o auxílio de material cirúrgico, e tripsina EDTA 0,25% (Gibco) foi adicionada para dissociação enzimática da matriz extracelular. Depois que os fragmentos da derme estavam bem dissociados, eram incubados em tripsina 0,25% durante 45 minutos em banho maria, a temperatura de 37°C. Após este período, foi adicionado DMEM com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Vitrocell) para bloquear a ação enzimática da tripsina. A solução foi filtrada, com um filtro de 70 nanômetros e em seguida centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm (392 g). O sobrenadante era descartado, o *pellet* ressuspensionado em meio completo (DMEM + SBF 10% + PS), as células plaqueadas em garrafas de cultura contendo meio e

mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Esta cultura primária foi denominada passagem 0 (P0). Este processo de isolamento das células foi realizado pela doutoranda Helena Debiazi Zomer.

4.3. Cultivo das células

Após o isolamento e expansão da cultura primária das DSC, as células foram repicadas. Para isto, as células foram incubadas em tripsina 0,25% por 3-5 minutos em estufa a 37°C. Em seguida, foi adicionado DMEM com 10% de SBF, e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm (392 g). O *pellet* foi ressuscitado e as células plaqueadas em uma nova garrafa. Este repique passava as células para passagem 1, e assim sucessivamente, sendo utilizadas células para experimentos até a passagem 8.

Todos os experimentos foram realizados utilizando pelo menos três diferentes linhagens celulares, isto é, provenientes de diferentes doadores.

4.4. Congelamento das células

Depois de realizar o isolamento e cultivo das DSC, as amostras foram congeladas em diversas passagens (entre P1 e P6) para posteriores análises de caracterização das DSC, e para utilização destas linhagens em outras pesquisas do laboratório.

O meio de congelamento era composto de meio completo acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma). As células eram tripsinizadas, centrifugadas e ressuscitadas em 1 mL de meio de congelamento e distribuídas em criotubos. Os tubos foram devidamente identificados com nome, tipo de célula, passagem, data, e rapidamente transferidos para um isopor específico (CoolCell), para que o congelamento fosse lento, e assim preservar a viabilidade das células, pois a cada um minuto neste recipiente a temperatura baixa 1°C em freezer -80°C. Este processo precisa ser rápido porque o DMSO é tóxico em temperatura ambiente, entretanto, ele serve para impedir a formação de cristais dentro das células após o congelamento (LADEIRA et al., 2012). Depois de 24 horas, os criotubos eram transferidos para caixas no freezer -80°C, ou armazenados em nitrogênio líquido.

Para realizar o descongelamento das células, o criotubo era retirado do freezer -80°C, e descongelado em temperatura ambiente. Em seguida, as células

eram transferidas para um tubo de 15 mL contendo 1 mL de meio completo. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm (392 g), o sobrenadante descartado, e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de meio completo. As células eram plaqueadas em garrafas de cultura celular e mantidas em estufa, a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.5. Análise morfológica

As MSC possuem como característica a morfologia fibroblastóide e aderência à placa de cultura celular. Então, para a realização da análise morfológica, as DSC cultivadas eram observadas diariamente, por meio de microscópio óptico, para verificar sua aderência ao plástico e identificar a morfologia. Posteriormente, elas foram fotomicrografadas em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus), que possui um sistema de captura de imagem acoplada.

4.6. Unidades formadoras de colônias

Este teste foi realizado para avaliar a capacidade das DSC em formar colônias, tendo em vista que esta é uma das características que as qualifica como MSC. A análise das unidades formadoras de colônias (CFU) foi realizada em triplicata. Foram plaqueadas DSC em segunda passagem, em uma placa de 6 poços a concentração celular de 5×10^2 por poço. As placas eram observadas diariamente para monitorar a proliferação celular e formação de colônias e após 5 dias era realizada a contagem das colônias. Para este procedimento, o meio de cultura foi retirado e a placa lavada com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados 2 mL de paraformaldeído 4% com corante *Crystal violet* (Merck) (Anexo 3) 0,5% em cada poço e estas incubadas por 30 minutos. Após este período, o paraformaldeído com o corante foi descartado e a placa lavada com água destilada. Ao final, a placa ficou aberta para que os poços ficassem secos possibilitando a visualização das colônias em coloração roxa. As colônias com mais de 5 células foram contadas e fotomicrografadas. O número de colônias encontrado foi dividido pelo número inicial de células plaqueadas e convertido para porcentagem para que fosse possível obter a eficiência de formação de colônias. Posteriormente, a análise gráfica foi realizada no programa GraphPad Prism 5.

4.7. Curva de proliferação celular

O objetivo deste teste é verificar o perfil de proliferação das DSC. Para isso, as células foram plaqueadas em segunda passagem na quantidade de 1×10^4 células por poço, em uma placa de 6 poços. Foi contado um poço a cada 24 horas, até as células atingirem total confluência, as células depois de contadas eram descartadas. O meio de cultura era trocado a cada 3 dias. Para a contagem das células, o meio foi retirado e 500 μ L de tripsina 0,25% adicionado, deixando agir por 5 minutos em estufa. Em seguida, foi adicionado 500 μ L de meio completo para inativação da tripsina. Com o auxílio de uma pipeta, a solução era homogeneizada e 10 μ L coletados para contagem celular em Câmara de Neubauer. Os quatro quadrantes das extremidades da câmara eram contados e o valor total dividido por 4, sendo que o resultado obtido significa a quantidade de células ($\times 10^4$) presentes em 1 mL. Após a contagem, as quantidades encontradas foram devidamente anotadas. Este procedimento foi realizado em duplicata para cada linhagem celular, com o objetivo de aumentar a precisão dos resultados. Posteriormente, a análise gráfica foi realizada no programa GraphPad Prism 5.

4.8. Análise fenotípica

A análise fenotípica das DSC foi realizada por imunofluorescência direta, para isto foram utilizados anticorpos específicos conjugados a fluorocromos (BD Biociences) (Tabela 1) que se ligam a antígenos na membrana celular. O resultado foi obtido por meio de leitura no equipamento citômetro de fluxo com o objetivo de verificar se as células expressam proteínas específicas na sua superfície.

Tabela 1: Anticorpos utilizados na análise fenotípica por meio de citometria de fluxo.

| Anticorpo | Imunoglobulina | Fluorocromo |
|------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Anti-CD90 (BD) | IgG1 de camundongo | Isotiocianato de fluoresceína (FITC) |
| Anti-CD73 (BD) | IgG1 de camundongo | Ficoeritrina (PE) |
| Anti-CD45 (BD) | IgG1 de camundongo | FITC |
| Anti-CD34 (BD) | IgG1 de camundongo | PE |

4.8.1. Citometria de fluxo

As DSC foram cultivadas em garrafas de 75 cm², em passagem 2 e 8. Após atingirem confluência de 80% as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS 1x com 10% de SBF, por três vezes. Posteriormente, as DSC foram contadas em Câmara de Neubauer, e transferidas para tubos de citometria em concentração de 1×10^5 células /50 µL por tubo.

Foram testados individualmente e com dupla marcação os anticorpos CD90, CD73, CD45, CD34. Também, foram utilizadas células sem marcação, que possui a função de calibrar o citômetro de fluxo e definir a fluorescência emitida naturalmente pelas células. Como controle positivo dos marcadores hematopoiéticos CD45 e CD34 foi utilizado sangue periférico, estes ficavam durante 20 minutos em solução tampão de lise para que as hemácias fossem lisadas. Após este período, as células sanguíneas foram ressuspensas em PBS 1x com 10% de SBF, por três vezes.

Posteriormente, as células mesenquimais e sanguíneas foram incubadas com os anticorpos específicos, e ficaram durante 1 hora em geladeira a 4°C. Os anticorpos eram manipulados na ausência de luz, e as amostras eram protegidas com o auxílio de papel alumínio. Após a incubação, as células mesenquimais e sanguíneas foram lavadas duas vezes com PBS 1x acrescido de 10% de SBF, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos (392 g), ressuspensas em 200 µL de PBS 1x acrescido de 10% de SBF e posteriormente analisadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Bioscience). Os dados foram gerados pelo software FACSDiva 6.0 e analisados pelo Flowing Software 2.

4.9. Diferenciação celular

A indução da diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica foi realizada por meio de tratamento com meios específicos, com o objetivo de verificar a plasticidade das DSC, característica essencial das MSC.

4.9.1. Adipogênica

Para a diferenciação adipogênica foram cultivadas 3×10^4 células em meio completo, em placa de 4 poços. Após atingirem confluência de 90% foi colocado meio completo acrescido de 10^{-8} M dexametasona (Sigma), 100 µM indometacina

(Sigma), 2,5 µg/ml insulina (Sigma), 0,5 mM isobutilmetilxantina (Sigma). Como controle, foi utilizado apenas meio completo. As células eram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca do meio a cada 3-4 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído e submetidas à análise fenotípica através de coloração com *Oil red* (Sigma) (Anexo 3).

4.9.2. Osteogênica

Para diferenciação osteogênica foram cultivadas 3x10⁴ células em meio completo, em placa de 4 poços. Após atingirem confluência de 90% foi colocado meio completo acrescido de 10⁻⁸ M dexametasona, 5,0 µg/ml ácido ascórbico (Sigma), 3,15 mg/mL β-glicerofosfato (Sigma). Como controle, foi utilizado apenas meio completo. As células eram mantidas a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca do meio a cada 3-4 dias. Após 30 dias, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído e submetidas à análise fenotípica através de coloração com *Alizarin red* (Sigma) (Anexo 3).

4.9.3. Condrogênica

Para o teste de diferenciação celular condrogênica foram utilizados o Kit StemXVivo Human/Mouse da empresa R&D Systems, seguindo o protocolo indicado pelo fabricante, com algumas adaptações. Desta forma, 2,5x10⁵ células foram mantidas em forma de *pellet*, em tubos cônicos de 15 mL em estufa a 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, com troca de meio a cada 3-4 dias. As análises foram realizadas com três linhagens diferentes, além do controle, em que foi utilizado apenas o meio completo, sem a indução de diferenciação.

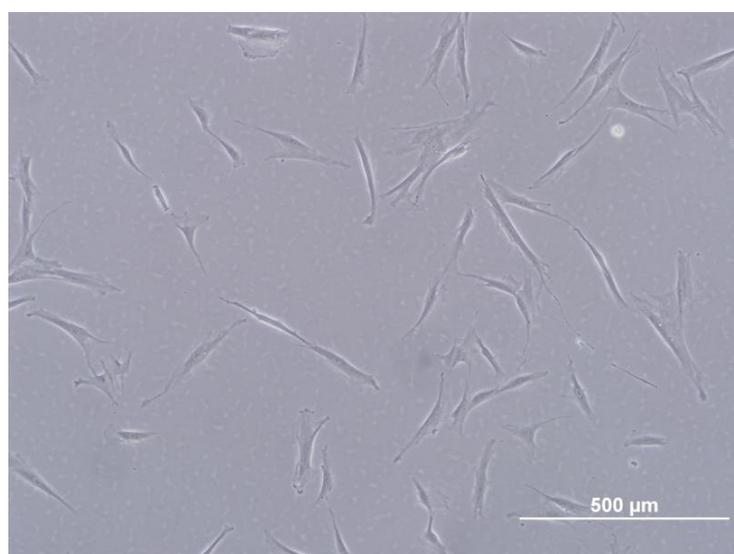
Após 30 dias, os *pellets* resultantes da diferenciação condrogênica foram fixados por uma hora em paraformaldeído a 4%, desidratados em álcool, diafanizados em xilol e depois imersos em parafina. Os blocos foram cortados em secções de 5 µm, com auxílio de um micrótomo. As lâminas foram coradas com *Alcian blue* (Sigma) e *Mallory* (Sigma) (Anexo 3), e fotomicrografadas em microscópio para visualização de fibras colágenas.

5. RESULTADOS

5.1. Análise morfológica

As células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana foram cultivadas e fotomicrografadas em microscópio invertido de contraste de fase. As DSC se mostraram aderentes ao plástico e com morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 3).

Figura 3. Morfologia.

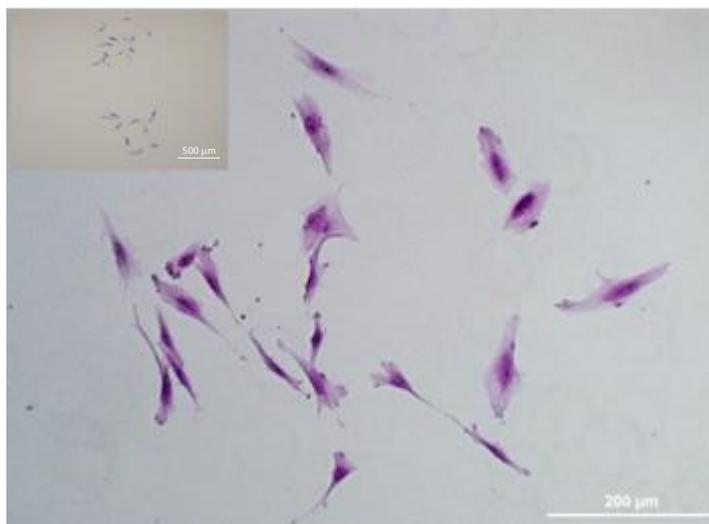


Fotomicrografia representativa da morfologia fibroblastóide das DSC.

5.2. Análise das unidades formadoras de colônias

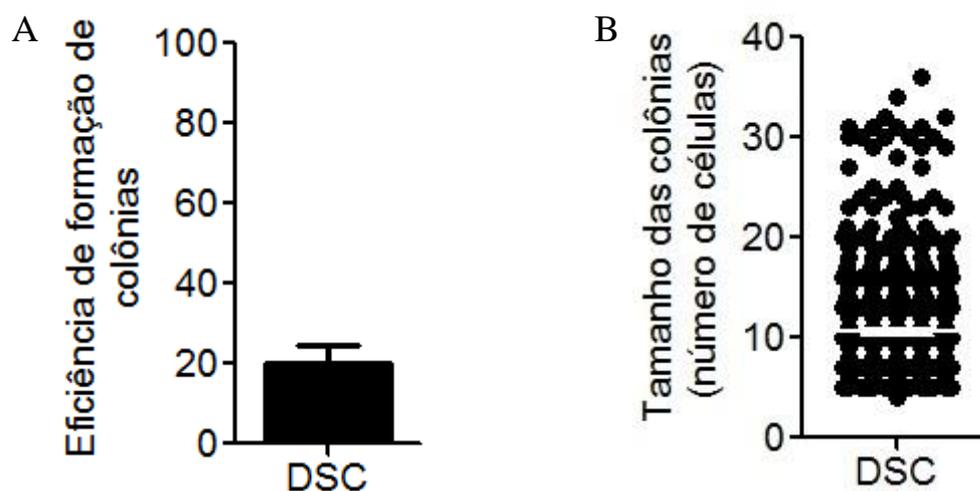
As células foram plaqueadas em baixa quantidade para que seu potencial na formação de colônias pudesse ser observado e quantificado depois de 5 cinco dias em cultura celular. Desta forma, as DSC apresentaram capacidade na formação de colônias (Figura 4), as quais foram fixadas e coradas com corante cristal violeta para realização da contagem do número de colônias e do número de células por colônias e foram representadas graficamente. Verificamos que a cada 500 células plaqueadas, a eficiência de formação de colônias variou de 17% a 31%, sendo que a média foi de 20% (Figura 5 A). Já o número de células por colônia variou de 5 a 36 células por colônia (Figura 5 B).

Figura 4. Unidade formadora de colônias de DSC.



Fotomicrografia representativa de CFU corada com corante cristal violeta.

Figura 5. Eficiência de formação de colônias.



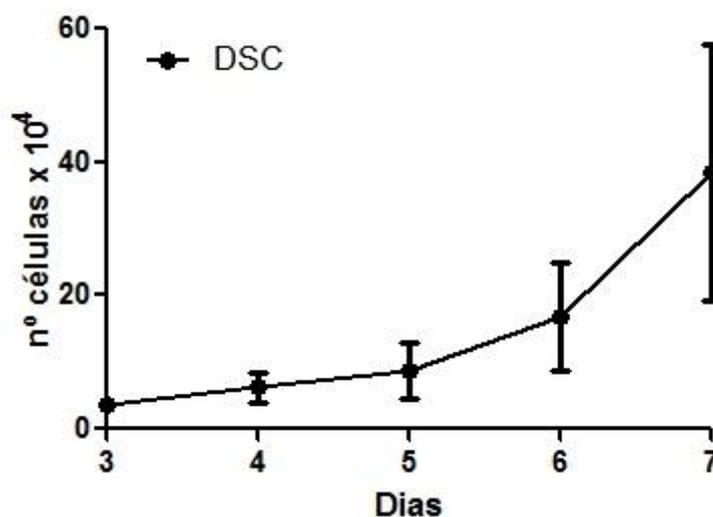
Representação gráfica da média da eficiência de formação de colônias, que foi de 20% (A); e do número de células por colônia, que variou entre 5 e 36 células por colônias (B).

5.3. Análise da proliferação celular

As células em passagem dois foram plaqueadas em placas de 6 poços e um poço por dia foi contado até atingirem confluência de 100%, o que ocorreu após 7 dias. Os resultados obtidos formaram uma curva crescente de proliferação celular, conforme demonstrado no gráfico seguinte (Figura 6). As DSC apresentaram alta capacidade de proliferação celular, apesar dos resultados serem bastante

heterogêneos entre as replicatas biológicas, o que fez com que o desvio padrão se tornasse elevado.

Figura 6. Proliferação.



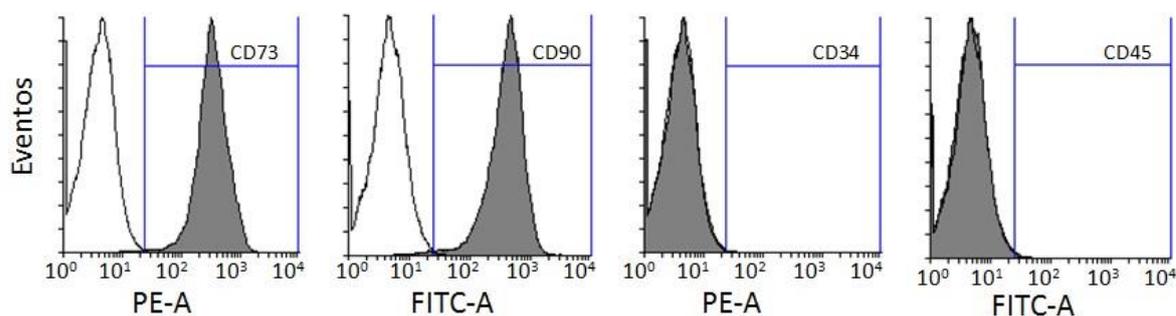
Representação gráfica da capacidade de proliferação celular das DSC.

5.4. Análise fenotípica

5.4.1. Citometria de fluxo

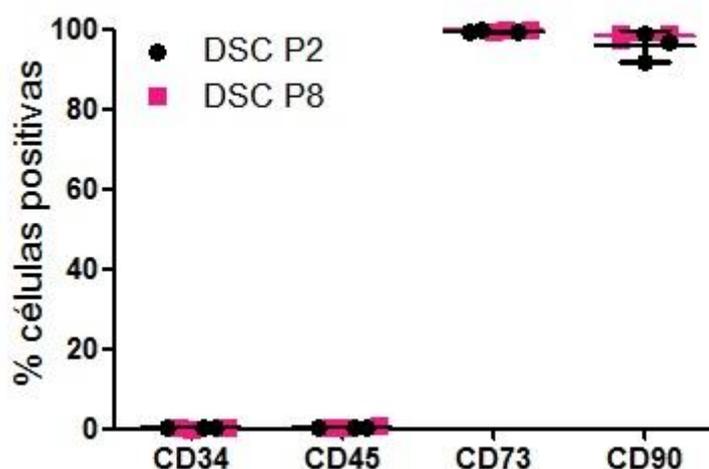
As DSC apresentaram os marcadores de superfície característicos das células-tronco mesenquimais. Foram analisadas células em passagem 2 e 8 e ambas apresentaram marcação individual e dupla para os marcadores mesenquimais CD73 e CD90, e não apresentaram marcação para os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 (Figura 7). As análises demonstraram que mesmo em diferentes passagens, em média, 99,58% das células são positivas para CD73 e 97,15% positivas para CD90. Os marcadores CD34 e CD45 apresentaram marcação insignificante, menor que 0,2% e 0,4%, respectivamente (Figura 8).

Figura 7. Perfil fenotípico.



Representação em histogramas do perfil imunofenotípico das amostras submetidas à citometria de fluxo para os marcadores de superfície CD73-PE, CD90-FITC, CD34-PE, CD45-FITC.

Figura 8. Expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em diferentes passagens.



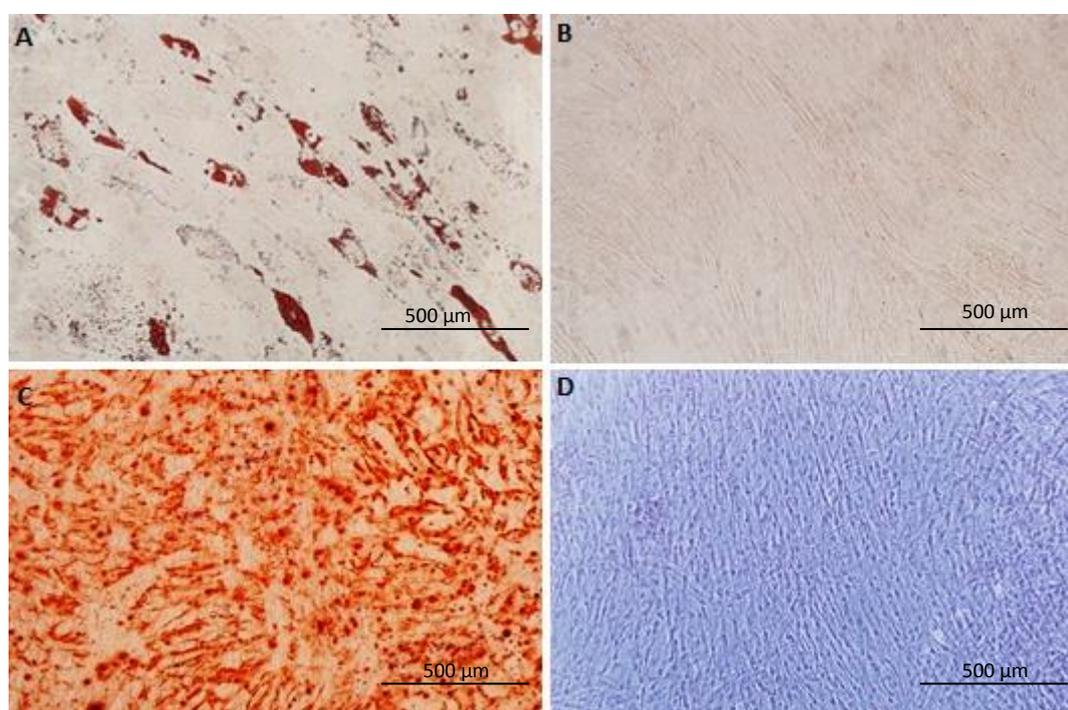
Representação gráfica da expressão de marcadores mesenquimais e hematopoiéticos em diferentes passagens. Para CD34 e CD45 menos de 0,2% e 0,4% apresentaram marcação, e para CD73 e CD90 mais de 99% e 97% apresentaram marcação.

5.5. Diferenciação celular

As células foram submetidas à diferenciação celular com meio específico durante 30 dias. Ao longo deste tempo foi observada a diferenciação gradativa das células para os fenótipos adipogênico, osteogênico e condrogênico. Na diferenciação adipogênica, as células ficavam com morfologia arredondada e acumulavam gotículas lipídicas em seu citoplasma, que depois de fixadas e coradas

com *Oil red* ficavam ainda mais evidentes (Figura 9 A). Já na diferenciação osteogênica, ocorria a deposição de depósito de cálcio extracelular, que em cultura não era tão evidente a visualização, porém, depois de corados com *Alizarin red*, a matriz extracelular ficava completamente corada e era claramente observada a diferenciação para este fenótipo (Figura 9 C). Como controle foram utilizadas células com meio completo, sem os fatores indutores de diferenciação, e estes não apresentaram diferenciação e nem marcação com os corantes utilizados (Figura 9 B e D).

Figura 9. Diferenciação adipogênica e osteogênica.

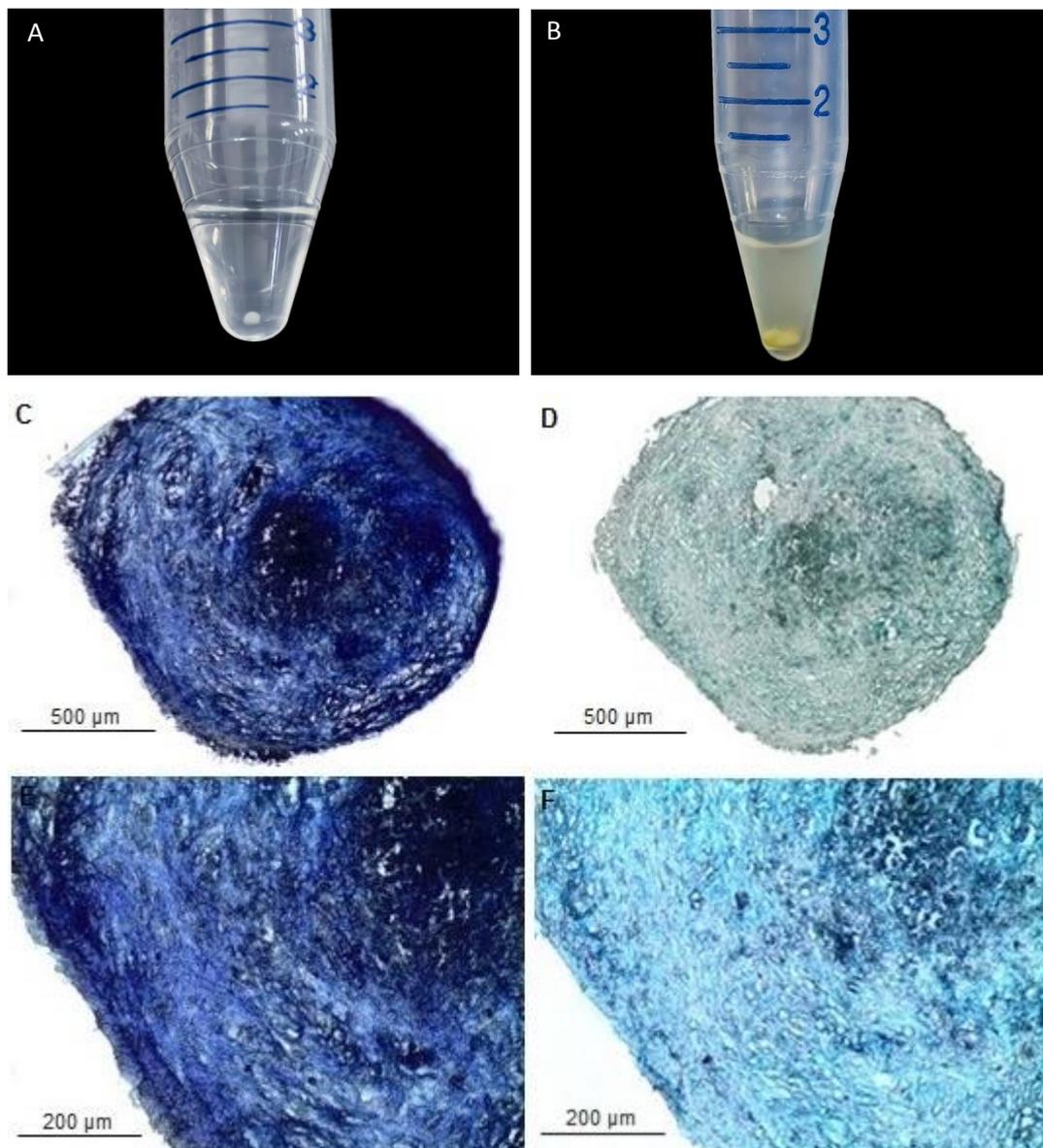


Fotomicrografia representativa da diferenciação adipogênica corada com *Oil red* para visualização das gotículas lipídicas no seu citoplasma (A). E a diferenciação osteogênica corada, com *Alizarin red* para visualização do depósito de cálcio, que formou uma matriz extracelular bem evidente (C). Os controles não apresentaram diferenciação e nem marcação com os corantes utilizados (B e D).

Na diferenciação condrogênica, após alguns dias em cultura, o *pellet* condrogênico já era visível a olho nu (Figura 10 A). O controle formou um aglomerado celular, mas não endureceu para que fosse possível fazer as lâminas histológicas (Figura 10 B). Os *pellets* condrogênicos foram emblocados e cortados em micrótomo, e as lâminas coradas com *Mallory* e *Alcian blue*, então foi possível

verificar o tecido cartilaginoso e as fibras colágenas coradas em azul (Figura 10 C, D, E e F). Desta forma, as DSC apresentaram a característica de plasticidade celular por meio deste teste.

Figura 10. Diferenciação condrogênica.



Fotografia macroscópica do *pellet* condrogênico (A) e do aglomerado celular que formou no controle (B), após 30 dias em cultura. E fotomicrografia representativa de corte histológico do *pellet* condrogênico com coloração *Mallory* (C e E) e *Alcian blue* (D e F) e em maior aumento está o tecido cartilaginoso para observação das fibras colágenas de ambas as colorações (E e F).

6. DISCUSSÃO

A escolha do tecido abdominal ocorreu devido à baixa frequência de cirurgias de ritidoplastia, que por consequência dificultou dar continuidade a pesquisas no LACERT. Uma solução eficaz foi utilizar células provenientes de descartes de abdominoplastia, cirurgias estas que são mais frequentes, segundo dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP, 2013). Além disso, a quantidade de pele descartada, na abdominoplastia, é muito maior. A idade dos pacientes, também, pode ser considerada um fator determinante para o potencial das células em cultura, e segundo dados da literatura a idade dos pacientes que fazem abdominoplastia é menor, se comparado com os pacientes da ritidoplastia (BYDLOWSKI et al., 2009; BEANE et al., 2014). A pele proveniente da região abdominal difere da pele facial em sua espessura, componentes estruturais da papila dérmica, e fibras elásticas que tendem a diminuir principalmente com o avanço da idade (LANGTON et al., 2012; ARDA et al., 2014; MIZUKOSHI et al., 2015).

As vantagens descritas acima fazem com que as DSC abdominais se tornem uma fonte alternativa de células, para dar continuidade a pesquisas promissoras no reparo de lesões cutâneas. Para que esta fonte alternativa pudesse ser utilizada foi necessário caracterizar esta nova linhagem celular, porque os tecidos da face têm origem embrionária na crista neural, enquanto, a origem embrionária da derme abdominal é mesenquimal. Portanto, a origem embrionária é um fator determinante para as características das células em cultura (DANI; BILLON, 2012; SOWA et al., 2013; CHEN et al, 2014).

Diante disto, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana de acordo com os critérios propostos pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy”.

As DSC abdominais apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastóide, já nas primeiras semanas de expansão em cultura. A partir da passagem 2, se tornaram células com rápida proliferação e mantiveram suas características morfológicas, proliferativas e fenotípicas por pelo menos 8 passagens. Comparando com as DSC faciais caracterizadas na pesquisa de Jeremias (2013), estas também demonstraram aderência ao plástico, morfologia

semelhante a fibroblastos, e puderam ser utilizadas e amplificadas até 20 passagens.

As DSC abdominais foram analisadas pelo teste de proliferação celular, e apresentaram uma fase lag nos dois primeiros dias, seguida de uma rápida proliferação, atingindo confluência após 7 dias em cultura. Os dados obtidos na curva de proliferação foram bastante heterogêneos entre as replicatas biológicas, o que fez com o que o desvio padrão se tornasse elevado. Esta variação pode ter ocorrido devido a erros técnico na hora da contagem ou pela variação individual entre as células dos pacientes. Na literatura é descrito que diversos fatores podem influenciar o potencial das células em cultura, um deles, por exemplo, é o fator idade que afeta a proliferação das células (PITA et al., 2010; BEANE et al., 2014). Por meio deste teste foi possível verificar que as DSC abdominais possuem alto potencial proliferativo, mas para obter resultados mais acurados é indicado aumentar o número de repetições para minimizar possíveis erros de manipulação e diminuir a variação entre os dados obtidos em cada paciente.

As DSC abdominais apresentaram, também, eficiência na formação de colônias, por meio do teste de CFU. Esses resultados sugerem que estas células possuem potencial de proliferação e auto-renovação *in vitro*. Entretanto, para confirmar, principalmente, esta última característica o ideal é realizar testes clonogênicos e desta forma obter resultados mais precisos sobre a proliferação e auto-renovação das DSC abdominais (BUICK; MACKILLOP, 1981; CAPLAN, 1991; ALISSON; ISLAN, 2009; KEATING, 2012). Comparando com a pesquisa desenvolvida por Jeremias (2013), as DSC faciais não foram analisadas pela curva de proliferação e CFU, entretanto foram analisadas por meio do teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazólico) (Sigma) e MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] (Promega), que visam avaliar a viabilidade das células. Como resultado foi verificado um aumento da viabilidade celular *in vitro*.

A análise fenotípica de imunofluorescência direta realizada por meio de citometria de fluxo comprovou que as DSC abdominais expressam, em diferentes passagens, os marcadores mesenquimais CD73 e CD90, e não expressam os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, corroborando com os dados encontrados na literatura (KRONENBERG, 2009; SALEM; THIEMERMANN, 2010; FEISST et al., 2014). No trabalho de Jeremias (2013), as DSC faciais também foram

analisadas por citometria de fluxo em passagens baixas (P1 e P3) e altas (a partir de P4), e como resultado não expressaram os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45, e expressaram os marcadores mesenquimais CD73, CD90 e CD105. Um resultado interessante descrito pela autora foi que as DSC faciais apresentaram um aumento progressivo na expressão de CD90 entre as células em passagens baixas (P1-P2) e altas (P20). Devido esta variação foram utilizadas as células até a passagem 12 para os demais experimentos. Nas DSC abdominais não foi verificado nenhuma variação significativa, muito pelo contrário, os resultados foram homogêneos, porém foram analisados apenas até a passagem 8.

Estes marcadores de superfície não são exclusivos das MSC, contudo foram estabelecidos pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” (DOMINICI et al., 2006). Além disso, a comarcação dos anticorpos foi realizada, o que aumentou a acurácia dos resultados obtidos nas DSC abdominais. Portanto, esta análise fenotípica foi conclusiva e importante, porque os resultados foram obtidos em diferentes passagens, mostrando que as células possuem estabilidade morfológica, proliferativa e fenotípica por pelo menos 8 passagens. Todas estas características abrem diversas possibilidades de se utilizar as DSC abdominais para outras pesquisas no laboratório, como também para terapia. Testes de estabilidade genética não foram realizados com estas células, mas para utilizá-las terapeuticamente é fortemente indicado que se faça este tipo de análise, porque em cultura as células se tornam muito proliferativas e a quantidade de divisão celular pode causar erros genéticos que podem levar a diversos problemas ao paciente (NIKITINA; CHAUSHEVA, 2014).

Os testes de diferenciação celular *in vitro* foram obtidos com sucesso para os fenótipos mesenquimais: adipócitos, osteócitos e condrócitos, confirmando a plasticidade das DSC abdominais (SCHWINDT et al, 2005; VISHNUBALAJI, 2012). Diante disto, estas células podem ser utilizadas para diversas finalidades, como por exemplo, para pesquisas *in vitro* com uma linhagem específica, como tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo, além de possibilitar a investigação dos mecanismos de diferenciação para cada um destes fenótipos (DENG et al, 2015; YANG et al, 2015). Estudos anteriores de Hill et al., (2012) e Jeremias et al., (2014), utilizando as DSC faciais avaliaram a plasticidade destas células para os fenótipos adipogênico e osteogênico. Estas apresentaram a diferenciação celular para estes dois fenótipos, entretanto, a diferenciação para o tecido condrogênico não foi testada. Característica

esta que qualifica ainda mais as DSC abdominais por apresentarem potencial de diferenciação para pelo menos três fenótipos, conforme estabelecido em literatura (DOMINICI et al., 2006). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho comprovam que as DSC abdominais possuem as características básicas para serem consideradas células estromais mesenquimais. Além disso, apresentaram características semelhantes às DSC faciais, mesmo com suas origens embrionárias distintas.

7. CONCLUSÕES

As DSC abdominais podem ser consideradas um tipo de MSC devido as características apresentadas em cultura, como aderência à placa de cultura celular, morfologia fibroblastóide, potencial na formação de colônias e alta capacidade de proliferação *in vitro*. Também, expressam os marcadores mesenquimais CD73 e CD90, e não expressam os marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. É essencial às MSC a característica de plasticidade celular, e as DSC abdominais apresentaram potencial de diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica, comprovando sua plasticidade. Este conjunto de características faz com que esta caracterização se torne válida, porque corrobora com os dados encontrados na literatura e estas células podem ser utilizadas para diversas finalidades terapêuticas.

Além disso, foi verificado que os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes às características encontradas nas DSC faciais, e desta forma, é possível afirmar que mesmo tendo origens embrionárias diferentes, ambas podem ser classificadas como MSC. Como também, as DSC abdominais podem ser consideradas uma fonte alternativa para a obtenção de MSC dérmicas, que possibilitam dar continuidade a pesquisas promissoras no reparo de lesões cutâneas.

REFERÊNCIAS

ALISSON, M. R.; ISLAN, S. Attributes of adult stem cells. **Journal of Pathology**, v. 217, p. 144-160, 2009.

ALONSO, L.; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, p. 11830-11835, 2003.

ARDA, O.; GOKSUGUR, N.; TUZUN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3-13, 2014.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 301-316, 2004.

BEANE, O. S. et al. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. **PloS One**, v. 9, n. 12, p. e115963, 2014.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BUICK, R. N.; MACKILLOP, W. J. Measurement of self-renewal in culture of clonogenic cells from human ovarian carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 44, n. 3, p. 349-355, 1981.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CASTRO, C. C. et al. Avaliação Sobre Resultados Tardios em Ritidoplastia. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 20, n. 2, p. 124-126, 2005.

CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney International Supplements**, v. 1, n. 3, p. 63-67, 2011.

CHEN, Z.; WANG, Y.; SHI, C. Therapeutic implications of newly identified stem cell populations from the skin dermis. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 8, p.1405-1422, 2015.

DANI, C.; BILLON, N. Adipocyte precursors: Developmental origins, self-renewal, and plasticity. **Adipose Tissue Biology**, v. 6, p. 414, 2012.

DA SILVA MEIRELLES L.; CAPLAN A. I.; NARDI N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

DENG, P. et al. Histone methyltransferases and demethylases: regulators in balancing osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **International Journal of Oral Science**, DOI: 10.1038, v. 7, p. 197-204, 2015.

DHAMODARAN, K. et al. Ocular stem cells: a status update! **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 56, p. 1-11, 2014.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOSS, M. X. et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. **Journal of Cellular and Molecular**, v. 8, n. 4, p. 465-473, 2004.

ESPINOZA, N.; PETERSON, M. How to depolarise the ethical debate over human embryonic stem cell research (and other ethical debates too!). **Journal of Medical Ethics**, v. 38, n. 8, p. 496-500, 2012.

FEISST, V. et al. Characterization of mesenchymal progenitor cell populations directly derived from human dermis. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 6, p. 631-642, 2014.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

HASHEMIAN, S. J. et al. Mesenchymal stem cells: rising concerns over their application in treatment of type one diabetes mellitus. **Journal of Diabetes Research**, v. 2015, ID. 675103, p. 19, 2015.

HILL, R. P. et al. Generation and Characterization of Multipotent Stem Cells from Established Dermal Cultures. **PloS One**, v. 7, n. 11, p. e50742, 2012.

HU, C. et al. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. **The Journal of Surgical Research**, v. 183, n. 1, p. 427–34, 2013.

JACKSON, W. M.; NESTI, L. J.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 3, n. 3, p. 20, 2012.

JEREMIAS, T. D. S. 2013. Avaliação do potencial terapêutico das células tronco mesenquimais derivadas da pele no reparo de lesões cutâneas. Tese de doutorado. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p.122.

JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: potential tool for skin regeneration. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e89542, 2014.

JUNQUEIRA; CARNEIRO. **Histologia Básica**. 10ª edição, editora Guanabara Koogan, 2004.

KALUF, R.; AZEVEDO, F. N.; RODRIGUES, L. O. Sistemática Cirúrgica em Pacientes Ex-Obesos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2006.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 6, p. 709-716, 2012.

KRONENBERG, H. Adult mesenchymal stem cells. **StemBook**, p. 1–12, 2009.

LADEIRA, P. R. S. et al. Cultivo de células tronco derivadas de tecido adiposo: uma análise crítica. **Revista de Medicina**, v. 91, n. 4, p. 246-252, 2012.

LANGTON, A. K. et al. Differential expression of elastic fibre components in intrinsically aged skin. **Biogerontology**, v. 13, n. 1, p. 37-48, 2012.

LIN, F. Adipose tissue – derived mesenchymal stem cells: a fat chance of curing kidney disease? **International Society of Nephrology**, v. 82, p. 731-733, 2012.

MENEZES, M. V. A. et al. Avaliação dos resultados do mini-lifting modificado: estudo prospectivo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 2, p. 285-290, 2010.

MIZUKOSHI, K. et al. Changes in dermal papilla structures due to aging in the facial cheek region. **Skin Research Technology**, v. 21, n. 2, p. 224-231, 2015.

NIKITINA, V. A.; CHAUSHEVA, A. I. Risk of genetic transformation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. **Russian Journal of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 91-95, 2014.

NINCHERI, P.; LUCIANI, P.; SQUECCO, R. Sphingosine 1-phosphate induces differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells towards smooth muscle cells. **Cellular Molecular Life Sciences**, v. 66, p. 1741-1754, 2009.

PANEPUCCI, R. A. et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1273-1278, 2004.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células-tronco para a saúde pública. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 3, p. 7-14, 2008.

PITA, P. C. C. et al. Lifting cervical gravitacional. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 2, p. 291-296, 2010.

RABIE, M. et al. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 8, p. 1640-1647, 2007.

RANI, S. et al. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 5, p. 812-23, 2015.

RIEKSTINA, U. et al. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. **Cytotechnology**, v. 58, p. 153-162, 2008.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C.; Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. **Stem Cells**, v. 28, p. 585-596, 2010.

SATIJA, N.K.; GURUDUTTA, G.U.; SHARMA, S. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. **Stem Cells**, v. 16, p. 7–23, 2007.

SBCP - SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA. **Cirurgias e Procedimentos**. Disponível em: <<http://www2.cirurgioplastica.org.br/de-acordo-com-a-isaps-brasil-lidera-ranking-de-cirurgias-plasticas-no-mundo/>>. Acesso em: 10 jun. 2015.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 15, n. 1, p. 13-19, 2005.

SCHIPANI, E.; KRONENBERG, H. M. Adult mesenchymal stem cells. Boston: The Stem Cell Research Community. **Stem Book**, p. 1–12, 2009.

SIDNEY, L. E. et al. Concise Review : Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. **Stem Cells**, v. 32, p. 1380–1389, 2014.

SOUZA, B. R. et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. **Citometry Part A**, v. 85, p. 43-77, 2014.

SOWA, Y. et al. Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. **PloS One**, v. 8, p. e84206, 2013.

TAMAKI, T. et al. Therapeutic isolation and expansion of human skeletal muscle-derived stem cells for the use of muscle-nerve-blood vessel reconstitution. **Frontiers in Physiology**, v. 6, p. 165, 2015.

VISHNUBALAJI, R. et al. Skin-derived multipotent stromal cells-an archrival for mesenchymal stem cells. **Cell and Tissue Research**, v. 350, n. 1, p. 1–12, 2012.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WISLET-GENDEBIEN, S. et al. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. **Stem Cells**, v. 23, n. 3, p. 392-402, 2005.

WONG, V. W. et al. Stem cell niches for skin regeneration. **International Journal of Biomaterials**, v. 2012, p. 926059, 2012.

XIAO, L.; TSUTSUI, T. Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: Stem cells in the core. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, n. 11, p. 2624-2636, 2013.

YANG, Z.; HAO, J.; HU, Z. M. MicroRNA expression profiles in human adipose derived stem cells during chondrogenic differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, p. 579-586, 2015.

ANEXOS

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
DEP. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA – BEG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”.

Pesquisador responsável: Prof. Dra. Andrea Trentin, RG: 45181543.

Pesquisador participante: Helena Debiazi Zomer.

Telefone para contato: (48) 3721-4582.

Prezado Senhor (a),

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), do trabalho de pesquisa “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”, de responsabilidade da pesquisadora Prof. Dra. Andrea Trentin. A seguir lhe serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do

trabalho. Qualquer dúvida o (a) Sr (a) poderá esclarecer entrando em contato com o Laboratório de Células tronco e Regeneração Tecidual, da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo telefone (48) 3721-4582.

Declaramos que as normas da Resolução 466/CONEP e suas complementares serão obedecidas em todas as fases da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Este estudo tem por objetivo realizar a cultura em laboratório de células-tronco derivadas da sua pele e/ou do seu tecido adiposo. Este estudo é necessário porque as mais variadas pesquisas podem ser realizadas *in vitro* com essas células, levando ao esclarecimento de muitas questões científicas e ao desenvolvimento de novas terapias.

Serão utilizados os pedaços de pele e/ou tecido adiposo subcutâneo que sobram das cirurgias plásticas. Isto não traz riscos, pois esses pequenos fragmentos que sobram normalmente são jogados fora (lixo hospitalar). A partir destes fragmentos, realizaremos culturas de células-tronco da pele e tecido adiposo sobre um biomaterial (Integra®), o qual serve de estrutura para o crescimento das células. Este estudo pretende avaliar o potencial de reparo da pele de camundongos tratados com as células-tronco derivadas da pele e do tecido adiposo, associadas ao biomaterial.

Estudos como estes são necessários, pois nos proporcionam conhecimentos que futuramente poderão ser empregados no desenvolvimento de terapias utilizando células-tronco, como por exemplo, na reconstituição de nova pele em casos de queimaduras. Reforçamos que os fragmentos de pele que venham a ser doados serão utilizados somente em procedimentos experimentais em laboratório.

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, permitindo a utilização do fragmento de pele e/ou tecido adiposo retirado durante a cirurgia plástica e que seria descartado, asseguramos o sigilo sobre sua participação, garantindo sua privacidade. Também garantimos que não haverá qualquer custo ou riscos para o (a) Sr (a) por participar desta pesquisa. Caso não queira mais fazer parte da mesma, pode entrar em contato através dos telefones citados acima.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que o (a) Sr (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador:

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____, RG _____,

fui esclarecido (a) sobre a pesquisa “Estudo comparativo do potencial terapêutico de células estromais mesenquimais derivadas da derme e do tecido adiposo humanos e seus meios condicionados associados a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo”.

Assinatura do paciente ou responsável:

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso de células estromais mesenquimais na regeneração da pele.

Pesquisador: Andrea Gonçalves Trentin

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41749315.7.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.076.626

Data da Relatoria: 11/05/2015

Apresentação do Projeto:

A pele consiste na primeira barreira de proteção do organismo e, por estar constantemente exposta ao meio, é altamente susceptível a traumas. A reparação tecidual envolve uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. As células estromais mesenquimais normalmente presentes no tecido participam deste processo por meio de secreção de citocinas e fatores de crescimento e substituição de células mortas. Neste contexto, a utilização terapêutica de células estromais mesenquimais visa a redução no tempo de migração destas até o sítio de injúria e melhora na qualidade do reparo. Mais recentemente, o uso do meio condicionado destas células tem sido utilizado para testar a modulação da resposta inflamatória por meio dos seus fatores secretados. O objetivo deste trabalho é avaliar comparativamente o potencial terapêutico do transplante direto das células estromais mesenquimais provenientes da derme e do tecido adiposo, e dos seus meios condicionados, associados a matriz de regeneração dérmica Integra® no reparo tecidual cutâneo. As células serão obtidas a partir de fragmentos de pele e tecido adiposo provenientes de abdominoplastias e lipoaspirações abdominais realizadas no Hospital Universitário da UFSC. As linhagens serão caracterizadas morfológica e fenotipicamente, e analisadas quanto ao potencial de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Camundongos Balb/c serão divididos em

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.076.626

grupos, anestesiados e submetidos a excisão de espessura total de pele de 8mm² na região dorsal. Os animais receberam as matrizes de regeneração dérmica contendo as células pre-cultivadas, ou embebidas no meio condicionado ou PBS. Os animais serão eutanasiados após 3, 7 e 14 dias após a cirurgia. A região da ferida será fotografada, medida e coletada para análises histológicas, imunohistoquímicas e moleculares. A partir destes estudos, espera-se verificar se a fonte de células estromais mesenquimais (derme ou tecido adiposo) interfere na eficácia terapêutica destas quando associadas a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo em camundongos e se o meio condicionado pode ser utilizado em substituição às células no reparo tecidual.

Hipótese:

I - A fonte de células estromais mesenquimais interfere na eficácia terapêutica destas quando associadas a um substituto dérmico no reparo tecidual cutâneo em camundongos. II - O efeito das células estromais mesenquimais na reparação tecidual cutânea se dá principalmente por citocinas e fatores de crescimento secretados no meio de cultivo. Este meio pode ser concentrado e utilizado em substituição às células estromais mesenquimais no reparo tecidual.

A pesquisa consiste na coleta de pele humana aplicada a camundongos. Em períodos alternados ocorrerá análise para verificar os resultados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar comparativamente o potencial terapêutico do transplante direto das células estromais mesenquimais provenientes da derme (DSC) e do tecido adiposo (ASC), e dos seus meios condicionados, associados a matriz de regeneração dérmica (MRD) Integra® no reparo tecidual cutâneo.

Objetivo Secundário:

Cultivar e avaliar a biocompatibilidade das DSC e ASC em associação a matriz de regeneração dérmica Integra® quanto a sobrevivência, adesão, morfologia e migração celular. Analisar as DSC e ASC em cultivos bidimensionais ou em Integra® em relação à expressão de citocinas e outros fatores envolvidos na regeneração tecidual. Coletar e concentrar o meio de cultivo de DSC e ASC e avaliar seu potencial de induzir a migração celular de queratinócitos e fibroblastos dérmicos *in vitro*. Avaliar o efeito da associação das DSC e ASC e dos respectivos meios condicionados com o Integra® no reparo da lesão tecidual cutânea de espessura total em camundongos, quanto a

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.076.626

integração do substituto dermico e as características macroscópicas da lesão, formação do tecido de granulação e a colonização celular na MRD, infiltração de células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos), neovascularização, depósito de matriz extracelular (fibrose), reepitelização, rastreamento das células transplantadas, e expressão gênica de marcadores relacionados com as diferentes fases do reparo tecidual na lesão cutânea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As amostras serão obtidas a partir de material de descarte de cirurgias plásticas (abdominoplastias e lipoaspirações), de forma que o paciente não será exposto a nenhum risco físico adicional decorrente da participação na pesquisa. Os pacientes doadores assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo informados que as amostras serão utilizadas apenas para fins experimentais e sem a identificação dos pacientes, mantendo o absoluto sigilo da sua identidade. O nome do paciente ou responsável estará apenas disposto nos Termos de Consentimento Livre Esclarecido. As amostras serão identificadas por numerais, de forma a desvincular qualquer forma de identificação dos pacientes as amostras.

Benefícios:

Os resultados deste trabalho vão responder a duas grandes perguntas: Se a fonte de células estromais mesenquimais (derme ou tecido adiposo) pode interferir na sua eficácia terapêutica no reparo de lesões cutâneas e se o seu meio condicionado poderia ser utilizado terapêuticamente em substituição as células no reparo de lesões cutâneas. Com estas respostas, novas terapias poderão ser desenvolvidas para o tratamento de pacientes com grandes lesões de pele, como no caso dos grandes queimados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante na medida que poderá produzir terapias visando proporcionar conforto ou solução para problemas de pele em decorrência de grandes queimaduras, conforme especificado no projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está conforme exigência da Resolução 466/CONEP. Destaque-se a pesquisadora oferecer ao participante, caso mude de ideia, quanto à sua participação ter a possibilidade de telefonar para o laboratório para pedir para retirar seu material da pesquisa. Isso é importante por demonstrar respeito para com a pessoa que atua oferecendo seu material para que a pesquisa possa ser desenvolvida.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.076.626

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pelo fato de receber todas as explicações devidamente fundamentadas, conforme solicitado em exame anterior somos pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 25 de Maio de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

COLORAÇÕES***Alcian blue***

- Alcian blue - 1 g
- Ácido acético glacial - 3 mL
- Água destilada – 100 mL

Alizarin red

- Vermelho de alizarina - 3 g
- Água destilada - 100 mL

Crystal violet

- Cristal violeta – 0,1 g
- Paraformaldeído 4% – 10 mL

Mallory

- Azul de anilina - 0,5 g
- Orange G - 2 g
- Ácido fosfotúngstico - 1 g
- Água destilada - 100 mL

Oil red**Solução-mãe:**

- Vermelho de óleo (*Oil red*) - 3,75 g
- Álcool isopropílico 99° - 100 mL

Solução de uso:

- Solução-mãe de *Oil red* - 3 mL
- Água destilada - 6,67 mL

POSTER APRESENTADO NO IV SIMPÓSIO DE INTEGRAÇÃO DAS PÓS-GRADUAÇÕES DO CCB/UFSC - 2015



Universidade Federal
de Santa Catarina

CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DA DERME ABDOMINAL HUMANA

VARELA, G. K. S¹, ZOMER, H. D¹, BARROS-DELBEN, P¹, SILVA, M. M¹, TRENTIN, A. G¹.

¹Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP 88040970, Florianópolis, SC, Brasil.

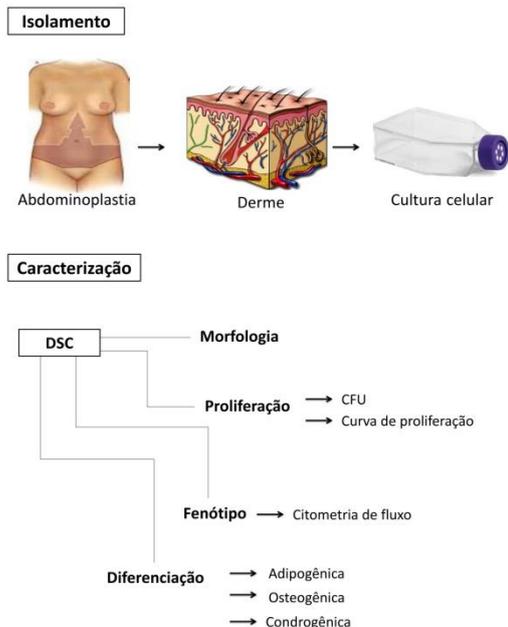
Introdução

As células estromais mesenquimais (MSC) são células-tronco multipotentes encontradas em vários tecidos, desde a fase fetal até a fase adulta. Apresentam muitas vantagens, como: facilidade de obtenção e isolamento, alta capacidade de propagação em cultura e de migrar para locais de lesão, além de serem pouco imunogênicas e não-tumorigênicas, o que facilita a utilização destas células para aplicações terapêuticas. A derme abdominal humana consiste em uma fonte promissora de MSC pois a cirurgia de abdominoplastia é uma das mais frequentes no Brasil e a quantidade de pele descartada é abundante.

Objetivos

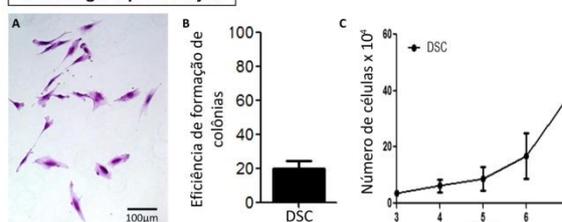
Caracterizar as células estromais mesenquimais derivadas da derme abdominal humana (DSC), com o intuito de disponibilizar uma nova linhagem de MSC para o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) e dessa forma dar continuidade a pesquisas envolvendo o reparo de lesões cutâneas.

Metodologia

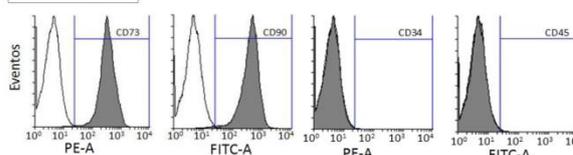


Resultados e Discussão

Morfologia e proliferação



Fenotipagem



Plasticidade

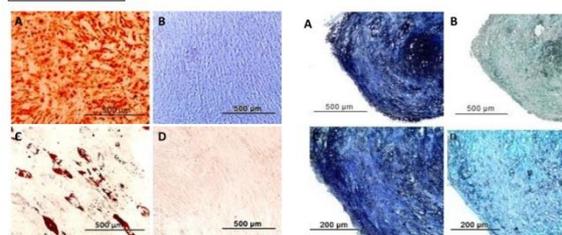


Figura 3: A) Matriz osteogênica corada com Alizarin Red; B) Controle osteogênico; C) Gotículas de gordura coradas com Oil Red; D) Controle adipogênico.

Figura 4: A e C) Pellet condrogênico corado com Mallory; B e D) Pellet condrogênico corado com Alcian Blue.

Conclusão

Os resultados estão de acordo com os critérios propostos pela Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (DOMINICI et al., 2006). As DSC possuem características semelhantes a outras MSC, consistindo em uma linhagem de células alternativa, agora disponível para novas pesquisas do LACERT.

Agradecimentos

