



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
CENTRO NACIONAL DE PRIMATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL

LUIS GUSTAVO RODRIGUES CARDOSO

**“MACACO DA NOITE (*Aotus azarai infulatus*) COMO MODELO BIOLÓGICO  
PARA ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO ADIPOSEO”**

**BELÉM**

**2015**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL

LUIS GUSTAVO RODRIGUES CARDOSO

**“MACACO DA NOITE (*Aotus azarai infulatus*) COMO MODELO BIOLÓGICO  
PARA ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO ADIPOSEO”**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Rita de Lima**

**BELÉM**

**2015**

---

Cardoso, Luis Gustavo Rodrigues

Macaco da noite (*Aotus azarai infulatus*) como modelo biológico para estudos com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. / Luis Gustavo Rodrigues Cardoso. - Belém, 2015.

66 f.: Il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Ana Rita de Lima

1. *Aotus azarai infulatus* 2. Tecido adiposo 3. Células-tronco 4. Mesenquimais I. Lima, Ana Rita de, Orient. II. Título.

CDD – 599.871633

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
CENTRO NACIONAL DE PRIMATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL DA  
AMAZÔNIA

LUIS GUSTAVO RODRIGUES CARDOSO

**“MACACO DA NOITE (*Aotus azarai infulatus*) COMO MODELO BIOLÓGICO  
PARA ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE  
TECIDO ADIPOSEO”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal da Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

DATA DE APROVAÇÃO

FEVEREIRO 2015

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Rita de Lima- Presidente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira- 1º Examinador  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Edna Cristina Santos Franco- 2º Examinador  
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Guerreiro Giese- 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Erika Renata Branco- Suplente  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

## **EPIGRAFE**

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

(Charles Chaplin)

“O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”.

(Albert Einstein)

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, meu pai, meus irmãos, sobrinhas e cunhados. Por sempre acreditarem em mim, e pelo amor durante esses longos 25 anos. Agradeço a vocês por tudo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois é nele que me amparo para seguir em frente a cada dificuldade encontrada em meu caminho.

À Profª Drª Ana Rita de Lima, pelas orientações, paciência, ajudas, dúvidas que foram tiradas até aqui e “puxões de orelha”. Obrigado pelos ensinamentos.

À Profª Drª Érika Branco pelos ensinamentos de protocolos, dúvidas esclarecidas e pela sua dedicação.

À MSc Klena Sarges Marruaz da Silva pela coleta realizada e sempre disponibilizando seu tempo para me ajudar quando precisei.

A todos os integrantes do Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética–SAMAM/IEC, especialmente ao Prof. Dr. Edivaldo Herculano de Oliveira e à Profª MSc Maria de Fátima que nos receberam de braços abertos. E também ao MSc Michel Platini que sempre me ajudou quando precisei.

À Universidade Federal Rural da Amazônia e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Profª Drª Edna Franco pela colaboração, ajuda e por permitir a execução de uma parte do meu experimento em seu laboratório de Imunopatologia Experimental da SAARB/IEC.

Ao Prof. Dr. Moysés Miranda pela colaboração e ajuda cedendo parte de seus Kits de diferenciação para que fosse possível o andamento do projeto. Obrigado

E à toda minha família: mãe, pai, irmão, sobrinhas, namorada e amigos que direta ou indiretamente contribuíram e contribuem para o meu crescimento profissional.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *Aotus azarai infulatus*. Fonte: <http://www.planet-mamiferes.org>.....16
- Figura 2.** Grupo de *Aotus azarai infulatus* no Centro Nacional de Primatas. Fonte: <http://www.planet-mamiferes.org>.....19
- Figura 3.** Representação esquemática mostrando o potencial de diferenciação das CTM. Fonte: <http://www.regeneravet.com.br/novo/index.php/cientifico/celulas-tronco>.....20
- Figura 4.** Representação esquemática da divisão celular simétrica e assimétrica das células-tronco.....21
- Figura 5.** Representação esquemática da origem de células-tronco embrionária. Fonte: <http://www.lance-ufjf.org/ceacutelulas-tronco.html>.....22
- Figura 6.** Representação esquemática da origem de células tronco embrionárias e células-tronco adultas. Fonte: <http://www.clinicasaadi.com.br/sistema-cardiovascular/procedimentos-e-intervencoes/celulas-tronco>.....23
- Figura 7.** Representação esquemática mostrando as principais linhagens celulares para que uma célula seja considerada Célula-Tronco. Fonte: <http://www.bebevida.com>.....25
- Figura 8.** Desenho esquemático mostrando a formação do tecido adiposo. Fonte: <http://www.lance-ufjf.org>.....26
- Figura 9.** Padrão de curva de crescimento celular, mostrando as fases de adaptação celular (Lag); fase exponencial (Log), onde a proliferação celular é máxima; fase estacionária (Platô), na qual não há aumento do número de células; fase de morte celular, quando as células começam a morrer. Fonte: <http://www.uol.com.br/fisiologia-e-crescimento-celular>.....28
- Figura 10.** Contenção do *Aotus azarai infulatus* para a colheita de tecido adiposo. Fonte: Arquivo pessoal.....32
- Figura 11.** Mister Frost. Aparelho utilizado para o armazenando de criotubo para o congelamento. Fonte: Arquivo Pessoal.....34
- Figura 12.** Curva de crescimento celular realizadas para as CTDTA de *Aotus azarai infulatus* para as passagens P1 a P5 (número de células x número de dias). As células foram contadas a cada 48 horas durante 12 dias.....41
- Figura 13.** Viabilidade após descongelamento e entre passagens de CTDTA. Comparando as criopreservadas e não criopreservadas percebe-se que não houve diferença significativa em sua viabilidade ( $P < 0.05$ ).....42



**Figura 14.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*, em cultivo *in vitro*. (A) Células apresentando morfologia em formato de fibroblastos (fibroblast-like) com 72 horas de cultivo. (A') As mesmas células apresentando confluência de 95%.....43

**Figura 15.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo em passagem P2 mostrando as medições (comprimento total e do núcleo), morfologia semelhante a fibroblastos e sem alterações morfológicas.....44

**Figura 16.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*, em cultivo *in vitro*. (A) Células em P1 apresentando aspecto de fibroblasto, tamanho menor e pouco achatadas. (A') Células em P8, apresentando morfologia semelhante a fibroblastos, porém mais largas e mais achatadas.....45

**Figura 17.** Diferenciação celular das células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*. (A) Diferenciação condrogênica mostrando a matriz extracelular de coloração azul através do Alcian Blue. (A') Grupo controle da diferenciação condrogênica. (B) Diferenciação adipogênica mostrando o acúmulo intracelular de gotículas lipídicas através da coloração com Oil Red. (B') Grupo controle da diferenciação Adipogênica. (C) Diferenciação osteogênica mostrando uma matriz extracelular rica em cálcio através da coloração com Alizarin Red. (C') Grupo controle da diferenciação Osteogênica.....46

**Figura 18.** Análise cariotípica da fêmea de *Aotus azarai infulatus* através de coloração convencional.  $2n=51$ .....47

**Figura 19.** Análise cariotípica da fêmea de *Aotus azarai infulatus* através da técnica em bandeamento G.  $2n=51$ .....48

**Figura 20.** Fotomicroscopia da caracterização imunocitoquímica das células-tronco mesenquimais de medula óssea de *Aotus azarai infulatus*. (A) Fenótipo para CD34; (B) Fenótipo para CD79 Alfa; (C) Fenótipo para CD45; (D) Grupo controle. (E) Fenótipo para CD73. (F) Fenótipo para CD90; (G) Fenótipo para CD105; (H) Grupo controle.....49

## LISTA DE ABREVIACOES

- CTs:** célula-tronco
- CTE:** célula-tronco embrionária
- CTA:** célula-tronco adulta
- CTM:** célula-tronco mesenquimal
- CTH:** célula-tronco hematopoiética
- FVE:** frao vascular estromal
- CTDTA:** célula-tronco derivada de tecido adiposo
- AVC:** acidente vascular cerebral
- SNC:** sistema nervoso central
- CMO:** células de medula óssea
- CENP:** Centro Nacional de Primatas
- IEC:** Instituto Evandro Chagas
- PBS:** phosphate buffered saline
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO:** dimetilsufxido
- SBF:** soro bovino fetal
- PFA:** paraformaldeído
- KCL:** cloreto de potássio
- CO<sup>2</sup>:** dióxido de carbono
- DAB:** diaminobenzidina
- B-gal:** beta-galactosidase
- ISCT:** International society for cellular therapy
- CEUA:** Comitê de tica no Uso de Animais

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>14</b>
<b>1.CONTEXTUALIZAÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1.1. O <i>Aotus azarai infulatus</i> .....	17
1.1.2. Células-tronco.....	19
1.1.3. Células-Tronco Embrionárias (CTE).....	21
1.1.4. Células-Tronco Adultas (CTA).....	23
1.1.5. Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo.....	25
1.1.6. Cultivo Celular.....	27
<b>2.MACACO DA NOITE (<i>Aotus azarai infulatus</i>) COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE.....</b>	<b>29</b>
2.1. INTRODUÇÃO.....	29
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.2.1. Aspectos legais, de bioética e biossegurança.....	30
2.1.2. Animais usados como modelo experimental.....	31
2.1.3. Coleta do Tecido Adiposo.....	31
2.1.4. Isolamento e Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo .....	32
2.1.5. Criopreservação.....	33
2.1.6. Morfologia celular.....	34
2.1.7. Viabilidade e Quantificação Celular.....	35
2.1.8. Curva de Crescimento Celular.....	35
2.1.9. Análise do cariótipo.....	36
2.1.10. Imunocitoquímica.....	37
2.1.11. Diferenciação celular.....	37
2.1.11.1. Condrogênese.....	37

2.1.11.2. Adipogênese.....	38
2.1.11.3. Osteogênese.....	38
2.1.12- Análise dos resultados.....	39
<b>2.3 RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
2.3.1. Curva de crescimento.....	40
2.3.2. Viabilidade das CTDTA após o descongelamento e entre as passagens...42	
2.3.3. Morfologia celular.....	43
2.3.4. Diferenciação Celular.....	45
2.3.5. Análise do Cariótipo.....	47
2.3.6. Imunocitoquímica.....	48
<b>2.4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>2.5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>61</b>

## RESUMO

Células-tronco mesenquimais (CTMs) são caracterizadas por serem células indiferenciadas que possuem como principais características a capacidade de autorenovação, alto potencial de proliferação e diferenciação em diversos tecidos. São facilmente isoladas *in vitro*, apresentando morfologia semelhante a fibroblastos e devem apresentar a capacidade de realizarem *in vitro* a diferenciação condrogênica, osteogênica e adipogênica, assim como serem positivas para CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD79 $\alpha$ . O presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus* KUHL-1820, oriundos do Centro Nacional de Primatas (CENP)- Ananindeua, PA. Acredita-se que tal espécie animal possui características que lhes permitem ser um excelente modelo biológico para estudos com fins de terapia celular, objetivou também analisar a curva de crescimento celular, porcentagem da viabilidade celular, antes e após a criopreservação, realizar análises morfológicas, testes imunocitoquímicos e a análises do cariótipo. As células foram isoladas por digestão enzimática com colagenase tipo IV e cultivadas *in vitro*. Os resultados mostraram que as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo possuem elevada capacidade de proliferação se expandindo rápido nas garrafas de cultivo, apresentaram viabilidade em média acima de 90% e não apresentou diferença significativa quando se comparou células submetidas à criopreservação com células não criopreservadas. Apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos e uma cinética de crescimento esperada para esse tipo de célula, foram positivas para CD105, CD73, e CD90 e negativa para CD34, CD79 $\alpha$  e CD45. Na análise cariotípica foi observado um rearranjo em heterozigose no par 3, no qual um dos cromossomos sofreu uma fissão cêntrica, originando dois acrocêntricos, sugerindo que o mesmo é uma alteração constitucional do animal analisado, sugerindo que o mesmo seja híbrido entre dois citótipos diferentes. As células responderam de maneira positiva para a diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica, comprovando sua multipotencialidade. Conclui-se, através dos resultados obtidos, que os testes básicos necessários para que uma célula seja considerada célula-tronco mesenquimal foram positivos nestes experimento, induzindo que a espécie *Aotus azarai infulatus* pode servir como excelente modelo biológico em estudos utilizando células-tronco mesenquimais e terapia celular

Palavra-chave: *Aotus azarai infulatus*; Tecido adiposo; Células-tronco mesenquimais

## **ABSTRACT**

The Mesenchymal Stem Cells (MSCs) are characterized by undifferentiated cells that have the main characteristics self-renewal, high potential for proliferation and differentiation in many tissues. The Mesenchymal Stem Cells are easily isolated in vitro, with fibroblast-like morphology and should exhibit the ability to perform in vitro chondrogenic, adipogenic and osteogenic differentiation, as well as being positive for CD105, CD73, and CD90 and negative for CD45, CD34, CD79 $\alpha$ . This study aims to evaluate the potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells of *Aotus azarai infulatus* KUHL-1820, obtained from the National Primate Center (CENP) - Ananindeua, PA. It is believed that this specie has characteristics that allows them to be an excellent biological model for studies of cellular therapy, also examining the cell growth curve, the percentage of cell viability before and after cryopreservation, performing morphological analysis, immunocytochemical tests and karyotype analyzes. The Cells were isolated by enzymatic digestion with type IV collagenase and cultured in vitro. The results showed that Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells has high proliferation capacity expanding fast in bottles of cultivation, showed average viability above 90% and was not significantly different when compared with cells subjected to cryopreservation and not cryopreserved cells . Showed fibroblast-like morphology and growth kinetics expected for this type of cells. Were positive for CD105, CD73, and CD90 and negative for CD34, CD45 and CD79 $\alpha$ . In karyotype analysis showed a rearrangement heterozygous at par 3, in which one of the chromosomes underwent a centric fission, yielding two acrocentric, suggesting that it is a constitutional alteration of the analyzed animal, suggesting that it is hybrid between two different cytotypes. The cells responded positively to the adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation. The results, showed that the basic tests required for a cell to be considered mesenchymal stem cells were positive in these experiments, leading to the *Aotus azarai infulatus* may be an excellent biological model in studies using mesenchymal stem cells and cellular therapy.

**Key-words:** *Aotus azarai infulatus*; Adipose tissue; Mesenchymal Stem Cells

## 1- CONTEXTUALIZAÇÃO

As células-tronco (CTs) são um grupo de células com capacidade de autorenovação, elevado potencial de proliferação e diferenciação em uma ampla variedade de tecidos. São classificadas, de acordo com sua origem, em células-tronco embrionárias (CTE), as quais derivam da massa celular interna dos blastocistos, classificadas como pluripotentes e as células-tronco adultas (CTA), multipotentes e atualmente consideradas uma alternativa para a terapia celular, visto que as CTE levantam muitos questionamentos éticos, políticos e religiosos limitando o uso terapêutico desse tipo de célula-tronco (ZUK et al., 2002).

Outro tipo de células-tronco adultas são as células-tronco mesenquimais (CTM), classificadas como multipotentes e encontram-se em vários tecidos, como o tecido adiposo, cordão umbilical, polpa dentária, medula óssea e apresentam potencial para se diferenciar em células de tecidos mesodérmicos, como os adipócitos, os condrócitos, osteócitos e em tecidos não mesodérmicos, como os hepatócitos, as células pancreáticas endócrinas, os neurônios e as células endoteliais vasculares, apresentando vantagem em comparação com as células-tronco derivadas do estroma da medula óssea, como o fácil método de obtenção dos tecidos (OKAMOTO; YARAK, 2010). Principalmente devido a esta plasticidade, as CTM têm despertado o interesse da comunidade científica no desenvolvimento de estudos pré-clínicos e clínicos que visam à terapia celular e regeneração tecidual (ZHANG et al., 2009).

A terapia celular é a área mais avançada da medicina veterinária e requer a utilização de modelos animais visando o melhor entendimento dos efeitos terapêuticos e também biológicos das CTM. Dentre os modelos mais utilizados em testes pré-clínicos e clínicos utilizando células-tronco estão os primatas, devido sua semelhanças filogenéticas com o homem (WOLF et al., 2004a; 2004b), sendo utilizados principalmente em pesquisas psicológicas, nas indústrias farmacêuticas e em pesquisas biomédicas relacionados às doenças comuns em humanos e à respectiva terapia (SASAKI et al., 2011).

As pesquisas sobre estudos biomédicos utilizando primatas não-humanos estão se tornando cada vez mais numerosos, todavia, ainda há poucos relatos na literatura com relação ao isolamento, cultivo, assim como a aplicação na medicina regenerativa utilizando células-tronco mesenquimais desses primatas, em função principalmente da disponibilidade desses animais para os estudos científicos e seu difícil manejo (DOMINGUES; CALDAS-BUSSIÈRE, 2006).



Por sua importância como modelo animal para o desenvolvimento de pesquisas utilizando células-tronco, torna-se fundamental o estudo sobre isolamento, sua expansão, assim como a diferenciação *in vitro* e capacidade de autorenovação das CTs destes animais (WOLF et al., 2004a), principalmente de espécies pouco estudadas para esses fins como por exemplo o *Aotus azarai infulatus* KUHL,1820 (Figura 1), visto que tais animais são utilizados em laboratórios principalmente para estudos sobre malária, câncer e fisiologia da visão (BAER et al., 1994; DIXSON, 1994; SASAKI et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar a espécie *Aotus azarai infulatus* KUHL-1820 para validá-la como modelo biológico para estudos utilizando células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, contribuindo ainda mais com os dados biológicos desta espécie. Acredita-se que tal espécie animal possui características que lhes permitem ser um excelente modelo biológico para estudos com fins de terapia celular. O estudo realizou a colheita e o isolamento das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, avaliou a curva de crescimento celular, viabilidade celular antes e após a criopreservação, mensuração morfológica das células, avaliação imunocitoquímica, análise do cariótipo e o processo de diferenciação celular.

**Figura 1.** Espécime de *Aotus azarai infulatus*.



**Fonte:** <http://www.planet-mammiferes.org>.



## 1.1.REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1.1. O *Aotus azarai infulatus*

O gênero *Aotus* possui aproximadamente 110 espécies e subespécies encontradas na Amazônia (RYLANDS et al, 2002), 53 dos quais são endêmicas (MACHADO et al, 2005). Atualmente são classificados dentro da família Aotidae, porém já fizeram parte da família “Cebidae” com base na morfologia dentária (TEJEDOR, 1998).

Muitos autores, durante vários anos, consideravam apenas uma espécie no gênero *Aotus*: *Aotus trivigartus* (NAPIER; NAPIER, 1967; HERSHKOVITZ, 1972; WRIGHT, 1981).

Porém, estudos citogenéticos mostraram que na realidade o gênero *Aotus* é constituído por uma população heterogênea diferindo na morfologia e número de cromossomos (WRIGHT, 1981). Rylands et al. (2002), após encontro realizado para a discussão taxonômica dos primatas neotropicais, sugerem a seguinte classificação:

**Reino:** Animalia

**Filo:** Chordata

**Classe:** Mammalia

**Ordem:** Primates

**Família:** Aotidae

**Gênero:** *Aotus*

**Espécie:** *Aotus azarai infulatus*

De acordo com Auricchio (1995) os animais do gênero *Aotus*, usualmente chamados de macaco-da-noite, são de hábitos noturnos e semelhantes aos lêmures do Velho Mundo. São dotados de cabeça arredondada, órbitas oculares e olhos grandes que ocupam grande parte do crânio. Possuem a visão adaptada ao escuro, porém podem diferenciar as cores, o que pode ser um indicativo de ancestralidade com primatas de hábitos diurnos.

Possuem manchas faciais e duas semiluas brancas sobre os olhos separadas por uma faixa preta e a sua pelagem é curta. O dorso varia do marrom ao cinza-avermelhado e o seu comprimento corporal é de aproximadamente 260mm. Possuem hábito arborícola, passam grande parte do dia dormindo e apresentam uma cauda não preênsil de aproximadamente 310 mm e peso ao redor de 1 kg (AURICCHIO, 1995; GREENBERG, 1997).

Segundo Auricchio (1995) sua densidade populacional varia entre 30 a 40 indivíduos por km<sup>2</sup>, sendo sua organização formada por aproximadamente 12 indivíduos que utilizam uma área de aproximadamente seis hectares e seu percurso diário não ultrapassa 400 metros.

Em cativeiro, a maturidade sexual das crias dos macacos-da-noite é tolerada pelos pais que não se opõem à presença de jovens em puberdade, porém em alguns grupos, brigas podem ocorrer quando a maturidade sexual dos jovens se aproxima, entre 18 e 24 meses de idade. Em condições naturais, provavelmente ocorra a emigração desses jovens de seu grupo familiar antes do desencadeamento das agressões (DIXSON, 1994).

Seu período de gestação dura cerca de 130 dias gerando apenas um filhote por ano, com peso de aproximadamente 130 g ao nascer. O filhote é carregado pelo macho, indo à fêmea somente para mamar. O desmame ocorre entre 5 e 12 meses e atingem a maturidade sexual aos 2 anos. Podem viver por aproximadamente 12 anos (AURICCHIO, 1995; GREENBERG, 1997) e não possuem dimorfismo sexual evidente (BAER et al., 1994).

Sua alimentação baseia-se em frutas, insetos, ovos de pequenos vertebrados, pequenos morcegos, filhotes de aves e a sua mandíbula sugere uma ligeira adaptação para alimentação à base de folhas (AURICCHIO, 1995; GREENBERG, 1997).

O *Aotus azarai infulatus* (Figura 2) apresenta cor geralmente cinza com reflexos grisalho-fino, garganta e partes inferiores dos membros amarelo-ocráceo-intenso. Frontes com manchas supra-oculares brancas e três manchas negras, sendo a central um losango maior e as outras como faixas, nunca se juntando à mancha central (RYLANDS et al. 2002).

Sua ocorrência abrange os Estados do Pará e Amazonas, entre os rios Gurupi e Tocantins e margem direita dos Rios Tapajós/ Juruena (AURICCHIO, 1995).

Do ponto de vista biomédico, são considerados excelentes modelos experimentais, sendo utilizados principalmente em estudos pré-clínicos da vacina da malária, em avaliações de drogas, polimorfismos, variação de antígenos parasitas, patologias, estudos sobre câncer, fisiologia da visão e em estudos básicos de seu sistema imune (CARVALHO et al. 2003).

**Figura 2.** Grupo de *Aotus azarai infulatus* no Centro Nacional de Primatas.

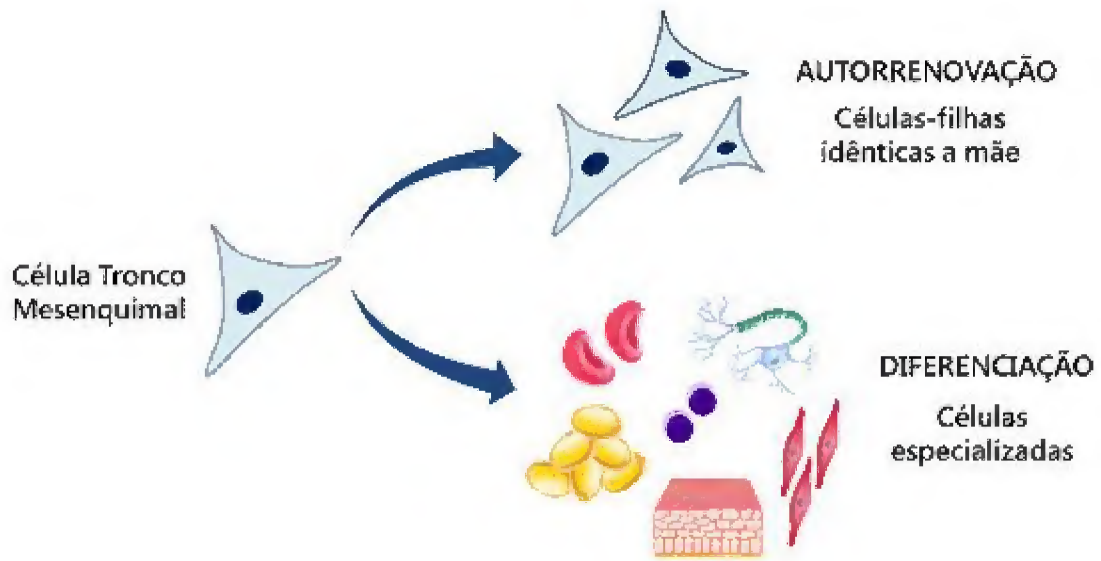


Fonte: <http://www.planet-mammiferes.org>.

### **1.1.2. Células-tronco**

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de autorenovação, elevado potencial de proliferação e também de diferenciação em diversos tecidos (Figura 3). Elas podem se multiplicar, sem que aconteça algum processo de diferenciação, fato pelo qual elas vem despertando cada vez mais o interesse destas células em estudos sobre terapia celular (ZUK et al., 2002; LEMISCHKA, 2005). Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão (BLAU et al. 2001; FODOR, 2003).

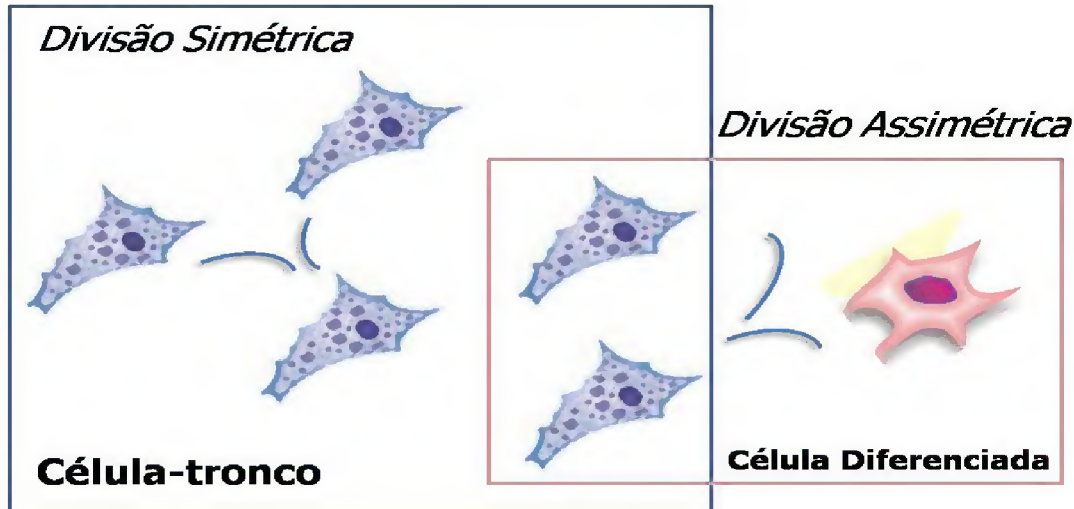
**Figura 3.** Representação esquemática mostrando o potencial de diferenciação das CTM.



**Fonte:** <http://www.regeneravet.com.br/novo/index.php/cientifico/celulas-tronco>.

Segundo Thompson et al. (1998) as células-tronco podem seguir dois tipos de divisão: simétrica e assimétrica (Figura 4). No primeiro caso a célula-tronco gera uma nova célula-tronco (CT) e uma célula progenitora; e no segundo a CT gera células diferenciadas. Esse processo ocorre mantendo a homeostase do tecido e o nicho das CT ativo. Tais nichos são microambientes fisiológicos, constituídos de células especializadas, que tem como função sinalizar e fornecer moléculas da superfície celular para controlar a taxa de proliferação das células-tronco, fator que determina a diferenciação das células progenitoras, protegendo as CT da apoptose.

**Figura 4.** Representação esquemática da divisão celular simétrica e assimétrica das células-tronco.



**Fonte:** <http://www.regeneravet.com.br/novo/index.php/cientifico/celulas-tronco>.

Zannettino et al. (2008) mostrou que essa relação entre as células-troncos e esses nichos ocorre nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário e se mantêm durante a vida adulta, sendo de grande importância para a ontogênese e reparação tecidual.

As células-tronco podem ser divididas em dois tipos, variando de acordo com sua origem e plasticidade. Elas podem ter origem embrionária, quando são isoladas do zigoto ou da massa celular interna do blastocisto, e as adultas que são as CT derivadas do organismo adulto. Em relação à capacidade dessas células em originar tecidos do organismo, as Células-Tronco Embrionárias (CTE) são classificadas como pluripotentes, ou seja, podem derivar os mais de 250 tipos diferentes de tecidos (ZAGO; COVAS, 2006); já as adultas possuem um potencial de diferenciação mais restrito, sendo classificadas como multipotentes e não possuem a capacidade de manter suas propriedades durante muito tempo em cultura e podem ser induzidas à diferenciação com a administração de fatores de crescimento apropriados ou outros sinais externos (WURMSER, 2004).

### 1.1.3. Células-Tronco Embrionárias (CTE)

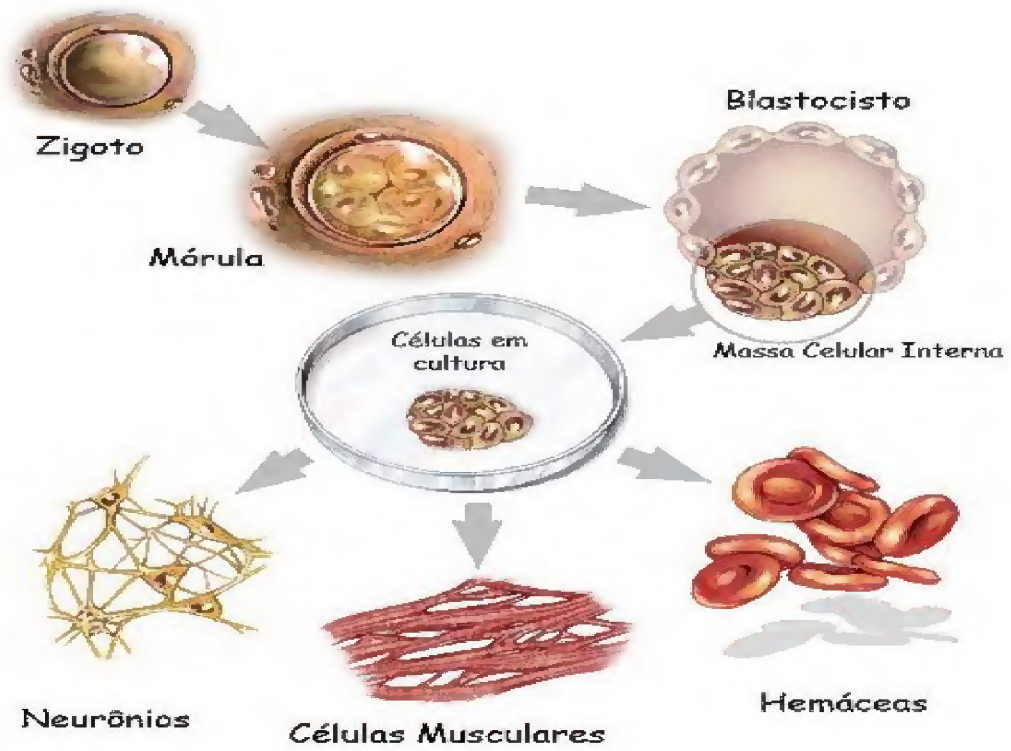
As células-tronco embrionárias (Figura 5) possuem a capacidade de desenvolver todos os tipos diferentes de tecidos, a partir das três camadas germinativas primordiais: ectoderma, mesoderma e endoderma, sendo classificadas como pluripotentes (MUMMERY et al., 2011).

As CTE podem ser obtidas de embriões por meio de técnicas mecânicas ou imunocirurgia e em cultivo *in vitro* crescem em forma de colônias, sendo viáveis durante um



período ilimitado, diferentemente do que ocorre no período em que estão indiferenciadas no desenvolvimento embrionário (MUMMERY et al., 2011).

**Figura 5.** Representação esquemática da origem de células-tronco embrionária.

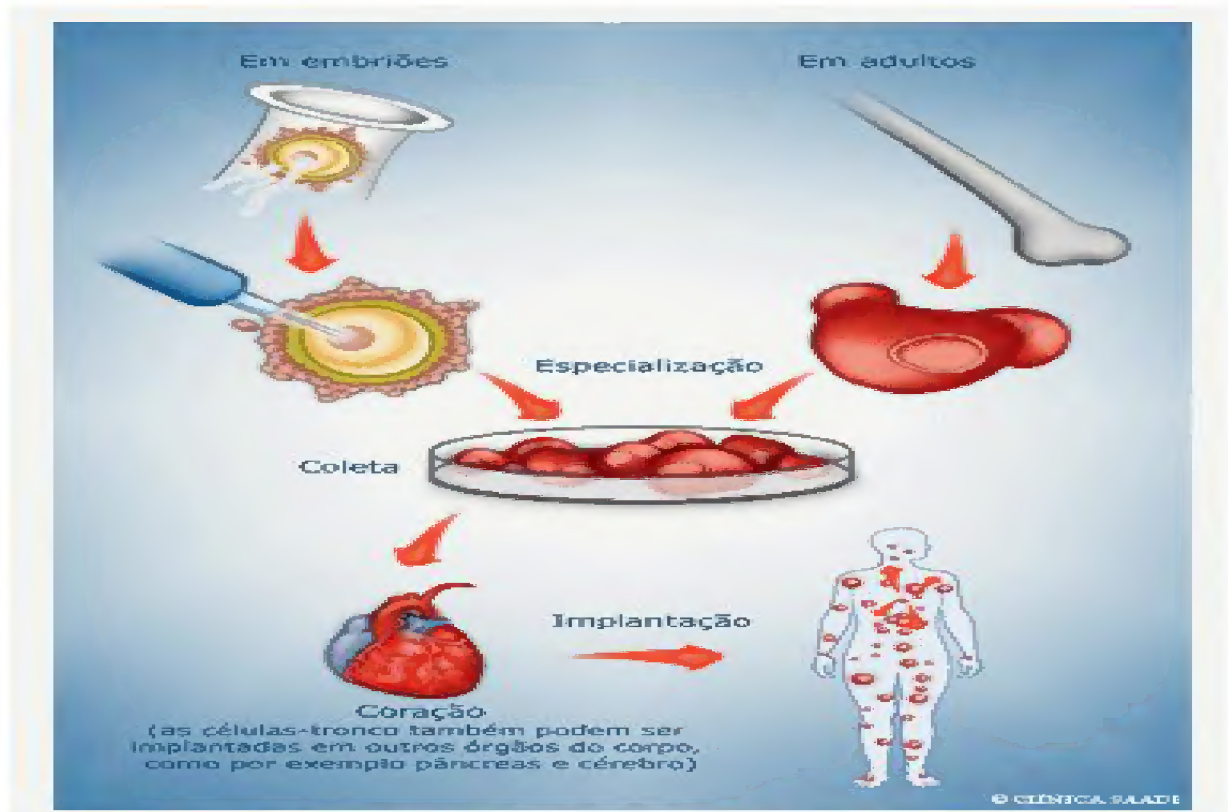


**Fonte:** <http://www.lance-ufrj.org/ceacutelulas-tronco.html>

#### 1.1.4. Células-Tronco Adultas (CTA)

Friendestein foi o primeiro pesquisador a descrever as células-tronco adultas (CTA), (Figura 6) em 1970, quando em seu estudo isolou *in vitro* células estromais da medula óssea de camundongo. Em sua pesquisa, ele demonstrou as características morfológicas, de expansão e de diferenciação celular. Em diferentes condições de cultura, observou-se que as CTA da medula óssea foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (DENNIS, 2002) e com base nessa capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, Caplan propôs, em 1991, o termo “célula-tronco mesenquimal” (CAPLAN, 1991).

**Figura 6.** Representação esquemática da origem de células tronco embrionárias e células-tronco adultas.



**Fonte:** <http://www.clinicasaadi.com.br/sistema-cardiovascular/procedimentos-e-intervencoes/celulas-tronco>.

De acordo com Abdallah e Kassem (2008) e Horwitz et al. (2005), entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco durante a vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada tanto como fonte de células-tronco hematopoéticas (CTH), quanto de células-tronco mesenquimais (CTM). Elas são um grupo de células presentes no estroma medular

capazes de se diferenciarem não somente em células de origem mesodérmica, mas também em outros tipos celulares não mesodérmicos, como os neurais e os hepatócitos.

Atualmente as células-tronco mesenquimais (CTM) são muito utilizadas (SASAKI et al., 2011; RANERA et al., 2012; BEANE et al., 2014; BAER, 2014). Estudos realizados por Meirelles e Nardi (2003), Haynesworth et al. (1996), Majumdar et al. (1998), Romanov et al. (2003) e Campagnoli et al. (2001) demonstraram que as CTM isoladas da medula óssea são capazes de se autorenovar, podendo diferenciar-se em várias linhagens de tecido conjuntivo, ósseo, adiposo e muscular.

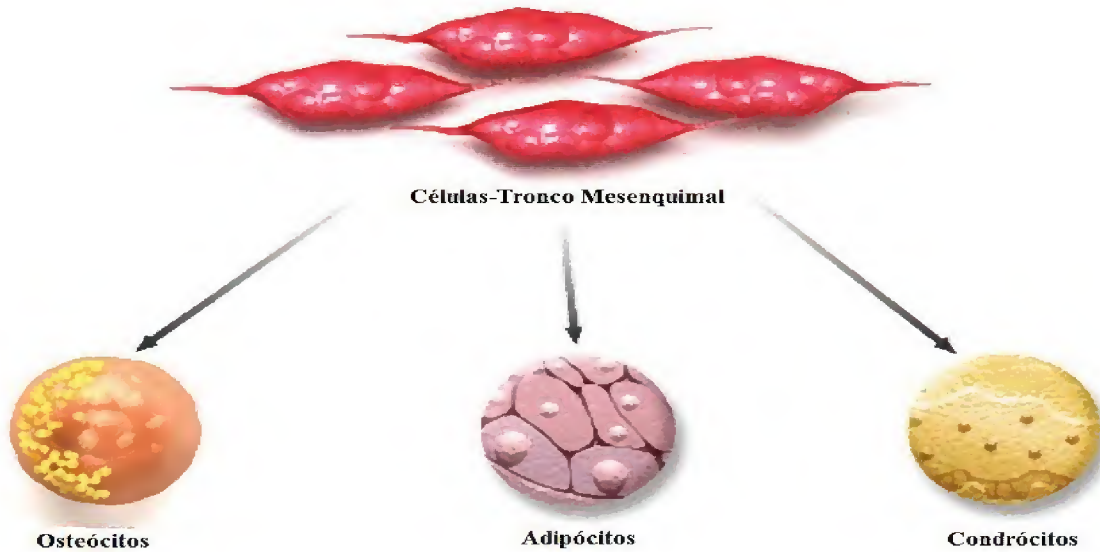
No tecido adiposo, a presença de tais células já havia sido reportada por Zuk et al. (2002) que realizaram estudos comprovando a existência de células-tronco no tecido adiposo humano e compararam o potencial de diferenciação dessas células com o das CTM isoladas da medula óssea. Esse trabalho provou que as células-tronco provenientes do tecido adiposo são semelhantes às células-tronco obtidas da medula óssea (FRASER et al., 2008).

Já se demonstrou que a população de células-tronco derivadas de tecido adiposo digerido com colagenase, também chamada de fração vascular estromal (FVE), é capaz de se diferenciar em diversas linhagens celulares, incluindo tecido adiposo, cartilagem, osso, musculatura esquelética, células neuronais, células endoteliais, cardiomiócitos e células do tecido muscular liso (PITTENGER et al, 1999; CAMPAGNOLI et al., 2001; ROMANOV et al, 2003). O tecido adiposo representa a fonte ideal de células-tronco autólogas, uma vez que sua obtenção é fácil e, muitas vezes, com capacidade proliferativa maior do que a das células derivadas da medula óssea (CASTEILLA et al, 2004).

Segundo a International Society for Cellular Therapy (ISCT), para uma população de células serem consideradas células-tronco devem apresentar alguns pré-requisitos: serem plástico-aderentes quando mantidas em condições de cultura; positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas para CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI et al., 2006) e serem capazes de se diferenciar em tecidos osteogênicos, condrogênicos e adipogênicos (Figura 7).



**Figura 7.** Representação esquemática mostrando as principais linhagens celulares para que uma célula seja considerada Célula-Tronco.



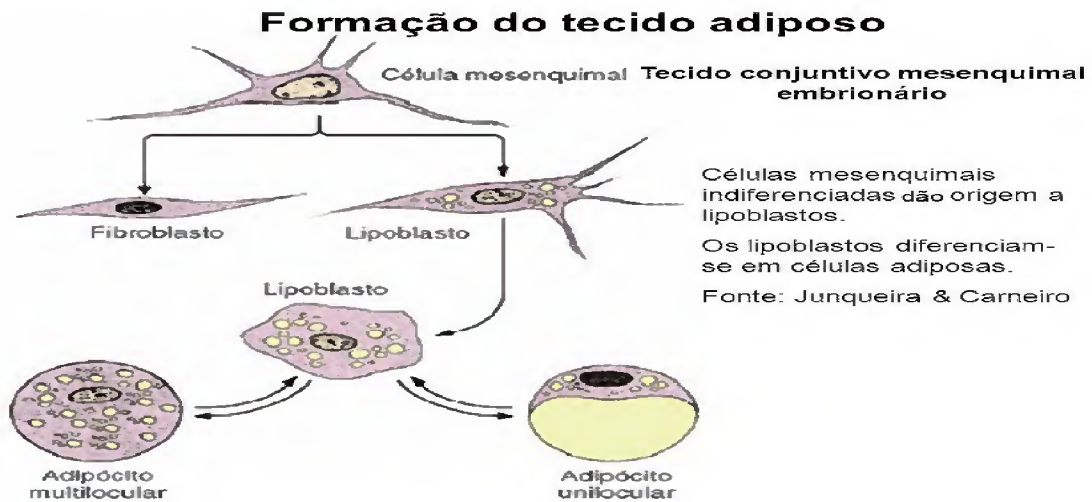
**Fonte:** <http://www.bebevida.com>.

As células-tronco adultas também podem expressar outras proteínas de superfície como: CD44, CD71 (receptor de transferrina), Stro-1, fibronectina, vimentina, CD73 (ecto-5'-nucleotidase, SH3 e SH4), entre outras. Porém, dependendo da fonte da qual são obtidas, métodos de isolamento celular e características da cultura, a expressão desses marcadores pode ocorrer de forma variada.

### 1.1.5. Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo

Dentre as diversas fontes em que podemos encontrar células-tronco mesenquimais (CTM), o tecido adiposo merece maior destaque (Figura 8), pois apresenta mais vantagens quando comparamos a outras fontes por apresentar baixo risco para os doadores, elevado número de CTM (é possível coletar de 100 mL até 1 l de tecido adiposo), apresentam maior frequência de CTM (1 a 10%) em relação, por exemplo, ao estroma da medula óssea e por ser capaz de manter seu potencial proliferativo de oito a dez passagens sem qualquer deterioração detectável em sua capacidade de autorenovação, além da ausência de rejeição imunológica (GRUBER et al, 2012; TOBITA et al. 2011).

**Figura 8.** Desenho esquemático mostrando a formação do tecido adiposo.



**Fonte:** <http://www.lance-ufRJ.org>.

O tecido adiposo é a maior reserva energética do organismo, possuindo 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).

Possui como seus principais constituintes celulares os 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-BAUGIL et al., 2005).

Os primeiros estudos abordando especificamente 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 (FVE), a qual é composta por um grupo de células heterogêneas. Zuk et al. (2001) comprovaram a presença de uma população de CT, de origem mesenquimal, na FVE de tecido adiposo humano, identificando células morfológicamente semelhantes a fibroblastos, com fácil expansão *in vitro* e potencial de diferenciação em células da linhagem mesodérmica: os osteócitos, condrócitos e adipócitos, tornando possível a utilização destas células na regeneração de

tecidos em casos de doenças do sistema musculoesquelético.

As células da FVE heterogêneas obtidas a partir da digestão enzimática da gordura são constituídas por diversas subpopulações de CT, sendo estas células 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, são consideradas multipotente. Após um número maior de passagens, as células tornam-se mais homogêneas e exibem uma morfologia semelhante a fibroblastos, preservando a habilidade proliferativa, o potencial de diferenciação e a estabilidade cromossômica (BAER; GEIGER, 2012).

Com o decorrer das passagens, as CTM podem entrar em processo de senescência celular, fase caracterizada pela presença de células grandes, largas, achatadas, ausência de proliferação celular e expressão de  $\beta$ -galactosidase associada à senescência, podendo apresentar redução do potencial de diferenciação, fato que pode acabar limitando sua utilização na terapia celular (WAGNER et al., 2008).

Com seu rápido crescimento (*in vitro*) e plasticidade das células estromais derivadas do tecido adiposo e as diversas vantagens mostradas, a utilização de células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) tem sido amplamente utilizada por diversos grupos de pesquisa quanto à biologia, caracterização e diferenciação usando CTDTA de várias espécies animais, inclusive de humanos, sendo de suma importância o conhecimento dos mecanismos que regulam a biologia destas células para que seja estabelecido um padrão para o isolamento, caracterização e manipulação, assim como das técnicas utilizadas em laboratórios para o desenvolvimento de terapias cada vez mais eficientes (YARAK; OKAMOTO, 2010).

#### **1.1.6. Cultivo Celular**

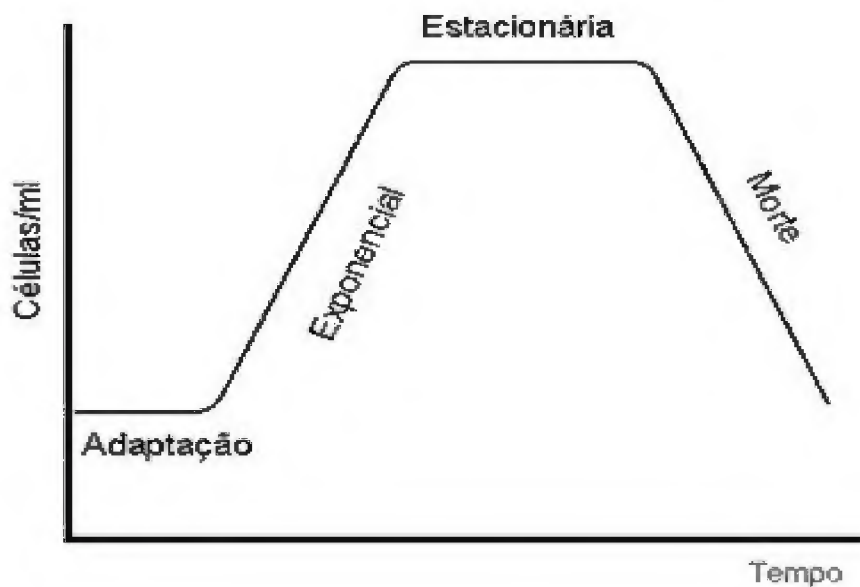
Os primeiros estudos sobre cultivo de células foram feitos por Harrison (1907) e até hoje o uso dessa técnica continua sendo uma importante ferramenta de estudo. O cultivo das células atualmente requer o procedimento de isolamento das células, separação e análise de viabilidade (CASTRO-MALASPINA, 1980; PITTENGER et al, 1999).

A partir dos estudos iniciais utilizando células de tecido adiposo desenvolvido por Rodbell e Jones (1966) cresceu o interesse de vários pesquisadores por este tipo de células. Em cultura, tais células apresentam morfologia semelhantes a fibroblastos, se aderem facilmente às placas de cultura e podem se multiplicar durante várias passagens sem que ocorra algum

processo de senescência celular. Para se manterem viáveis em cultura, são mantidas com meio de cultura geralmente composto por soro bovino fetal (10% a 20%) e meio essencial mínimo (DIGIROLAMO, 1999; MINGUEL et al., 2001).

Quando ao seu crescimento *in vitro*, podemos dividir as células-tronco em três fases: Lag (Adaptação celular), Log (Crescimento exponencial), Platô ou Plateau (Fase estacionária) e morte celular (Células entram em declínio), (Figura 9).

**Figura 9.** Padrão de curva de crescimento celular, mostrando as fases de adaptação celular (Lag); fase exponencial (Log), onde a proliferação celular é máxima; fase estacionária (Platô), na qual não há aumento do número de células; fase de morte celular, quando as células começam a morrer.



**Fonte:** <http://www.uol.com.br/fisiologia-e-crescimento-celular>.

É de suma importância a avaliação da curva de crescimento nas culturas celulares, pois conhecendo o ciclo de crescimento dessas células podemos saber qual a melhor quantidade de células podemos utilizar em determinado experimento, sua duração, qual melhor quantidade de reagentes e meio de cultivo utilizar, assim como o tempo necessário para realizar determinados testes (LÉO, 2008).

Outro fator importante em uma cultura é saber se as células que estão sendo manipuladas não apresentam nenhuma instabilidade genética, visto que *in vitro*, tais células são cultivadas por longos períodos aumentando a chance de desenvolverem anormalidades genéticas (MITALIPOVA et al., 2005). Neste sentido, é importante a realização de vários testes citogenéticos para avaliação do perfil de cada célula que será utilizada, com o objetivo de identificar possíveis alterações cromossômicas (PAYÃO et al., 2009).

## **2- MACACO DA NOITE (*Aotus azarai infulatus*) COMO MODELO BIOLÓGICO PARA ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO**

### **2.1- INTRODUÇÃO**

Os primatas têm sido utilizados como modelos biológicos desde o século XVIII com os trabalhos de Koch e Pasteur, no entanto, foi a partir da metade do século XX que tais animais passaram a integrar o grupo de animais de laboratório. As publicações sobre estudos biomédicos utilizando primatas não-humanos estão se tornando cada vez mais numerosos principalmente no que diz respeito aos estudos envolvendo células-tronco de medula óssea e de tecido adiposo para fins de terapia celular (ANDRADE et al., 2002)

As células-tronco são um grupo de células indiferenciadas que podem ser classificadas, de acordo com sua origem em células-tronco embrionárias ou adultas, sendo as embrionárias encontradas em estágios iniciais pós-fertilização, obtidas a partir da massa celular interna dos blastocistos ou até mesmo por meio de clonagem terapêutica para esse fim (ZUK et al., 2002; WOBUS & BOHELER, 2005).

Em relação às células-tronco adultas, estão incluídas nesse grupo as células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco mesenquimais (CTM), células-tronco neurais, células-tronco da pele, células-tronco derivadas de tecido adiposo dentre outras inúmeras. Dentre as CTs que foram utilizadas durante bastante tempo, estão as de medula óssea, que desde o século passado são utilizadas no tratamento de diferentes doenças que afetam o sistema hematopoiético (SIMINIAK; KURPISZ, 2003).

Durante várias décadas a utilização de células-tronco derivadas da medula óssea foi utilizada, porém pesquisas mais recentes têm utilizado células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo subcutâneo, o que representa uma alternativa de CTM e apresenta vantagem em relação às células-tronco de medula óssea principalmente quanto à facilidade de obtenção, isolamento e apresentam maior número de CTM em relação às CTM de medula óssea (TOBITA et al., 2011; GRUBER et al., 2012).

Acredita-se, assim, que a utilização de um modelo animal como o *Aotus azarai infulatus* pode ajudar bastante em estudos envolvendo a terapia celular, visto que esta espécie do ponto de vista biomédico já são considerados excelentes modelos experimentais, principalmente em estudos pré-clínicos da vacina da malária, avaliações de drogas,

patologias, estudos sobre câncer, fisiologia da visão e estudos sobre seu sistema imune (CARVALHO et al., 2003).

Assim, o presente estudo objetivou a realização da colheita e isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*, avaliação da viabilidade celular antes e após a criopreservação, análises morfológicas, diferenciação celular nas linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, avaliação imunocitoquímica, análise de cariótipo e curva de crescimento celular, com objetivo de chegar até a validação desta espécie como modelo biológico em estudos envolvendo células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e seu uso em terapia celular.

## **2.2- MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1. Aspectos legais, de bioética e biossegurança**

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (CEUA), sob protocolo n° 032/2013 e pelo sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Ministério do Meio Ambiente, sob protocolo n° 47277-1 (Anexo I).

A manipulação dos animais seguiu todos os protocolos e foi realizada seguindo os padrões de biossegurança necessários em biotérios, vedando qualquer propagação de doenças entre animais e no próprio homem (POLITI et al., 2008). Os pesquisadores e técnicos envolvidos no momento de coleta do tecido adiposo utilizaram os equipamentos de proteção individual necessários para a manipulação animal, assim como os equipamentos de proteção coletiva (luvas, máscaras, toucas, roupas adequadas).



### **2.1.2- Animais usados como modelo experimental**

A coleta de tecido adiposo foi realizada no Centro Nacional de Primatas (CENP) do Instituto Evandro Chagas (IEC) localizado no município de Ananindeua, Pará, Brasil (Latitudes 1°38'26" sul e Longitude 48°38'22" oeste), sendo utilizado cinco primatas não humanos da espécie *Aotus azarai infulatus* KUHL, 1820, dos quais foi realizada a coleta do referido tecido. Os animais são identificados por tatuagens e microchip, situados na face medial interna da coxa direita, com as siglas da espécie e por mais três letras. Os animais utilizados foram três fêmeas e dois machos saudáveis. Os animais foram mantidos sob uma dieta a base de frutas, legumes e rações para primatas, assim como água ad libitum. Não houve óbito durante a realização do experimento.

### **2.1.3- Coleta do Tecido Adiposo**

O animal foi sedado com associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (2 mg/Kg, via IM) (Zoletil<sup>®</sup>50- Virbac) (Figura 10), após ser estabelecido jejum sólido e hídrico de 6 horas. Após a sedação, foi realizada tricotomia na região próxima à musculatura coracobraquial e bloqueio anestésico com lidocaína 1% (0,05ml) na região a ser incisada (2 cm<sup>2</sup>). Foi então colhida amostra de tecido adiposo subcutâneo, sendo este armazenado e transportado em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e antibióticos para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética da Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas para processamento.

Após a biópsia, o animal recebeu medicação analgésica a base de cetoprofeno (2mg/kg, IM, a cada 8h, durante 3 dias), além de curativo local com pomada a base de nitrofurazona. O procedimento foi realizado no Setor de Clínica do Centro Nacional de Primatas (CENP).

**Figura 10.** Contenção do *Aotus azarai infulatus* para a colheita de tecido adiposo.



**Fonte:** Arquivo pessoal

#### **2.1.4- Isolamento e Cultivo das Células-Tronco Mesenquimais Derivadas de Tecido Adiposo**

No Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas, a amostra transportada foi processada seguindo protocolo proposto por Banas et al. (2007). A porção coletada foi lavada em PBS com antibiótico (50 µg/mL de gentamicina), em seguida a massa central foi separada, macerada e digerida em Colagenase Tipo IV, diluída em DMEM (Meio essencial mínimo de Dulbecco), sob a concentração de 1 mg/ml por 1 hora a uma temperatura de 37° C em estufa de cultivo celular.

Após o período de incubação, a colagenase foi inativada com a adição de meio de cultivo completo (DMEM suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino, Gibco; Antibiótico e Anti-fúngico) e o material foi centrifugado por 10 min a 1000 x g sob uma temperatura de 37°C. Após, o sobrenadante foi removido e o precipitado ressuscitado e esse procedimento foi repetido duas vezes para somente depois cultivá-lo em placas contendo o meio de cultivo.

Após a realização desse procedimento, uma amostra da Fração Vascular Estromal (FVE) foi obtida para a realização da viabilidade celular através da coloração com o Azul de Tripán (Merck) em Câmara de Neubauer e contagem celular em microscópio óptico. Em seguida, as células foram plaqueadas em frascos para cultura de células (25 cm<sup>2</sup>, 50 ml) estéril



SARSTEDT, contendo meio completo e foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%). Após a incubação, os frascos foram lavados com Tampão Salino Fosfato (PBS) e as células não aderidas foram removidas.

As células aderidas foram mantidas em meio de cultura, sendo esse trocado a cada 48 horas. Com 95% de confluência, a partir da passagem inicial (P0), as células foram submetidas à tripsinização (repique), sendo utilizada a Tripsina + EDTA (TrypLE expresso, Gibco) por cerca de 30 segundos e em seguida a tripsina foi inativada com meio de cultura completo. A cada tripsinização as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 x g sob uma temperatura de 37°C e submetidas à contagem em Câmara de Neubauer para verificação da viabilidade celular e parte foi submetida ao congelamento utilizando-se uma solução crioprotetora de Soro Bovino Fetal (SBF) e Dimetilsulfóxido (DMSO), posteriormente sendo armazenadas em Ultra Freezer a -86°C para utilização futura.

#### **2.1.5- Criopreservação**

O processo de congelamento e descongelamento seguiu o protocolo descrito por Minonzio et al (2014), no qual uma solução crioprotetora contendo 0,5 ml de DMSO (10%) e 4,5 (90%) de SBF era preparada e deixada na geladeira por cerca de 30 minutos. Durante esse período os frascos contendo as células foram lavados com PBS para a eliminação de células mortas. Após a realização da lavagem dos frascos, as células foram tripsinizadas e observadas em microscópio invertido.

Em seguida, a tripsina foi inativada com o meio de congelamento anteriormente preparado e as células ali contidas foram transportadas para criotubos devidamente identificados e colocados dentro do aparelho Mister Frost (recipiente utilizado para armazenamento de criotubos) que possui uma taxa de arrefecimento de -1°C/minuto, taxa ideal para a preservação das células (Figura 11).

Para a realização do descongelamento, as amostras em criotubos foram colocadas em banho-maria, a 37°C, com o cuidado de não molhar a tampa do tubo para evitar possível contaminação com a água do banho.

Feito o descongelamento, os criotubos eram limpos com álcool (70%) e levados ao fluxo laminar, onde as amostras eram colocadas em tubos contendo 10 ml de meio e centrifugadas por 10 minutos para eliminar o crioprotetor utilizado. Após esse período, o sobrenadante era eliminado e as células semeadas novamente em frascos de cultura contendo meio completo.

**Figura 11.** Mister Frost. Aparelho utilizado para o armazenando de criotubo para o congelamento.



**Fonte:** Arquivo Pessoal

### 2.1.6- Morfologia celular

Para determinação da morfologia das células cultivadas nas passagens P1 a P8, foram utilizadas  $5 \times 10^3$  células em um volume de aproximadamente 20-30  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo, que foram expandidas em lâmina de 4 câmaras para cultura celular, estéril, ESTERIPLAS® de 25 x 75 x 1.2 mm e mantidas em estufa à 37°C com 5% de  $\text{CO}_2$  durante uma hora para a aderência celular. Após este período foram adicionados 2 mL de meio de cultivo (DMEM) enriquecido com 20% de soro bovino fetal em cada placa, as quais foram mantidas em cultivo durante 24, 48, 72 e 120 horas.

Após os períodos acima indicados, o meio de cultivo foi retirado da placa até a secagem das lamínulas contendo as células e foram fixados com Paraformaldeído (PFA) 4% por cerca de 20 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas duas vezes com água deionizada e coradas com Hematoxilina filtrada durante 5 minutos.

Passado os 5 minutos necessários, a hematoxilina foi retirada e as lamínulas foram lavadas com água deionizada duas vezes. Aproximadamente 20 células de cada período foram avaliadas quanto à morfologia e mensuradas usando o programa Axio Vision LE®.

### **2.1.7- Viabilidade e Quantificação Celular**

Após cada processo de repique era realizada a viabilidade e quantificação celular em câmara de Neubauer seguindo o protocolo descrito por Freshney (2000). Uma alíquota (1ml) das amostras era coletada e colocada em um tubo cônico para centrifugar durante 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante era desprezado e o “pelet” obtido era ressuspensionado em solução de PBS (3 ml) e homogeneizada.

As células (10  $\mu$ l) eram então transferidas para microtubos de 5ml contendo o corante Azul de Tripan 0,2 % (10  $\mu$ l) onde eram homogeneizadas com o auxílio de uma pipeta. O azul de Tripan é um reagente que é excluído do citoplasma de células viáveis; já as células mortas são incapazes de excluí-lo e aparecem azuis.

### **2.1.8- Curva de Crescimento Celular**

Para a avaliação das medidas de crescimento celular, utilizou-se o protocolo descrito por Freshney (2000). As células foram plaqueadas em garrafas de cultura celular (25cm<sup>2</sup>, 50ml) estéril, SARSTEDT®, com a concentração de  $1 \times 10^5$  em cada garrafa com meio de cultura completo (DMEM) enriquecido a 20% de soro bovino fetal. Foram realizadas curvas de crescimento nas células com as passagens P1 a P5.

As células foram coletadas a cada 2 dias durante o período de 12 dias para aferir o volume e a viabilidade celular. Para a coleta das células, utilizou-se tripsina (1ml) e PBS para a lavagem, sendo posteriormente armazenadas em tubos cônicos e centrifugadas durante 10 minutos a 1000 x g. Após a centrifugação, o sobrenadante era despejado e o “pelet” ressuspensionado em PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer através da marcação com o azul de Tripan.

O resultado (logaritmo) do número celular, em cada um dos dias durante o período avaliado, foi calculado e plotado em gráfico exponencial, a partir do qual foi obtida a curva de crescimento para as células. Nessa curva identificaram-se as fases Lag, Log e Plateau, que mostram toda a dinâmica das células durante os dias de cultivo e representam as fases de adaptação, crescimento exponencial e de estabilização.

### 2.1.9. Análise do cariótipo

Todos os procedimentos relacionados à análise do cariótipo foram executados junto ao laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética da SAMAM/IEC.

Para obtenção dos cromossomos, observou-se a cultura até que a mesma atingisse ótima concentração de células em divisão mitótica, momento no qual foi adicionada uma solução de colchicina 0,016% (100 µL para cada 5ml de meio) . Após 1 hora à 37°C, as células foram colhidas utilizando solução de tripsina+EDTA, sendo transferidas para um tubo cônico de 15ml e centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos. Após descarte do sobrenadante foram adicionados 5ml de solução hipotônica (KCl 0,075M), o material foi ressuscitado gentilmente e incubado a 37°C, por 12 minutos. A ação da solução hipotônica foi interrompida utilizando-se uma solução fixadora (fixador Carnoy). Em seguida, este material foi então ressuscitado e centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos, com retirada de sobrenadante, adição de novo fixador. Essa lavagem foi realizada por 3 vezes. Após a última lavagem, o pellet final foi ressuscitado em 1ml de fixador e armazenado em freezer (-20° C).

Para análise cariotípica, 1 (uma) gota do material foi gotejado em lâmina previamente lavada e mantida em água destilada. O material foi corado com solução de Giemsa (5% em tampão fosfato pH 6.8) por 5 minutos. Após lavagem e secagem à temperatura ambiente, as lâminas foram analisadas em microscópio de campo claro, e as melhores metáfases foram fotografadas usando-se objetiva de imersão (100x) e o programa GeneAis para captura e montagem.

Para o bandeamento G, as lâminas com uma gota da suspensão cromossômica foram envelhecidas por 72 horas, no mínimo, a 37°C. Após este período a lâmina foi incubada em 2xSSC a 45°C por 4 minutos lavando-se em seguida com água destilada, e corando-se com solução de corante Wright, diluído em tampão fosfato na razão de 3:1, por 1 minuto e 30 segundos. Após lavagem com água destilada, a lâmina foi deixada secar à temperatura ambiente e analisada. A análise foi feita em microscópio de campo claro, e as melhores metáfases foram fotografadas usando-se objetiva de imersão (100x) e o programa GeneAis para captura e montagem.

### **2.1.10. Imunocitoquímica**

Os procedimentos relacionados à imunocitoquímica foram executados junto ao laboratório de Imunopatologia Experimental da SAARB/IEC.

Para esta análise foram utilizados anticorpos específicos: anti-CD45, anti-CD34 e anti-CD79Alfa (marcadores negativos de superfície para CTMs), anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD-105 (marcadores positivos de superfície para CTMs).

Cultivou-se em lâmina de 4 câmaras para Cultura Celular, estéril, ESTERIPLAS®, uma alíquota de  $5 \times 10^3$  células em cada câmara, em meio de cultivo (DMEM) enriquecido a 20% de soro bovino fetal, á 37 °C em ambiente com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para sua aderência. Após fixou-se com PFA 4%, e realizou-se bloqueio da peroxidase endógena e das proteínas inespecíficas, e em seguida incubou-se em anticorpos primários: anti-CD45, anti-CD34 e anti-CD79, anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD-105, mantendo uma câmara como controle, overnight em câmara úmida. No dia seguinte incubou-se no anticorpo secundário, estreptavidina e biotina e a 37°C, posteriormente revelando com DAB.

### **2.1.11- Diferenciação celular**

Todos os procedimentos relacionados à morfologia e a diferenciação foram executados junto ao laboratório de Imunopatologia Experimental da SAARB / IEC. As células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto à capacidade de diferenciação in vitro para três linhagens celulares: condrócitos, adipócitos e osteócitos.

#### **2.1.11.1- Condrogênese**

Para a diferenciação condrogênica, foi utilizada uma densidade de  $1.6 \times 10^7$  células/cm<sup>2</sup> (uso do fabricante) para a obtenção de uma micromassa. Feito isso, a micromassa, em P6, foi plaqueada em placas de 24 poços e incubadas em estufa com atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 37°C contendo meio completo por 3 dias. Ao fim do terceiro dia o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação condrogênica (StemPro Chondrogenesis Kit, Gibco, USA). O meio foi trocado a cada 72 horas e o processo de diferenciação durou 21 dias.

Após 21 dias, a micromassa de células foi lavada com PBS, duas vezes e fixadas com PFA por 20 minutos. Em seguida, o paraformaldeído foi retirado e a monocamada celular foi lavada com água deionizada aplicando-se em seguida o corante Alcian Blue 1% (Sigma-

Aldrich, USA) o qual foi deixado sob as células durante 5 minutos. Após esse período foram lavadas com água deionizada mais duas vezes e avaliadas.

#### **2.1.11.2- Adipogênese**

Para o início do processo de diferenciação adipogênica foi realizada a contagem celular para a determinação da densidade necessária a ser utilizada ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>). Em seguida, as células em P6 foram plaqueadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa com atmosfera úmida de CO<sup>2</sup> a 37°C, contendo meio completo, para expandir durante 3 dias.

Após o terceiro dia o meio de cultivo foi substituído pelo meio de diferenciação adipogênica (Stempro Adipogenesis Kit, Gibco, USA) e usado de acordo com as instruções do fabricante. Foram realizadas trocas de meio a cada 72 horas e o processo durou 21 dias.

Decorridos o período de 21 dias, a monocamada de células foi lavada com PBS, duas vezes e fixadas com PFA (paraformaldeído). Em seguida, o paraformaldeído foi retirado e a monocamada celular foi lavada com água deionizada aplicando-se em seguida o corante Oil Red O (Sigma-Aldrich, USA) o qual foi deixado sob as células durante 5 minutos. Após esse período foram lavadas com água deionizada mais duas vezes e avaliadas.

#### **2.1.11.3- Osteogênese**

A diferenciação osteogênica foi realizada utilizando as células em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. As amostras, em P6, foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas em estufa com atmosfera úmida de CO<sup>2</sup> a 37°C contendo meio completo por 3 dias. Ao fim do terceiro dia o meio foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (StemPro Osteogenesis Kit, Gibco, USA). O meio foi trocado a cada 72 horas e o processo de diferenciação durou 21 dias.

Após o período necessário, a monocamada de células foi lavada com PBS, duas vezes, sob uma temperatura ambiente e fixada com PFA durante 20 minutos. O PFA em seguida foi retirado e a monocamada lavada com água deionizada, duas vezes, e coberta com o corante Alizarin Red 2% pH 4,2 (Sigma-Aldrich, USA) por 5 minutos e novamente lavada mais duas vezes com água deionizada e avaliadas.

### **2.1.12- Análise dos resultados**

A análise dos resultados foi feita de maneira qualitativa por meio da avaliação da curva de crescimento, viabilidade e morfologia celular e também através de médias e desvio padrão (DP) e por meio do teste T de Student não pareados para comparar grupos quando necessário.



## **2.3- RESULTADOS**

### **2.3.1- Curva de crescimento**

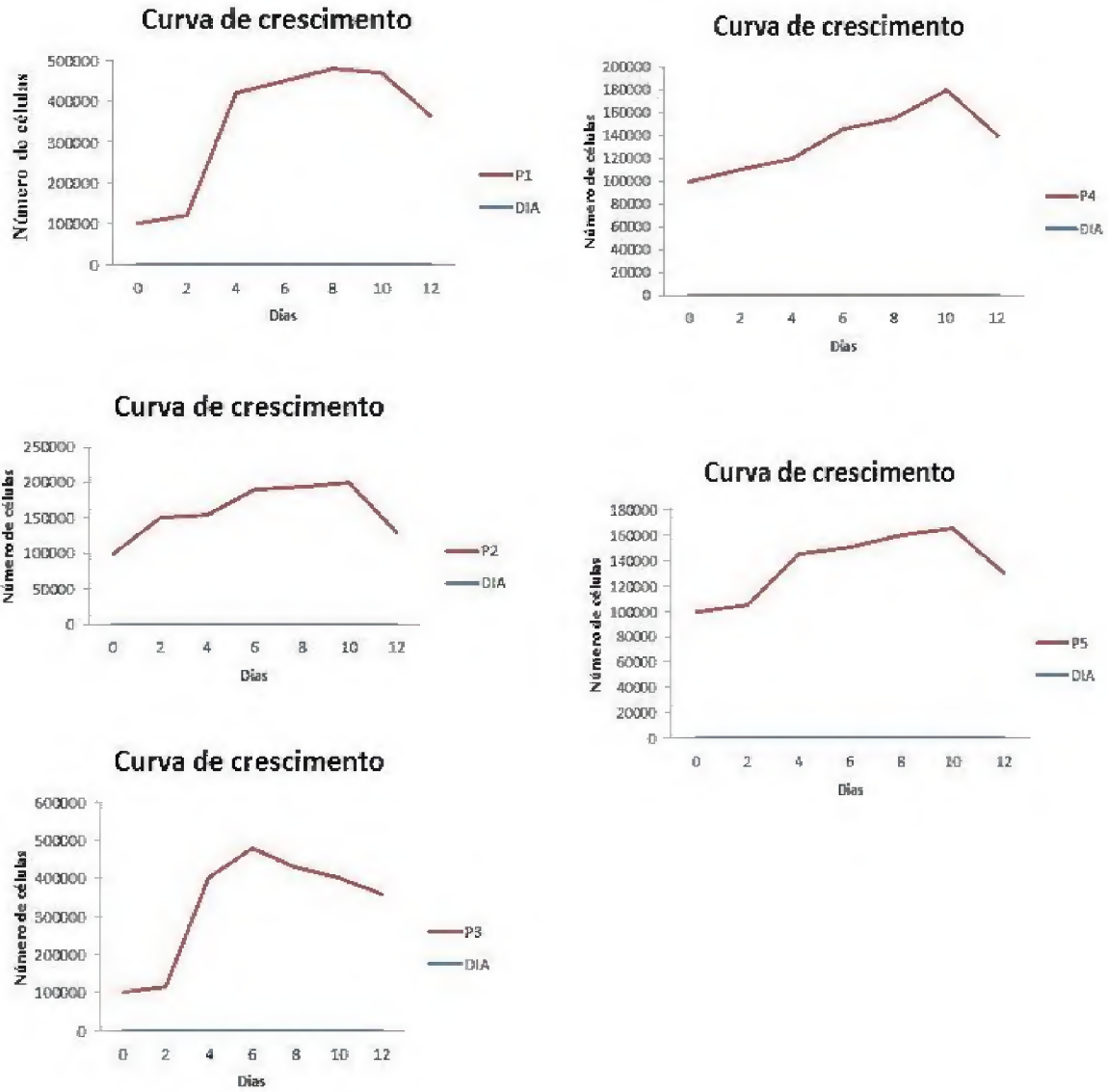
Todas as passagens apresentaram uma cinética de crescimento bem parecida, na qual a primeira fase (chamada Lag), período de adaptação celular onde ocorre pouca ou nenhuma divisão celular foi observada, em média, em todas as passagens nas primeiras 48 horas. Após esse período, as células entraram em crescimento exponencial (fase Log), período onde a proliferação é máxima, sempre constante e durou cerca de seis dias (2º ao 8º dia) para a passagem P1; 10 dias nas passagens P2, P4 e P5 (2º ao 10º dia) e quatro dias (2º ao 6º dia) na passagem P3.

Após o período Log, observou-se um período em que as células se estabilizaram e a sua proliferação foi mínima (fase estacionária ou Plateau), caracterizada por um declínio da atividade metabólica celular e durou aproximadamente 48 horas nas passagens analisadas.

Após esse período ocorreu a fase de declínio ou morte celular, onde foi possível observar a diminuição da taxa de crescimento celular no mesmo período em todas as passagens (aproximadamente 48 horas), (Figura 12).



**Figura 12.** Curva de crescimento celular realizadas para as CTDTA de *Aotus azarai infulatus* para as passagens P1 a P5 (número de células x número de dias). As células foram contadas a cada 48 horas durante 12 dias.

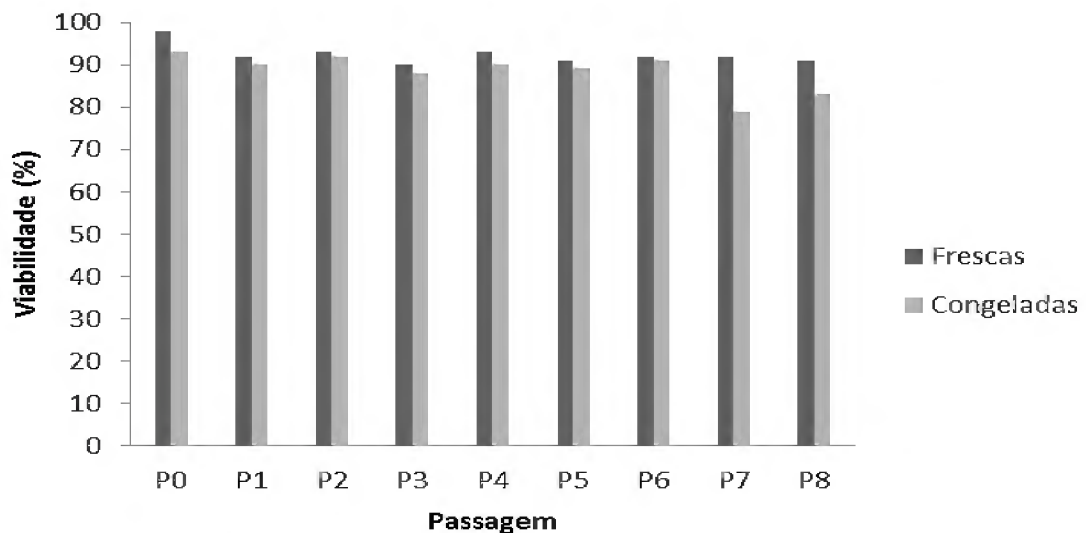


### 2.3.2- Viabilidade das CTDTA após o descongelamento e entre as passagens

Com o objetivo de avaliar as CTDTA a cada repique, as células foram submetidas à contagem em câmara de Neubauer, desde a passagem inicial (P0) até a P8, tanto nas culturas com células criopreservadas quanto as culturas não criopreservadas, para comparação.

As culturas com células não criopreservadas apresentaram uma média de  $92,44\% \pm 2,29$  de viabilidade, enquanto que as culturas submetidas à criopreservação apresentaram uma média de  $88,33\% \pm 4,52$ . Apesar de em algumas passagens a viabilidade de células criopreservadas apresentarem uma ligeira queda, foi possível concluir que não houve diferença significativa entre os dois tipos de células analisadas, criopreservadas e não criopreservadas ( $P < 0,05$ ), (Figura 13).

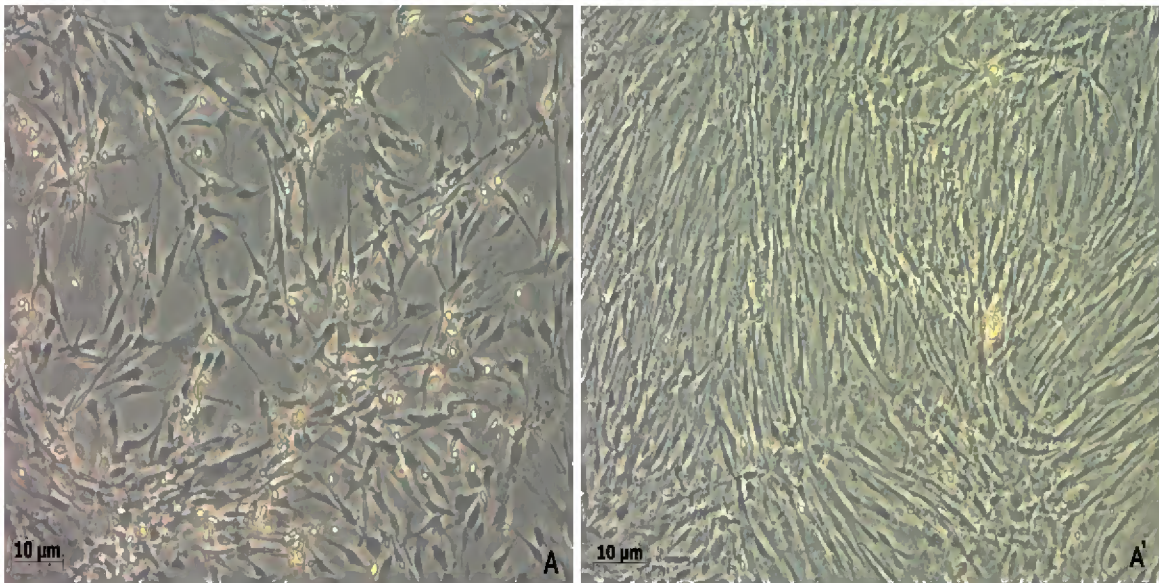
**Figura 13.** Viabilidade após descongelamento e entre passagens de CTDTA. Comparando as criopreservadas e não criopreservadas percebe-se que não houve diferença significativa em sua viabilidade ( $P < 0,05$ ).



### 2.3.3- Morfologia celular

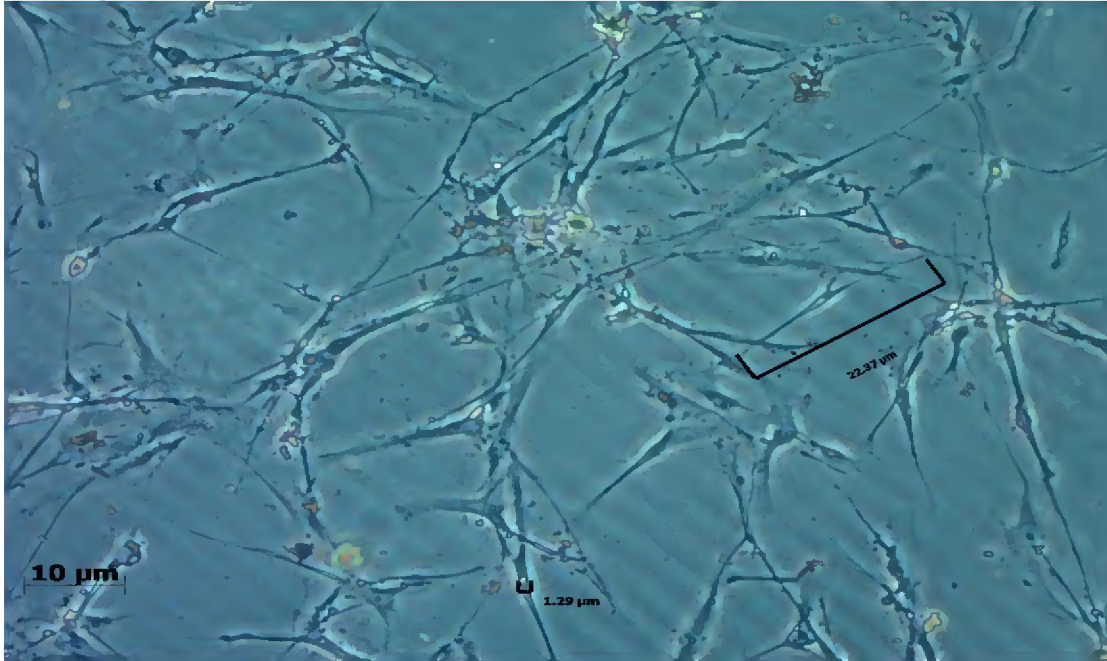
As CTDTA demonstraram alta capacidade de expansão *in vitro* e exibiram uma morfologia semelhante a fibroblastos durante todo o período observado, tornando-se morfológicamente mais homogênea à medida que as células foram repicadas (Figura 14).

**Figura 14.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*, em cultivo *in vitro*. (A) Células apresentando morfologia em formato de fibroblastos (fibroblast-like) com 72 horas de cultivo. (A') As mesmas células apresentando confluência de 95%.



A cada passagem as células foram medidas (P1 a P8) para saber se houve alguma alteração em seu formato ao longo dessas passagens (Figura 15). As células apresentaram, em média, tamanho de 28 $\mu$ m.

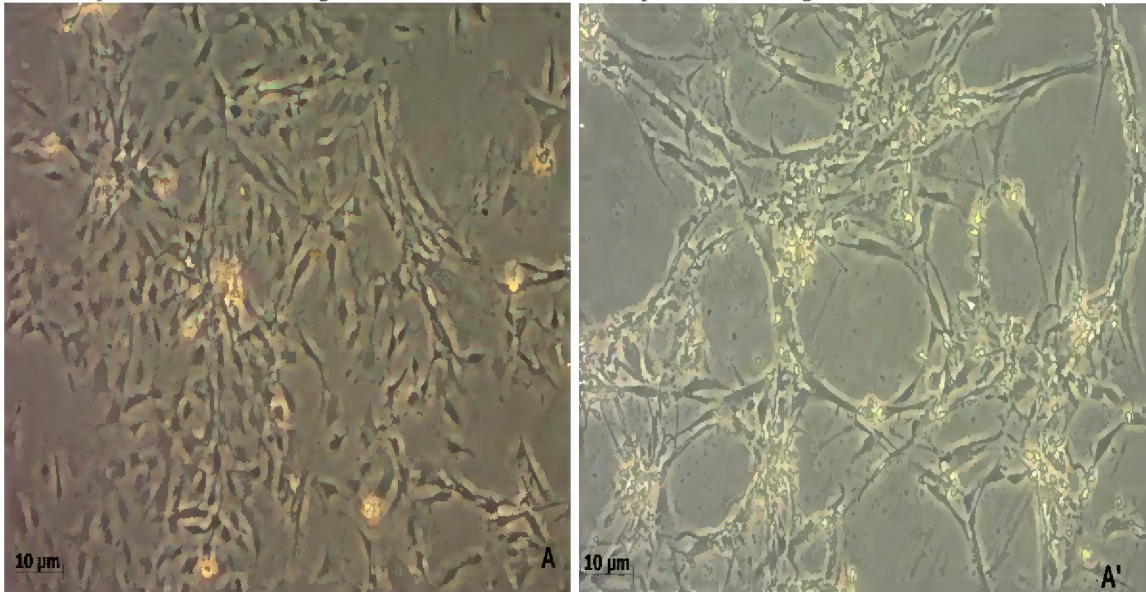
**Figura 15.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo em passagem P2 mostrando as medições (comprimento total e do núcleo), morfologia semelhante a fibroblastos e sem alterações morfológicas.



Alterações morfológicas foram observadas em algumas garrafas analisadas à medida que as células foram repicadas, tornando-se mais achatadas, mais largas e maiores em algumas garrafas com passagens mais tardias, como em uma na passagem P8, liberando alguns detritos celulares no meio de cultura e apresentando um citoplasma mais granuloso comparado com as células em passagens iniciais, até P5, nas quais as células eram menores e menos achatadas (Figura 16).



**Figura 16.** Fotomicrografia de células-tronco derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus*, em cultivo in vitro. (A) Células em P1 apresentando aspecto de fibroblasto, tamanho menor e pouco achatadas. (A') Células em P8, apresentando morfologia semelhante a fibroblastos, porém mais largas e mais achatadas.

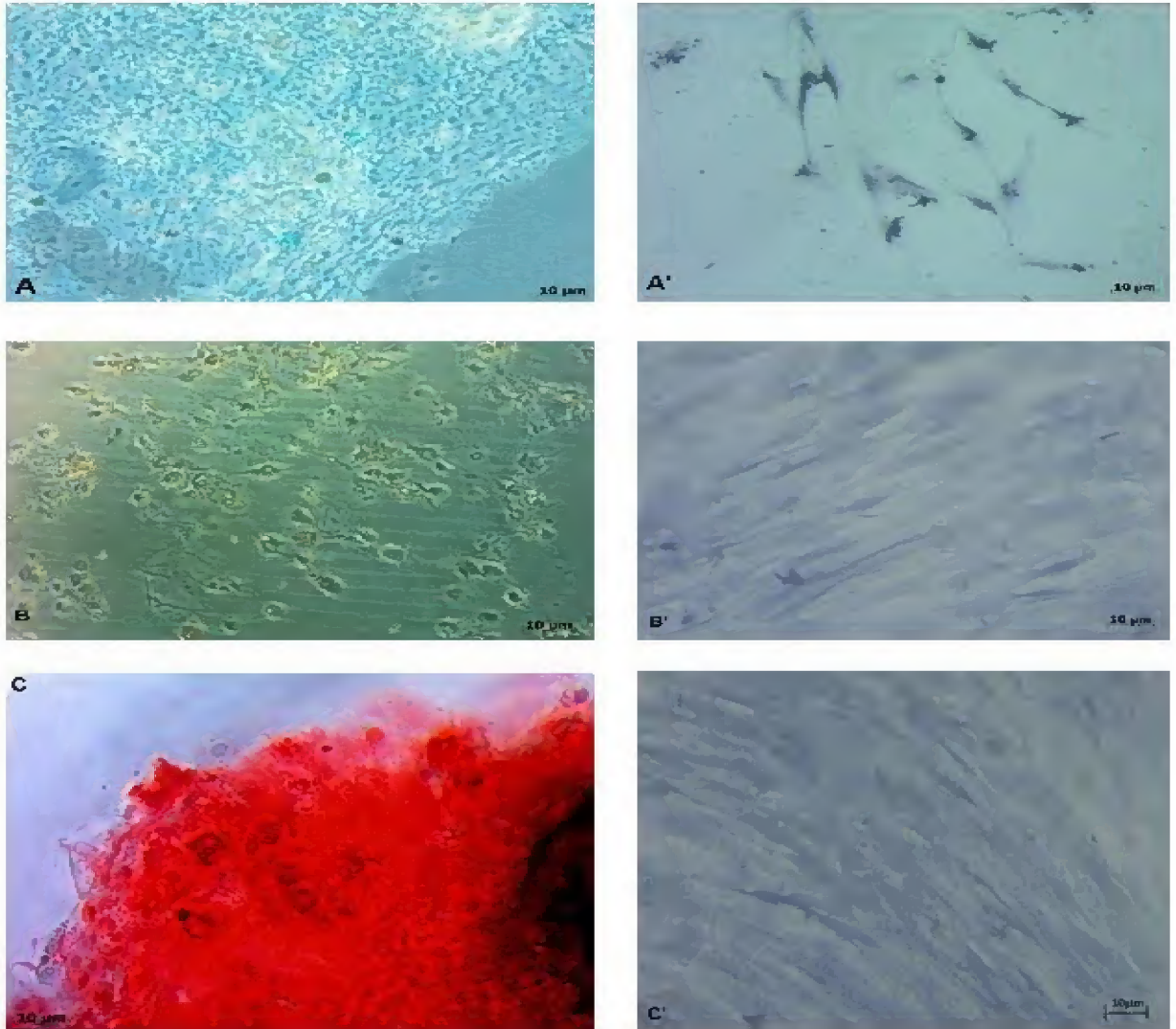


#### 2.3.4- Diferenciação Celular

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo mostraram capacidade de diferenciação nas principais linhagens celulares consideradas pela literatura como essenciais para que uma célula seja considerada células-tronco, tais como linhagem osteogênica, condrogênica e adipogênica, comprovando sua multipotencialidade.

A indução condrogênica foi evidenciada com a presença de proteoglicanos identificados com a coloração Alcian Blue (Figura 17A). As células submetidas à diferenciação adipogênica revelou a presença de gotículas lipídicas coradas com Oil Red e identificadas facilmente (Figura 17B). As células submetidas à diferenciação osteogênica demonstraram, através da coloração com Alizarin Red S, mostraram uma matriz celular calcificada, comprovando a diferenciação (Figura 17C). As figuras 17A', 17B' e 17C' correspondem ao grupo controle das diferenciações Condrogênica, Adipogênica e Osteogênica, respectivamente.

**Figura 17.** Diferenciação celular das células mesenquimais derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai* infulatus. (A) Diferenciação condrogênica mostrando a matriz extracelular de coloração azul através do Alcian Blue. (A') Grupo controle da diferenciação condrogênica. (B) Diferenciação adipogênica mostrando o acúmulo intracelular de gotículas lipídicas através da coloração com Oil Red. (B') Grupo controle da diferenciação Adipogênica. (C) Diferenciação osteogênica mostrando uma matriz extracelular rica em cálcio através da coloração com Alizarin Red. (C') Grupo controle da diferenciação Osteogênica.

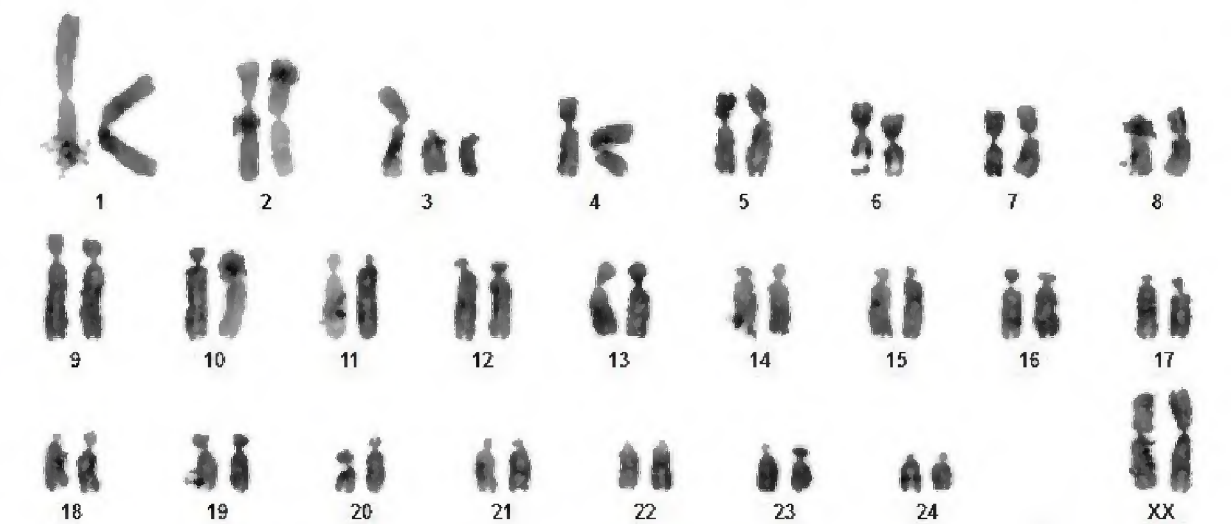


### 2.3.5- Análise do Cariótipo

A análise do cariótipo da espécie *Aotus azarai infulatus* foi realizada utilizando células em P3, P5 e P7 através de coloração convencional (Figura 18) e bandeamento G (Figura 19).

O animal identificado é uma fêmea e apresentou  $2n=51$ . O número ímpar é devido à presença de um rearranjo em heterozigose no par 3, no qual um dos cromossomos sofreu uma fissão cêntrica, originando dois acrocêntricos.

**Figura 18.** Análise cariotípica da fêmea de *Aotus azarai infulatus* através de coloração convencional.  $2n=51$ .



**Figura 19.** Análise cariotípica da fêmea de *Aotus azarai infulatus* através da técnica em bandeamento G.  $2n=51$ .



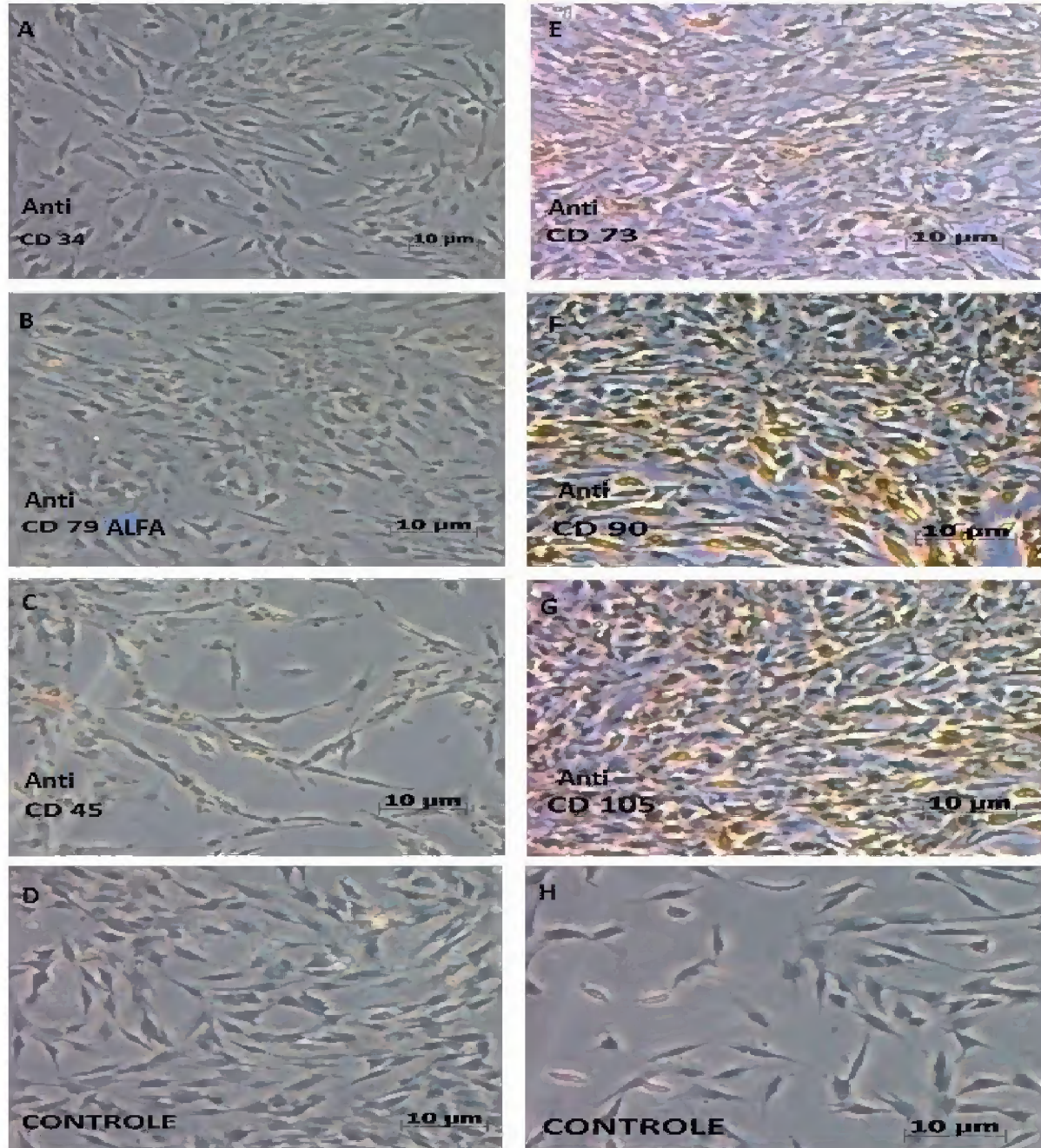
### 2.3.6- Imunocitoquímica

Expressão de células marcadoras de superfície de CTDTA de *Aotus azarai infulatus* foi avaliada usando a técnica de imunocitoquímica e foram negativas para os anticorpos anti-CD34 (Figura 20A), anti-CD79Alfa (Figura 20B), anti-CD45 (Figura 20C), e positivas para os anticorpos anti-CD73 (Figura 20E), anti-CD90 (Figura 20F) e anti-CD105 (Figura 20G).

As figuras 20D e 20H refere-se ao grupo controle dos anticorpos negativos e positivos, respectivamente.



**Figura 20.** Fotomicroscopia da caracterização imunocitoquímica das células-tronco mesenquimais de medula óssea de *Aotus azarai infulatus*. (A) Fenótipo para CD34; (B) Fenótipo para CD79 Alfa; (C) Fenótipo para CD45; (D) Grupo controle. (E) Fenótipo para CD73. (F) Fenótipo para CD90; (G) Fenótipo para CD105; (H) Grupo controle.



## 2.6. DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo já foram descritas em muitas espécies de animais para ser investigado o potencial terapêutico em muitas doenças. Porém, em primatas não-humanos como o *Aotus azarai infulatus* KUHL-1820 ainda há necessidade de mais estudos que visem as propriedades biológicas, de cultivo e diferenciação das CTDTA desta espécie (KANG et al., 2004).

O estudo demonstrou o isolamento, cultivo, caracterização e diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de *Aotus azarai infulatus* KUHL-1820 e encontrou um padrão para essas células similares a outros estudos realizados com esse mesmo tipo de células em outros tipos de animais, tais como em humanos (ZUK et al., 2001; YOKOMIZO et al., 2011), em ratos (KANG et al., 2004), cavalos (RANERA et al., 2012) e também em outros grupos de primatas, como o macaco Rhesus (GAGLIARDI; BUNNELL, 2011).

As células-tronco derivadas de tecido adiposo apresentaram uma cinética de crescimento bem parecida para as passagens que foram submetidas à essa análise, mostrando a fase Lag, Log e Plateau. Seu declínio ocorreu por volta do 10º e 12º dia, corroborando com outros estudos usando diferentes tipos de células-tronco mesenquimais, tais como células-tronco de medula óssea de búfalo (GADE et al., 2012), tecido adiposo de *Chlorocebus aethiops* (MIRANDA, 2013) e tecido adiposo de suínos (DARIOLLI, 2011).

A análise da viabilidade antes e após o ciclo de criopreservação se mostrou bem parecida para os criotubos testados apesar de em algumas passagens terem sofrido uma ligeira queda, porém estão de acordo com outros estudos e com os dados obtidos para este tipo celular realizado em outras espécies, como em humanos (LEE et al., 2010), cães (MARTINELLO et al., 2010) e porcos (DARIOLLI, 2011). E também com o estudo realizado por (MINONZIO et al., 2014) para desenvolver um protocolo seguro para extrair e congelar células-tronco de tecido adiposo e encontraram uma viabilidade celular em média de 89,6% variando de 81% até 98%, números que, em média, também corroboram com esse estudo.

As CTDTA se expandiram de maneira rápida e fácil *in vitro*, através da propriedade de aderência ao plástico. Mostraram uma cultura heterogênea de células nos primeiros dias de cultivo, tornando-se morfológicamente mais homogênea e com uma morfologia semelhante a

fibroblastos ao longo das passagens, variando em seu formato apenas em poucas garrafas de cultura, apresentando um citoplasma mais granuloso e sendo mais achatadas. Já foi demonstrado em outros estudos que essas características morfológicas são características das células-tronco mesenquimais, as quais se apresentam com uma morfologia mais achatada e heterogênea em início de cultura, tornando-se mais homogênea conforme o progresso das passagens (MIRANDA, 2013). Apresentaram, em média, tamanho de 28  $\mu\text{m}$  corroborando com a literatura que afirma que células-tronco derivadas de tecido adiposo apresentam-se em camada única de células, com aspecto achatado e com aproximadamente 25 a 30 micrômetros de diâmetro (LADEIRA et al. 2012).

Tais características já haviam sido reportadas nos trabalhos pioneiros de Zuk et al (2001), que em seus trabalhos pioneiros com linhagens de tecido adiposo humano também descreveram uma morfologia celular em forma de fibroblasto, assim como Vieira et al (2010) e Kang et al (2004) que trabalharam com tecido adiposo de cães e de macacos Rhesus, respectivamente, e encontraram essas mesmas características, afirmando que as células-tronco de tecido adiposo possuem uma expansão *in vitro* bem rápida.

As alterações morfológicas encontradas em poucas garrafas de cultivo neste estudo podem estar ligadas, de acordo com Wagner et al. (2008), ao processo de senescência celular, que é uma fase caracterizada pela presença de células grandes, largas, achatadas, ausência de proliferação celular e expressão de  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal).

O potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais nas três principais linhagens mesodérmicas é de fundamental importância e pode ser usado para caracterizar CTM (GADE, 2012). Sendo assim, a confirmação da diferenciação celular das CTDTA de *Aotus azarai infulatus*, KUH-1820 neste estudo, indicam a multipotencialidade dessas células.

A plasticidade das CTDTA já foi reportada também em estudo com humanos (NOGUEIRA, 2009) e em outras espécies de animais, como cavalos, porcos, macacos Rhesus e búfalos (KANG, 2003; STREM, 2005; LEE, 2006). Porém, apesar de células-tronco mesenquimais serem originadas do mesoderma, muitos estudos já comprovaram a diferenciação dessas células em linhagens não mesodérmicas, como hepatócitos, células pancreáticas, células epiteliais e células neuronais (KANG et al., 2004; SEO et al., 2005; MOSHTAGH et al., 2012; BAER; GEIGER, 2012).



Miranda (2013), trabalhando com tecido adiposo de *Chlorocebus aethiops* também já demonstrou que as células derivadas de tecido adiposo possuem essas características de diferenciação, apresentando as mesmas características das encontradas nesse estudo, sugerindo que esse tipo de célula possui grande relevância clínica e podem servir como uma alternativa no uso em terapias tanto em várias espécies de primatas, quanto em humanos.

Dariolli (2011) em seus estudos demonstrou que as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de porcos criopreservadas também possuem características que lhes permitem ser utilizadas na terapia celular. Elas foram capazes de se diferenciarem também em tecido adiposo e ósseo e mantiveram suas características morfológicas de crescimento e plasticidade quando comparadas com células não submetidas ao congelamento.

Em todas as análises cariotípicas realizadas, rearranjos cromossômicos foram observados sugerindo que são alterações constitucionais da fêmea, que pode ser híbrida entre dois citótipos diferentes. O fato de o animal se encontrar em cativeiro pode, de acordo com Cicmanec et al. (1977) e Simpson e Jones (1982), ter influenciado nesse processo, visto que muitos híbridos são produzidos em cativeiro, principalmente quando as populações possuem cromossomos similares, especialmente em populações polimórficas.

As células-tronco mesenquimais podem ser obtidas a partir de diversos tipos de tecidos e são fenotipicamente heterogêneas podendo expressar diversos tipos de marcadores de superfície, visto que a expressão desses marcadores pode se dar dependendo do tipo de tecidos das quais as células foram obtidas, assim como método de isolamento e características da cultura (BYDLOWSKI et al., 2009). Neste estudo, para as células submetidas ao teste de imunocitoquímica, foram encontrados marcados de superfície positivos para CD73, CD105 e CD90, e negativas para CD34, CD45 e CD79Alfa. Segundo a International Society for Cellular Therapy (ISCT) um dos critérios mínimos para que uma células seja considerada célula-tronco é apresentar a expressão positiva para CD73, CD105 e CD90, e negativa para CD34, CD45 e CD79Alfa. É importante realizar os testes de caracterização fenotípica das células para saber o grau de pureza das culturas, pois elas podem apresentar diversos tipos celulares heterogêneos, assim como outros tipos de marcadores (GRONTHOS et al., 2001; SABATINI et al., 2005).

## 2.5- CONCLUSÃO

- Os dados obtidos permitiram concluir que as CTDTA apresentaram uma cinética de crescimento padrão em todas as passagens submetidas a essa análise.
- A viabilidade e capacidade de proliferação *in vitro* foi positiva tanto para as culturas submetidas à criopreservação quanto para as culturas não criopreservadas, não apresentando nenhuma diferença significativa.
- As CTDTA apresentaram uma morfologia semelhante a fibroblastos, uma das características das células-tronco mesenquimais, não apresentando nenhuma alteração em seu tamanho na grande maioria das passagens.
- Foram capazes de realizar a diferenciação nas três principais linhagens mesodérmicas, confirmando sua multipotencialidade.
- Em todas as análises observadas, foram identificados rearranjos cromossômicos, sugerindo que as células observadas sejam de um animal híbrido.
- Apresentou resultados satisfatórios quando caracterização fenotípica, visto que os critérios mínimos estabelecidos para que uma célula seja considerada célula-tronco foram obedecidos, como ausência de marcação para CD34, CD79 $\alpha$ , CD45 e presença de marcação para CD105, CD73, CD90.

Sendo assim, os critérios mínimos para que uma célula seja considerada célula-tronco foram alcançados neste experimento, sugerindo que a espécie *Aotus azarai infulatus* pode ser considerado como um excelente modelo experimental para o uso em terapias celulares e pesquisas com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.

## REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, B.M; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Ther.** v.15, n.2, p.109-16, 2008.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil.** São Paulo: terra brasilis, 168p. 1995.
- BAER, J.F.; WELLER, R.E.; KAKOMA, I. Aotus: the owl monkeys. San diego: **Academic press**, 380p. 1994.
- BAER, P. C; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells International.** v.2012, p.11. 2012.
- BAER, P.C. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: Na update on their phenotype in vivo and in vitro. **World Journal of Stem Cells.** v6, n.3, p.256-265, 2014.
- BANAS, A.; TERATANI, T.; YAMAMOTO, Y.; TOKUHARA, M.; TAKESHITA, F. QUINN, G.; OKOCHI, H.; OCHIYA, T. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Source of Human Hepatocytes. **Hepatology.** v.46, n.1, p. 19-228. 2007.
- BEANE, O.S.; FONSECA, V.C.; COOPER, L.L.; KOREN, G.; DARLING, E.M. Impact of Aging on the Regenerative Properties of Bone Marrow-, Muscle-, and Adipose-Derived Mesenchymal Stem/ Stromal Cells. **Plos one.** v.9, n.12. 2014.
- BLAU, H.M.; BRAZELTON, T.R; WEIMANN, J.M. The evolving concept of a stem cell: entity or function? **Cell.** v.105, n.7, p.829-41. 2001.
- BYDŁOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F.; JANZ, E.F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia,** v.31n.1, p.25-35, 2009.
- CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S.; BENNETT, P.R.; BELLANTUONO, I. N.M.; FISK, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood.** v.98, n.8, p.2396-402. 2001.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research.** v.9, n.5, p.641-50. 1991.
- CARVALHO, L.J.M.; ALVEZ, F.A.; OLIVEIRA, S.G.; VALLE, R.D.R.; FERNANDES, A.A.M.; MUNIZ, J.A.P.C.; RIBEIRO, C.T.D. Severe anemia affects both splenectomized and non-splenectomized Plasmodium falciparum infected Aotus infulatus monkeys. **Memorias do instituto Oswaldo Cruz,** Rio de janeiro, v.98, n.5, p. 679-686. 2003.

CASTEILLA, L.; CHARRIERE, G.; LAHARRAGUE, P.; COUSIN, B.; PLANAT BENARD, V.; PERICAUD, L. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: comeback to sources. **Annales de Chirurgie Plastique Esthétique** . v.49, n.5, p. 409-18.2004.

CASTRO-MALASPINA, H. Characterization of human bone marrow fibroblast colony forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**. v. 56, n. 2, p. 289-301, 1980.

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 Letters**. v. 579, n. 17, p. 3487-92, 2005.

CICMANEC, J. C; CAMPBELL, A.K. 1977. Breeding the owl monkey (*Aotus trivirgatus*) in a laboratory environment. **Laboratory Animal Newsletter**. v.27, p.512-517.1977

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Medica Portuguesa**. v.19, p.251-256. 2006.

DARIOLLI, R. **Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de porcos criopreservadas e sua responsividade ao Shear stress**. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2011.

DENNIS, J.E.; CHARBORD, P. Origin and differentiation of human and murine stroma. **Stem Cells**. v.20, n.3, p205-14.2002.

DIGIROLAMO, C. M. Propagation and senescent of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Brasilian Journal of Haematology**. v.107, n. 2, p. 275-81, 1999.

DIXSON, A.F. Reproductive biology of the owl monkey. In: BAER JF, WELLER RE, KAKAOMA, I. *Aotus: the owl monkey*. San Diego, CA: **Academic Press**. p. 113-132. 1994.

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

FRASER, J. K.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. Adipose-derived stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v.449, p.59-67, 2008.

FRESHNEY R.I. **Culture of Animal Cells, a manual of basic technique**. 4th ed. 2000.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinetics**. v.3, n.4, p.393-403.1970.

FODOR, W.L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. **Reproductive Biological Endocrinology**. v.1, p.102. 2003.

GADE, N.E.; PRATHEESH, M.D; NATH, A; DUBEY, P.K; AMARPAL; SHARMA, B; SAIKUMAR, G; SHARMA, G.T. Molecular and Cellular Characterization of Buffalo Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 358-367, 2012.

GAGLIARDI, C; BUNNELL, B.A. Isolation and culture of rhesus adipose-derived stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 702, p. 3-16, 2011.

GREENBERG, J. **Nocturnality in the owl monkey, Aotus sp.** 1997.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A.; ROBEY, P.G.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue derived stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**. v.189, n.1, p.54-63. 2001.

GRUBER, H.E.; SOMAYAJI, S.; RILEY, F.; HOELSCHER, G.L.; NORTON, H.J.; INGRAM, J. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. **Biotech Histochemistry**. v.87, n.4, p.303-11. 2012.

HARRISON, R.G. Observtions on the living developing nerve fiber. **Proceedings of the society for experimental biology and medicine**, v.4, p.140-13. 1907.

HAYNESWORTH, S.E.; BABER, M.A; CAPLAN, A.I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. **Journal of Cellular Physiology**. v.166, n.3, p.585-92. 1996.

HERSHKOVITZ, P. The recente mammals of the neotropical region: a zoogeographic and ecological review. In: KEAST, A.; ERK, F.C.B.; GLASS, B. (Ed). **Evolution, mammals and Southern Continents**. Albany: State University of New York Press, p.311-431, 1972.

HORWITZ EM, L.E.; BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v.7,n.5, p.393-5. 2005.

KANG, S.K; LEE, D.H; BAE, Y.C; KIM, H.K; BAIK, S.Y; JUNG, J.S. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Experimental. Neurology**, v. 183, n. 2, p. 355-366, 2003.

KANG, S.K; PUTNAM, L.A; YLOSTALO, J.; POPESCU, I.R.; DUFOUR, J. BELUSOV, A.; BUNNELL, B.A. Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. **Journal of Cell Science**. v. 117, p.4289-4299. 2004.

LADEIRA, P.R.S.; ISAAC, C.; NAKAMURA, Y.M.; TULIHASHI, M.C.; PAGGIARO, A.O.; FERREIRA, M.C. Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adipose: uma análise crítica. **Revista da Associação Médica Brasileira** (São Paulo), v.91, n.4, p.246-52. 2012

LEE, J.H; KEMP, D.M. Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 3, p. 882–888, 2006.



LEE, J.E; KIM, I.; KIM, M. Adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells obtained from cryopreserved adipose aspirates. **Dermatology surgery**. 2010, v. 36, n. 7, p.1078-1083, 2010.

LEMISCHKA, I.R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academic Science**.; v.8, p.1044:132. 2005.

LÉO, P. Células animais: conceitos básicos: In: MORAES, A. M., AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do cultivo de células animais**, São Paulo: Roca, p. 15-41, 2008.

MACHADO, A.B.M; MARTINS, C.S; DRUMMOND, G.M.. **Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção Incluindo as Listas das Espécies Quase Ameaçadas e Deficiente em Dados**. Belo Horizonte: Fundação Biobiversitas. 157 p. 2005.

MAJUMDAR, M.K.; THIEDE, M.A.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.; GERSON, S.L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**. v.176, n.1, p.57-66. 1998.

MARTINELLO, T; BRONZINI, I; MACCATROZZO, L; MOLLO, A; SAMPAOLESI, M. MASCARELLO, F. Canine adipose-derived-mesenchymal stem cells do not lose features after a long-term cryopreservation. **Research in veterinary science**, v. 91, n. 1, p. 18-24, 2010.

MEIRELLES, L.D.A.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, v.123, n.4, p.702-11. 2003.

MINONZIO, G.; CORAZZA, M.; MARIOTTA, L.; GOLLA, M.; ZANZI, M.; GANDOLFI, D.F.; SOLDATI, G. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. **Cryobiology**. In press. 2014.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**. v. 226, n. 6, p. 507-20, 2001.

MIRANDA, C.M.F.C. **Isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo de Chlorocebus aethiops**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal). Universidade Federal do Pará. 74p. 2013.

MITALIPOVA, M. M. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. **Nature. Biotechnology**. v. 23, n.1, p. 19-20, 2005.

MOSHTAGH, P.R; EMAMI, S.H.; SHARIFI, A.M. Differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cell into insulin-producing cells: in vitro study. **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 69, p. 451-458. 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.

NAPIER, J.R.; NAPIER, P.H. A handbook of living primates morphology, ecology and behaviour of nonhuman primates. London: **Academic Press**, 456, 1967.

NOGUEIRA, C. R. **Isolamento, caracterização e análise da estabilidade citogenética após expansão in vitro de células-tronco mesenquimais derivadas do epitélio amniótico, tecido adiposo e polpa de dente decíduo humano.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 70p. 2009.

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

PAYÃO, S. L. M.; SEGATO, R.; SANTOS, R. R. Genetic control of cultivated human stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.** v. 31, p. 15-18, 2009.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, A.D.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.** v.284, n.5411, p.143-7. 1999.

POLITI, F. A. S.; MAJEROWICZ, J.; CARDOSO, T. A. O.; PIETRO, R. C. L. R; SALGADO, H. R. N. Caracterização de biotérios, legislação e padrões de biossegurança. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences,** v. 29, n. 1, p. 17-28, 2008.

RANERA B; REMACHA, A.R; ÁLVAREZ-ARGUEDAS, S; ROMERO, A; VÁZQUEZ, F.J; ZARAGOZA, P; MARTÍN-BURRIEL1, I; RODELLAR, C. Effect of hypoxia on equine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Veterinary Research,** v. 8, n.142, 2012.

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

ROMANOV, Y.A.; SVINTSITSKAYA, V.A.; SMIRNOV, V.N.. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC like cells from umbilical cord. **Stem Cells.** v.21, n.1, p.105-10. 2003.

RYLANDS, A.B.; SCHNEIDER, H.; LANGGUTH, A.; MITTERMEIER, R.A.; GROVES, C.P.; RODRÍGUES-LUNA, E. 2000. An assessment of the diversity of the new world primates. **Neotropical Primates.** v.8, n.2, p.61-93. 2002.

SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M.; JODON DE VILLEROCHÉ, V.; ROSSI, G.A.; BROUTY-BOYÉ, D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation.** v.85, n.8, p.962-71. 2005.

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, n. 10, 2011.

SEO, M.J; SUH, S.Y; BAE, Y.C; JUNG, J.S. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 1, p. 258–264, 2005.

SIMINIAK, T.; KURPISZ, M. Myocardial replacement therapy. **Circulation**, v. 108, n. 10, p. 1167-71, 2003.

SIMPSON, J. S.; JONES, A.C. Hybrid production in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). **Laboratory Animal**, v.16, p.71 – 72, 1982.

STREM, B.M; HICOK, K.C; ZHU, M; WULUR, I; ALFONSO, Z; SCHREIBER, R.E; FRASER, J.K; HEDRICK, M.H. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **Keio Journal of Medicine**, v. 54, n. 3, p. 132–141, 2005.

TEJEDOR MF. La position de *Aotus* y *Callicebus* en la filogenias de los primatas platirrininos. **Bol Primatol Lat** v.7, p.13-29, 1998.

THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S.; WAKNITZ, M.A.; SWIERGIEL, J.J.; MARSHAL, V.S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. v.282, n.5391, p.1145-47. 1998.

TOBITA, M.; ORBAY, H.; MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. **Discovery Medicine**. v.11, n.57, p.160-70, 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, n.3, 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, n.5. 2008.

WRIGHT, P.C. The night monkeys, genus *Aotus*. In: COIMBRA-FILHO, A.F.; MITTERMEIER, R.A. (Ed). **Ecology and behavior of neotropical primates**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, v.1, p.211-240, 1981.

WOBUS, A. M. & BOHELER K. R. Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. **Physiological Reviews**. v.85, n.2, p. 635-78, 2005.

WOLF, D. P.; KUO, H.C; FRANCIS, P. A. U. K-Y.; LESTER, L. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells. **Biology of Reproduction**, v.71, n.6, p.1766–1771, 2004a.

WOLF, D. P.; THORMAHLEN, S.; RAMSEY, C.; YEOMAN, R. R.; FANTON, J.; MITALPOV, S. Use of Assisted Reproductive Technologies in the Propagation of Rhesus Macaque Offspring. **Biology of Reproduction**, v.71, n.6, p.486-493, 2004b.

WURMSER, A.E.; PALMER, T.D.; GAGE, F.H. Cellular interactions in the stem cell niche. **Science**, v.304, n.5675, p.1253-1255, 2004.

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. **Journal of Clinic Investigation**. v. 112, n. 12, p. 1821-30, 2003.

YARAK S, OKAMOTO O.K. Células-tronco derivadas de tecido adi- poso humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85, n.5, p.647-56. 2010.

YOKOMIZO, V.M.F; BENEMOND, T.M.H; BRESSAN, F.F; SANGALLI, J.R; PIEIRI, N.C.G; CASALS, J.B; MARTINS, D.S; MEIRELLES, F.V. Células-tronco derivadas de tecido adiposo:isolamento,cultivo in vitro e perspectivas de utilização em dermatologia. **Surgical and Cosmetc Dermatology**. v.3, n.1, p.55-59. 2011.

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. **Células-tronco: a nova fronteira da Medicina**. Rio de Janeiro: Atheneu. 263p. 2006.

ZANNETTINO, A.C.; PATON, S.; ARTHUR, A.; KHOR, F.; ITESCU, S.; GIMBLE, J.M. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. **Journal of Cell Physiology**. v.214, n.2, p.413-21. 2008.

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. **Journal of the neurological Science**. v.279, n.1/2, p. 30-38, 2009.

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. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

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

## ANEXO I

**CEUA**

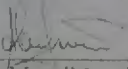
MS SECRETARIA DE VIGILANCIA EM SAUDE  
INSTITUTO  
EVANDRO  
CHAGAS

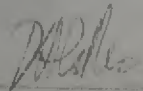
Certificado nº 32/2013

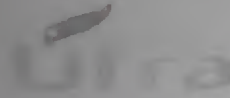
**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 0032/2013, intitulado "Coleta, separação e diferenciação de células mesenquimais de tecido adiposo em *Callithrix penicillata*" sob a responsabilidade da pesquisadora Ana Rita de Lima, está de acordo com os PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC.

Ananindeua-PA, 15 de janeiro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Ana Cláudia Magalhães de Oliveira  
Secretária da CEUA/IEC/SVS/MS

  
\_\_\_\_\_  
Paulo Henrique Gomes de Castro  
Vice-Coordenador  
CEUA/IEC/SVS/MS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
INSTITUTO DA SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL

Belém, 06 de Janeiro de 2015

Ao Ilmo. sr. dr.  
Carlos Jorge Costa Faro  
Diretor do Centro Nacional de Primatas

Senhor Diretor,

Solicito a autorização para a troca de espécimes, inicialmente íamos trabalhar com a espécie *Callithrix penicillata* para o desenvolvimento do projeto intitulado "**Coleta, separação e diferenciação de células mesenquimais de tecido adiposo em *Callithrix penicillata***", porém tal espécie apresentam o metabolismo muito alto consumindo muita energia, dificultando a obtenção do referido tecido. Assim, solicitamos a troca para a espécie *Aotus azarai infulatus*, e, conseqüentemente o projeto passa a ser: "**Coleta, separação e diferenciação de células mesenquimais de tecido adiposo em *Aotus azarai infulatus***".

Atenciosamente,

Ana Rita de Lima  
Pesquisadora Principal do Projeto

Diego Ronaldo Moretti  
Assistente Técnico de Gestão  
SIAPE nº 1.904.260

RF-000000 000 14/01/15



MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

**INSTITUTO  
EVANDRO  
CHAGAS**

Parecer nº 028/2014/CEUA/IEC/SVS/MS

Protocolo CEUA - nº 032/2013

Ilma.sra. dra.

Ana Rita de Lima

Investigadora principal do Projeto

Ananindeua/PA, 29 de outubro de 2014.

Senhora Coordenadora,

Em atenção à carta datada de 15 de outubro de 2014, que solicita a autorização para troca de espécimes, onde utilizará exemplares da espécie *Aotus azarae infulatus* no lugar da espécie *Callithrix penicillata*; solicita também a prorrogação do cronograma de execução do Projeto intitulado "**Coleta, separação e diferenciação de células mesenquimais de tecido adiposo em *Callithrix penicillata***", informamos que após análise da justificativa, a referida solicitação foi aprovada.

Recomendamos a consulta ao Centro Nacional de Primatas - CENP, para verificação da disponibilidade da espécie e solicitamos que a anuência seja encaminhada a esta CEUA.

Recomendamos ainda que mantenha atualizado todos os documentos pertencentes ao projeto e no final que encaminhe um relatório consolidado com informações pertinentes a pesquisa.

Atenciosamente,



Livia M. dos Neves Casseb  
Coordenadora da CEUA/IEC/SVS/MS





Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47277-1	Data da Emissão: 14/02/2014 18:24	Data para Revogação: 14/01/2018
-----------------	-----------------------------------	---------------------------------

\* De acordo com o art. 25 da Lei 032014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser renovada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do arquivamento de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Ana Rita de Lima	CPF: 265.861.098-12
Título do Projeto: Avaliação de células tronco mesenquimais derivadas de células adiposas em Áreas úmidas Inúltimas	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e documentação de dados sobre as áreas úmidas Inúltimas	12/2013	12/2015
2	Coleta de células tronco mesenquimais de tecidos adiposos	01/2014	02/2015
3	Elaboração de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo	03/2014	02/2015
4	Metodologia, curva de crescimento e viabilidade celular	06/2014	02/2015
5	Análise dos dados obtidos e busca de publicação de resultados	08/2014	12/2015

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo deverão ser realizadas em uma ou várias áreas úmidas, em todo o território nacional, que apresentem o estabelecimento de recursos hídricos e vegetais, tendo por objeto coletar dados, imagens, amostras biológicas e minerais, papéis integrados da cultura nativa e cultura popular, presença e presença de espécies por meio de registros e listagens que se descrevem a seguir. O estudo terá duração de 12 meses, sendo realizado a partir do mês de Janeiro de 2014 até dezembro de 2015. Este documento NÃO define o planejamento futuro e os membros de sua equipe da necessidade de obter as autorizações necessárias em nome do titular, bem como do comprometimento da responsabilidade pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de área indígena (FUNAI), da unidade de conservação ambiental (distrito ou município) ou do proprietário, amandatório, passivo ou condutor de área úmida. São lidas de unidade de conservação hídrica não possuem de regulamentação jurídica adequada em curso.
2	Este documento somente poderá ser utilizado para as atividades de pesquisa Número de SISBIO nº 022014 ou de pesquisa Número de SISBIO nº 022015, no qual especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou similares. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para as atividades de pesquisa Número de SISBIO nº 022014 ou de pesquisa Número de SISBIO nº 022015, no qual especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou similares. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.licencia.gov.br">www.licencia.gov.br</a> (serviços online - Licença de exportação ou importação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, visando a morte ou dano significativo a outros grupos e empregar sempre de coleta ou captura quando comprovada a viabilidade de captura de indivíduos de interesse em condições in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da coleta ou captura de espécimes, deverão de posse de um formulário de coleta ou captura de informações necessárias que substituem a descrição do ato, produzindo mediante decisão registrada, no ato de coleta ou captura ou registrada pelo SISBIO, e o material biológico coletado armazenado nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento NÃO dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre o acesso e o comércio de produtos biológicos extraídos no território nacional, na condição sustentável e na zona econômica exclusiva, ou no estabelecimento mediante acesso de terceiros genéticos, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.licencia.gov.br/legis">www.licencia.gov.br/legis</a> .
8	Encerrado o prazo de validade da autorização, o pesquisador titular desta autorização deverá comunicar a administração da unidade a fim de CANCELAR o SISBIO das atividades, as condições para realização das coletas e demais de infra-estrutura da unidade.

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Luana Lopes Pinheiro	Coordenador	265.226.547-66	RG 2027 de UF-PA	Brasileira
2	Thaís Fátima Marinho de Silva	Coordenador	265.261.295-15	3388284-2 UF-PA	Brasileira
3	Ana Francisca Farias Casarim	Coordenador	388.284.245-26	3388284-2 UF-PA	Brasileira
4	LUIS GUSTAVO RODRIGUES CARDOZO	Coordenador	200.277.803-07	8414244-52 UF-PA	Brasileira
5	Thaís Fátima Marinho	Coordenador	184.321.673-62	33025191-2 UF-PA	Brasileira

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Localidade	UF	Coordenadas do local	Outro
1	ANANIMONIA	PA	Centro Nacional de Pesquisa	Fazenda UC Fátima

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi emitido com base na Instituição Normativa nº 022014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade e integridade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio em Internet ([www.licencia.gov.br/sisbio](http://www.licencia.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 23247587



Página 03



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SIBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 47277-1	Data de Emissão: 16/12/2014 18:24	Data para Revalidação: 14/01/2018
-----------------	-----------------------------------	-----------------------------------

\* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do SioBio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

#### Dados do titular

Nome: Ana Rita de Lencastre	CPF: 265 801 098-02
Título do Projeto: Avaliação de citocinas lincoas reconstituídas derivadas de células adiposas em <i>Aedes aegypti</i> infectadas	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

#### Atividades X Taxões

#	Atividade	Taxões
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Aedes albopictus</i> , <i>Aedes triseriatus</i> , <i>Aedes albopictus</i>

#### Materiais e métodos

1	Método de coleta (Pimenta)	Outras amostras biológicas coletadas in situ
2	Método de captura/coleta (Pimenta)	Arma
3	Método de manutenção (Pimenta)	Yatajari/Arma

#### Destino do material biológico coletado

#	Museu local destino	Tipo destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi gerado com base na Instrução Normativa nº 09/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade do regulatório deste documento, por meio da página do SioBio no Internet (www.icmbio.gov.br/siobio).

Código de autenticação: 23247587



Página 2/5

