



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO MIRANDA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE *Chlorocebus aethiops***

**Belém
2013**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA**

CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO MIRANDA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE *Chlorocebus aethiops***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente na Amazônia, para obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Saúde e Meio Ambiente
Orientador (a): Prof^ª. Dra. Érika Renata Branco

**Belém
2013**

Miranda, Carla Maria Figueiredo de Carvalho

Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Chlorocebus aethiops*./ Carla Maria Figueiredo de Carvalho Miranda. - Belém, 2013.

74 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia - PPGSPA) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. *Chlorocebus aethiops*. 3. Tecido adiposo. 4. Multipotência. 5. Senescência celular. I. Título.

CDD – 571.1

CARLA MARIA FIGUEIREDO DE CARVALHO MIRANDA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE *Chlorocebus aethiops***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia da Universidade Federal Rural da Amazônia como requisito para obtenção do grau de mestre. Área de concentração: Saúde e Meio Ambiente na Amazônia.

Data da aprovação: 31/07/13

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Érika Renata Branco- Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^ª. Dra Maria Angélica Miglino– 1^a Examinador
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi – 2^a Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof^ª. Dra Ana Rita Lima– 3^a Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

DEDICATÓRIA

À minha família, sempre!! Pelo cuidado e pela incondicional dedicação, amor e esforço que fizeram para que eu recebesse uma educação digna. Vocês são o meu verdadeiro porto seguro. Amo todos vocês, de coração!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus Pai Todo-poderoso por sempre ter estado ao meu lado e pela oportunidade que Ele nos dá, todos os dias, para aprender a amar, a perdoar e a ajudar ao próximo, às vezes sem que percebamos. Agradeço eternamente a **Virgem Maria** pela Sua proteção e intercessão perante a Deus. “Eu sei que é difícil esperar, mas Deus tem um tempo para agir e para curar. Só é preciso confiar!!”.

Aos meus maravilhosos tios-pais Marta, Teca, Marcelina, Mônica, Cristina, Nonato, Pedrinho, Ismael, Manoel e Zeca. **Aos meus primos**, David, Denzel, Mateus, Isabelle e Anderson. **Aos meus queridos avós** Maria Leontina, Erothildes (in memoriam) e Raimundo Pedro (in memoriam). Agradeço imensamente a família FIGUEIREDO pelo apoio, confiança e esperança no meu sucesso profissional. Essa caminhada não teria sido possível sem vocês, pois vocês são o meu alicerce!

À minha mãe, Joana D’arc, à minha irmã, Socorro, e ao meu pai, Luis Carlos, pelo apoio, amor, carinho e dedicação durante toda a minha trajetória na universidade, acompanhando-me em todas as etapas e compreendendo-me nos momentos em que estive ausente em favor da minha profissão. Agora sabemos que todo o esforço valeu, e sempre, valerá à pena!

Ao Moysés Miranda, não poderia deixar de agradecer pela co-orientação durante a execução deste projeto. Agradeço pela disponibilidade em repassar o conhecimento, sempre tentando manter a paciência! Obrigada pelos conselhos, pelas críticas, pelos quase 10 anos de convivência e, principalmente, por acreditar no meu potencial! Agradeço à sua maravilhosa família, que sempre estará guardada no meu coração, Dona Zuíla, Seu Brás, Rosa e, agora mais recentemente, Pedro César, por sempre me tratarem com muito carinho e terem estendido a mão quando precisei.

Aos meus queridos animais de estimação, Flor, Zulu (in memoriam) e Lulu, pelo companheirismo, carinho e amor que sentem por mim e demonstravam todos os dias! Apesar das circunstâncias ter nos afastado, nunca esquecerei vocês!!

A professora Érika, pela sua dedicação como professora e por acreditar e confiar no meu trabalho. Agradeço pela oportunidade de ter feito parte de sua equipe e pelo consequente conhecimento adquirido nesta importante etapa da minha carreira profissional.

Ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética–SAMAM/ Instituto Evandro Chagas, especialmente à professora Maria de Fátima e Klena Sarges, e a todos da equipe que participaram da coleta e processamento da biópsia.

Ao Laboratório de Citogenética da UFPA, especialmente à professora Susana Milhomem, que abriu as portas para mim do laboratório; ao Jorge, pela solicitude e pelos conhecimentos repassados e à Jaqueline, sempre disposta a me ajudar. Muito obrigada por tudo!

Ao professor Ohashi, por ter me recebido novamente no laboratório e, principalmente, pela confiança em meu trabalho. Obrigada, mais uma vez, pela oportunidade!

A toda equipe do Laboratório de Fecundação In Vitro, André, Hamilton, Paulo, Bruno, Felipe, Karynne, Miyuka, Priscilona, Alessandra, e, especialmente, ao Thiago, Nathália, Priscilinha, Mayra e Cíntia por toda a ajuda e espontaneidade em ajudar quando eu precisava, seja qual fosse a hora do dia (ou da noite). Agradeço muito a vocês pela colaboração e amizade!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao projeto.

**“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando
A certeza de que precisamos continuar
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar**

**Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro”**

Fernando Sabino

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células raras, indiferenciadas, possuindo alto potencial de auto-renovação, proliferação e diferenciação. Tal plasticidade poderia possibilitar a utilização destas células na medicina regenerativa. Assim, objetivou-se isolar, caracterizar e diferenciar CTM derivadas do tecido adiposo subcutâneo de *Chlorocebus aethiops*. As CTM foram isoladas por digestão enzimática com colagenase tipo I e cultivadas *in vitro* até a passagem 4 em Dulbecco's Modified Eagle's Medium, suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi realizada curva de crescimento celular e, posteriormente, avaliação quanto à presença de senescência, por meio da atividade da enzima β -galactosidase, e integridade cromossômica. As células foram caracterizadas mediante a marcação de receptores de superfície específicos para CTM e também para a ausência de marcadores exclusivos de células hematopoiéticas. A diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos foi induzida *in vitro*, sendo avaliada após coloração específica. Os resultados mostraram que CTM de tecido adiposo de *C. aethiops* têm a capacidade de expandir em cultura, proliferando-se em formato fibroblastóide ao longo das passagens. Foi observado percentual de células senescentes (12,5%), porém sem alteração cromossômica. As células apresentaram positividade para marcadores específicos de CTM e potencial de diferenciação em linhagens mesodérmicas, comprovando a multipotência de CTM derivados do tecido adiposo de *C. aethiops*.

PALAVRAS-CHAVE: células-tronco mesenquimais, *Chlorocebus aethiops*, tecido adiposo, multipotência, senescência celular.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSCs) are rare and undifferentiated cells, possess high potential for self-renewal, proliferation and differentiation. This plasticity could allow the use of such cells in regenerative medicine. The objective was to isolate, characterize and differentiate *Chlorocebus aethiops* adipose tissue-derived MSCs. MSCs were isolated by enzymatic digestion using type I collagenase and in vitro cultured until passage 4 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. It was performed cell growth curve and, subsequently evaluation for senescence, through the activity of the enzyme β -galactosidase, and chromosomal integrity. Cells were characterized by presence of surface receptors for MSCs and also to the absence of specific markers of hematopoietic cells. The differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes was induced in vitro and was assessed by specific staining. The results demonstrated that *C. aethiops* adipose-derived MSCs have the ability to expand in culture, proliferating fibroblastoid-shaped along the passages. It was observed percentage of senescent cells (12.5%), but without chromosomal alteration. The cells were positive for specific markers of MSCs and demonstrated mesodermal lineages differentiation potential, proving the multipotency of *C. aethiops* adipose tissue- derived MSCs.

KEY WORDS: mesenchymal stem cells, *Chlorocebus aethiops*, adipose tissue, multipotency, cellular senescence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Indivíduos da espécie de primatas não-humanos, *Chlorocebus aethiops*,..... **21**
- Figura 2:** Fotomicrografia de colônias indiferenciadas de células-tronco embrionárias (CTE) de camundongo (seta verde) cultivadas sobre monocamada de fibroblastos (seta vermelha) (NITTA et al., 2013)..... **25**
- Figura 3:** Representação esquemática da técnica original usada para gerar células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). As células da pele diferenciadas são isoladas e cultivadas. Posteriormente, 4 genes (Oct 4, Sox 2, Klf 4 e c-Myc), que codificam proteínas requeridas para a reprogramação celular até um estágio embrionário, são introduzidos para as células da pele por meio de um vírus contendo estes genes. Após algumas semanas de cultivo, uma fração das células transfectadas formam colônias, assemelhando-se morfológicamente às células-tronco embrionárias, com potencial de diferenciação nas três linhagens germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma... **26**
- Figura 4:** Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongo isoladas e cultivadas por Friedenstein et al (1974).. **30**
- Figura 5:** Procedimento de coleta de medula óssea utilizando agulha e seringa previamente heparinizada A) Punção do tubérculo umeral de coelho (OLIVEIRA et al., 2006); B) Punção da crista ilíaca de primata não- humano, *Chlorocebus aethiops*. **35**

LISTA DE FIGURAS (ARTIGO)

FIG. 1. Chlorocebus aethiops adipose-derived mesenchymal stem cells at different time and passages. (A) After thawing- passage 1 (P1). (B) Adherent cells in initial culture- day 4 (P1). (C) MSCs in 90% confluence (P2). (D) MSCs in P3. (Original magnification 100 x)..... **60**

FIG. 2. Chlorocebus aethiops ASCs growth curve (cell number vs number of days). Cells were counted every 48 hours for 12 days. Phases of the curve: lag phase (12-24h), log phase (6 days), plateau phase (8-10 days), the decline in the rate of cell growth (10-12 days)..... **61**

FIG. 3. Senescence in Chlorocebus aethiops ASCs detected by β -Gal staining at pH 6.0. (A) Cells with activity of the enzyme β -galactosidase (yellow arrow) at passage 4. (B) MSCs nucleus stained with 10 μ g/mL Hoechst 33342. (C) Overlap of the images A and B. (Original magnification 100 x)..... **62**

FIG. 4. Normal chromosomal of Chlorocebus aethiops ASCs. Metaphase spreads of passage 4 showing diploid number of chromosomes (original magnification 1000x)... **63**

FIG. 5. Immunophenotypic characterization of Chlorocebus aethiops ASCs at passage 4. Cell nucleus was stained with 10 μ g/mL Hoechst 33342. (A, B, C) Immunofluorescent staining of MSCs with CD73, CD105 and CD90, respectively (yellow arrow). (D, G) CD73 negative control group. (E, H) CD105 negative control group. (F, I) CD90 negative control group. Scale bar: in (A-C, E, F) 50 μ m for (A-C, E, F, H, I); in (D) 100 μ m for (D, G)..... **64**

FIG. 6. Immunophenotypic characterization of Chlorocebus aethiops ASCs at passage 4. Cell nucleus was stained with 10 μ g/mL Hoechst 33342. (A, B, C) Immunofluorescent staining of MSCs with CD34, CD45 and CD79, hematopoietic cell markers. (D-F) Negative control group of CD34, CD45 and CD79, respectively. Scale bar: in (A, B) 50 μ m for (A, B, D, E); in (C) 100 μ m for (C, F)..... **65**

FIG. 7. Cell differentiation of Chlorocebus aethiops MSCs after 21 days of induction. (A) Adipogenic differentiation demonstrating red-coloured lipid droplets by Oil Red O staining. (A') Adipogenic cells control group. (B) Chondrogenic differentiation

demonstrating blue-coloured extracellular matrix stained by Alcian Blue (yellow arrow). (B') Cells in micromass (blue arrow)- chondrogenic cells-control group. (C) Osteogenic differentiation demonstrating calcium-rich deposits stained by Alizarin Red S. (C') Osteogenic cells control group. (Original magnification 100x). **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC: células dendríticas apresentadoras de antígenos

ASCs: células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

bFGF: fator de crescimento do fibroblasto

β -Gal: β -Galactosidase

BM-MSCs: bone marrow-derived mesenchymal stem cells

CENP: Centro Nacional de Primatas

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CFU-Fs: unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos

CTA: CTs de origem adulta

CTDTA: células-tronco derivadas do tecido adiposo

CTE: células-tronco de origem embrionária

CTF: células-tronco de origem fetal

CTH: células-tronco hematopoiéticas

CTM: células-tronco mesenquimais

CTMO: células-tronco derivadas da medula óssea

CTs: células-tronco

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: dimethylsulfoxide

EGF: fator de crescimento epidermal

FBS: fetal bovine serum

HGF: fator de crescimento do hepatócito

IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase

IEC: Instituto Evandro Chagas

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina- 1

IL: interleucina

IM: intramuscular

iPS: induced pluripotent stem cells

ISCT: Sociedade Internacional de Terapia Celular

LIF: fator inibidor da leucemia

M-CSF: fator de crescimento estimulador de macrófago

MHC: complexo de histocompatibilidade maior

MO: medula óssea

NK: natural killer

PGE₂: prostaglandinas

PBS: Phosphate Buffered Saline

SCU: sangue do cordão umbilical

SSEA: stage specific embryonic antigens

SVF: fração vascular estromal

TGF- β 1: fator de crescimento transformador β -1

TNF- α : fator de necrose tumoral- α

UFPA: Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CHLOROCEBUS AETHIOPS.....	21
2.2	CÉLULAS- TRONCO (CTs).....	23
2.2.1	Células-Tronco Embrionárias (CTE).....	23
2.2.2	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (Induced Pluripotent Stem Cells- iPS).....	26
2.2.3	Células-tronco do Sangue do Cordão Umbilical.....	28
2.2.4	Células-tronco de Origem Fetal (CTF).....	28
2.2.5	Células-tronco de Origem Adulta (CTA).....	29
2.2.5.1	Células-Tronco Mesenquimais (CTM).....	29
2.2.5.1.1	Células-Tronco Derivadas da Medula Óssea (CTMO).....	34
2.2.5.1.2	Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo (CTDTA).....	35
3	HIPÓTESE	39
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
	REFERÊNCIAS	41
	Isolation and Characterization of Chlorocebus aethiops Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells	53
	Introduction	54
	Materials and Methods	56
	Results	60
	Discussion	67
	References	70
	ANEXOS	73

Introdução

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco (CTs) são populações celulares com capacidade de auto-renovação, alto potencial de proliferação e diferenciação em vários tecidos, tais características têm possibilitado cada vez mais o estudo destas células na terapia regenerativa. Podem ser classificadas, de acordo com a origem, em células-tronco embrionárias (CTE), derivadas da massa celular interna dos blastocistos, sendo caracterizadas pela pluripotência, porém muitos questionamentos políticos, éticos e religiosos ainda limitam o uso terapêutico destas células, tornando as células-tronco adultas (CTA), consideradas multipotentes, uma fonte alternativa para a terapia celular (ZUK et al., 2002).

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células somáticas, adultas, indiferenciadas, encontradas em vários tecidos, sendo responsáveis pela regeneração tecidual durante alguma injúria ou renovação celular. Podem ser encontradas na pele, cordão umbilical, tecido adiposo, medula óssea e polpa dentária (GOMES; GRINFELD, 2008). Também possuem habilidade de auto-renovação, potencial proliferativo e de diferenciação em diversas linhagens celulares, como adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos in vivo e in vitro, sendo classificadas, portanto, como multipotentes (ZUK et al., 2002).

Recentemente, pesquisadores também têm demonstrado a possibilidade de diferenciação das CTM em outros tipos celulares não mesodérmicos, como hepatócitos e neurônios (BYDLOWSKI et al., 2009). Devido a esta plasticidade, as CTM têm despertado o interesse da comunidade científica em desenvolver estudos pré-clínicos e clínicos visando à terapia celular e regeneração tecidual, considerando-se a alta capacidade proliferativa; potencial de diferenciação; secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (ZHANG et al., 2009); modulação do ambiente para a hematopoiese; modulação da resposta inflamatória; angiogênese e baixa imunogenicidade, o que permitiria o transplante alogênico (CAPLAN, 2009).

O avanço da medicina regenerativa requer a realização de experimentos clínicos em modelos animais visando ao melhor entendimento dos efeitos biológicos e terapêuticos das CTM. Neste intuito, alguns resultados satisfatórios já foram obtidos no tratamento experimental de determinadas enfermidades estudadas nas seguintes espécies: em ratos, submetidos à diabetes mellitus (ZHANG, et al., 2009); em equinos, submetidos à tendinite (CROVACE et al., 2010); em ovinos, submetidos à injúria na placa de crescimento da cartilagem (MCCARTY et al., 2010); em cães, submetidos à doença de Chagas (SOUSA et

al., 2011); em primatas não humanos, submetidos à isquemia cerebral (oclusão da artéria cerebral média) (SASAKI et al., 2011); em humanos, em casos de injúrias da medula espinhal (WRIGHT et al., 2011); em suínos, submetidos à injúria renal (ZHU et al., 2012).

Dentre os modelos animais mais adequados em testes clínicos de CTs estão os primatas, devido às similaridades filogenéticas destes com a espécie humana (WOLF et al., 2004a; WOLF et al., 2004b), tornando-os principais modelos experimentais em pesquisas biomédicas relacionadas às doenças comuns em humanos e à respectiva terapia (SASAKI et al., 2011). Todavia, ainda há poucos estudos na literatura em relação ao isolamento, cultivo e aplicação na medicina regenerativa de CTM em primatas não humanos, em função do difícil manejo e disponibilidade destes animais para estudos científicos (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).

Sendo assim, dada a importância da utilização de primatas como modelo animal para o desenvolvimento de pesquisas com CTs, torna-se imprescindível o estudo fundamental do isolamento, expansão, auto-renovação e diferenciação *in vitro* das CTs destes animais (WOLF et al., 2004a), principalmente em espécies ainda pouco estudadas e eficientes como modelos experimentais de doenças humanas, como por exemplo do *Chlorocebus aethiops* (JASINSKA et al., 2007).

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CHLOROCEBUS AETHIOPS

O gênero *Chlorocebus* abrange primatas do velho mundo, sendo também conhecidos como macaco-verde-africano. Estão divididos em quatro espécies, denominadas vervet (*Chlorocebus pygerythrus*), grivet (*Chlorocebus aethiops*), sabaeus (*Chlorocebu sabaeus*) e tantalus (*Chlorocebus tantalus*) (TCHITCHEK et al., 2012). Estão inseridos como um membro da família Cercopithecidae e subfamília Cercopithecinae. Atualmente, as espécies que formam o gênero *Chlorocebus* são classificadas formalmente como uma única espécie *Cercopithecus aethiops* (GROVES et al., 2005).

O *C. aethiops* é encontrado originalmente no nordeste da África, restrito às regiões da Etiópia, Sudão, Djibouti e Eritreia. Alimentam-se de flores, frutos, insetos e alguns pequenos vertebrados, sendo, portanto, classificados como animais onívoros. A maturidade sexual masculina é atingida em torno de 5 a 6 anos de idade, enquanto que a feminina, em aproximadamente 3 anos, sendo o período de gestação de 6 meses e o pico de nascimentos ocorrendo no verão. O comprimento dos machos é em torno de 49 cm e, fêmeas, 42,6 cm. O peso corporal destes animais varia de 3,4 a 8,0 kg (PAULMOR et al., 1997) (Figura 1).



Figura 1: Indivíduos da espécie de primatas não-humanos, *Chlorocebus aethiops*.
Fonte: Arkive, 2013.

O macaco-verde-africano tem sido amplamente utilizado em estudos neuroanatômicos e inúmeras pesquisas biomédicas, as quais incluem doença cardiovascular (COOK et al., 1995); oftalmologia (SATO et al., 2005); farmacologia (WARD et al., 2008); neurociências, como a doença de Alzheimer (FAINMAN et al., 2007), doença de Parkinson (CAMPOS- ROMO et al., 2009), comportamento e psicopatologia (BAILEY et al., 2007); injúria cerebral precoce (BURKE et al., 2010); biologia celular (ALMEIDA et al., 2011); doenças infecciosas (BOSSART et al., 2011); imunologia (TCHITCHEK et al., 2012) e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HAUS et al., 2013), dentre outras.

Os primatas são os modelos animais mais interessantes para serem utilizados em pesquisas biomédicas em comparação com outras espécies animais, devido à proximidade biológica com os humanos. Dentre os primatas, o *Chlorocebus aethiops* representa a espécie mais adequada, por apresentar maior similaridade filogenética com a espécie humana (WOLF et al., 2004a; WOLF et al., 2004b). Alguns estudos relacionados às características biológicas, potencial de proliferação, diferenciação e efeitos terapêuticos das CTM derivadas do tecido adiposo já vêm sendo realizados em espécies como macaco Rhesus, porém ainda precisa ser elucidado em *C. aethiops* (HAUS et al., 2013).

2.2 CÉLULAS-TRONCO (CTs)

As CTs são células indiferenciadas presentes em todos os organismos. As principais características são: capacidade de auto-renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, dando origem a novas CTs e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, como células do cérebro, coração, músculo e rim (LEMISCHKA, 2005). Desta forma, acredita-se que estas células, presentes nos diferentes tecidos, tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (BYDLOWSKI et al., 2009).

Em relação ao potencial de diferenciação, as CTs são classificadas em: a) Totipotentes: todas as células que contribuem para a formação do organismo e dos anexos embrionários; b) Pluripotentes: células que originam tecidos das três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), com exceção da placenta e dos anexos embrionários; c) Multipotentes: células encontradas em tecidos adultos que se diferenciam em diversas linhagens celulares, restritas de determinado órgão; d) Oligopotentes: células progenitoras de apenas um tipo celular (ZHANG et al., 2006). Quanto à origem, as CTs também podem ser classificadas em CTs de origem embrionária (CTE), CTs do sangue do cordão umbilical, CTs de origem fetal (CTF), CTs de origem adulta (CTA) (ANDERSON et al., 2001) e, mais recentemente, uma nova categoria de CTs: as células-tronco pluripotentes induzidas, conhecidas como iPS-Induced Pluripotent Stem Cells (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

2.2.1 Células-Tronco Embrionárias (CTE)

As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento embrionário datam já do final do século XIX, com as primeiras tentativas de cultivo in vitro de embriões de coelho. Porém, foi na década de 1960 que Robert Edwards descobriu que cada blastômero formado após as primeiras divisões mitóticas do embrião era capaz de se dividir, por tempo limitado, em uma placa de Petri, onde, aproximadamente 5 a 7 dias após a fecundação, as células mais internas do embrião tornaram-se firmemente compactas, formando estruturas denominadas de corpos embrióides, possuindo a capacidade de desenvolver todos os tipos diferentes de tecidos, a partir das três camadas germinativas primordiais: o ectoderma, mesoderma e endoderma, sugerindo, assim, a pluripotencialidade destas células (MUMMERY et al., 2011). Posteriormente, a massa celular interna foi considerada como o nicho das CTE, sendo

isoladas pela primeira vez em 1981 a partir de embriões de camundongos (EVANS; KAUFMAN, 1981). Em 1995, registrou-se o isolamento e cultivo de CTE de macaco Rhesus (THOMSON et al., 1995), sendo que em humanos a primeira linhagem de CTE só foi desenvolvida em 1998 (THOMSON et al., 1998).

Linhagens de CTE podem ser obtidas de embriões a partir de duas técnicas: por meio mecânico ou imunocirurgia, que consiste na combinação de anticorpos que reconhecem as células e fatores complemento, atuando conjuntamente na destruição das células do trofoblasto (MUMMERY et al., 2011). Em condições favoráveis *in vitro*, as CTE apresentam algumas características semelhantes às células presentes no embrião, incluindo a expressão de marcadores de superfície, como o SSEA (stage specific embryonic antigens), CD9, Thy1 e HLA1. Também é possível detectar a expressão de alguns genes relacionados ao desenvolvimento e à manutenção do estado indiferenciado de CTs, tais como Oct4, Sox2, Nanog, os quais regulam a expressão de muitos outros genes também envolvidos no desenvolvimento. A atividade de algumas enzimas também pode ser semelhantemente observada, como por exemplo a telomerase, enzima essencial à continuidade da auto-renovação celular (MIGUEL et al., 2010).

Durante o cultivo *in vitro*, as CTE crescem em forma de colônias, mantendo-se viáveis por um período ilimitado, em contraste ao curto período no qual permanecem indiferenciadas durante o desenvolvimento embrionário, sendo co-cultivadas sobre uma monocamada de fibroblastos, os quais secretam fatores essenciais ao crescimento e à manutenção do estado indiferenciado das células, este fator foi identificado como fator inibidor da leucemia (LIF) (Figura 2). A preservação da pluripotencialidade também pode ser comprovada em CTE cultivadas *in vitro*, a partir da geração de quimeras após inserção das células em blastocistos, confirmando a capacidade de contribuir para a formação de todos os tecidos do organismo, exceto os tecidos extra-embrionários, e, principalmente, para a transmissão da informação genética às gerações subsequentes (MUMMERY et al., 2011).

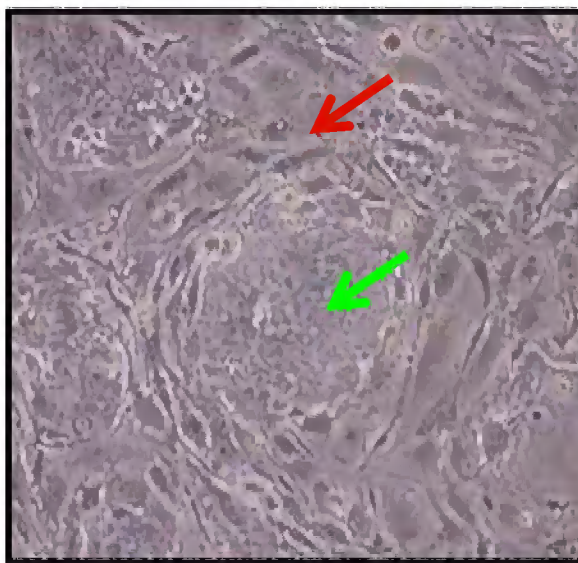


Figura 2: Fotomicrografia de colônias indiferenciadas de células-tronco embrionárias (CTE) de camundongo (seta verde) cultivadas sobre monocamada de fibroblastos (seta vermelha). Fonte: NITTA et al., 2013.

As CTE tem despertado grande interesse científico pelo grande potencial para uso como alternativa terapêutica em diversas doenças crônicas, como doença de Alzheimer e Parkinson, injúria da medula espinhal, cardiomiopatias e diabetes, devido apresentarem algumas vantagens em comparação às células-tronco de origem adulta (CTA), como a facilidade de isolamento, capacidade de diferenciação pluripotente e o crescimento ilimitado in vitro. No entanto, existem algumas desvantagens que ainda limitam o uso terapêutico destas células, como: a dificuldade de estabelecer o controle do desenvolvimento, devido à tendência em se diferenciarem espontaneamente em cultura; formação de teratomas quando injetadas em animais imunodeficientes, em resposta a diferentes estímulos in vivo; rejeição imune e conflitos éticos, devido à destruição do embrião (PEREIRA, 2008).

2.2.2 Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (Induced Pluripotent Stem Cells - iPS)

Apesar da pluripotencialidade das CTE, o que poderia ser uma alternativa terapêutica para diversas doenças, as limitações éticas quanto ao uso de embriões têm incitado a busca de fontes alternativas de células pluripotentes, com a habilidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares. A partir dos trabalhos anteriores sobre reprogramação celular utilizando a transferência nuclear de células somáticas para oócitos (GURDON, 1962), Takahashi e Shinya Yamanaka (2006) demonstraram que células diferenciadas podem ser revertidas para um estado de pluripotência em resposta a um estímulo externo. Assim, após a introdução de 24 fatores de transcrição em fibroblastos da pele de camundongo por meio de vetores retrovirais, identificaram que quatro destes genes (Oct4, Klf4, Sox2 e cMyc), normalmente expressos em CTE, reprogramaram os fibroblastos para células-tronco pluripotentes induzidas, as quais assemelham-se às CTE (Figura 3).

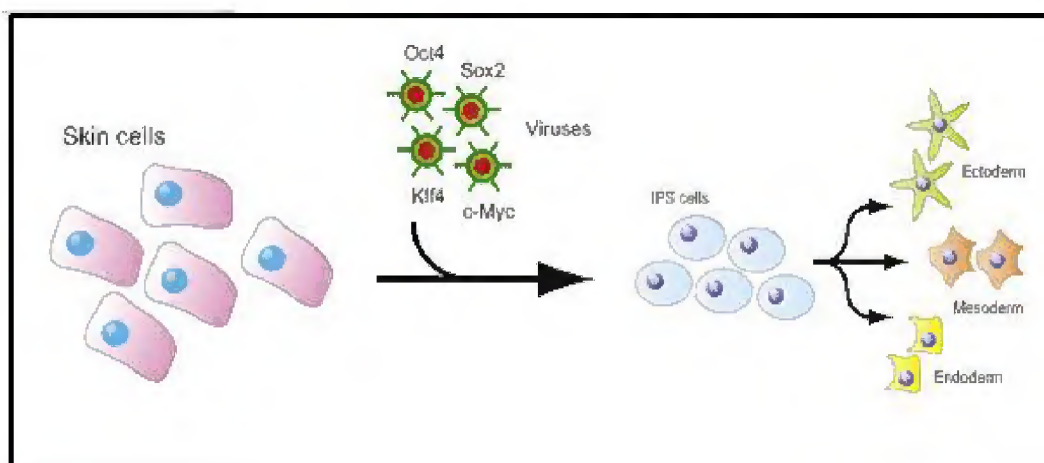


Figura 3: Representação esquemática da técnica original usada para gerar células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). As células da pele diferenciadas são isoladas e cultivadas. Posteriormente, 4 genes (Oct 4, Sox 2, Klf 4 e c-Myc), que codificam proteínas requeridas para a reprogramação celular até um estágio embrionário, são introduzidos para as células da pele por meio de um vírus contendo estes genes. Após algumas semanas de cultivo, uma fração das células transfectadas formam colônias, assemelhando-se morfologicamente às células-tronco embrionárias, com potencial de diferenciação nas três linhagens germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma. Fonte: (MUMMERY et al., 2011).

A técnica de geração de células iPS tem permitido aos pesquisadores elucidar os mecanismos de diferenciação destas células em diversas linhagens celulares, aplicação como modelos de doenças e de drogas, além de prover uma fonte autóloga alternativa para a terapia celular (SAPORTA et al., 2011). Assim, as células iPS têm sido muito utilizadas

como modelo para o estudo de diversas doenças, principalmente, nas desordens neurológicas, tais como: esclerose lateral amiotrófica (DIMOS et al., 2008), atrofia muscular espinhal (EBERT et al., 2009), doença de Parkinson (SOLDNER et al., 2009) e esquizofrenia (BRENNAND et al., 2011).

Okamoto e Takahashi em 2011 induziram a formação de células do epitélio pigmentar da retina (EPR) a partir de células iPS de primatas não-humanos (macacos *Cynomolgus*) geradas por meio de fibroblastos da pele. As células diferenciadas do EPR apresentaram a expressão de marcadores tecido-específicos e, também, algumas funções atribuídas às células *in vivo* para a homeostase dos fotorreceptores, possibilitando a pesquisa dos efeitos destas células após o transplante.

Recentemente, com o progresso na reprogramação celular, outras fontes de tecidos têm sido utilizadas para produção de células pluripotentes a partir da inserção dos fatores de transcrição propostos por Takahashi e Yamanaka (2006), como o sangue do cordão umbilical, devido à disponibilidade e por apresentarem menos alterações genéticas em relação às células adultas (TAKENAKA et al., 2009), o sangue periférico (OKITA et al., 2013) e os queratinócitos (WICHTERLE; PRZEDBORSKI, 2010).

Assim, a reprogramação genética de células diferenciadas até o estágio de pluripotência possibilita elucidar os mecanismos de desenvolvimento celular e apresenta a mesma expectativa das CTE quanto ao potencial terapêutico, devido às diversas semelhanças como morfologia, pluripotência, formação de quimeras, capacidade de auto-renovação e padrões de expressão gênica semelhantes, sem a necessidade do uso de embriões (PURI; NAGY, 2012).

No entanto, o processo para geração das células iPS ainda apresenta baixa eficiência, detecção de anormalidades cromossômicas durante a expansão e passagens prolongadas e formação de teratomas em animais imunossuprimidos de forma mais agressiva do que os formados pelas CTE. Este fenômeno associado às iPS, deve-se possivelmente à integração de vetores retrovirais e à presença do fator c-Myc, que aumentam o risco de tumorigenicidade. Assim, avanços tecnológicos já foram obtidos quanto à produção destas células, como o uso de plasmídeos episomais, os quais não integram no genoma (OKITA et al., 2013), e utilização de outros fatores de transcrição definidos, Oct4, Sox2, Nanog e Lin28 (YU et al., 2007). Porém, o uso destas células ainda é inviável para terapia celular imediata (YULIN et al., 2012).

2.2.3 Células-Tronco do Sangue do Cordão Umbilical

As CTs do sangue do cordão umbilical (SCU) são uma importante fonte de CTs, obtidas logo após o nascimento do indivíduo a partir de métodos não invasivos, ocupando um estágio intermediário entre as CTE e as CTA, podendo ser utilizadas em transplantes, uma vez que as células presentes na fração mononuclear, dentre elas as células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais, possuem maior potencial de proliferação, maiores telômeros e são menos propensas a causar reações imunológicas em comparação com as outras fontes de CTs citadas (ALI; BAHBAHANI, 2010). Além disso, as CTs do sangue do cordão umbilical possuem a capacidade de se transformar em células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) após transfecção dos genes necessários à reprogramação celular (Oct-4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) (TAKENAKA et al., 2010).

A fração mononuclear do SCU contém populações de CTs e progenitores celulares heterogêneos, incluindo as CTM, as quais apresentam características e morfologia semelhantes às CTM da medula óssea, porém possuem mais vantagens, como: maior abundância de células, acessibilidade e maior potencial de diferenciação em células neurais, hepatócitos, osteoblastos, adipócitos e condrócitos (BHANDARI et al. 2010). Entretanto, as CTM derivadas do SCU são raras, aproximadamente 4 dentre 10^9 células nucleadas, e a taxa de isolamento in vitro é baixa, em torno de 30%, principalmente de SCU de neonatos nascidos a termo (SI et al., 2011).

2.2.4 Células-Tronco de Origem Fetal (CTF)

As CTF são tipos celulares primitivos, podendo ser isoladas do sangue ou medula óssea fetais, tão bem quanto, de outros tecidos, incluindo o fígado e o rim, ou mesmo, tecidos extra-embriônicos, como o âmnion (URANIO et al., 2011) e córion (FUKUCHI et al., 2004). O sangue fetal é uma fonte rica de células tronco hematopoiéticas (CTH), as quais proliferam mais rapidamente do que as CTs derivadas da medula óssea adulta. No primeiro trimestre, o sangue fetal também contém uma população de CTM, as quais auxiliam a hematopoiese e diferenciam-se em múltiplas linhagens celulares (KEELIN; NICHOLAS, 2004).

As vantagens das CTF, em comparação às células embrionárias ou adultas, são respectivamente: menor questionamento ético, baixa imunogenicidade (MIHU et al., 2009) e maior potencial de crescimento, plasticidade e multipotencialidade (MIKI et al., 2005).

2.2.5 Células-Tronco de Origem Adulta (CTA)

As CTA incluem as CTs hematopoiéticas (CTH), CTs mesenquimais (CTM), CTs neurais, CTs da pele e inúmeras outras. As CTA mais conhecidas são as presentes na medula óssea (MO), que desde a década de 50 são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético: as CTH, que estão em íntimo contato com o estroma (SIMINIAK; KURPISZ, 2003); e as CTM, que dão origem a vários tecidos conectivos (BYDLOWSKI et al., 2009).

Durante muitos anos, as CTs derivadas da MO foram as primeiras fontes de CTs para aplicações terapêuticas. Entretanto, pesquisas recentes têm mostrado que o tecido adiposo subcutâneo representa uma fonte alternativa de CTM com a vantagem de apresentar maior facilidade de abordagem e de isolamento das CTs do tecido adiposo coletado (TOBITA et al., 2011).

2.2.5.1 Células-Tronco Mesenquimais (CTM)

As CTM presentes na MO foram descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores (1974), que utilizaram células mononucleares da MO de camundongo. Estas células foram distinguidas da maioria das células hematopoiéticas devido à rápida aderência nas placas de cultivo, nas quais uma rara população se desenvolveu em unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos (CFU-Fs). As células aderentes eram heterogêneas, apresentando alta proliferação após alguns dias de cultivo, tornando-se mais homogeneamente fibroblastóides ao decorrer das passagens. Subsequentemente, estes pesquisadores demonstraram a capacidade de diferenciação desta subpopulação de células em outra linhagem celular, a osteogênica (Figura 4).

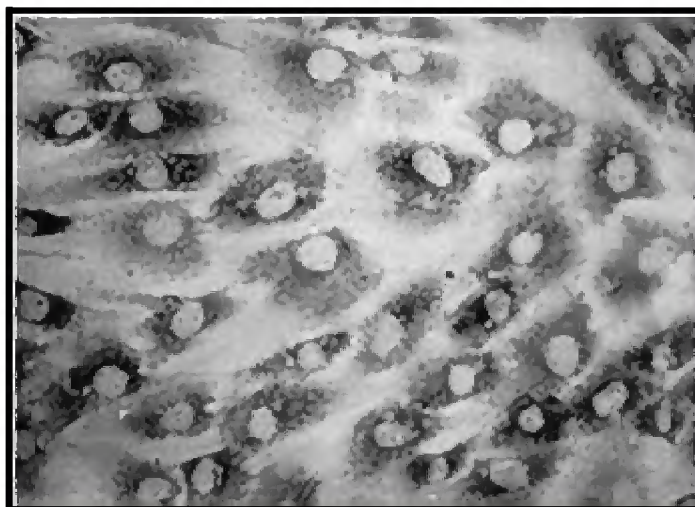


Figura 4: Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongo isoladas e cultivadas por Friedenstein et al (1974).

As CTM são populações celulares heterogêneas, caracterizando-se pela habilidade de auto- renovação, potencial de diferenciação multipotente e grande plasticidade, tornando-se, portanto, indispensáveis em determinados processos de reparação tecidual. O termo mesenquimal deve-se ao fato de que estas células diferenciam-se em linhagens teciduais mesodermiais, incluindo osso, cartilagem e gordura. Porém, novos estudos comprovam a capacidade de originar também tecidos não mesodermiais, como hepatócitos, neurônios, células epiteliais, renais, dentre outras (SI et al., 2011).

As CTM estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, incluindo o sangue periférico de fetos jovens, sangue do cordão umbilical, estroma da medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular, polpa dentária, membrana sinovial, órgãos parenquimatosos, placenta, sangue do cordão umbilical, sangue menstrual humano e fluido amniótico (DEV et al. 2011).

Apesar das CTM derivadas destes vários tecidos apresentarem similaridade quanto à morfologia e às propriedades biológicas, existem algumas diferenças entre as várias fontes de CTM relacionadas à quantidade de células recuperadas após a coleta, ao potencial de proliferação quando submetidas à cultura *in vitro* e à diferença de idade do doador (quanto maior a idade, maior declínio na taxa de crescimento e na capacidade de diferenciação celular), tais fatores são indispensáveis na escolha da fonte mais adequada para utilização destas células em aplicações terapêuticas. Neste sentido, as principais fontes pesquisadas e já

utilizadas experimentalmente na medicina regenerativa são a MO, o tecido adiposo e o sangue do cordão umbilical (KERN et al., 2006).

As CTM apresentam poucos marcadores imunofenotípicos específicos, impossibilitando a identificação de um único marcador que poderia ser utilizado para configurar a homogeneidade das CTM. Além disso, existe a possibilidade destes marcadores apresentarem modificações determinadas pelas condições do meio de cultivo *in vitro* ao longo das passagens. Portanto, para a caracterização adequada é necessário estabelecer a identificação de marcadores específicos e não específicos (SI et al., 2011).

Embora vários marcadores de superfície para identificação de CTM já tenham sido identificados, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) estabeleceu que apenas a identificação dos marcadores CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR, é suficiente para a caracterização imunofenotípica de CTM (MONTEIRO et al., 2009). No entanto, a ISCT também estabeleceu outros critérios necessários para identificar as CTM, tais como: aderência à superfície plástica quando mantidas em cultivo *in vitro* por longos períodos e potencial de diferenciação multipotente em linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas (DOMINICI et al., 2006).

Numerosos estudos têm relatado a expressão de um grande número de moléculas bioativas pelas CTM, como as moléculas de adesão (integrinas), as proteínas de matriz extracelular, as selectinas, as citocinas [Flt- 3, interleucinas, fator de necrose tumoral- α (TNF- α)] e fatores de crescimento [fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento do fibroblasto (bFGF), fator de crescimento do hepatócito (HGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF)], permitindo interações com demais células (TOBITA et al., 2011).

O efeito trófico exercido pelas CTM no tecido alvo tem sido o principal fator no desencadeamento da regeneração tecidual, a partir da secreção das moléculas bioativas já mencionadas, cuja ação está vinculada à redução da inflamação, da apoptose, da fibrose e ao estímulo da regeneração do tecido lesionado, e, até mesmo, por meio da interação célula-célula (SI et al., 2011). Na injúria celular aguda, as CTM proliferam-se, aumentam a secreção de moléculas bioativas e migram para o local de lesão tecidual onde exercerão primeiramente efeitos parácrinos, por meio da ação trófica destas células. Os mecanismos relacionados à migração das CTs envolvem ligação a receptores específicos presentes no

tecido lesionado e secreção de moléculas que atuam modulando a resposta inflamatória e angiogênese das células envolvidas no processo de reparação tecidual (CAPLAN, 2009).

Assim, o tecido local lesionado induz à quimiotaxia das CTM, que são reguladas de acordo com o microambiente tecidual, promovendo a diferenciação das CTs em células tecido-específicas, células que participam do microambiente ou nicho para a reparação do tecido e células regulatórias, as quais contribuem para a regeneração tecidual por meio da secreção de citocinas, exercendo funções tróficas e imunomodulatórias (SI et al., 2011).

Os efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios das CTM ainda não estão completamente elucidados, porém, alguns mecanismos podem ser explicados. Após o contato direto das CTs com o tecido alvo, ou mediante interação parácrina pelas células do sistema imune, as CTM desencadeiam a liberação de diversos fatores, que vão agir sobre os linfócitos e células dendríticas apresentadoras de antígenos (APC), os quais incluem as prostaglandinas (PGE2), as interleucinas (IL-4, IL-6, IL-10), o fator de crescimento transformador β -1 (TGF- β 1), o fator de crescimento hepatóide (HGF) e a enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (TRENTO; DAZZI, 2010).

O TGF- β 1 e HGF foram as primeiras moléculas identificadas como mediadoras das propriedades imunossupressoras de CTM, sendo responsáveis pela supressão da proliferação dos linfócitos T e B, enquanto que a liberação de PGE2 inibe, especificamente, a produção dos linfócitos T citotóxicos natural killer (NK) e as demais citocinas pró-inflamatórias. A ação da IDO nos linfócitos T causa depleção do aminoácido triptofano, importante para o crescimento e funcionamento destas células, induzindo à depleção de nutrientes e/ou produção de metabólitos tóxicos no citoplasma (MONTEIRO et al., 2009).

As CTM também interferem na diferenciação, maturação e ativação das células dendríticas APC, através da mediação de fatores como a IL-6 e o fator de crescimento estimulador de macrófago (M-CSF). O complexo de histocompatibilidade maior-I (MHC-I) está envolvido na imunomodulação pelas CTM, as quais expressam níveis menores destas moléculas e ausência de expressão de moléculas MHC-II. Conseqüentemente, este mecanismo impossibilita a ação dos linfócitos, justificando a baixa imunogenicidade durante os transplantes alogênicos (LE BLANC; RINGDEN, 2007). De maneira geral, as CTM possuem habilidade de suprimir a ativação e proliferação de linfócitos T e B, a partir do bloqueio destas células na fase G0/G1 do ciclo celular, e de proteger o tecido lesionado através da liberação de moléculas anti-inflamatórias e anti-apoptóticas (TRENTO; DAZZI, 2010).

Devido às propriedades imunomodulatórias e imunossupressoras exercidas pelas CTM, o transplante destas células tem sido utilizada experimentalmente no tratamento de doenças do enxerto contra hospedeiro, observadas no transplante de CTs alogênicas, e, também, em doenças autoimunes, incluindo diabetes mellitus tipo 1 (FIORINA et al., 2009), artrite reumatóide (BOUFFI et al., 2009), lupus eritematoso sistêmico (ZHANG et al., 2010) e esclerose múltipla (MARTINO et al., 2010).

Assim, as CTM têm sido muito estudadas para aplicações em terapia celular, devido apresentarem diversas vantagens como: facilidade de obtenção, coleta realizada a partir do próprio paciente que receberá as CTs, baixa imunogenicidade, habilidade de integração no tecido hospedeiro, facilidade de manipulação no laboratório, alta capacidade de proliferação celular *in vitro* e capacidade multipotente de diferenciação celular quando submetidos a meios de cultivos específicos (YARAK; OKAMOTO, 2010).

Por estas características, as CTM têm atraído a atenção de vários pesquisadores, pois são de grande interesse para serem usadas no tratamento de diversas doenças, utilizando-se desde a fração de células mononucleares da medula óssea, que contém pequenas quantidades de CTM, até culturas expandidas em laboratório, obtidas de diversos órgãos (MONTEIRO et al., 2009). As culturas de CTM podem ser aplicadas *in situ* (no local da lesão); isoladas ou combinadas com substitutos ósseos e biomateriais; ou infusão intravenosa, podendo estar diferenciadas ou não (MONTEIRO et al., 2008).

2.2.5.1.1 Células-Tronco Derivadas da Medula Óssea (CTMO)

A medula óssea (MO) foi a primeira fonte de CTs para aplicações terapêuticas, haja vista que no organismo adulto é capaz de produzir 6 bilhões de células por quilograma de peso corporal por dia (KORBLING et al., 2003). Está constituída de células sanguíneas diferenciadas e pelo estroma, uma combinação heterogênea de células incluindo adipócitos, reticulócitos, células endoteliais, fibroblastos e onde estão presentes células-tronco hematopoiéticas (CTH) e mesenquimais (CTM) (WISLET-GENDEBIEN et al., 2012).

As CTH encontradas na MO originam diferentes tipos de células sanguíneas, incluindo a linhagem mielóide, como eritrócitos, megacariócitos, monócitos e granulócitos, e a linhagem linfóide, como linfócitos B, T e NK (Natural Killer), representando percentuais de 0,01% a 0,05%, podendo também circular no fígado fetal, no sangue do cordão umbilical e no sangue periférico, onde sua concentração é ainda menor (~ 0,001%) (PEREIRA, 2008). As CTH podem ser identificadas e separadas a partir da detecção de alguns marcadores de superfície, tais como CD34+, CD38+, CD133+ e CD90+, dentre outros (ABDELHAY et al., 2009).

A função das CTM encontradas no estroma da MO está vinculada à manutenção de um microambiente de preservação das CTH, a partir da secreção de quimiocinas e fatores de crescimento que contribuem para o nicho e proliferação das CTH, e estímulo para hematopoiese, abrangendo as etapas de sobrevivência, auto-renovação e diferenciação das células hematopoiéticas. Esta característica das CTM torna indispensável à associação destas células às CTH durante um transplante, onde contribuem, também, com a tolerância imune devido à baixa imunogenicidade e ao efeito imunossupressivo (MOHANTY et al., 2010).

No entanto, as CTM no estroma da MO representam uma parcela muito pequena do total das células mononucleares (0,01% a 0,001%), sendo este percentual diretamente relacionado com a idade, assim, na medula de um feto existem 25 vezes mais CTM em comparação à medula de uma pessoa adulta (PANEPUCCI et al., 2004).

A MO pode ser coletada, por meio de punção com agulha de biópsia e seringa previamente heparinizada, em diversos locais, como a crista íliaca (DEL CARLO et al., 2004), tubérculo umeral (OLIVEIRA, 2009), fossa trocântérica femoral (OLSSON et al., 2009) e esterno (ALVES et al., 2009) (Figura 5). No entanto, o uso destas células derivadas da MO apresenta algumas desvantagens, como método de coleta doloroso, morbidade e recuperação de um baixo número de CTM. Por isso, novas pesquisas têm sido direcionadas a estabelecer uma fonte alternativa de CTs (ZUK et al., 2002).



Figura 5: Procedimento de coleta de medula óssea utilizando agulha e seringa previamente heparinizada **A)** Punção do tubérculo umeral de coelho (OLIVEIRA et al., 2006); **B)** Punção da crista ilíaca de primata não- humano, *Chlorocebus aethiops* (Arquivo pessoal, 2012).

2.2.5.1.2 Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo (CTDTA)

O tecido adiposo é a maior reserva energética do organismo, apresentando uma relevante plasticidade durante toda a vida. As principais características deste tecido, além do armazenamento de energia, são: isolamento térmico, barreira física ao trauma, função endócrina (produção de leptina, hormônio fundamental na regulação dos depósitos energéticos e da fertilidade) e metabolismo dos hormônios esteróides (COSTA; DUARTE, 2006).

Os principais constituintes celulares são pré-adipócitos (isentos de lipídeos), adipócitos maduros, células endoteliais, macrófagos, CTM (ZUK et al., 2001), fibroblastos (XU et al., 2003) e linfócitos (CASPAR- BAUGIL et al., 2005). Assim como a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesênquima e contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado e permite a extração de um grande volume de tecido com uma baixa morbidade (CASPAR-BAUGUIL et al., 2005).

Os trabalhos pioneiros sobre o isolamento de células da gordura foram desenvolvidos por Rodbell e Jones (1966), que usaram o método enzimático (digestão com colagenase) para isolar adipócitos de ratos da fração vascular estromal (SVF), a qual é composta por um grupo de células heterogêneas. Posteriormente, Zuk et al. (2001) comprovaram a presença de uma população de CTs, de origem mesenquimal, na SVF de tecido adiposo humano, identificando células morfologicamente semelhantes aos fibroblastos, com fácil expansão in

vitro e potencial de diferenciação em células da linhagem mesodérmica-osteócitos, condrócitos e adipócitos, tornando possível a utilização destas células na regeneração de tecidos em casos de doenças do sistema musculoesquelético.

Outros tipos celulares já foram obtidos utilizando-se as CTDTA, como por exemplo, células semelhantes à cardiomiócitos e células endoteliais. Também participam da regeneração muscular e promovem neovascularização após a sua transferência para modelos animais (PLANAT-BERNARD et al., 2004 a; PLANAT-BERNARD et al., 2004 b).

O tecido adiposo subcutâneo pode ser coletado da região glútea e abdominal por meio de lipoaspiração ou realização de biópsia, sendo um procedimento minimamente invasivo em comparação à coleta de MO (VIEIRA et al., 2010). Porém alguns pesquisadores descobriram que alguns fatores podem interferir na proliferação e qualidade do cultivo das CTDTA, tais como: idade, sexo do doador e local de obtenção do tecido adiposo. De acordo com Majka et al (2010), células progenitoras encontradas na SVF de tecido adiposo de camundongo podem ser frequentemente mais observadas em depósitos de gordura visceral em comparação à subcutânea, sendo mais observadas em fêmeas e apresentam aumento da quantidade conforme o avanço da idade. Em humanos, um maior número de CTs foi recuperado a partir da coleta do tecido adiposo do braço em relação a outras regiões, como coxa, abdômen e peito (PRUNET-MARCASSUS et al., 2006).

As células da SVF, obtidas a partir da digestão enzimática da gordura, são heterogêneas, sendo constituídas por diversas subpopulações de CTs e estas células são isoladas, no cultivo primário inicial, a partir da propriedade de aderência ao plástico e alterações na expressão de marcadores de superfície, que ocorrem nas células dependendo das condições ou tempo do cultivo. A fração das células aderentes é considerada multipotente, apresentando, inicialmente, morfologia heterogênea, com um tempo de duplicação inversamente proporcional à idade do doador e dependente da densidade de plaqueamento inicial para permitir uma boa taxa de expansão. Após um número maior de passagens, as células tornam-se mais homogêneas e exibem morfologia fibroblastóide, preservando a habilidade proliferativa, o potencial de diferenciação e a estabilidade cromossômica (BAER; GEIGER, 2012).

No entanto, com o decorrer das passagens, as CTM podem entrar em processo de senescência celular, sendo esta fase caracterizada pela presença de células grandes, largas, achatadas, ausência de proliferação celular e expressão de β -galactosidade associada à senescência. CTM senescentes podem apresentar redução do potencial de diferenciação, limitando, assim, a utilização na terapia celular (WAGNER et al., 2008).

Técnicas de isolamento e expansão em cultura de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea foram as primeiras fontes de CTs para aplicações terapêuticas. Porém, o uso destas células apresenta algumas desvantagens, como o método de coleta dolorosa e invasiva, alta morbidade e recuperação de um baixo número de CTM (ZUK et al., 2002). Com isso, pesquisas recentes têm comprovado que o tecido adiposo subcutâneo fornece uma fonte alternativa de CTM com a vantagem de apresentar maior facilidade de coleta com pouco desconforto para o doador, facilidade de isolamento, maior frequência de CTM (1 a 10%) em relação ao estroma da MO (0.001- 0.01%) e maior taxa de proliferação celular (OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006; TOBITA et al., 2011).

Assim, devido ao rápido crescimento *in vitro* e plasticidade das células estromais derivadas do tecido adiposo, diversos grupos de pesquisa estão realizando estudos quanto à biologia, caracterização e diferenciação usando CTDTA de várias espécies animais e, até mesmo, de pacientes humanos, para verificar os efeitos terapêuticos destas células. A seguir, algumas pesquisas são exemplificadas.

Kang et al (2004) isolaram, caracterizaram e diferenciaram *in vitro* CTDTA de macaco Rhesus em linhagens mesodérmicas e neurais, obtendo resultados satisfatórios, os quais poderiam proporcionar uma alternativa terapêutica em distúrbios neurológicos, levando-se em consideração a proximidade biológica dos primatas com os humanos.

Black et al (2008) avaliaram o efeito clínico do transplante autólogo de CTDTA em cães portadores de osteoartrite do cotovelo, os quais apresentaram melhora ao longo do tempo quanto à claudicação e à dor à manipulação após uma única injeção intra-articular de CTM.

A habilidade de proliferação e diferenciação de CTDTA humano em linhagens celulares endócrinas do pâncreas foi testada por Moshtagh et al (2012), que identificaram mudanças morfológicas de CTM para células-semelhantes às das ilhotas pancreáticas, as quais foram capazes de secretar insulina *in vitro*. Este resultado foi testado na prática por Li et al (2012), que infundiram CTDTA em ratos portadores de diabetes mellitus tipo 1 após indução com estreptozotocina (substância tóxica ao pâncreas que produz inflamação e destruição do seu parênquima), sendo duas semanas depois observada diminuição das taxas sanguíneas de glicose e aumento da expressão de insulina pelas células β pancreáticas dos animais.

Objetivo

3 HIPÓTESE

O tecido adiposo de primatas não humanos, *Chlorocebus aethiops*, é uma fonte de células-tronco mesenquimais, apresentando potencial de diferenciação multipotente em linhagens adipogênicas, osteogênicas e condrogênicas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de primatas não humanos, *Chlorocebus aethiops*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e cultivar as CTM;
- Avaliar as características morfológicas das CTM;
- Avaliar a curva de crescimento celular;
- Avaliar a presença de senescência celular;
- Avaliar a integridade cromossômica;
- Caracterizar as CTM mediante marcação de receptores de superfície específicos para CTM e também para a ausência de marcadores exclusivos de células hematopoiéticas;
- Caracterizar as CTM mediante ensaio de diferenciação *in vitro* em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABDELHAY, E. S. F. W.; BRAGA, H. F. P.; BINATO, R.; BOUZAS, L. F. S. Células-tronco de origem hematopoética: expansão e perspectivas de uso terapêutico. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 31(1):2-8, 2009;
- ALI, H.; BAHBAHANI, H. Umbilical cord blood stem cells – potential therapeutic tool for neural injuries and disorders. *Acta Neurobiol Exp.* 70: 316–324. 2010.
- ALMEIDA, J.; HILL, C.; COLE, K. Authentication of African green monkey cell lines using human short tandem repeat markers. **BMC Biotechnology**, 11:102- 14, 2011.
- ALVES, A. L. G.; VIEIRA, M. E. M.; BARREIRA, A. P. B.; MOTA, L. S. L. S.; SAITO, M. E.; KOHAYAGAWA, A.; HUSSNI, C. A.; WATANABE, M. J.; OLIVEIRA, P. G. G. Protocolo de isolamento de células mononucleares de medula óssea de equinos. **Vet. e Vet. e Zootec.** p. 650-655, v.16, n.4, 2009.
- ANDERSON, D. J; GAGE, F. H; WEISSMAN, I. L. Can stem cells cross lineage boundaries? **Nature** 7: 393–395. 2001.
- BAER, P. C; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells International**. 2012.
- BAILEY, J. N.; BREIDENTHAL, S. E.; JORGENSEN, M. J.; MCCracken, J. T.; FAIRBANKS, L. A. The association of DRD4 and novelty seeking is found in a nonhuman primate model. **Psychiatr Genet** 17(1): pag 23–27, 2007.
- BHANDARI, D.; SEO, K.; ROH, K.; JUNG, J.; KANG, S.; KANG, K. REX-1 expression and p38 MAPK activation status can determine proliferation/differentiation fates in human mesenchymal stem cells. **PLoS One** 5: e10493. 2010.
- BLACK, L. L., GAYNOR, J., ADAMS, C., DHUPA, S., SAMS, A. E., TAYLOR, R., HARMAN, S., GINGERICH, D. A., HARMAN, R. Effect of Intraarticular Injection of Autologous Adipose-Derived Mesenchymal Stem and Regenerative Cells on Clinical Signs of Chronic Osteoarthritis of the Elbow Joint in Dogs. **Veterinary Therapeutics**, v. 9, No. 3, 2008.
- BOSSART, K. N.; GEISBERT, T. W.; FELDMANN, H.; ZHU, Z.; FELDMANN, F.; GEISBERT, J. B.; YAN, L.; FENG, Y. R.; BRINING, D.; SCOTT, D.; WANG, Y.; DIMITROV, A. S.; CALLISON, J.; CHAN, Y. P.; HICKEY, A. C.; DIMITROV, D. S.;

BRODER, C. C.; ROCKX, B. A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. **Science translational medicine**, 3(105):105ra103, 2011.

BOUFFI, C.; DJOUAD, F.; MATHIEU, M.; NOEL, D.; JORGENSEN, C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? **Rheumatology** 48, 1185–1189, 2009.

BRENNAND, K. J.; SIMONE, A.; JOU, J.; GELBOIN-BURKHART, C.; TRAN, N.; SANGAR, S.; LI, Y.; MU, Y.; CHEN, G.; YU, D.; MCCARTHY, S.; SEBAT, J.; GAGE, F. H: Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. **Nature**. 473:221-225, 2011.

BURKE, M.W.; ZANGENEHPOUR, S.; PTITO, M. Partial recovery of hemiparesis following hemispherectomy in infant monkeys. **Neurosci. Lett.** 469, pag 243–247, 2010.

BYDŁOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematologia. Hemoterapia**, 31 (1). 2009.

CAMPOS-ROMO, A.; OJEDA-FLORES, R.; MORENO-BRISEÑO, P.; FERNANDEZ-RUIZ, J. Quantitative evaluation of MPTP-treated nonhuman parkinsonian primates in the hallway task. **J. Neurosci. Methods** 177, pag 361–368, 2009.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**. v. 217, p 318- 324, 2009.

CASPAR-BAUGUIL, S.; COUSIN, B.; GALINIER, A.; SEGAFREDO, C.; NIBBELINK, M.; ANDRE, M.; CASTEILLA, L.; PENICAUD, L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. **FEBS Lett**, v. 579, n. 17, p. 3487-92, Jul 4, 2005.

COOK, J. J.; SITKO, G. R.; BEDNAR, B.; CONDRA, C.; MELLOTT, M. J.; FENG, D. M.; NUTT, R. F.; SHAFER, J. A.; GOULD, R. J.; CONNOLLY, T. M. An Antibody Against the Exosite of the Cloned Thrombin Receptor Inhibits Experimental Arterial Thrombosis in the African Green Monkey. **Circulation**, 91(12): pag 2961–2971, 1995.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med. Port.**: 19: 251-256. 2006.

CROVACE, A.; LACITIGNOLA, L.; ROSSI, G.; FRANCIOSO, E. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. **Vet Med Int.** 2010.

DEL CARLO, R. J.; MONTEIRO, B. S.; DAIBERT, A. P. F.; PINHEIRO, L. C. P. Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto na ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, Viçosa, v.51, n.295, p.411-418, 2004.

DEV, K.; GIRI, S. K.; KUMAR, A.; YADAV, A.; SINGH, B.; GAUTAM, S. K. Derivation, Characterization and Differentiation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Amniotic Fluid Derived Stem Cells. **Reproduction in domestic animals.** 2011.

DIMOS, J. T.; RODOLFA, K. T.; NIAKAN, K. K.; WEISENTHAL, L. M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G. F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C. E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science.** 321:1218-1221, 2008.

DOMINGUES, S. F. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C. Fisiologia e biotécnicas da reprodução desenvolvidas em fêmeas de Primatas Neotropicais importantes para a pesquisa biomédica. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.30, n.1/2, p.57-71, 2006.

DOMINICI, M.; BLANC, K.L.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy.** Vol. 8, No. 4, 315- 317, 2006.

EBERT, A. D.; YU, J.; ROSE, F. F.; JR. MATTIS, V. B.; LORSON, C. L.; THOMSON, J. A.; SVENDSEN, C. N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. **Nature.** 457:277-280, 2009.

EVANS, M.;KAUFMAN, M. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature.** 292:154-156. 1981.

FAINMAN, J.; EID, M. D.; ERVIN, F. R.; PALMOUR, R. M. A primate model for Alzheimer's disease: investigation of the apolipoprotein E profile of the vervet monkey of St. Kitts. **Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.** 144B, pag 818–819, 2007.

FIORINA, P.; JUREWICZ, M.; AUGELLO, A.; VERGANI, A.; DADA, S.; ROSA, S.; SELIG, M.; GODWIN, J.; LAW, K.; PLACIDI, C.; SMITH, R. N.; CAPELLA, C.; RODIG,

S.; ADRA, C. N.; ATKINSON, M.; SAYEGH, M. H.; ABDI, R.; Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. **J. Immunol.** 183, pag 993–1004, 2009.

FRIEDENSTEIN, A.J; DERIGLAZOVA, U.F., KULAGINA, N.N; PANASUK, A.F; RUDAKOWA, S.F; LURIA, E.A; RUADKOW, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Exp Hematol** . 2:83-92, 1974.

FUKUCHI, Y.; NAKAJIMA, H.; SUGIYAMA, D.; HIROSE, I.; KITAMURA, T.; TSUJI, K. Human placenta derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, p. 649-658, 2004.

GOMES, R.G.C., GRINFELD, S. Odontologia. **Clín.-Científ.** Recife, 7 (1): 29-33, jan/mar., 2008.

GROVES, C. P.; WILSON, D. E.; REEDER, D. M. **Mammal Species of the World** (3rd ed.). Baltimore: Johns Hopkins University Press. pp. 158-159, 2005.

GURDON, J. B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. **J. Embryol. Exp. Morphol.** 10, 622–640. 1962.

HAUS, T.; AKOM, E.; AGWANDA, B.; HOFREITER, M.; ROOS, C.; ZINNER, D. Mitochondrial Diversity and Distribution of African Green Monkeys (*Chlorocebus* Gray, 1870). **American Journal of Primatology.** 75:350–360. 2013.

<http://www.arkive.org/grivet-monkey/chlorocebus-aethiops>. Disponível em: 01/03/13.

JASINSKA, A. J.; SERVICE, S.; LEVINSON, E. M.; SLATEN, E.; LEE, O.; SOBEL, E.; FAIRBANKS, L. A.; BAILEY, J. N.; JORGENSEN, M. J.; BREIDENTHAL, S. E.; DEWAR, K.; HUDSON, T. J.; PALMOUR, R.; FREIMER, N. B.; OPHOFF, R. A. A genetic linkage map of the vervet monkey (*Chlorocebus aethiops sabaues*). **Mamm Genome.** 18: 347–360, 2007.

KANG,S.K.; PUTNAM, L.A., YLOSTALO, J., POPESCU, I. R., DUFOUR, J., BELOUSOV, A.; BUNNELL, B. A. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. *Journal of Cell Science* 117 (18), 2004.

KEELIN, O.; NICHOLAS, M. Fetal stem cells. **Clinical obstetrics and gynaecology.** v. 18 (6), 853-875 p, 2004.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells** 24, 1294–1301. 2006.

KORBLING, M.; STROV, Z.; CHAMPLIN, R. Adult stem cells and tissue repair. Bone Marrow Transplantation. **USA**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **J. Intern. Med.** 262, 509–525. 2007.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Ann N Y Acad Sci.** 1044:132-8. 2005.

LI, Y.Y, LIU, H.H, CHEN, H.L, LI, Y.P. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate STZ-induced pancreas damage in type 1 diabetes **Biomed Mater Eng.** 22(1-3):97-103. 2012.

MAJKA, S. M.; FOX, K. E.; PSILAS, J. C.; HELM, K. M.; CHILDS, C. R.; ACOSTA, A. S.; JANSSEN, R. C.; FRIEDMAN, J. E.; WOESSNER, B. T.; SHADE, T. R.; VARELLA-GARCIA, M.; KLEMM, D. J. Proceedings De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. **Proc Natl Acad Sci, USA**, 107:14781–14786, 2010.

MARTINO, G.; FRANKLIN, R.J.; VAN EVERCOOREN, A. B.; KERR, D. A. Stem Cells in Multiple Sclerosis (STEMS) Consensus Group. Stem cell transplantation in multiple sclerosis: current status and future prospects. **Nat. Rev. Neurol.** 6, 247–255, 2010.

MCCARTY, R. C.; XIAN, C. J.; GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A. C. W.; FOSTER, B. K. Application of Autologous Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells to an Ovine Model of Growth Plate Cartilage Injury. **The Open Orthopaedics Journal.** v. 4, 2010.

MIGUEL, M. P; FUENTES-JULIÁN, S.; ALCAINA, Y. Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. **Stem Cell Rev and Rep** 6:633–649, 2010.

MIHU, C. M.; RUS, C. D.; SORITAU, O.; SUSMAN, S.; MIHU, D. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the amniotic membrane. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 50, p. 7-73, 2009.

MIKI, T.; LEHMANN, T.; CAI, H.; STOLZ, D. B.; STROM, S. C. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1549- 1559, 2005.

MOHANTY, S. T.; KOTTAM, L.; GAMBARDELLA, A.; NICKLIN, M. J.; COULTON, L.; HUGHES, D.; WILSON, A. G.; CROUCHER, P. I.; BELLANTUONO, I. Alterations in the self-renewal and differentiation ability of bone marrow mesenchymal stem cells in a mouse model of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, vol. 12, no. 4, p. R149, 2010.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO-NETO, N. M.; DEL CARLO, R. J. Terapia celular em reparação óssea – aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, s2, p. 95-100, 2008.

MONTEIRO, B. S.; ARGÔLO, N. M. N.; DEL CARLO, R. J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, 2009.

MOSHTAGH, P. R.; EMAMI, S. H.; SHARIFI, A. M. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. **Journal of Physiology and Biochemistry**. December 2012.

MUMMERY, C.; WILMUT, S. R.; STOLPE, A. V.; ROELEN, B. A. J. Stem Cells: scientific facts and fiction, 323 p. Capítulo 4: Of mice and men: the history of the stem cell, 59- 86 pag. **Elsevier**. 2011.

NITTA, M.; IMAMURA, M.; INOUE, Y.; KUNITOMO, Y.; LIN, Z. Y.; OGAWA, T.; YOGO, K.; ISHIDA-KITAGAWA, N.; FUKUNAGA, N.; OKANO, H.; SATO, E.; TAKEYA, T.; MIYOSHI, J. Aberrant Gene Expression and Sexually Incompatible Genomic Imprinting in Oocytes Derived from XY Mouse Embryonic Stem Cells In Vitro. **PLoS One**. 8(3): e58555. 2013.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J.; VAN, S. M.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M. N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T. E.; et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. **Cytotherapy**, v. 8, p. 166-77, 2006.

OKAMOTO, S; TAKAHASHI, M. Induction of Retinal Pigment Epithelial Cells from Monkey iPS Cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, vol. 52, no. 12, 2011.

OKITA, K.; YAMAKAWA, T.; MATSUMURA, Y.; SATO, Y.; AMANO, N.; WATANABE, A.; GOSHIMA, N.; YAMANAKA, S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. **Stem Cells** 31, 458-466, 2013.

OLIVEIRA, B.J.N.A.; STEFANES, S.A.; JACOBINA, G.C.; FARIAS, A.; ALMEIDA, R. M. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea no processo de consolidação de fraturas de fêmur. In: Anais do III Concevepa, Brasília, p.88-90, 2006.

OLIVEIRA, B.J.N.A. **Enxerto osteocondral alógeno, associado à inoculação de células mononucleares da medula óssea e proteína morfogenética óssea no reparo do sulco troclear de coelhos.** 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OLSSON, D. C.; PIPP, N. L.; MARTINS, D. B.; TOGNOL, G. K.; JÚNIOR, E. B. S.; MULLER, D. C.; LOPES, S. T. A.; MARCONATO, F.; MÖRCHBÄCHER, P. D.; TEIXEIRA, L. V. Colheita de medula óssea em cães: modelo para obtenção da fração total de células Mononucleares. **Ciência Rural.** Santa Maria, v.39, n.1, p.141-147, jan-fev, 2009.

PANEPUCCI, R. A.; SIUFI, J. L.; SILVA, W. A. Jr; PROTO- SIQUIERA, R.; NEDER, L.; ORELLANA, M; et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow- derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells.** 22 (7): 1263- 78, 2004.

PALMOUR, R. M.; JOHN MULLIGAN, J.; H. J.; ERVIN, F. Insights from model systems of monkeys and men: vervets and the genetics of human-like behaviors. **Am. J. Hum. Genet.** 61: pag 481-488, 1997.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células- tronco para a saúde pública. **Ciênc. saúde coletiva.** 13 (1), 2008.

PLANAT-BENARD, V.; MENARD, C.; ANDRE, M.; PUCEAT, M.; PEREZ, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circ Res,** v. 94, n. 2, p. 223-9, Feb 6 2004 a.

PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J. S.; COUSIN, B.; ANDRE, M.; NIBBELINK, M.; TAMARAT, R.; CLERGUE, M.; MANNEVILLE, C.; SAILLAN-BARREAU, C.; DURIEZ, M.; TEDGUI, A.; LEVY, B.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation,** v. 109, n. 5, p. 656-63, Feb 10 2004 b.

PRUNET-MARCASSUS B, COUSIN B, CATON D, ANDRE M, PENICAUD L, CASTEILLA L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: sitespecific differences. **Exp Cell Res.** 312:727–736. 2006.

PURI, M. C.; NAGY, A. Concise Review: Embryonic Stem Cells Versus Induced Pluripotent Stem Cells: The Game Is On. **Stem Cells**. 30:10–14, 2012.

RODBELL, M.; JONES, A. B. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (Clostridium perfringens alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. **J Biol Chem**, v. 241, n. 1, p. 140-2, Jan 10, 1966.

SAPORTA, M. A.; GRSKOVIC, M.; DIMOS, J. T. Induced pluripotent stem cells in the study of neurological diseases. **Stem Cell Research & Therapy**. 2:37, 2011.

SASAKI, M.; HONMOU, O.; RADTKE, C.; KOCSIS, J. D. Development of a Middle Cerebral Artery Occlusion Model in the Nonhuman Primate and a Safety Study of I.V. Infusion of Human Mesenchymal Stem Cells. **Plos One**. v. 6, Issue 10, 2011.

SATO, A.; FAIRBANKS, L. A.; LAWSON, P. T.; LAWSON, G. W. Effects of Age and Sex on Hematologic and Serum Biochemical Values of Vervet Monkeys (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). **Contemporary Topics**. vol 44. no. 1. 2005.

SI, Y.; ZHAO, Y.; HAO, H.; FU, X.; HAN, W. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Research Reviews** 10. 93–103. 2011.
SIMINIAK, T.; KURPISZ, M. Myocardial replacement therapy. **Circulation**, v. 108, n. 10, p 1167-71, 2003.

SOLDNER, F.; HOCKEMEYER, D.; BEARD, C.; GAO, Q.; BELL, G. W.; COOK, E. G.; HARGUS, G.; BLAK, A.; COOPER, O.; MITALIPOVA, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Parkinson's disease patient derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. **Cell**. 136:964-977, 2009.

SOUSA, M. G.; JUNIOR, D. P.; PASCON, J. P. E.; NETO, G. B. P.; CARARETO, R.; CHAMPION, T.; CAMACHO, A. A. Cardiac function in dogs with chronic Chagas cardiomyopathy undergoing autologous stem cell transplantation into the coronary arteries. **Can Vet J**. 52:869–874, 2011.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. 126, 663–676, 2006.

TAKENAKA, C.; NISHISHITA, N.; TAKADA, N.; JAKT, L.; KAWAMATA, S. Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. **Exp Hematol** 38: 154–162. 2010.

TCHITCHEK, N.; JACQUELIN, B.; WINKER, P.; DOSSAT, C.; SILVA, C.; WEISSENBACH, J.; BLANCHER, A.; MULLER-TRUTWIN, M.; BENECKE, A. Expression sequence tag library derived from peripheral blood mononuclear cells of the chlorocebus sabaeus. **BMC Genomics**, 13:279, 2012.

THOMSON, J.A., KALISHMAN, J., GOLOS, T.G., DURNING, M., HARRIS, C.P., BECKER, R.A., HEARN, J.P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 92, pp. 7844-7848. 1995.

THOMSON, J.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S.S., WAKNITZ, M.A., SWIERGIEL, J.J., MARSHALL, V.S., JONES, J.M. Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. **Science**, 282: 1145-1147. 1998.

TOBITA, M.; ORBAY, H.; MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. **Discov Med.** 11(57):160-70, 2011.

TRENTO, C.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. **Swiss Med Wkly.** 140. 2010.

URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, A. C.; L'ABBATE, A.; CATACHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. **Mol. Reprod. Dev.**, v.78, n. 5, p.361-373, 2011.

VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Isolation, Characterization, and Differentiation Potential of Canine Adipose-Derived Stem Cells. **Cell Transplantation**, v. 19, p. 279–289, 2010.

WAGNER, W.; HORN, P.; CASTOLDI, M.; DIEHLMANN, A.; BORK, S.; SAFFRICH, R.; BENES, V.; BLAKE, J.; PFISTER, S.; ECKSTEIN, V.; HO, A. D. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. **PLoS ONE**. v. 3 (5), 2008.

WARD, K. W.; COON, D. J.; MAGIERA, D.; BHADRESA, S.; NISBETT, E.; LAWRENCE, M. S. Exploration of the African green monkey as a preclinical pharmacokinetic model: intravenous pharmacokinetic parameters. **Drug metabolism and disposition the biological fate of chemicals**, 36(4): pag 715–720, 2008.

WICHTERLE, H.; PRZEDBORSKI, S. What can pluripotent stem cells teach us about neurodegenerative diseases. **Nature Neuroscience**, vol. 13, no. 7, pp. 800–804, 2010.

WISLET-GENDEBIEN, S.; LAUDET, E.; NEIRINCKX, V.; ROGISTER, B. Adult BoneMarrow:Which StemCells for Cellular Therapy Protocols in Neurodegenerative Disorders? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 2012.

WOLF, D. P.; KUO, H-C.; FRANCIS, P. A. U. K-Y.; LESTER, L. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. **Biol Reprod**, v.71, p.1766–1771, 2004a.

WOLF, D. P.; THORMAHLEN, S.; RAMSEY, C.; YEOMAN, R. R.; FANTON, J.; MITALIPOV, S. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. **Biol Reprod**, v.71, p.486-493, 2004b.

WOODS, R. P.; FEARS, S. C.; JORGENSEN, M. J.; FAIRBANKS, L. A.; TOGA, A. W.; FREIMER, N. B. A web-based brain atlas of the vervet monkey, *Chlorocebus aethiops*. **NeuroImage** 54: 1872–1880, 2011.

WRIGHT, K. T.; MASRI, W. E.; OSMAN, A.; CHOWDHURY, J.; JOHNSON, W. E. B. Bone Marrow for the Treatment of. Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications. **Stem Cells**. v. 29: pag 169–178, 2011.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**. v. 112, n. 12, p. 1821-30, 2003.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **An Bras Dermatol**. v. 85, n. 5, p. 647-56, 2010.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**. 318:1917–1920, 2007.

YULIN, X.; LIZHEN, L.; LIFEI, Z.; SHAN, F.; RU, L.; KAIMIN, H.; HUANG, H. Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Folia Biologica (Praha)**. 58, 221-230, 2012.

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F. S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L. M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J. T.; GENG, Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: mechanism, methods and clinical applications. **Journal of Cardiothoracic-renal research**, v.1, p 3-14, 2006.

ZHANG, J.; BRODIE, C.; LI, Y.; ZHENG, X.; ROBERTS, C. et al. Bone marrow stromal cells therapy reduces proNGF and p75 expression in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. neurol Sci.** 279: pag 30- 8. 2009.

ZHANG, H.; ZENG, X.; SUN, L. Allogenic bone-marrow-derived mesenchymal stem cells transplantation as a novel therapy for systemic lupus erythematosus. **Expert. Opin. Biol. Ther.** 10, 701–709, 2010.

ZHU, X. Y.; KRIER, J. D.; LERMAN, A.; LERMAN, L. O. Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Decrease Renal Injury in Experimental Swine Renal Artery Stenosis Through Different Mechanisms. **Stem Cells.** 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng.** v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

Artigo

Artigo apresentado conforme normas da revista Stem Cells and Development

Isolation and Characterization of *Chlorocebus aethiops* Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells

Carla M. F. C. Miranda¹, Moysés S. Miranda², Otávio M. Ohashi², Maria F. L. Assis³, Klena S. M. Silva³, Maria A. Miglino⁴, Rosa M. Cabral⁵, Ana R. Lima⁵, Érika R. Branco⁵

Mesenchymal stem cells (MSCs) are rare and undifferentiated cells, possess high potential for self-renewal, proliferation and differentiation. This plasticity could allow the use of such cells in regenerative medicine. The objective was to isolate, characterize and differentiate *Chlorocebus aethiops* adipose tissue-derived MSCs. MSCs were isolated by enzymatic digestion using type I collagenase and in vitro cultured until passage 4 in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% fetal bovine serum. It was performed cell growth curve and, subsequently evaluation for senescence, through the activity of the enzyme β -galactosidase, and chromosomal integrity. Cells were characterized by presence of surface receptors for MSCs and also to the absence of specific markers of hematopoietic cells. The differentiation into adipocytes, chondrocytes and osteocytes was induced in vitro and was assessed by specific staining. The results demonstrated that *C. aethiops* adipose-derived MSCs (ASCs) have the ability to expand in culture, proliferating fibroblastoid-shaped along the passages. It was observed percentage of senescent cells (12.5%), but without chromosomal alteration. The cells were positive for specific markers of MSCs and demonstrated mesodermal lineages differentiation potential, proving the multipotency of *C. aethiops* adipose tissue-derived MSCs. Thus, *C. aethiops* is regarded as a model organism in biomedical research for studies in cell therapy.

¹Postgraduate Program in Animal Health and Production in the Amazonia, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Brasil.

²Institute of Biological Sciences, Laboratory of In Vitro Fertilization, Federal University of Pará, Belém, Brasil.

³Laboratory of Tissue Culture and Cytogenetics– SAMAM/ Evandro Chagas Institute, Ananindeua, Brasil.

⁴University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brasil.

⁵Department of Morphophysiology and Anatomy of Domestic Animals, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Brasil.

Introduction

Stem cells (SCs) have the ability of proliferation, self-renewal and differentiation into cells of the mesodermal lineages. There are two main sources of SCs: embryonic stem cells (ESCs) and the adult stem cells. ESCs are pluripotent stem cells derived from the inner cell mass of blastocysts, an early-stage embryo. However the use of these cells in regenerative medicine is limited due to teratoma formation, immune rejection and many ethical and political issues. Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells present in all tissues and possess multipotency, ability for self-renewal and low immunogenicity. These properties make MSCs an ideal candidate cell type for tissue engineering and regenerative medicine [1].

MSCs were first described by Friedenstein and colleagues [2]. In their pioneering work isolated murine bone marrow, observing a rare cell population adhered to the culture plate as fibroblast colony-forming units (CFU-Fs), such cells had the potential to differentiate into mesodermal lineages. Decades later, Zuk and colleagues [3] demonstrated the presence of MSCs in the stromal-vascular fraction (SVF) from human adipose tissue, which possess easy in vitro expansion and potential differentiation into cells of the mesodermal lineages- osteocytes, adipocytes and chondrocytes, making it possible to isolate these cells from other species and their use in tissue regeneration in diseases of the musculoskeletal system.

Currently, MSCs may be found in perivascular regions of other tissues such as synovial membrane, periosteum, dental pulp, peripheral blood, menstrual blood, umbilical cord blood, endometrial, muscle tissue and amniotic fluid [4]. Despite the MSCs have the ability of differentiate into mesodermal lineages, due to the same embryonic origin, recent studies demonstrate the transdifferentiation potential to liver, neural, epithelial, pancreatic and renal cells [5].

MSCs derived from various tissues have a similar morphology and biological properties. However, there are some differences related to the region of tissue, amount of cells recovered after collection, proliferation during in vitro culture and difference in donor age. These are essential factors to choose the most appropriate source of MSCs for use in therapeutic applications [6].

Adipose tissue has been increasingly used as an alternative source of MSCs with several advantages because they can be easily harvested in a minimally invasive and cheaper manner, minimal patient discomfort and expand in vitro under specific culture conditions.

Compared with bone marrow stromal, adipose tissue has higher frequency of MSCs (0.001-0.01% versus 1-10%, respectively) and higher rate of cell proliferation, influenced by different sampling sites [7,8]. Proliferation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) obtained from different sites such as subcutaneous, omental and inguinal fat depots, showed a higher number of cells from subcutaneous space, therefore there is differences between species [9].

An increasing number of studies have showed the possible therapeutic effects of MSCs in regenerative medicine in humans and animal models, because their potency to modulate local environment, activate endogenous progenitor cells, secrete various growth factors and have immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects, stimulating the angiogenesis of cells involved in tissue repair process [10]. Because of their promising role in regenerative therapy, MSCs have been used as an attractive therapeutic tool for the repair of neurodegenerative disorders, cartilage and tendon defects, spinal injuries, cardiac defects, bone defects and autoimmune diseases [11].

Most experimental research is carried out in rodents, but the primates are the most suitable animal model for clinical tests of SCs, especially *Chlorocebus aethiops*, due phylogenetic similarities with the human species [12, 13]. It is the animal of choice for biomedical research related to common diseases in humans and their therapy [14]. However, there are few studies in the literature concerning the isolation, cultivation and application of MSCs in regenerative medicine in nonhuman primates, especially *C. aethiops*, making essential knowledge of the biological properties of these cells to use possibly in the future for cellular therapy.

Materials and Methods

The procedures were carried out under requirements of animal welfare recommended by the Commission of Ethics in Animal Use (CEUA) of the Evandro Chagas Institute (Ananindeua, Pará, Brazil), protocol number 0010/2011.

Adipose tissue harvesting

Adipose tissue samples were obtained from two non-human primates (*Chlorocebus aethiops*), males, both 8 years old, from National Primate Center (CENP), attached to the Evandro Chagas Institute (IEC), situated at Ananindeua/ PA.

The animals were sedated upon intramuscular (IM) injection with association of Tiletamine and Zolazepam Hydrochloride (Zoletil) at 10mg/kg. The area of left flank was aseptically prepared. Then, a 2-3 cm incision was made and a sample of subcutaneous adipose tissue was removed and transported in phosphate-buffered saline (PBS) to the Laboratory of Tissue Culture and Cytogenetics of the Environment Section of the Evandro Chagas Institute, where the tissue was processed. After collection of biopsy, the animals were treated with Tramadol hydrochloride (2 mg/ kg/IM) for five days.

Isolation and culture of Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

The biopsy was rinsed extensively in PBS, containing 50 µg/mL of gentamicin, minced and digested with collagenase type I (1 mg/mL) at 37°C for 2 h. After incubation, enzyme activity was neutralized with equal volumes of culture medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium, DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco) and centrifuged at 200 g for 5 min to separate floating adipocytes from stromal cells. Then, the pellet was resuspended in DMEM and centrifuged again for 5 minutes under the same conditions.

An aliquot of SVF was submitted to the test of cell viability by staining with Trypan Blue in Neubauer chamber. After, the cells were plated in T25 flasks containing DMEM, supplemented with 10% FBS, 3.7 g/L NaHCO₃ and 50 µg/mL gentamycin, and incubated at 37C/ 5% CO₂ overnight. Following incubation, the flasks were washed with PBS to remove residual unattached cells.

The cells were maintained in culture and the medium was renewed every 3 days. After they achieved about 85% confluence during passage 0 (P0), the cells were trypsinized (TrypLE Express, Gibco) for 3 to 5 minutes, centrifuged for 5 minutes at 200 g, frozen in DMEM supplemented with 20% FBS and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) and stored in liquid nitrogen.

Frozen samples were transported to the Laboratory of In Vitro Fertilization of Federal University of Pará (UFPA) and the cells were thawed in a water bath at 37°C for 1 min, then washed twice in DMEM to remove the cryoprotectant, cultured again under the same conditions and evaluated in the 4 passage.

Cell morphology

Chlorocebus aethiops adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) morphological characteristics were examined at 10 magnification using an inverted microscope (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc.), along the passages (P0-P4), in order to check the development of fibroblast-like morphology, characteristic observed in MSCs.

Growth curve

The growth characteristic of *C. aethiops* ASCs was evaluated from 2-12 days (triplicate). The MSCs of passage 4 were seeded in 24-well plate (TPP) at the rate of 10^4 cells per well and the media were changed every 72 h. The cell number was counted in Neubauer chamber every 48 hours.

Cellular senescence

Senescence was assessed using a β -Galactosidase (β -Gal) Staining Kit, in which β -Gal activity is detected in senescent cells at pH 6.0 but is absent in proliferating cells.

Cells were incubated in a 24 well plate at a density of 10^4 cells/ well at passage 4. About reaching 80% confluence, the culture medium was removed, the wells were washed with PBS and the cells were fixed at room temperature for 15 minutes in 4% paraformaldehyde and incubated overnight at 37°C, without CO₂, in a solution of β -galactosidase staining (containing 1 mg/ml X-Gal, 400 mM citric acid/sodium phosphate buffer (pH 6.0), 500 mM each of potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide, 1,5 M NaCl, and 20 mM MgCl₂).

Senescent cells (blue) were identified by a fluorescence microscope. The cell nucleus were stained with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Hoechst 33342 diluted in PBS for 15 minutes at room temperature. Then, the cells were counted in 10 different fields (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc.) at 100 magnification and calculated the percentage of senescent cells from the overlap of images, using the program Adobe Photoshop CS3.

Karyotyping of MSCs

Mitotic index of *C. aethiops* ASCs from passage 4 were assessed and incubated in DMEM supplemented with colchicine for 1 h at 37°C in 5% CO₂ incubator. Cells were washed in PBS and removed using 0.25% trypsin. Subsequently, the cells were suspended in hypotonic solution (75 mM KCl) for 10 minutes at 37°C in 5% CO₂ and then fixed in chilled 3:1 methanol/ acetic acid for 5 minutes at room temperature and centrifuged at 200 g for 3 minutes. The pellet was rinsed in chilled fixative and metaphases were placed on slides. Slides were stained with 4% Giemsa solution for 3 minutes and then a minimum of 3 metaphases were analyzed using a microscope with oil immersion at 100 magnification.

Immunophenotyping

As described by International Society for Cellular Therapy (ISCT), the cells were characterized by the presence of cell surface markers: CD105 (endoglin), CD90 (Thy-1) and CD73, and also to the absence of specific markers of hematopoietic cells, CD34 and CD45, CD79a, in order to exclude the presence of other cells in the culture.

ASCs from passage 4 were used for the immunophenotypic characterization. The cells were rinsed in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 15 minutes at room temperature and rinsed again in PBS. Then, the cells were incubated in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.3 M glycine (blocking solution) for 30 minutes at ambient temperature. ASCs were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with primary antibodies (1:50 dilution) (CD105, CD90, CD73, CD34, CD45 and CD79) (Santa Cruz Biotechnology, CA). Negative controls were considered in all analyzes incubation without primary antibodies.

After three PBS washes, cells were incubated for 1 hour at room temperature with Alexa488 and Alexa594 (1:150 dilution) (Invitrogen, EUA) or Goat anti-mouse FITC (1:250 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, CA). Cell nucleus were stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Hoechst 33342 for 15 minutes. Finally, cells were washed, mounted on slides and visualized

under the fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE 300, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). Negative controls were also analyzed.

Adipogenic differentiation

For adipogenic differentiation, the cells were incubated in 24-well plates containing DMEM at a density of 10^4 cells/ cm^2 (4 passage). After 3 days, the medium was replaced by the adipogenic differentiation kit (StemPro, Gibco), according to manufacturer's instructions, containing calcium, phosphate, sodium pyruvate, sodium bicarbonate. The cells cultured for 21 days, changing the medium every 3 days. As a negative control, an equal number of cells were incubated with DMEM for the same period. Adipogenesis was confirmed by intracellular accumulation of lipid droplets assessed by Oil Red O 1.25% staining for 5 minutes, after cell fixation in 4% paraformaldehyde for 1 hour at room temperature.

Osteogenic differentiation

For osteogenic differentiation, the cells were incubated in 24-well plates containing DMEM at a density of 5×10^3 cells/ cm^2 (4 passage). After 3 days, the medium was replaced by the osteogenic differentiation kit (StemPro, Gibco), according to manufacturer's instructions, containing sodium phosphate, sodium pyruvate, sodium bicarbonate. The cells cultured for 21 days, changing the medium every 3 days. As a negative control, an equal number of cells were incubated with DMEM for the same period. Osteogenesis was confirmed by accumulation of mineralized calcium phosphate assessed by Alizarin Red S 2% staining for 5 minutes, after cell fixation in 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature.

Chondrogenic differentiation

For chondrogenic differentiation, cells were seeded (0.25×10^7 cells/ ml) as a micromass for 2 hours (4 passage). Further chondrogenic differentiation kit (StemPro, Gibco), according to manufacturer's instructions, containing glutamine, pyruvate, sodium bicarbonate, was added and the cells cultured for 21 days, changing the medium every 3 days. As a negative control, an equal number of cells were incubated with micromass culture medium for the same period. Chondrogenesis was confirmed by presence of proteoglycans by Alcian Blue 1% staining for 5 minutes, after cell fixation in 4% paraformaldehyde for 20 minutes at room temperature.

Results

Cell morphology

After isolation of stromal vascular fraction (SVF) from *C. aethiops* adipose tissue, cell viability was 90% from Trypan blue staining. After thawing, the cells were assessed again and the viability was 78%.

Adherent cells demonstrated heterogeneous and flattened morphology (Fig. 1B) and a few days after isolation, it was possible to observe fibroblast-like cells proliferating quickly, becoming uniform with the progress of passages (Fig. 1C-1D).

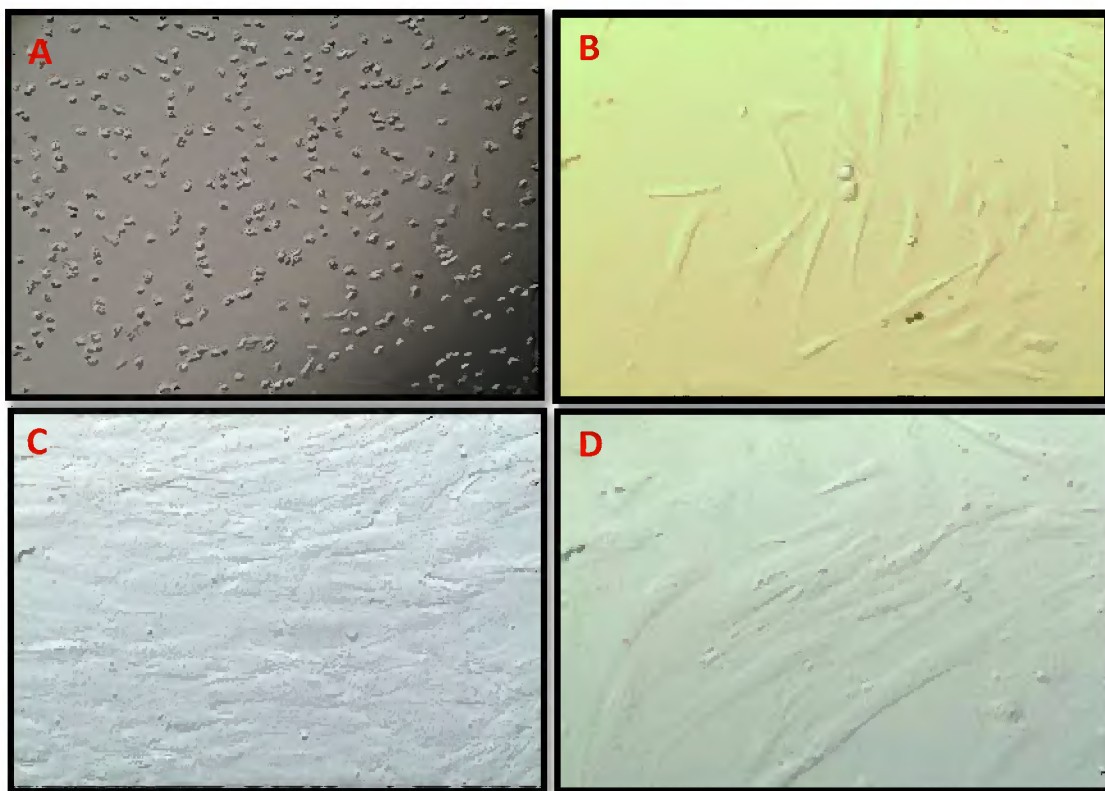


FIG. 1. *Chlorocebus aethiops* adipose-derived mesenchymal stem cells at different time and passages. (A) After thawing- passage 1 (P1). (B) Adherent cells in initial culture- day 4 (P1). (C) MSCs in 90% confluence (P2). (D) MSCs in P3. (Original magnification 100 x).

Growth curve

The growth curve of *C. aethiops* ASCs from passage 4 was assessed at every 48 h during 12 days of culture (triplicate). The first phase of the growth curve, called the lag period, was very short (approximately 12-24 hours), corresponding to a little cell growth and allows the cells to recover from trypsinization. Then, cells entered in exponential growth in the 2-8 days, corresponding to log phase (6 days), in which the number of cells increased faster. After high cell proliferation, MSCs entered the third phase, called plateau (8-10 days), stabilization in growth rate was observed. During 10-12 days, decreased the growth likely due cell intrinsic factors (Fig. 2).

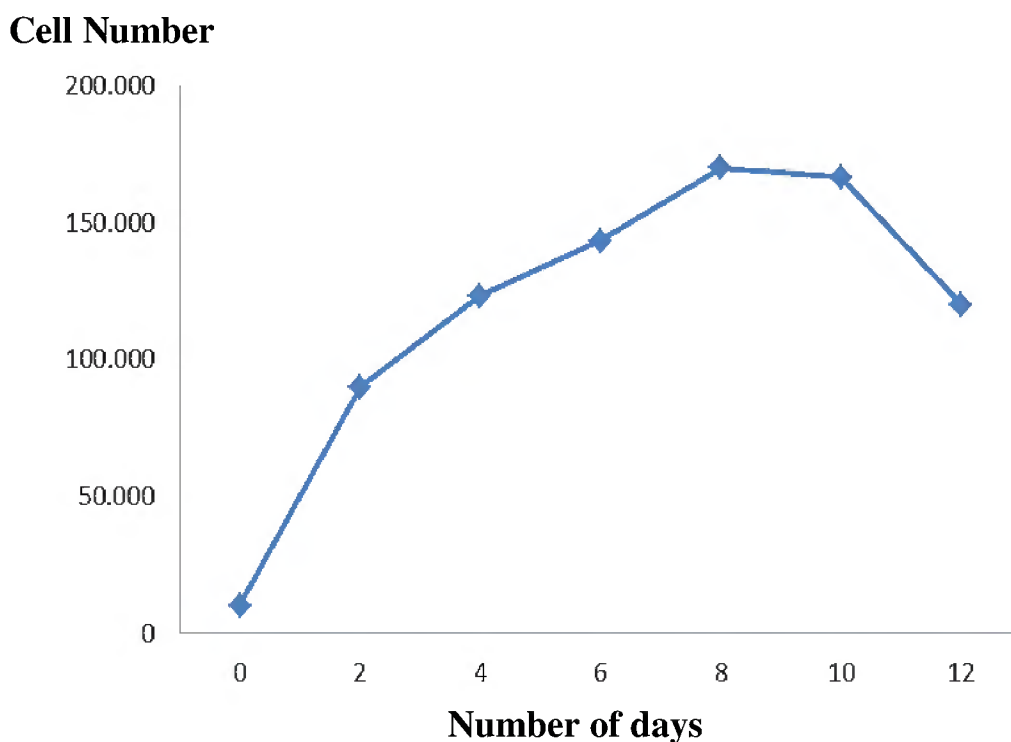


FIG. 2. *Chlorocebus aethiops* ASCs growth curve (cell number vs number of days). Cells were counted every 48 hours for 12 days. Phases of the curve: lag phase (12-24h), log phase (6 days), plateau phase (8-10 days), the decline in the rate of cell growth (10-12 days).

Cellular senescence

C. aethiops ASCs from passage 4 were examined by cellular senescence test, using a β -Gal staining protocol, in which β -Gal is expressed in senescent cells at pH 6.0. An increase in β -Gal staining was observed in cells from the detection cell cytoplasm stained with blue due to the reaction of β -Gal (Fig. 3A). A total cell number, counted at ten different microscopic fields, was 770 cells (Fig. 3B) and senescent cells were 96 (12.5%) (Fig. 3C).

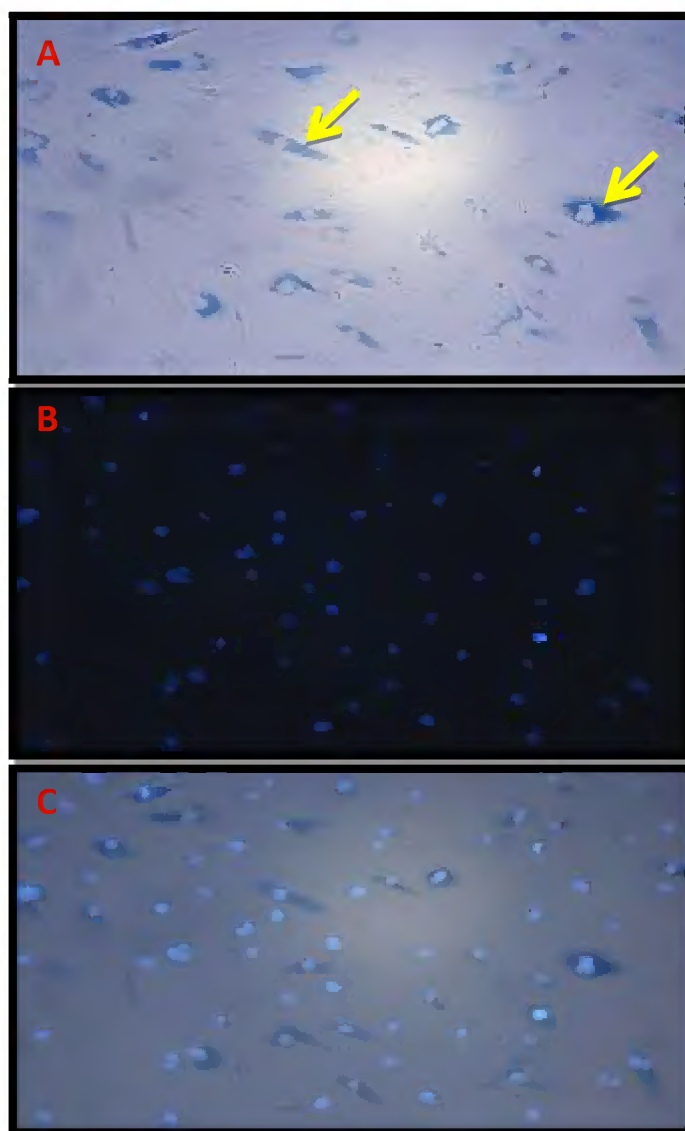


FIG. 3. Senescence in *Chlorocebus aethiops* ASCs detected by β -Gal staining at pH 6.0. (A) Cells with activity of the enzyme β -galactosidase (yellow arrow) at passage 4. (B) MSCs nucleus stained with 10 μ g/mL Hoechst 33342. (C) Overlap of the images A and B. (Original magnification 100x).

Karyotyping of MSCs

C. aethiops ASCs from passage 4 were assessed for integrity of chromosomes. Metaphases spreads of the *C. aethiops* MSCs showed normal karyotype (60chromosomes) (Fig. 4).

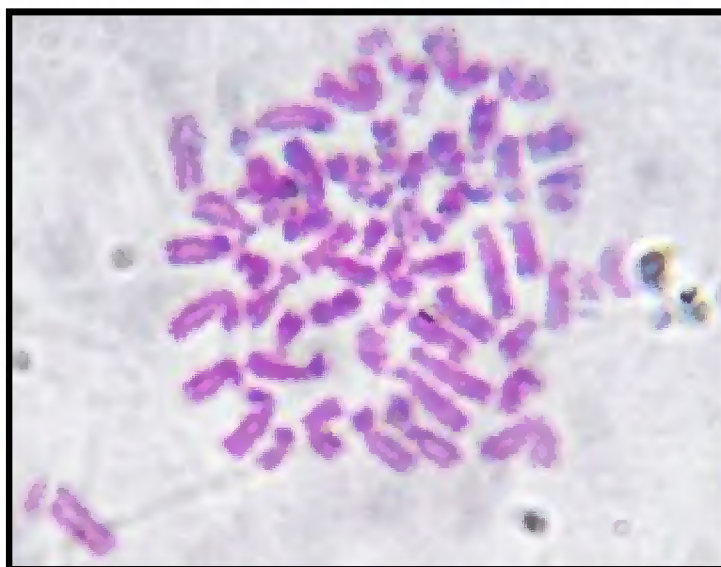


FIG. 4. Normal chromosomal of *Chlorocebus aethiops* ASCs. Metaphase spreads of passage 4 showing diploid number of chromosomes (original magnification 1000x).

Immunophenotyping

Expression of cell surface markers of *C. aethiops* MSCs was evaluated by immunofluorescence at passage 4. These cells were positive for CD73, CD105 and CD90, considered markers for MSCs (Fig. 5A-5I) and negative for CD34, CD45 and CD79, hematopoietic lineages specific markers (Fig. 6A-6F)

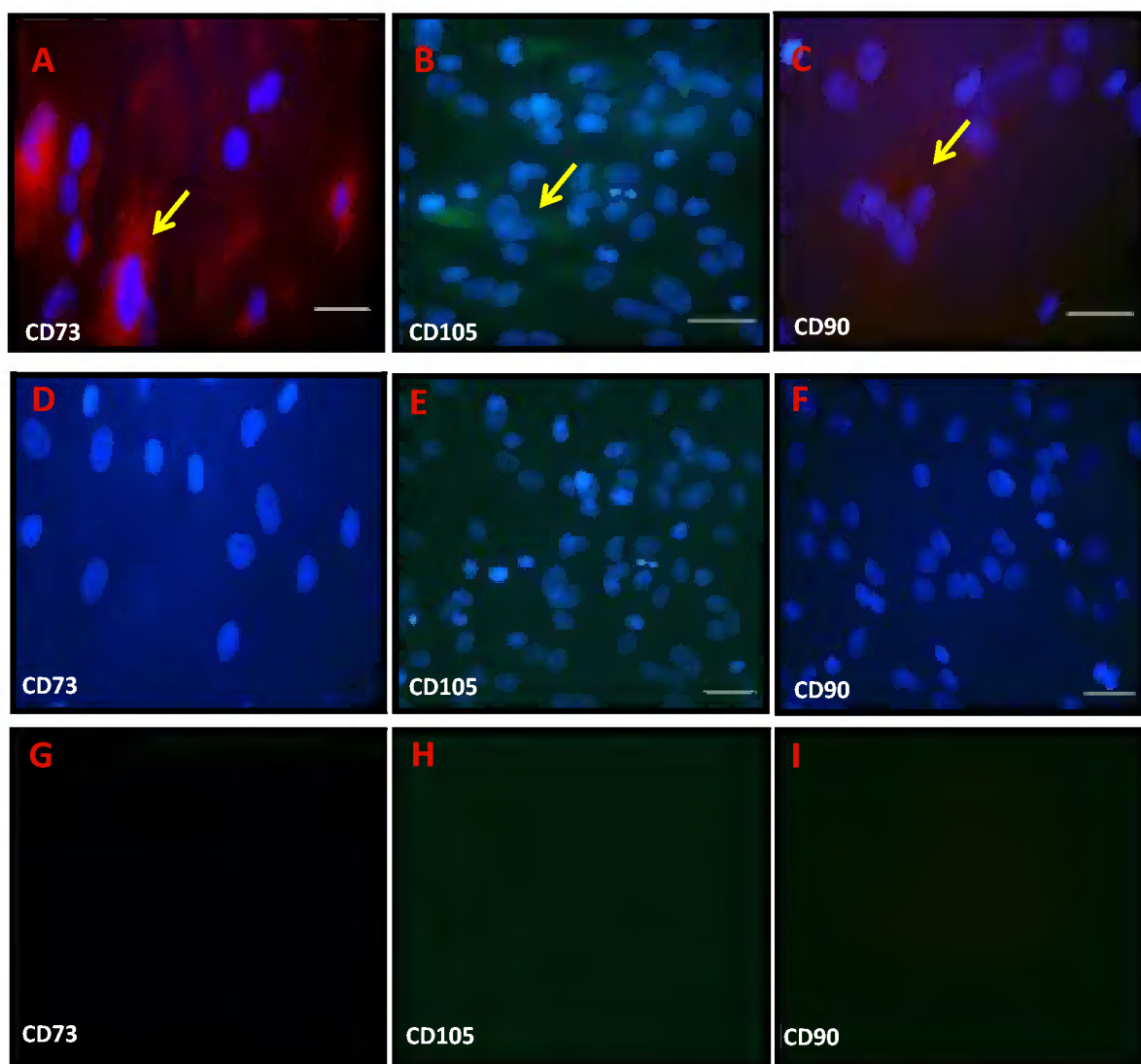


FIG. 5. Immunophenotypic characterization of *Chlorocebus aethiops* ASCs at passage 4. Cell nucleus was stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342. (A, B, C) Immunofluorescent staining of MSCs with CD73, CD105 and CD90, respectively (yellow arrow). (D, G) CD73 negative control group. (E, H) CD105 negative control group. (F, I) CD90 negative control group. Scale bar: in (A-C, E, F) 50 μm for (A-C, E, F, H, I); in (D) 100 μm for (D, G).

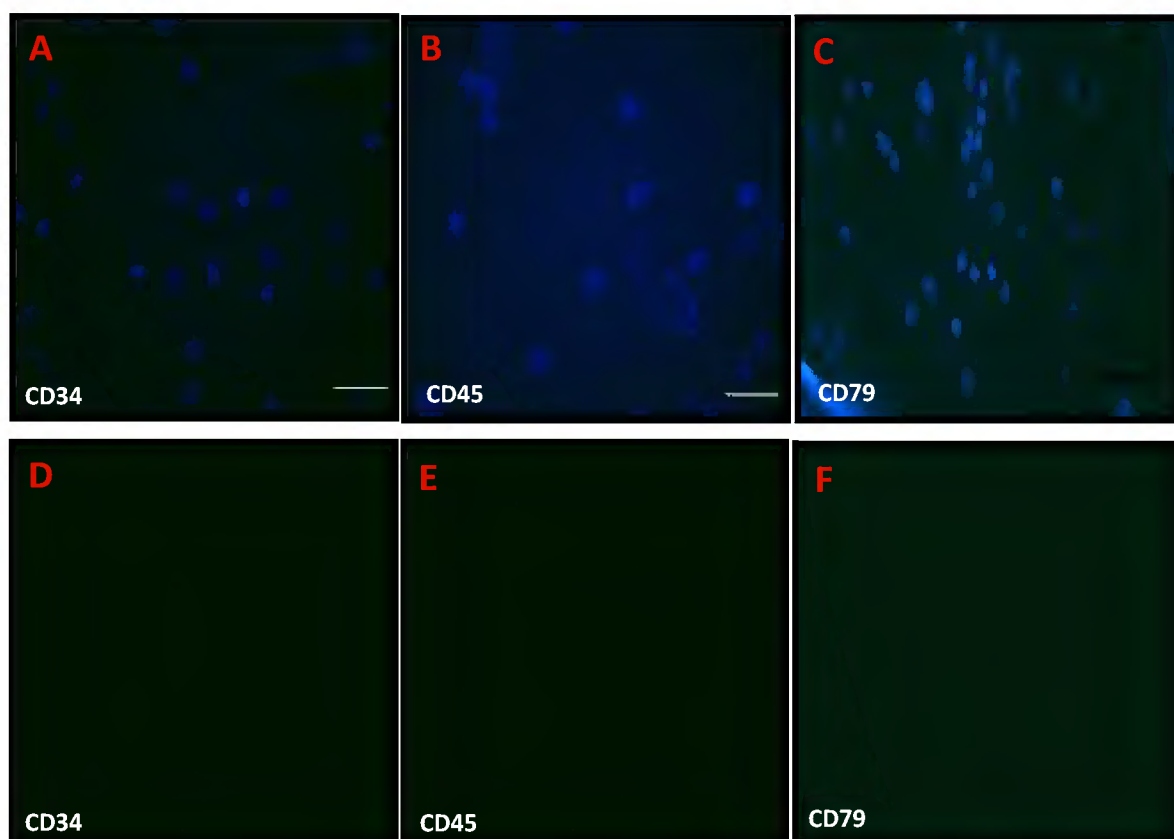


FIG. 6. Immunophenotypic characterization of *Chlorocebus aethiops* ASCs at passage 4. Cell nucleus was stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342. (A, B, C) Immunofluorescent staining of MSCs with CD34, CD45 and CD79, hematopoietic cell markers. (D-F) Negative control group of CD34, CD45 and CD79, respectively. Scale bar: in (A, B) 50 μm for (A, B, D, E); in (C) 100 μm for (C, F).

Differentiation

To confirm the *C. aethiops* MSCs multipotency, cells were differentiated toward the adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages, using lineage-specific induction factors during 21 days each one (Stempro, Gibco). *C. aethiops* ASCs showed intracellular lipids droplets stained in red by Oil Red O (Fig. 7A-7A'). Differentiated chondrocytes cultured in micromass showed blue matrix stained by Alcian Blue, demonstrating the production of proteoglycans (Fig. 7B-7B'). Osteogenic differentiation was confirmed by mineralization of the extracellular matrix, which was demonstrated by calcium-rich deposits when stained by Alizarin Red S (Fig. 7C-7C').

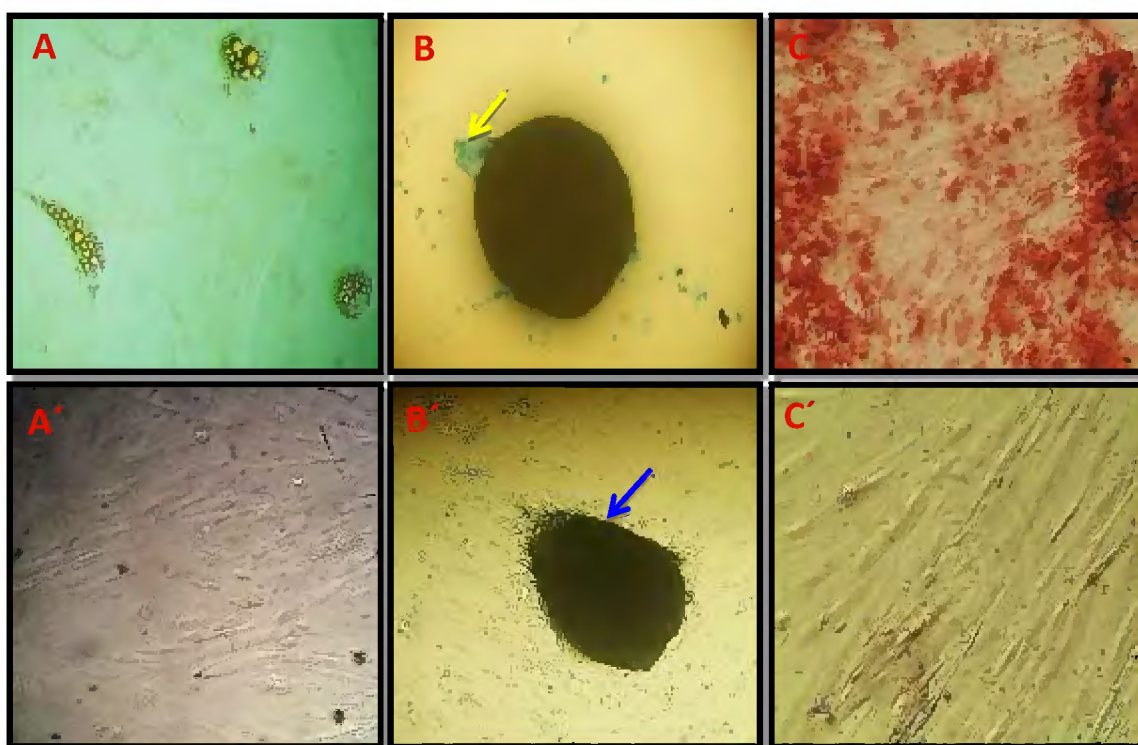


FIG. 7. Cell differentiation of *Chlorocebus aethiops* MSCs after 21 days of induction. (A) Adipogenic differentiation demonstrating red-coloured lipid droplets by Oil Red O staining. (A') Adipogenic cells control group. (B) Chondrogenic differentiation demonstrating blue-coloured extracellular matrix stained by Alcian Blue (yellow arrow). (B') Cells in micromass (blue arrow)- chondrogenic cells-control group. (C) Osteogenic differentiation demonstrating calcium-rich deposits stained by Alizarin Red S. (C') Osteogenic cells control group. (Original magnification 100x).

Discussion

Tissue engineering and regenerative medicine are indicated when the tissue or organ suffers an injury that have involved loss of function, spontaneous regeneration and compensatory mechanisms. Cultured MSCs are an interesting target for use in cell therapy because some advantages, such as absence of problems regarding cellular regulation and ethical conflicts, availability of cells in various organs, collection by non-invasive methods, ease of proliferate and differentiate into several cell lines and possess immunomodulatory and trophic effects, anti-inflammatory properties and low immunogenicity [10, 15].

Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) were firstly isolated in the 70s and have been studied yet in several species for therapeutic applications. However, bone marrow acquisition procedures is very painful, requiring general or spinal anesthesia, possess high morbidity and low recovery of MSCs, approximately one MSC for every 10^5 mononuclear cells, affecting the in vitro proliferation [8]. Thus, Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ASCs) represent an alternative source of SCs and may be collected more easily and security, with minimal patient discomfort and higher cell number, facilitating the expansion in culture [3].

ASCs have been described in many different species to investigate therapeutics effects in several diseases. Nonhuman primates, particularly *Chlorocebus aethiops*, are important animals models useful to cell therapy research due to physiological and phylogenetic similarity. Therefore, there are few reports about the biological properties, cultivation and differentiation of ASCs in this specie [16].

This study demonstrated the isolation, culture, characterization and differentiation potential of *Chlorocebus aethiops* ASCs, which are similar to reports on in vitro expansion of ASCs in other species such as humans [3], mice [17], dogs [18], horses [19] and Rhesus monkey [16, 20].

ASCs expanded easily in vitro and were isolated on the basis of plastic adherence property. Twenty four hours after culture, cells were observed with heterogeneous and flattened morphology. After, adherent cells grew as fibroblast-like cells that further formed symmetric and uniform colonies along the passages. These morphological characteristics are attributed to MSC and were also identified in the pioneering work of Zuk and colleagues in humans [3] and other species, such as Rhesus monkey [16] and rats [21].

Chlorocebus aethiops ASCs exhibited a growth curve characterized by the initial lag phase, followed by exponential log phase and then enter the plateau or stationary phase.

However, cells declined after 10-12 days due likely to cell intrinsic factors. The growth curve obtained for *C. aethiops* showed similarity to other studies using different sources of MSCs, such as goat umbilical cord [24], buffalo amniotic fluid [4], equine [19] and buffalo bone marrow [11].

MSCs have been used in regenerative medicine due to their self-renewal properties, high rate of proliferation, ease of in vitro expansion, multipotent differentiation, immunoregulation and trophic effects. However, despite MSCs proliferate in culture for long passages, after successive cell divisions, they may become senescent. Moreover, the microenvironment in vitro is different from in vivo, causing changes in properties typically observed in vivo due to artificial culture [19].

Senescent cells are characterized by changes in cell morphology (cells become enlarged and flatter), limited capacity to replicate and altered pattern of gene expression. Some studies in humans [22] and mice MSCs [23] demonstrated decrease in the differentiation potential in cultures more prolonged, suggesting that senescent MSCs may be limited in therapeutic applications [24]. However, the cellular senescence occurs naturally in all cells of the body, including SCs in vivo, decreasing the regenerative potential with advancing age [25].

Due to the importance of the analysis of cellular senescence for basic research and cell therapy, *C. aethiops* ASCs were evaluated in this study. The percentage of senescent cells present in culture in the passage 4 (P4) was 12.5%, without chromosomal abnormality. Other studies using humans adipose and bone marrow-derived MSCs also demonstrated percentage of senescent cells in culture at late passages [3, 24].

MSCs can be obtained from a vast source of tissues, therefore these cells are phenotypically very heterogeneous and there is not a surface marker specific and defined. The variable expression of markers may be also due at different cell isolation methods, conditions or phase of culture and the different species [26]. Therefore, the International Society for Cell Therapy (ISCT) has established the minimal criteria to characterization cell surface markers of MSCs, expression of CD73, CD105 and CD90 as positive markers, and CD34, CD45 and CD79 (hematopoietic cell-specific), and as negative markers [34]. This study demonstrated the results of immunophenotypic characterization of *C. aethiops* ASCs were positive for CD73, CD105 and CD90 and negative for CD34, CD45 and CD79, following the minimum criteria required by the ISCT.

The differentiation potential of MSCs in the three mesodermal lineages is extremely important and has also been used as a morphological and functional criterion to characterize

MSCs [11]. Thus, confirmation of differentiation potential of *C. aethiops* ASCs into adipocytes, chondrocytes and osteocytes indicates the multipotency of these cells.

The plasticity of ASCs has also been reported in other species such as cattle, sheep, horses, human, porcine, canine and Rhesus monkey [16, 27, 28]. Despite MSCs originate from the mesoderm, several reports has proven the transdifferentiation potential of these SCs in neuronal cells [16], hepatocytes [29], pancreatic islets cells [30] and epithelial cells [31]. These characteristics could be attractive for use of MSCs in clinical applications in regenerative medicine.

In conclusion, *C. aethiops* ASCs can be expanded *in vitro*, possess potential for self-renewal, proliferation, differentiation in mesodermal lineages, karyotype conservation and expression of MSCs-specific cell surface markers. These features have clinical relevance for the possibility of these cells serve as a tool for the investigation of therapeutic effects in several diseases in this specie and humans.

Acknowledgments

We thank association with Laboratory of Tissue Culture and Cytogenetics (Evandro Chagas Institute) and Laboratory of In Vitro Fertilization and Laboratory of Cytogenetics, both of Federal University of Pará. This work was supported by CNPq and CAPES.

Authors Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Ding D-C, W-C Shyu and S-Z Lin. (2011). Mesenchymal Stem Cells. Cell Transplantation 20: 5–14.
2. Friedenstein AJ, UF Deriglazova, NN Kulagina, AF Panasuk, SF Rudakowa, EA Luriá and IA Ruadkow. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 2: 83–92.
3. Zuk PA, M Zhu, H Mizuno, J Huang, JW Futrell, AJ Katz, P Benhaim, HP Lorenz and MH Hedrick. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7 (2): 211-28.
4. Dev K, SK Giri, A Kumar, A Yadav , B Singh and SK Gautam. (2011). Derivation, Characterization and Differentiation of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Amniotic Fluid Derived Stem Cells. Reproduction in domestic animals.
5. Si Y, Y Zhao, HJ Hao, XB Fu and WD Han. (2011). MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. Ageing Research Reviews 10: 93–103.
6. Kern S, H Eichler, J Stoeve, H Klüter and K Bieback. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells 24: 1294–1301.
7. Oedayrajsingh-Varma MJ, SM Van, M Knippenberg, MN Helder, J Klein-Nulend, TE Schouten, MJ Ritt and FJ van Milligen. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue harvesting procedure. Cytotherapy 8: 166-77.
8. Tobita M, H Orbay and H Mizuno. (2011). Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. Discov Med 11(57):160-70.
9. Lim, J-H, L Boozer, CL Mariani, JA Piedrahita, NJ Olby. Generation and characterization of neurospheres from canine adipose tissue-derived stromal cells. Cellular Reprogramming 12 (4). 2010.
10. Ankrum J and JM Karp. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: two steps forward, one step back. Trends Mol. Med. (Epub ahead of print).
11. Gade NE, MD Pratheesh, A Nath, PK Dubey, Amarpal, B Sharma, G Saikumar and GT Sharma. (2012). Molecular and Cellular Characterization of Buffalo Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Reprod Dom Anim.

12. Wolf DP, HC Kuo, KY Pau and L Lester. (2004a). Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. Biol Reprod 71: 1766–1771.
13. Wolf DP, S Thormahlen, C Ramsey, RR Yeoman, J Fanton and S Mitalipov. (2004b). Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. Biol Reprod 71: 486-493.
14. Sasaki M, O Honmou, C Radtke, JD Kocsis. (2011). Development of a Middle Cerebral Artery Occlusion Model in the Nonhuman Primate and a Safety Study of I.V. Infusion of Human Mesenchymal Stem Cells. Plos One 6: Issue 10.
15. Gimble JM, AJ Katz, A Bruce and Bunnell. (2007). Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. Circ Res 100:1249-1260.
16. Kang SK, LA Putnam, J YLOSTALO, IR POPESCU, J DUFOUR, A BELOUSOV and BA BUNNELL. (2004). Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. Journal of Cell Science 117 (18).
17. Kang, SK, DH Lee, YC Bae, HK Kim, SY Baik and JS Jung. (2003). Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. Exp. Neurol 183, 355-366.
18. Neupane M, CC Chang, M Kiupel and V Yuzbasiyan-Gurkan. (2008). Isolation and Characterization of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Tissue Engineering 14 (6).
19. Ranera B, AR Remacha, S Álvarez-Arguedas, A Romero, FJ Vázquez, P Zaragoza, I Martín-Burriell and C Rodellar. (2012). Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. BMC Veterinary Research 8:142.
20. Gagliardi C and BA Bunnell. (2011). Isolation and culture of rhesus adipose-derived stem cells. Methods Mol Biol 702: 3-16.
21. Liu G-B, Y-X Cheng, Y-K Feng, C-J Pang, Q Li, Y Wang, H Jia and X-J Tong. (2011). Adipose-derived stem cells promote peripheral nerve Repair. Arch Med Sci 7, 4: 592-596.
22. Noer A, AC Boquest and P Collas. (2007). Dynamics of adipogenic promoter DNA methylation during clonal culture of human adipose stem cells to senescence. BMC Cell Biol 8: 18.
23. Kretlow JD, Y-Q Jin, W Liu, WJ Zhang, T-H Hong, G Zhou, LS Baggett, AG Mikos and Y Cao. (2008). Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. BMC Cell Biology 9:60.

24. Wagner W, P Horn, M Castoldi, A Diehlmann, S Bork, R Saffrich, V Benes, J Blake, S Pfister, V Eckstein and AD Ho. (2008). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. PLoS ONE 3, Issue 5.
25. Wagner W, S Bork, P Horn, D Kronic, T Walenda, A Diehlmann, V Benes, J Blake, F-X Huber, V Eckstein, P Boukamp and AD Ho. (2009). Aging and Replicative Senescence Have Related Effects on Human Stem and Progenitor Cells. PLoS ONE 4, Issue 6.
26. Bydlowski SP, AA Debes, LMF Maselli, EFL Janz. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 31(Supl. 1): 25-35.
27. Strem BM, KC Hicok, M Zhu, I Wulur, Z Alfonso, RE Schreiber, JK Fraser and MH Hedrick. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stemcells. Keio Journal of Medicine 54 (3) 132–141.
28. Lee JH and DM Kemp. (2006). Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (3): 882–888.
29. Seo MJ, SY Suh, YC Bae and JS Jung. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications 328 (1) 258–264.
30. Moshtagh PR, SH Emami and AM Sharifi. (2012). Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: an in vitro study. Journal of Physiology and Biochemistry.
31. Baer PC and H Geiger. (2012). Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. Stem Cells International.

ANEXOS



Figura 1: Procedimento de coleta do tecido adiposo de *Chlorocebus aethiops*. A) Tricotomia do flanco esquerdo. B) Antissepsia da região. C) Incisão subcutânea de 2 a 3 cm no flanco esquerdo. D) Obtenção da biópsia do tecido adiposo.

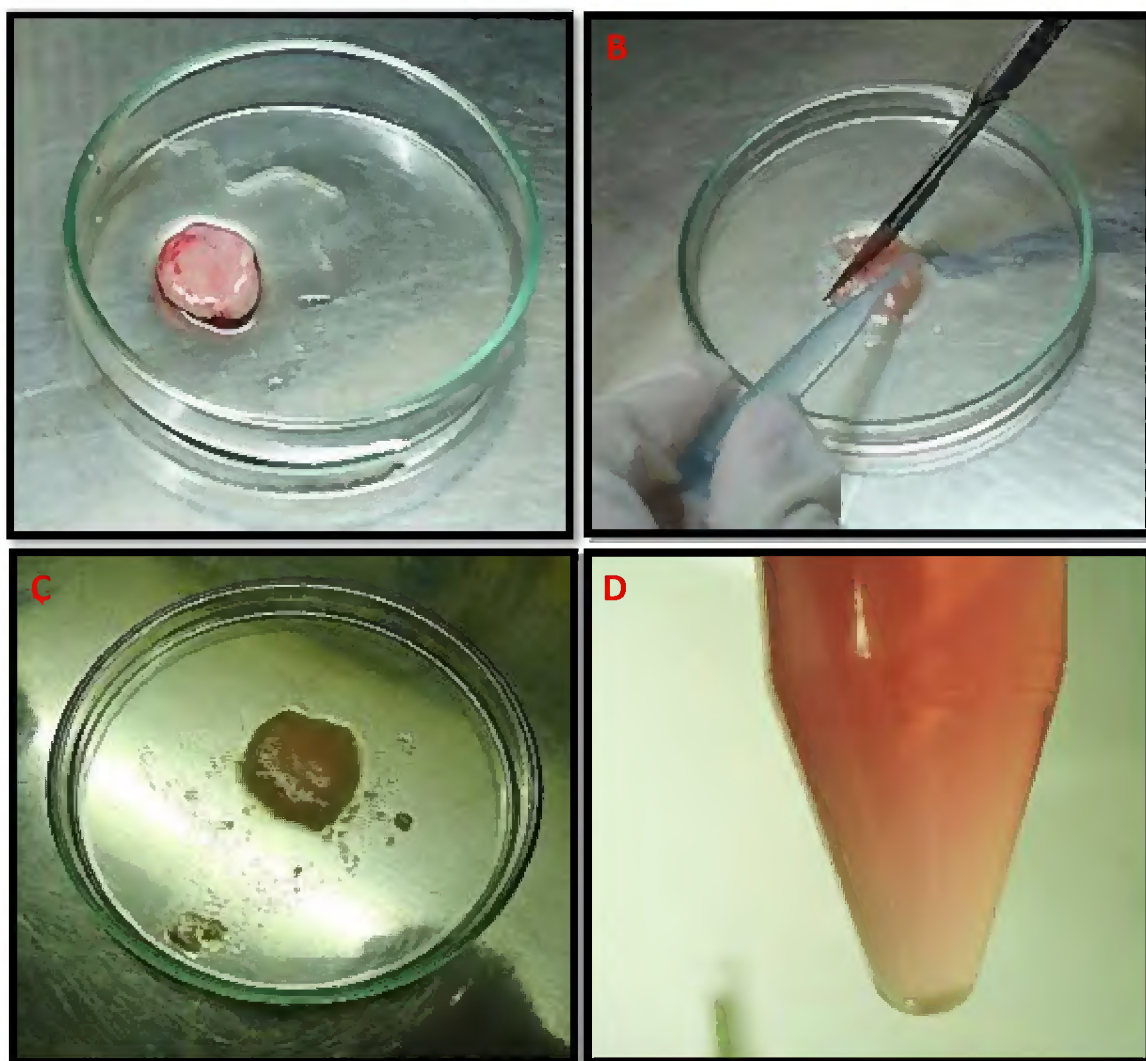


Figura 2: Procedimento de isolamento de células-tronco obtidas a partir do tecido adiposo subcutâneo da região do flanco de *Chlorocebus aethiops*. **A)** Lavagem extensiva da biópsia de tecido adiposo em PBS, contendo 50 µg/mL de gentamicina. **B)** Processo de maceração da amostra com auxílio de lâmina de bisturi. **C)** Formação de massa homogênea, após a maceração, para a digestão enzimática com collagenase tipo 1 (1 mg/ml) durante 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ em ar. **D)** Pellet, contendo a fração vascular estromal (SVF) do tecido adiposo, obtido após centrifugação a 200 g por 5 minutos em DMEM.