



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

LUANE LOPES PINHEIRO

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
***Saimiri sciureus*: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

BELÉM
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
MESTRADO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

LUANE LOPES PINHEIRO

CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
Saimiri sciureus: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Érika Renata Branco

BELÉM

2015

Pinheiro, Luane Lopes

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*): isolamento e caracterização. / Luane Lopes Pinheiro. - Belém, 2015.

66 f.: Il.

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

1. Células-tronco mesenquimais 2. *Saimiri sciureus* – caracterização 3. Macaco-de-cheiro - tecido adiposo - isolamento I. Título.

CDD – 616.02774

LUANE LOPES PINHEIRO

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
Saimiri sciureus: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO**

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

Aprovado em fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Érika Renata Branco – Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof^ª. Dr^ª. Edna Cristina Santos Franco – 1º Examinador
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

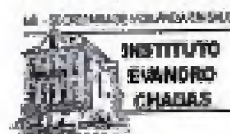
Prof^º. Dr^º. Moyses dos Santos Miranda – 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Prof^º. Dr^º. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira – 3º Examinador
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Prof^ª. Dr^ª. Ana Rita de Lima – Suplente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

PARECER DA COMISSÃO DE BIOÉTICA

CEUA



Certificado nº 31/2013

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 0031/2013, intitulado "Colheita, isolamento e diferenciação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de *Saimiri sciureus*" sob a responsabilidade da pesquisadora Érica Renata Branco, 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

DEDICATÓRIA

*Dedicada ao meu Pai,
Milton Honório Pinheiro (in memoriam),
cujo a retidão de caráter será sempre minha fonte de inspiração,
admiração e motivação.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora **Dr^a. Érika Branco**, pelos ensinamentos, confiança, oportunidade e incentivo constante, durante toda a minha vida acadêmica, e por acreditar no meu potencial para realização deste trabalho, o qual possibilitou um enorme ganho de conhecimento e crescimento profissional. Obrigada!

À Professora **Dr^a. Ana Rita de Lima**, minha co-orientadora, por todas as vezes que você me auxiliou das mais diversas maneiras. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados, disponibilidade e amizade.

Ao Professor **Dr^o. Edivaldo Herculano de Oliveira**, pelo acolhimento em seu laboratório, disponibilizando-o para a realização deste trabalho, e sobretudo, agradeço imensamente a oportunidade de conhecê-lo, e por todo o aprendizado durante o convívio com os seus orientados.

À toda equipe do **Laboratório de Cultivo de Tecidos e Citogenética**, pela forma amigável com que me receberam e pelo apoio sempre que necessário, sendo eu apenas uma "agregada". Em especial, Michelly, Nete, Michele técnica, Flavia, Ludmila, Fabio, Wallax e Benilson, pelos agradáveis momentos de convivência e descontração; à Ana Teka Tobelem por compartilhar, também, os momentos de dificuldade; e ao Michel Platini, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade e prontidão em ajudar na execução deste trabalho, desde os primeiros dias de laboratório com o cultivo celular, e principalmente, pela paciência com toda parte citogenética.

À Professora **Dr^a. Edna Franco**, pelos ensinamentos e boa vontade ao me receber em seu laboratório para realização da diferenciação e imunocitoquímica. Sua ajuda e colaboração foram imprescindíveis. Obrigada, também, aos seus orientados, Claudia e Adriano.

Ao Professor **Dr^o. Moyses Miranda**, e sua orientada Karynne, pela disponibilidade em ajudar sempre que necessário.

À pesquisadora **Klena Sarges**, pelo auxílio durante a coleta de tecido e pelo compartilhamento de materiais.

Ao Centro Nacional de Primatas e à médica veterinária **Aline Imbeloni**, pelo auxílio nos cuidados com os animais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida durante a realização desta pesquisa.

Meus agradecimentos especiais...

À minha **família**, minha mãe Lúcia, e irmãs, Vane, Leidi e Dira, pela certeza absoluta de amor incondicional, que cuida, ampara e orienta pelo resto da vida. E a minha filha canina Lua, meu presente divino, por toda demonstração de amor (e infinitas pausas) durante as horas de estudo.

Às minhas **amigas de longa data**, Dani, por todo apoio, cuidado e incentivo pessoal e profissional, e Monique, Manu, Ana Carla, Karen, Grazi e Carol, que sempre compreenderam a minha ausência e nunca se ausentaram de mim.

E a todos os meus **amigos “ufranianos”**, pelo companheirismo e torcida durante esses dois anos.

RESUMO

PINHEIRO, L. L. **Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de Saimiri sciureus: isolamento e caracterização.** 2015. 66 f. Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Os macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.) estão entre os primatas neotropicais mais utilizados como modelo biológico, com destaque, nos últimos anos, em numerosas áreas biomédicas. No entanto, ainda não foi investigado no âmbito do cultivo e terapia celular. Assim, objetivou-se isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Saimiri sciureus*, visando contribuir com futuras pesquisas a partir desta espécie, como modelo experimental em medicina regenerativa e terapia celular. Foram utilizados dois animais, adultos, machos, pertencentes ao Centro Nacional de Primatas - CENP, Ananindeua, Pará, para coleta do tecido adiposo por meio de lipectomia. As células foram isoladas por digestão enzimática e cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham's e F12 Nutrient Mixture na mesma proporção suplementado com 20% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Foram avaliadas quanto à viabilidade, morfologia, proliferação, plasticidade, imunofenotipagem e estabilidade cromossômica por análise citogenética clássica e molecular. Os procedimentos realizados permitiram fácil isolamento e expansão das células, mantendo alta viabilidade e padrão morfológico ao longo do cultivo, potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, imunofenotipagem característica de células-tronco mesenquimais e integridade citogenômica até a última passagem analisada (P8). Nossos resultados, somados às propriedades terapêuticas das células-tronco mesenquimais, demonstram segurança para transplante autólogo em ensaios clínicos utilizando o *Saimiri sciureus*.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, *Saimiri sciureus*, tecido adiposo.

ABSTRACT

PINHEIRO, L. L. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells of Saimiri sciureus: isolation and characterization. 2015. 66 f. Master of Animal Health and Production in Amazonia, Federal Rural University of Amazonia, 2015.

The squirrel monkey (genus *Saimiri*) are among the most used neotropical primates as a biological model in several biomedical areas. However, this species has not yet been investigated for cultivation stem cell therapy. Our objective was to isolate and characterize *Saimiri sciureus* adipose-derived mesenchymal stem cells, in order to contribute to future research with this species as an experimental model in regenerative medicine and cell therapy. Two individuals adult male belonging to the Centro Nacional de Primatas - CENP, Ananindeua, Pará, were used adipose tissue was collected by lipectomy. Cells were isolated by enzymatic digestion and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's e F12 Nutrient Mixture in same proportion, supplemented with 20% fetal bovine serum, at 37 ° C with 5% CO₂. The following aspects were evaluated: viability, morphology, proliferation, plasticity, immunophenotyping and chromosomal stability by cytogenetics analysis classical and molecular. Our results showed that this approach allowed easy isolation and expansion of cells, maintaining high viability and morphology during the cultivation, differentiation potential in lineages osteogenic, adipogenic and chondrogenic, immunophenotyping characteristic of mesenchymal stem cells and cytogenomics integrity in high passes (P8). Added to the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, our results demonstrated safety for autologous transplantation in clinical trials using the *Saimiri sciureus*.

Keywords: Mesenchymal stem cells, *Saimiri sciureus*, adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 1 - | Diferenças entre o padrão de formato do arco superciliar e a espessura do pincel caudal entre os grupos de Saimiri: Gótico (A) e Romano (B). Fonte: HERSHKOVITZ, 1984 | 21 |
| Figura 2 - | Macaco-de-cheiro (Saimiri sciureus). Fonte: MAGALHÃES, 2010..... | 23 |
| Figura 3 - | Plasticidade de acordo com o grau de especialização celular. Fonte: NOGUEIRA, 2009 | 26 |
| Figura 4- | Propriedades biológicas e potencial terapêutico das CTM-TA. Fonte: ONG; SUGII, 2013 | 31 |

LISTA DE FIGURAS (Artigo)

- Figura 1 - Fotomicrografia da cultura de CTM-TA de *S. sciureus* demonstrando morfologia típica de CTM-TA. (A) Células em P0 com quatro dias de cultivo. (B) Confluência celular após 8 dias de isolamento. (C) População celular com morfologia heterogênea em P1. (D) e (E) Cultivo em P4 e P8, respectivamente, mostrando manutenção da morfologia fibroblastoide e divisões mitóticas (setas). (F) Células pavimentosas com citoplasma abundante, ocasionalmente encontradas após formação de confluência exacerbada. Barra de escala: 100 μm e 50 μm 48
- Figura 2 - Viabilidade de CTM-TA de *S. sciureus* avaliada pelo teste azul de Tripan em diferentes passagens 49
- Figura 3 - Curva de crescimento de CTM-TA de *S. sciureus* quantificadas a cada 48 horas durante 20 dias, podendo-se observar a fase lag (2-4), fase log (4-10), fase platô (10-14) e declínio celular (14-20)..... 49
- Figura 4 - Diferenciação celular de CTM-TA de *S. sciureus* em P8, após indução osteogênica (A) demonstrando matriz de cálcio extracelular pela coloração Alizarin Red, adipogênica (B) demonstrando gotículas lipídicas pela coloração Oil Red O e condrogênica (C) demonstrando proteoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue. Barra de escala: 100 μm e 50 μm 50
- Figura 5 - Caracterização imunocitoquímica de CTM-TA de *S. sciureus* em P8, podendo-se observar células com morfologia fibroblastoide com imunomarcagem positiva para CD105, CD90 e CD73 e negativa para CD34 e CD79. Barra de escala: 200 μm 51
- Figura 6 - Cariótipo banda G de CTM-TA de *S. s. sciureus*: metáfases (esquerda) e cariótipos das passagens 4 (A), 6 (B) e 8 (C), mostrando $2n= 44$ cromossomos (σ)..... 52
- Figura 7 - Cariótipo de CTM-TA de *S. s. sciureus* demonstrando à direita o padrão de hibridização dos cromossomos humanos..... 53
- Figura 8 - Imagens representativas de algumas hibridizações com sonda de *Homo sapiens* (HSA) em metáfases de CTM-TA de *S. s. sciureus*..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Bovine Serum Albumine

CENP: Centro Nacional de Primatas

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CT: Células-tronco

CTM: Células-tronco Mesenquimais

CTM-TA: Células-tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil Sulfóxido

F12: Ham's F12 Nutrient Mixture

SFB: Soro Fetal Bovino

FISH: Fluorescent in Situ Hybridization

FVE: Fração Vascular Estromal

IEC: Instituto Evandro Chagas

IM: Via Intramuscular

iPS: Induced Pluripotent Stem Cell

ISCT: International Society for Cellular Therapy

NK: Natural Killer

P: Passagem

PBS: Phosphate Buffer Saline

NDP: Número de Duplicação da População

PDT: Population Doubling Time

PFA: Paraformoldeido

TC: Tempo de Cultura

UFC: Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | OBJETIVOS GERAIS | 19 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 3.1 | GÊNERO Saimiri | 21 |
| 3.2 | CARACTERÍSTICAS GERAIS DO Saimiri sciureus | 23 |
| 3.3 | UTILIZAÇÃO DO Saimiri spp. EM PESQUISAS BIOMÉDICAS | 24 |
| 3.4 | CÉLULAS-TRONCO | 26 |
| 3.5 | CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS | 27 |
| 3.6 | CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO | 30 |
| 4 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| 5 | Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de macaco-de- cheiro (Saimiri sciureus): isolamento e caracterização | 41 |
| | Introdução | 42 |
| | Materiais e Métodos | 43 |
| | Resultados | 48 |
| | Discussão | 54 |
| | Conclusão | 57 |
| | Referências | 58 |
| 6 | ANEXO | 63 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os primatas não humanos, devido às proximidades filogenéticas com o homem, são importantes modelos para o estudo de diversas doenças, e atualmente, tem se observado um considerável crescimento na utilização de primatas neotropicais em diversas áreas do conhecimento, fato atribuído a algumas vantagens em relação aos macacos do Velho Mundo (WARD; VALLENDER, 2012).

O Brasil é o país com maior diversidade de primatas do mundo. São 139 espécies e subespécies, sendo a maioria destas presentes na Amazônia (ICMBio, 2014). A disponibilidade destes animais é, certamente, um dos principais contribuintes para a ascensão do Brasil na comunidade internacional de pesquisa biomédica, onde com base na produtividade ao longo da última década, lidera países como Japão, França e Inglaterra em relação ao número de artigos publicados que usam modelos de primatas não humanos (TORRES et al., 2010).

A Família Cebidae (Primates, Platyrrhini) engloba a maioria dos primatas neotropicais, e dentre estes se destaca a subfamília Saimiriinae, a qual pertence o *Saimiri sciureus*, uma das espécies brasileiras mais utilizadas como modelo biológico devido seu tamanho relativamente pequeno e facilidade de contenção (AURICHIO, 1995; WARD; VALLENDER, 2012). Neste sentido, tal espécie torna-se interessante para estudos envolvendo terapia celular, por meio de utilização de células-tronco.

Diante da temática do estudo proposto, considera-se como célula-tronco um tipo especial de célula indiferenciada, que apresenta a capacidade de se renovar e originar diferentes tipos celulares especializados, podendo ser classificadas como embrionárias ou somáticas, de acordo com sua origem e plasticidade (BIANCO et al., 2008; KEATING, 2012; KAPUR et al., 2013)

As células-tronco mesenquimais (CTM), são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas, presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos, onde são responsáveis pela regeneração e manutenção destes (KEATING, 2012). Em virtude de suas propriedades biológicas, como potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, potencial imunomodulador, capacidade de migração para sítios de inflamação, e facilidade de isolamento e expansão em cultura, as CTM tornaram-se alvo de interesse em diversos estudos, tanto em relação a seus aspectos básicos, como em sua utilização terapêutica para o tratamento de diversas doenças (ONG; SUGII, 2013).

Nos últimos anos, as CTM já foram isoladas de uma variedade de tecidos, humanos e animais, e o crescente interesse no tecido adiposo se dá em função de importantes vantagens em relação às outras fontes de células-tronco (KOKAI et al., 2013). As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) apresentam taxa de sucesso de isolamento e rendimento maior comparadas à medula óssea (NAGATA et al., 2013), e se destacam pela facilidade, rapidez e segurança de coleta e processamento (YARAK; OKAMOTO, 2010), possibilitando sua obtenção por meio de procedimentos minimamente invasivos, como lipossucção e lipectomia (MONACO et al., 2009).

O isolamento das CTM-TA foi realizado com sucesso em diversos grupos animais, entretanto, até o presente momento não foi descrito na espécie *Saimiri sciureus*, fato relevante para este estudo considerando a importante utilização deste primata neotropical em pesquisas biomédicas (ANDRADE et al., 2010).

Assim, estabelecer procedimentos para isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Saimiri sciureus*, visa contribuir com futuros estudos experimentais, aplicados em medicina regenerativa e terapia celular, em que se possam utilizar tal animal como modelo para determinadas doenças.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Estabelecer procedimentos de colheita, isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Saimiri sciureus*.

2.2 Objetivos Específicos:

- Estabelecer uma técnica de colheita de tecido adiposo e isolamento de células-tronco mesenquimais de *Saimiri sciureus*;
- Analisar a capacidade de proliferação das células-tronco mesenquimais por meio de uma curva de crescimento;
- Verificar a expressão dos marcadores de superfície celular CD105, CD90 e CD73 e a ausência de marcadores de células hematopoiéticas CD34 e CD79;
- Comprovar seu potencial de diferenciação em multilinhagens pelo ensaio de diferenciação em três tipos (osteogênica, adipogênica e condrogênica);
- Avaliar a estabilidade cromossômica das células-tronco mesenquimais em diferentes passagens por análise citogenética clássica e molecular (FISH).

REVISÃO
DE
LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *Saimiri*

A taxonomia do gênero *Saimiri* é uma das mais controvertidas dentre os primatas do Novo Mundo (ROCHA, 2002). Pertence à família Cebidae, subfamília Saimirinae, popularmente são conhecidos no Brasil como macaco-de-cheiro, mão-de-ouro, cai-pussu, jurupari, boca-preta, e em inglês squirrel monkey (SILVA JR. et al., 2008).

Há diferentes propostas quanto ao número de espécies no gênero, e o arranjo filogenético entre elas também gera discordâncias (HERSHKOVITZ, 1984, 1987; THORINGTON, 1985; COSTELLO et al., 1993; BOINSKI; CROOP, 1999; GROVES, 2005).

Segundo Hershkovitz (1984, 1987) existem quatro espécies organizadas em dois grandes grupos: o gótico e o romano, distinguidos por características externas, como formato do arco superciliar e espessura do pincel caudal, comportamento e distribuição geográfica (Figura 1). O grupo gótico ocorre na América do Sul e Central, possui o arco gótico, com ponta de cauda com tufo grosso, e é representado pelas espécies *Saimiri sciureus*, subespécies *S. s. sciureus*, *S. s. albigena*, *S. s. cassiquiarensis* e *S. s. macrodon*; *Saimiri ustus*; e *Saimiri oerstedii*, subespécies *S. o. oerstedii* e *S. o. citrinellus*. Já o grupo romano ocorre apenas na América do Sul, possui arco romano associado a uma ponta de cauda com tufo fino, e é representado apenas pela espécie *Saimiri boliviensis*, com cinco subespécies (*S. b. boliviensis*, *S. b. jaburuensis*, *S. b. peruviensis*, *S. b. pluvialis* e *S. b. vanzolini*).

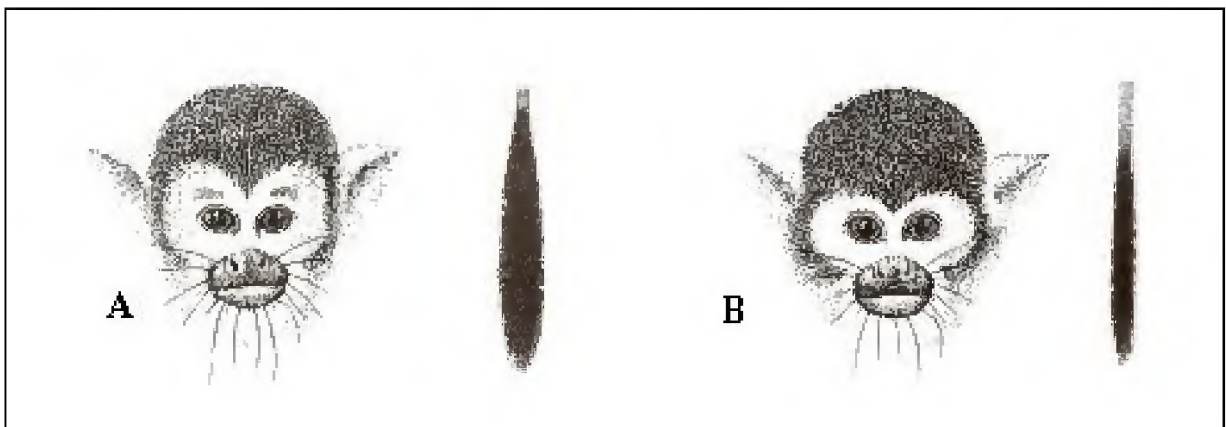


Figura 1. Diferenças entre o padrão de formato do arco superciliar e a espessura do pincel caudal entre os grupos de *Saimiri*: Gótico (A) e Romano (B). Fonte: HERSHKOVITZ, 1984.

Para Thorington Jr. (1985), que analisou caracteres craniométricos, o gênero *Saimiri* possui apenas duas espécies: *Saimiri sciureus*, com quatro subespécies (*S. s. sciureus*, *S. s. boliviensis*, *S. s. cassiquarensis* e *S. s. oerstedii*) e *Saimiri madeirae* (=ustus). Ainda em 1985, Ayres descreveu uma nova espécie, *Saimiri vanzolinii*, alterando tais propostas.

Costello et al. (1993) averiguaram dados sobre morfologia, distribuição geográfica, ecologia, comportamento, bioquímica e caracteres crânio-dentários, reconhecendo apenas duas espécies: *S. oerstedii* (na América Central) e *S. sciureus* (na América do Sul), enquanto Boinski e Croop (1999) avaliando dados morfológicos, comportamentais, genes nucleares e mitocondriais, sugeriram a existência de quatro espécies: *S. sciureus*, *S. boliviensis*, *S. oerstedii* e *S. ustus*, corroborando a proposta de Hershkovitz (1984).

Após revisão da literatura em taxonomia, e com base em características genéticas, físicas e comportamentais, Groves (2005) propôs a classificação do gênero em cinco espécies: *Saimiri sciureus*, *Saimiri ustus*, *Saimiri oerstedii*, *Saimiri vanzolinii* e *Saimiri boliviensis*.

A identificação precisa do macaco-de-cheiro requer, muitas vezes, além da análise do fenótipo, a análise do cariótipo. Com relação aos estudos citogenéticos realizados até o momento em espécies e subespécies, todas apresentam 44 cromossomos (diplóide), entretanto, variam quanto ao seu número de pares autossômicos acrocêntricos entre 5 a 7 (ABEE, 2000) (Tabela 1).

No presente trabalho, utilizaremos a classificação proposta por Hershkovitz (1984).

Tabela 1. Autossomos acrocêntricos entre subespécies de *Saimiri* (Adaptado de ABEE, 2000).

| Nome científico | Nº de cromossomos (Diplóide) | Variação | Autossomos Acrocêntricos |
|-----------------------------------|---------------------------------|----------|-----------------------------|
| <i>Saimiri sciureus</i> | | | |
| <i>S. sciureus sciureus</i> | 44 | Gótico | 7 |
| <i>S. sciureus macrodon</i> | 44 | Gótico | 6 |
| <i>Saimiri boliviensis</i> | | | |
| <i>S. boliviensis boliviensis</i> | 44 | Romano | 6 |
| <i>S. boliviensis peruviansis</i> | 44 | Romano | 5 |
| <i>S. boliviensis vanzolinii</i> | 44 | Romano | 6 |
| <i>Saimiri oerstedii</i> | | | |
| <i>S. oerstedii oerstedii</i> | 44 | Gótico | 5 |
| <i>Saimiri ustus</i> | | | |
| | 44 | Gótico | 5 |

Fonte: HERSHOKOVITZ, 1984.

3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO *Saimiri sciureus*

O *Saimiri sciureus* possui ampla distribuição geográfica estando presente em vários países, como Brasil, Colômbia, Guiana Francesa, Guiana, Suriname e Venezuela (GROVES, 2005). É amplamente encontrado na Amazônia oriental, onde ao sul do rio Amazonas, sua distribuição se estende desde o rio Tapajós até a zona de transição entre os domínios Amazônicos e dos Cerrados, no Maranhão. E ao norte, ocorre desde a margem esquerda dos rios Negro e Branco até a costa atlântica do Amapá e das Guianas (SILVA JR. et al., 2008).

Esta espécie pertence ao grupo denominado “Gótico”, possuindo uma máscara facial branca e pêlos do capuz formando um desenho em forma de “V” entre os olhos. Apresentam a região circumbucal de coloração escura e pelagem curta e espessa, com coloração geral aguti-acinzentada. Possuem orelhas peludas e cauda não preênsil, com um tufo de pêlos no seu terço terminal, em forma de “pincel”. Outras características são: mãos, pés e a maior parte da superfície interna e parte proximal de toda a superfície externa dos antebraços laranja ou amarelado (SILVA JR. et al., 2008) (Figura 2).



Figura 2. Macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*). Fonte: MAGALHÃES, 2010.

Os *S. sciureus* atingem a maturidade sexual em um curto período de tempo (2,5 a 3 anos de idade) e são sexualmente dimórficos, expressado na coloração da pelagem e medidas biométricas. As fêmeas adultas desenvolvem uma mancha pré-auricular na pelagem, de coloração negra, enquanto que os machos, na maioria das medidas corporais e cranianas são maiores, sendo também mais pesados, especialmente durante o período reprodutivo (SILVA JR. et al., 2008).

São primariamente arborícolas, de hábitos diurnos, mas conseguem se deslocar de forma muito eficiente pelo solo (AURICHIO, 1995). Alimentam-se de uma grande variedade de itens, como frutas, insetos, néctar, folhas, flores e pequenos vertebrados (SILVA JR. et al., 2008). E de maneira geral, apresentam uma estrutura social com machos dominantes, fracos laços sociais entre fêmeas, e frequente e intensa competição por alimentos (MAGALHÃES et al., 2010).

3.3 UTILIZAÇÃO DO *Saimiri* spp. EM PESQUISAS BIOMÉDICAS

Para a investigação biomédica, os primatas não humanos são importantes modelos animais para o estudo de diversas doenças, devido a sua maior proximidade filogenética com os seres humanos (WARD; VALLENDER, 2012). A presença de maiores semelhanças, do que com outros modelos animais, em termos de genética, anatomia, fisiologia e comportamento, permitem desenhos experimentais longitudinais complexos e melhor previsão da resposta ao tratamento em seres humanos (PLATT et al., 2012).

Os macacos do Velho Mundo foram os primeiros modelos de primatas não humanos, tanto por razões históricas de acesso, bem como pela proximidade filogenética, entretanto, nas últimas quatro décadas tem-se observado um considerável crescimento nas pesquisas com primatas neotropicais em diversas áreas do conhecimento (TORRES et al., 2010; WARD; VALLENDER, 2012).

Esse fato pode ser atribuído a algumas vantagens em relação aos macacos do Velho Mundo, como menor tamanho, que varia de pequeno a médio porte, permitindo a diminuição dos custos de manutenção da colônia com alimentação, manejo e instalações (alojamento em grupo), e na pesquisa farmacológica, reduzindo custos na síntese de compostos; disponibilidade das espécies; boa adaptabilidade às condições de cativeiro; facilidade de manejo; bom desempenho reprodutivo e alcance de maturidade sexual mais cedo; menor

expectativa de vida, com máximo de 15 anos em cativeiro, o que permite estudo do envelhecimento e de doenças relacionadas à idade; e, além disso, macacos do Novo Mundo não portam naturalmente o herpes vírus B, diminuindo preocupações em relação à biossegurança (TORRES et al., 2010; WARD; VALLENDER, 2012).

O sagui comum (*Callithrix jacchus*) e os macacos-de-cheiro (*Saimiri* spp.) são as espécies do Novo Mundo mais comumente utilizadas, ambos se destacaram como valiosos animais em numerosas áreas biomédicas por melhor se encaixarem às condições supracitadas, e recentemente, impulsionado pelo sequenciamento do genoma do sagui comum, e lançamento pendente do genoma do *Saimiri boliviensis boliviensis* (WARD; VALLENDER, 2012).

Os macacos-de-cheiro mais utilizados são o *Saimiri sciureus sciureus*, o *Saimiri boliviensis boliviensis* e o *Saimiri boliviensis peruviansis*, sendo que os três são geneticamente distinto entre si (VANDEBERG et al., 1990) e apresentam variabilidade fenotípica (ZIMBLER-DELORENZO; STONE, 2011). A principal dificuldade em estudos com macacos-de-cheiro tem sido exatamente, a existência de variabilidade genética entre as populações e a não compreensão concreta acerca da filogenia do gênero *Saimiri*, o que tem tornado comum na literatura, a não identificação ou má identificação de espécies e subespécies de macacos-de-cheiro, por negligência da comunidade biomédica onde são valiosos modelos (WARD; VALLENDER, 2012).

Além das vantagens comuns aos demais primatas neotropicais, os macacos-de-cheiro apresentam uma maior tolerância a alguns fatores de estresse ambientais associados a centros de pesquisa (TARDIF et al., 2006). Historicamente, estes serviram como modelos para o estudo de doenças parasitárias (GALLAND, 2000), mas também para inúmeras pesquisas de ciência clínica e comportamental (WILLIAMS; GLASGOW, 2000).

De acordo com Andrade et al. (2010), durante a década de 90, com os avanços da biologia molecular e celular, os estudos do sistema nervoso central, do comportamento e da percepção, utilizando o *Saimiri* spp. foram os mais publicados na literatura científica. E neste sentido, torna-se, também, interessante para estudos envolvendo terapia celular, por meio de utilização de células-tronco.

3.4 CÉLULAS-TROCO

As células-tronco (CT) são células indiferenciadas, que apresentam como características fundamentais a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares (BIANCO et al., 2008; KEATING, 2012; KAPUR et al., 2013). Para isso, essas células apresentam uma divisão assimétrica, gerando duas células filhas diferente: uma idêntica à mãe, mantendo seu estado indiferenciado e proporcionando a reposição ativa da sua população, e outra comprometida com uma via de diferenciação, na qual o microambiente celular fornece os sinais que definem a direção da diferenciação (GODARA et al., 2008).

De acordo com sua origem e plasticidade, ou seja, capacidade em originar tecidos do organismo, as CT têm sido convencionalmente classificadas em embrionárias ou adultas. As CT de origem embrionária são isoladas da massa celular interna do embrião no estágio de blastocisto, e são pluripotentes, sendo capazes de se diferenciar em qualquer linhagem derivada dos três folhetos embrionários: endoderma, mesoderma e ectoderma. Já as com origem a partir do zigoto, são classificadas como totipotentes, podendo se diferenciar nas células dos três folhetos embrionários, além de células dos anexos embrionários (BIANCO et al., 2008; KEATING, 2012). As CT adultas, ou somáticas, são encontradas em tecidos desenvolvidos (feto, recém-nascido, juvenil ou adulto) e classificadas como multipotentes, possuindo um potencial de diferenciação mais limitado, em tipos celulares do mesmo folheto embrionário de origem (SERAKINCI; KEITH, 2006; KEATING, 2012) (Figura 3).

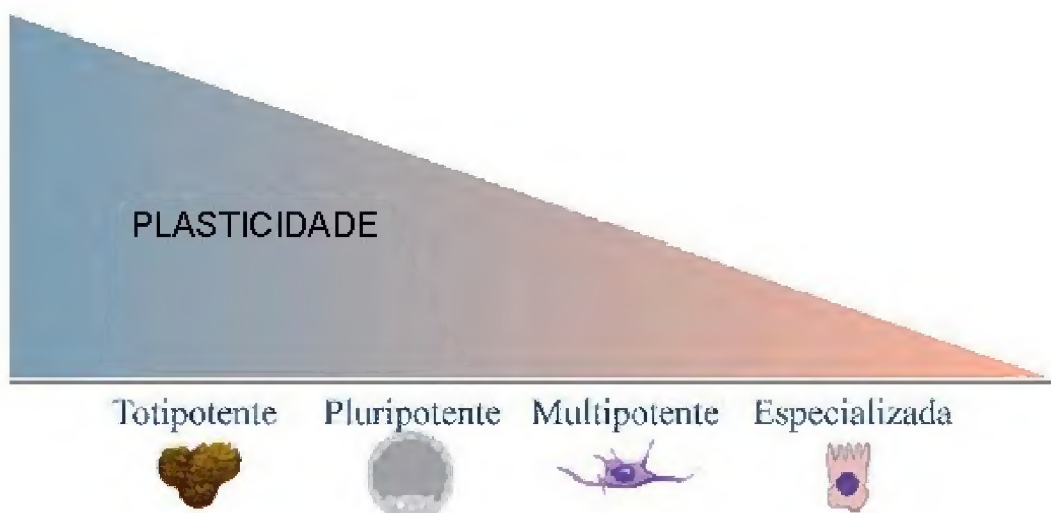


Figura 3. Plasticidade de acordo com o grau de especialização celular. Fonte: NOGUEIRA, 2009.

Desde a descrição do primeiro isolamento e cultivo de CT embrionárias humanas em 1998 (THOMSON et al., 1998), a pluripotência dessas células abriu possibilidades visionárias para o tratamento de uma variedade de doenças. No entanto, a sua utilização está limitada por fatores éticos e religiosos, e a sua aplicação clínica apresenta importantes obstáculos, relativos ao seu potencial de tumorigenicidade e a possibilidade de reações de rejeição imunológica, por representarem uma fonte alogênica de células (MIMEAULT et al., 2007).

Dessa forma, as CT adultas, menos polêmicas, porém, tanto quanto promissoras, surgiram como alternativa no cenário científico mundial, e têm sido objeto de diversos estudos devido o seu potencial em aplicações terapêuticas (DOMINICI et al., 2006; ONG; SUGII, 2013).

3.5 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas, presentes em regiões perivascularares de tecidos adultos, responsáveis pela regeneração e manutenção destes (KEATING, 2012).

Foram identificadas por Friedenstein e colaboradores, nas décadas de 1960 e 1970, como uma subpopulação de células da medula óssea com potencial osteogênico, caracterizadas pela aderência rápida ao plástico de cultura de tecidos, aparência do tipo fibroblastoide e pela capacidade de se desenvolver em unidade formadora de colônia (UFC) (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Posteriormente, Owen (1988) propôs a ideia de uma célula-tronco não-hematopoiética da medula óssea, e Caplan (1991), com base na capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares, foi quem propôs o termo célula-tronco mesenquimal.

Além da medula óssea, as populações de CTM foram isoladas a partir de uma variedade de tecidos, incluindo sangue do cordão umbilical (ERICES et al., 2000), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), tecido adiposo (ZUK et al., 2001), placenta (FUKUCHI et al., 2004), polpa dentária (WANG et al., 2004), pele (SHIH et al., 2005), células perivascularares do cordão umbilical (SARUGASER et al., De 2005) e fluido amniótico (NADRI; SOLEIMANI, 2007).

Comparações entre estudos publicados nas décadas de 1990 e 2000 revelaram certa confusão quanto à definição de CTM, o que levou à proposta de uma nova terminologia e

critérios por parte da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, do inglês International Society for Cellular Therapy) (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006). Conforme estas propostas, os critérios para caracterização de CTM incluem aderência ao plástico, diferenciação *in vitro* em três linhagens diferentes (adipogênica, condrogênica e osteogênica), expressão de marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e ausência de marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79, e moléculas de superfície HLA-DR (KEATING, 2012). Um dos grandes desafios para o campo tem sido exatamente a ausência de um marcador específico para definir as CTM (KEATING, 2012).

Denominadas multipotentes, antigamente acreditava-se que as CTM possuíssem seu potencial de diferenciação restrito somente às células de mesma origem embrionária do tecido no qual se encontrava. Entretanto, diversas pesquisas demonstraram uma maior plasticidade, podendo originar tecidos mesodermis e não mesodermis, o que aumentou o interesse nessas células (ASHJIAN et al., 2003; PLANAT-BENAD et al., 2004; TIMPER et al., 2006; KOKAI et al., 2013).

Em virtude do seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, inicialmente, pensava-se em seu uso para mediar a reparação tecidual por meio de substituição das células danificadas (MAHMOOD et al., 2003). Entretanto, hoje é conhecido que a resposta à lesão tecidual se dá pela reparação em função de efeitos parácrinos e imunomoduladores, por meio da produção de diversos fatores tróficos, alguns dos quais fornecem base para sua capacidade em modular respostas imunes (CHEN et al., 2008; KARP; LENG TEO, 2009; KOKAI et al., 2013).

Neste sentido, as CTM não estão envolvidas apenas no processo de reparação e homeostase dos tecidos dos quais são isoladas, mas também contribuem para a recuperação e a regeneração de outros tipos celulares, pois expressam um grande número de moléculas bioativas, como moléculas de adesão (selectinas e integrinas), proteínas de matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento (fator de crescimento do hepatócito, fator de crescimento epidermal, fator de crescimento do fibroblasto e fator de crescimento semelhante à insulina) (TOBITA et al., 2011), os quais são capazes de promover um efeito reparador endógeno, antiinflamatório, antiapoptótico, pró-angiogênico, neurotróficos, imunomodulador e antifibrótico no processo de reparação tecidual (KEATING, 2012; KOKAI et al., 2013; ONG; SUGII, 2013).

Além de possuírem propriedades imunossupressoras devido a habilidade de suprimir a ativação e proliferação de linfócitos T e B, células natural killer (NK) e células dendríticas (KEATING, 2012), as CTM não expressam o complexo principal de histocompatibilidade

classe II (MHC-II), e expressam pequenas quantidades de classe I (MHC-I), o que permite que as células de defesa do organismo, as quais utilizam o MHC para reconhecimento do próprio e do não-próprio, falhem ao tentar ativar o sistema imunológico do hospedeiro (SALGADO et al., 2010).

Assim, as CTM tornaram-se alvo de interesse dos cientistas, tanto em seus aspectos básicos, como pelo seu potencial em aplicações terapêuticas (KEATING, 2012). Apesar de possuírem a capacidade de se expandir inúmeras vezes em cultura, para sua utilização em terapia celular, existe um consenso de que devem ser utilizadas apenas em baixas passagens (geralmente considerado até o subcultivo 4 ou 5), devido a indícios da ocorrência de alterações cromossômicas, senescência replicativa e perda de função, como resultado de cultura prolongada (MIURA et al., 2006; WAGNER et al., 2008).

As CTM possuem a capacidade de migrar para tecidos lesionados em resposta a gradientes quimiotáticos, e muito se tem pesquisado a respeito da mobilização de CTM nativas e do homing de CTM exógenas infundidas por diferentes vias, sendo homing, definido como a captura das CTM pela vasculatura de um tecido, seguido de sua transmigração através do endotélio (KARP et al., 2009).

As CTM podem ser administradas combinadas à biomateriais, ou isoladas, por vias de administração sistêmica, como a intravenosa, intraperitoneal e intraarterial, ou diretamente no local de interesse, como a intracardíaca (KARP et al., 2009). A via de administração é uma das variáveis importantes que pode definir o sucesso de um transplante de células-tronco por interferir diretamente no fornecimento eficiente de células para o local de interesse (ZHAO et al., 2012).

A via sistêmica venosa, por ser a menos invasiva, tem sido a mais utilizada em estudos pré-clínicos e clínicos, entretanto, além do desconhecimento da real concentração celular necessária para alcançar a área de lesão desejada, estudos tem demonstrado que as CTM após administração acumulam-se rapidamente nos pulmões, baço e fígado (KARP et al., 2009; ZHAO et al., 2012). Já a administração pela via sistêmica arterial, por ignorar a captação inicial pelos pulmões, resulta em maior disponibilidade de células para sítios de isquemia, porém, podem conduzir a uma maior probabilidade de oclusões microvasculares (WALCZAK et al., 2008; KARP et al., 2009)

3.6 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE

O tecido adiposo apresenta importantes funções no organismo, como fornecer rigidez e resistência aos tecidos, manter a homeostase térmica, auxiliar na estática visceral, servir como reservatório de energia e funcionar como um órgão endócrino (ZUTTON et al., 2013; KOKAI et al., 2013). Distribui-se no organismo como tecido adiposo branco subcutâneo e tecido adiposo branco visceral, consistindo em uma população celular heterogênea, chamada de Fração Vascular Estromal (FVE), formada por adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, pericitos vasculares, células hematopoiéticas, células endoteliais, células musculares lisas e células-tronco mesenquimais (ONG; SUGII, 2013).

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTM-TA) foram caracterizadas pela primeira vez por Zuk et al. (2001), e referem-se à população de células aderentes isoladas da FVE, de morfologia fibroblastoide, e multipotentes, possuindo as propriedades tradicionais de CTM isoladas a partir da medula óssea (ONG; SUGII, 2013).

Nos últimos anos, o interesse no tecido adiposo tem crescido em função de importantes vantagens em relação às outras fontes de células-tronco. Em relação à quantidade, as CTM-TA estão abundantemente presentes no tecido adiposo, onde constituem 1% das células totais, quando comparado com apenas 0,001-0,002% de CTM na medula óssea, apresentando, conseqüentemente, uma taxa de sucesso de isolamento e rendimento muito maior (NAGATA et al., 2013). E, além disso, o tecido adiposo se destaca pelo fácil acesso, rapidez e segurança de coleta e processamento, possibilitando sua obtenção por meio de procedimentos minimamente invasivos, como a liposucção e a lipectomia (YARAK; OKAMOTO, 2010).

Diversos estudos têm apresentado um amplo potencial de diferenciação *in vitro* das CTM-TA em diferentes linhagens celulares. Além de células de mesma origem mesodérmica, como condrócitos, osteócitos, adipócitos (ZUK et al. 2001) e miócitos (MIZUMO et al., 2002), também foi mostrada a diferenciação em neurônios (SAFFORD et al., 2002; ASHJIAN et al., 2003), cardiomiócitos (PLANAT-BENAD et al., 2004), células endoteliais (MIRANVILLE et al., 2004), hepatócitos (SEO et al., 2005), células epiteliais (BRZOSKA et al., 2005) e células pancreáticas endócrinas (TIMPER et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo indiferenciadas podem ser administradas tanto através da circulação sistêmica, ou diretamente no local da lesão, para posterior diferenciação *in vivo* no tipo celular apropriado (ONG; SUGII, 2013). As CTM-TA

demonstram capacidade de migrar preferencialmente à sítios de inflamação, devido a expressão de alguns receptores de quimiocinas e ligantes específicos, pelo tecido lesionado, permitindo o direcionamento em um mecanismo semelhante à migração transendotelial e diapedese dos leucócitos (KATZ; MERICLI, 2011).

Outras propriedades biológicas das CTM-TA para aplicação clínica, além da capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens e homing para áreas de injúria, incluem a secreção de fatores de crescimento, os quais atuam na reparação tecidual por mecanismos parácrinos (SALGADO et al., 2010; KAPUR et al., 2013), e o seu potencial imunomodulador, o qual promove a reparação por meio de efeitos imunossupressores (McINTOSH et al., 2013). Além disso, assim como as CTM de outras fontes, as CTM-TA também não expressam MHC-II, o que potencialmente permite o transplante alogênico em pacientes imunocompetentes, com o mínimo de reações imunes no hospedeiro (ONG; SUGII, 2013) (Figura 3).

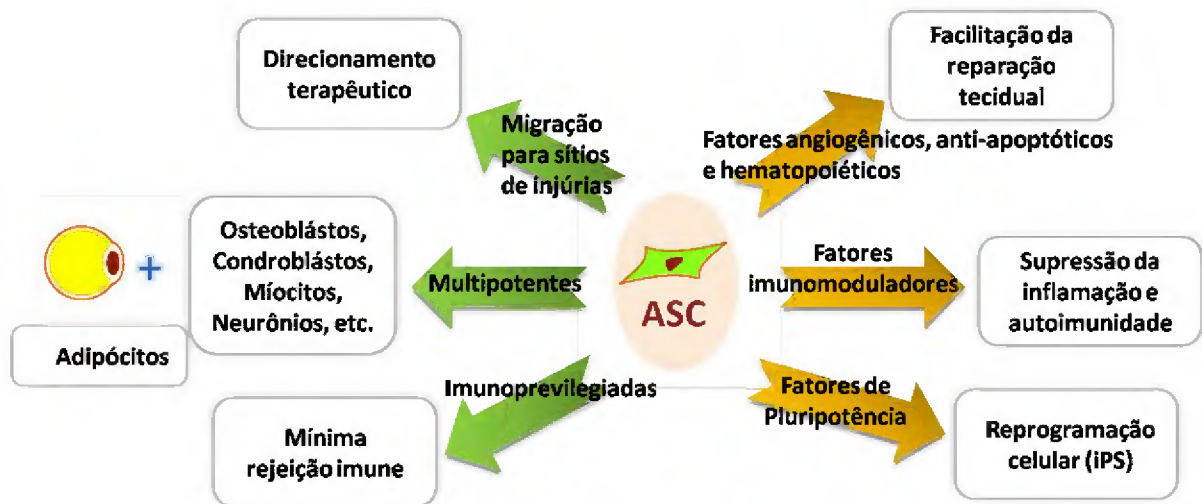


Figura 4. Propriedades biológicas e potencial terapêutico das CTM-TA (ASC, do inglês Adipose-derived Stem Cell). Fonte: Adaptado de ONG; SUGII, 2013.

Em modelos animais, as CTM-TA têm mostrado efeitos positivos em algumas aplicações terapêuticas, como, por exemplo, na regeneração após danos nos rins (YANG et al., 2013), acidente vascular cerebral (IKEGAME et al., 2011), infarto do miocárdio (GNECCHI et al., 2008), lesão do nervo periférico (MARCONI et al., 2012), lesão da medula espinhal (RYU et al., 2009) e esclerose lateral amiotrófica (MARCONI et al., 2013).

Outro interesse crescente nas CTM-TA está relacionado ao seu uso para geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS Cells, do inglês Induced Pluripotent Stem Cells) (ONG; SUGII, 2013). As iPS são células geneticamente modificadas e reprogramadas, que se originam de células somáticas ou de células-tronco somáticas, por meio de mecanismos de transfecção celular de fatores que são altamente expressados por células-tronco embrionárias (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4), gerando exemplares pluripotentes similares à estas (TAKAHASHI et al., 2007). Segundo Sugii et al. (2010), a eficiência na reprogramação de CTM-TA para produção de iPS, é substancialmente maior do que a descrita a partir de fibroblastos de seres humanos e camundongos, devido a secreção intrínseca de um alto nível de fatores de auto-renovação pelas CTM-TA.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEE, C. R. Squirrel Monkey (*Saimiri* spp.) Research and Resources. **ILAR Journal**, v. 41, n. 1, p.2-9, 2000.
- ANDRADE, A., RIBEIRO, M. C., MARINHO, A. M., FERREIRA FILH, J. **Biologia, manejo e medicina de primatas não humanos na pesquisa biomédica**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2010. 471 p.
- ASHJIAN, P. H., ELBARBARY, A. S., EDMONDS, B., DEUGARTE, D., ZHU, M., ZUK, P. A., LORENZ, H. P., BENHAIM, P., HEDRICK, M. H. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 11, p. 1922–1931, 2003.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. Guarulhos: Terra Brasilis, 1995. 168p.
- AYRES, J. M. C. On a new species of squirrel monkeys, genus *Saimiri*, from Brazilian Amazonia (Primates, Cebidae). **Papeis Avulsos de Zoologia**, v. 36, p. 147-164, 1985.
- BIANCO, P., ROBEY, P. G., SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. **Stem Cell Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.
- BOINSKI, S.; CROOP, S. J. Disparate data sets resolve squirrel monkey (*Saimiri*) taxonomy: Implications for behavioral ecology and biomedical usage. **Journal of Primatology**, n. 20, p. 237-256, 1999.
- BRZOSKA, M., GEIGER, H., GAUER, S., BAER, P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 330, p. 142-50, 2005.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.
- CHEN, L., TREDGET, E.E., WU, P.Y., AND WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. **PLoS One**, v. 3, 2008.
- COSTELLO, R. K., DICKNSON, A. L., ROSENBERGER, S., BOINSKI, SZALAY, F. S. **Squirrel monkeys (genus *Saimiri*) Taxonomy: a multidisciplinary study of the biology of species**. In Kimbel and Martin, p. 177-210, 1993.
- DE BARI, C., DELL'ACCIO, F., TYLZANOWSKI, P., LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis & Rheumatology**, v. 44, p. 1928–1942, 2001.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., KRAUSE, D.S., DEANS, R.J., KEATING, A., PROCKOP, DJ., AND HORWITZ,

E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315–317, 2006.

ERICES, A., CONGET, P., MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, v. 109, p. 235–242, 2000.

FRIEDENSTEIN, A.J., GORSKAJA, J.F., AND KULAGINA, N.N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, p. 267–274, 1976.

FUKUCHI, Y., NAKAJIMA, H., SUGIYAMA, D., HIROSE, I., KITAMURA, T., TSUJI, K. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 649-58, 2004.

GALLAND, G. G. Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. **ILAR Journal**, v. 41, p.37-43, 2000.

GODARA, P., NORDON, R. E., MCFARLAND, C. D. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 83, p. 397-407, 2008.

GNECCHI, M., ZHANG, Z., NI, A., DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, p. 1204–19, 2008.

GROVES, C. P. Order Primates. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (eds.). **Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. 3.ed., Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. p.111-184. v.1

HERSHKOVITZ, P. Taxonomy of squirrel monkeys genus *Saimiri* (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report with description of a hitherto unnamed form. **American Journal of Primatology**, v. 7, p. 155-210, 1984.

HERSHKOVITZ, P. Ucares, New World monkeys of the genus *Cacajao* (Cebidae, Platyrrhini): a preliminary taxonomic review with the description of a new subspecies. **American Journal of Primatology**, v. 12, p. 1-53, 1987.

HORWITZ, E. M.; LE 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. 393-395, 2005.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Primatas Brasileiros**, 2014. <<http://www.icmbio.gov.br/cpb/primatas-brasileiros.html>>. Acessado em 24 de julho de 2014.

IKEGAME, Y., YAMASHITA, K., HAYASHI, S., MIZUNO, H., TAWADA, M., YOU, F., YAMADA, K., TANAKA, Y., EGASHIRA, Y., NAKASHIMA, S., YOSHIMURA, S., IWAMA, T. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. **Cytotherapy**, v. 13, n. 6, p. 675-685, 2011.

KAPUR, S. K., KATZ, A. J. Review of the adipose derived stem cell secretome. **Biochimie**, v. 12, p. 2222-8, 2013.

KARP, J.M., LENG TEO, G.S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, p. 206–216, 2009.

KATZ, A., MERICLI, A. Stem cells derived from fat. In: ATALA, A., LANZA, R., THOMSON, J., NEREM, R., editors. **Principles of regenerative medicine**. Academic Press, p. 365–81, 2011.

KEATING, A. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. **Cell Stem Cell**, v. 20, p. 709-716, 2012.

KOKAI, L. E., MARRA, K., RUBIN, J. P. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. **Translational Research**, p. 1-10, 2013.

MAGALHÃES, T. P. **Ecologia, comportamento e associações poliespecíficas do macaco-de-cheiro (Saimiri sciureus), Amazônia oriental**. 2010. Dissertação (Mestrado). 66f. Programa de Pós-graduação em Zoologia, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2010.

MAHMOOD, A., LU, D., LU, M., CHOPP, M. Treatment of traumatic injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. **Neurosurgery**, v. 53, p. 697–702, 2003.

MARCONI S. et al., Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. **Neuroscience**, v. 248, p. 333-343, 2013.

MARCONI, S., CASTIGLIONE, G., TURANO, E., BISSOLOTTI, G., ANGIARI, S., FARINAZZO, A., CONSTANTIN, G., BEDOGNI, G., BEDOGNI, A., BONETTI, B. Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. **Tissue Engineering Part A**, v. 18, p. 1264–72, 2012.

McINTOSH, K. R., FRAZIER, T., ROWAN, B. G., GIMBLE, J. M. Evolution and future prospects of adipose-derived immunomodulatory cell therapeutics. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 9, p. 175–84, 2013.

MIRANVILLE, A., HEESCHEN, C., SENGENES, C., CURAT, C.A., BUSSE, R., BOULOUMIE, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. **Circulation**, v. 110, p. 349–355, 2004.

MIURA, M., MIURA, Y., PADILLA-NASH, H.M., MOLINOLO, A.A., FU, B., PATEL, V., SEO, B.M., SONOYAMA, W., ZHENG, J.J., BAKER, C.C. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. **Stem Cells**, v. 24, p. 1095–1103, 2006.

MONACO, E.; LIMA, A. S.; BIONAZ, M.; MAKI, A.; WILSON, S. M.; HURLEY, W. L.; WHEELER, M. B. Morphological and transcriptomic comparison of adipose and bone

marrow derived porcine stem cells. **The open tissue engineering & regenerative medicine journal**, v. 2, p. 20-33, 2009.

NAGATA, T., TOMOYUKIMITSUMORI, A. B. C, HIDEKI IWAGURO, C.N. Adipose tissue-derived stem and regenerative cells for tissue regeneration. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, p. 127–131, 2013.

NADRI, S., SOLEIMANI, M. Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. **Cytotherapy**, v. 9, p. 729–737, 2007.

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

ONG, W. K., SUGII, S. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 1083– 1086, 2013.

OWEN, M., FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation symposium**, v. 136, p. 42-60, 1988.

PLANAT-BENAD, V., MENARD, C., ANDRE, M. et al., Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circulation Research**, v. 94, p. 223–229, 2004.

PLATT, D. M., CAREY, G., SPEALMAN, R. D. Models of Neurological Disease (Substance Abuse): Self-Administration in Monkeys. **NIH-PA Author Manuscript: Curr Protoc Pharmacol**. p. 2-23, 2012.

ROCHA, D. C. C. **Mapeamento citogenético comparativo de Saimiri boliviensis e Saimiri ustus com Homo sapiens e Saguinus oedipus por FISH-Multicolor**. 2002. 151 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Belém, 2002.

RYU, H. H., LIM, J. H, BYEON, Y. E, et al. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adiposederived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, p. 273–84, 2009.

SAFFORD, K. M., HICOK, K. C., SAFFORD, S. D., HALVORSEN, Y. D., WILKISON, W. O., GIMBLE, J. M., RICE, H. E. Neurogenic differentiation of murine and human adiposederived stromal cells. **Biochem Biophys Res Commun**, V. 294, p. 371–379, 2002.

SALGADO, A. J, REIS, R. L, SOUSA, N. J., GIMBLE, J. M. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, p. 103–10, 2010.

SARUGASER, R., LICKORISH, D., BAKSH, D., HOSSEINI, M.M., AND DAVIES, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. **Stem Cells**, v. 23, p. 220–229, 2005.

SCHÄFFLER, A., BÜCHLER, C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells basic and clinical implications for novel cellbasedtherapies. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 818-27, 2007.

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

SERAKINCI, N., KEITH, W. N. Therapeutic potencial of adult stem cells. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 9, p. 1243-6, 2006.

SHIH, S., BARTOLD, P. M., MIURA, M. et al. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 8, p. 191–199, 2005.

SILVA JR, J. S., SILVA, C.R, KASECHER, T. P. **Primatas do Amapá. Guia de identificação de bolso**. Bogotá: Panamericana, 2008.

SUGII, S., KIDA, Y., KAWAMURA, T., SUZUKI, J., VASSENA, R., YIN, YQ., et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v, 107, p. 3558–63, 2010.

TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K., YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, p. 1-12, 2007.

TARDIF, S., BALES, K., WILLIAMS, L., MOELLER, E. L., ABBOTT, D., SCHULTZ-ESCURECER, N., MENDOZA, S., MASON, W., BOURGEOIS, S., RUIZ, J. Preparing New World monkeys for laboratory research. **ILAR Journal**, v. 47, p. 307–315, 2006.

THOMSON, J. A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S. S., WAKNITZ, M. A., SWIERGIEL, J. J., MARSHAL, V. S. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Hum an Blastocysts. **Science**, v. 282, p.1145-47, 1998.

THORINGTON JR., R. W. The taxonomy and distribution of squirrel monkeys (Saimiri). In: **Handbook of Squirrel Monkeys Research**. L. A. ROSENBLUM; COE, C. L. (eds). New York, London, Plenum. Press, 1985, p. 1-33.

TIMPER, K., SEBOEK, D., EBERHARDT, M, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 1135-1140, 2006.

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.

TORRES, L. B., ARAUJO, B. H. S., CASTRO, P. H. G., CABRAL, F. R., MARRUAZ, K. S., ARAUJO, M. S., SILVA, S. G., MUNIZ, J. A. P. C. CAVALHEIRO, E. A. The use of

New world primates for biomedical research: an overview of the last four decades. **American Journal of Primatology**, v. 72, p. 1055-1061, 2010.

VANDEBERG, J. L., WILLIAMS-BLANGERO, S. W., MOORE, C. M., CHENG, M., ABEE, C.R. Genetic relationships among three squirrel monkey types: Implications for taxonomy, biomedical research, and captive breeding. **American Journal of Primatology**, v. 22, p. 101–111, 1990.

WALCZAK, P., ZHANG, J., GILAD, A. A., KEDZIOREK, D., RUIZ-CABELLO, J., YOUNG, R. G., PITTENGER, M. F., VAN ZIJL, P. C. M., HUANG, J., BULTE, J. W. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. **Stroke**, v. 39, p. 1569-1574, 2008.

WARD, J. M.; VALLENDER, E. J. The resurgence and genetic implications of New World primates in biomedical research. **Trends in Genetics**, v. 28, n.12, p. 586-91, 2012.

WANG, H. S., HUNG, S. C., PENG, S. T., HUANG, C. C., WEI, H. M., GUO, Y. J., FU, Y. S., LAI, M. C., CHEN, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, v. 22, p. 1330–1337, 2004.

WILLIAMS, L., GLASGOW, M. Squirrel monkey behavior in research. **ILAR Journal**, v. 41, p. 26–36, 2000.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-56, 2010.

ZHAO, W., JUN-JIE, L., DA-YONG, C., XIAO, L., LIN-YING, Z., YONG, E., SHU-QIANG, Y., DE-SHENG, W., KE-FENG, D. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 10, p. 1048-1058, 2012.

ZIMBLER-DELORENZO, H. S., STONE, A. I. Integration of field and captive studies for understanding the behavioral ecology of the squirrel monkey (*Saimiri* sp.). **American Journal of Primatology**, v. 73, p. 607–622, 2011.

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

ZUTTON, M. S. S., WENCESLAU, C. V., LEMOS, P. A., TAKIMURA, C., KERKIS, I. Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 21, n. 3, p. 281-7, 2013.

ARTIGO

Apresentado conforme normas da revista Stem Cells and Development, à exceção da língua.

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de macaco-de-cheiro (*Saimiri sciureus*): isolamento e caracterização

Luane Lopes Pinheiro^{1,6}, Ana Rita de Lima^{1,6}, Ana Thereza Tobelem⁶, Michel Platini², Edivaldo Herculano C. de Oliveira², Moyses dos S. Miranda⁴, Klena Sarges M. da Silva⁵, Edna Cristina S. Franco³, Érika Branco^{1,6}

¹Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil

²Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética, SAMAM, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil

³Laboratório de Imunopatologia Experimental, SAARB, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Pará, Brasil

⁴Laboratório de Fertilização In Vitro, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

⁵Centro Nacional de Primatas, Ananindeua, Pará, Brasil

⁶Instituto da Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará, Brasil

Os macacos-de-cheiro (gênero *Saimiri*) estão entre os primatas neotropicais mais utilizados como modelo biológico, dessa forma objetivamos isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Saimiri sciureus*, visando contribuir com futuras pesquisas em que se possa utilizá-lo como modelo experimental em medicina regenerativa e terapia celular. Foram utilizados dois animais, adultos, machos, pertencentes ao Centro Nacional de Primatas – CENP, Ananindeua, Pará, para coleta do tecido adiposo por meio de lipectomia. As células foram isoladas por digestão enzimática e cultivadas em DMEM:F12 com 20% de SFB, em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Foram avaliadas quanto à viabilidade, morfologia, proliferação, plasticidade, imunofenotipagem e estabilidade cromossômica por análise citogenética clássica e molecular. Os procedimentos realizados permitiram fácil isolamento e expansão das células, mantendo alta viabilidade e padrão morfológico ao longo do cultivo, potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, imunofenotipagem característica de células-tronco mesenquimais e integridade citogenômica até a última passagem analisada (P8). Nossos resultados, somados às propriedades terapêuticas das células-tronco mesenquimais, demonstram segurança para transplante autólogo em ensaios clínicos utilizando o *Saimiri sciureus*.

Introdução

Células-tronco mesenquimais (CTM) são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas, presentes em regiões perivasculares de tecidos adultos, onde são responsáveis pela regeneração e manutenção destes [1]. Em virtude de suas propriedades biológicas, como, facilidade de isolamento e expansão em cultura, potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, potencial imunomodulador, capacidade de migração para locais de lesão e secreção de uma variedade de moléculas bioativas, as CTM tornaram-se alvo de interesse em diversos estudos, tanto em relação a seus aspectos básicos, como em sua utilização terapêutica para o tratamento de diversas doenças [2].

As CTM já foram isoladas de uma variedade de tecidos, humanos e animais, e o crescente interesse no tecido adiposo como fonte de células-tronco, se dá em função de importantes vantagens para aplicação clínica, como, maior rendimento e facilidade de colheita por procedimentos minimamente invasivos [3].

Em modelos animais, as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) têm mostrado efeitos positivos em alguns estudos experimentais, aplicados em regeneração, por exemplo, após enfarto do miocárdio em camundongos [4], lesão da medula espinhal em cães [5], acidente vascular cerebral em camundongos [6], lesão do nervo periférico em rato [7] e esclerose lateral amiotrófica em camundongos [8].

Porém, para a investigação biomédica, devido a maior proximidade evolutiva com os seres humanos, os primatas não humanos são modelos animais mais importantes para o estudo de diversas doenças [9], já que a presença de maiores semelhanças em termos de genética, anatomia, fisiologia e comportamento, permitem desenhos experimentais longitudinais complexos e melhor previsão da resposta ao tratamento em seres humanos [10].

Os macacos-de-cheiro (*Saimiri* sp.) estão entre as espécies de primatas neotropicais mais comumente utilizadas como modelo biológico, tendo se destacado nos últimos anos como valiosos animais em numerosas áreas biomédicas [9]. Neste sentido, objetivamos isolar e caracterizar CTM-TA da espécie *Saimiri sciureus*, visando contribuir com futuros estudos em que se possa utilizá-lo como modelo experimental, em medicina regenerativa e terapia celular.

Material e métodos

Animais

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas – IEC, Ananindeua, Pará, sob protocolo nº 031/2013, e pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) do Ministério do Meio Ambiente, sob protocolo nº 42308-1, sendo utilizados dois macacos-de-cheiro da espécie *Saimiri sciurius*, machos, com idade de 10 e 14 anos, pesando em média 850 g, pertencentes ao Centro Nacional de Primatas – CENP, Ananindeua, Pará.

Colheita do Tecido Adiposo

Os animais em jejum prévio, alimentar (6 horas) e hídrico (3 horas), foram tranquilizados quimicamente com 6 mg/kg de anestésico composto da associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato zolazepam (Zoletil 50), por via intramuscular (IM). Em seguida realizou-se tricotomia e anti-sepsia da região abdominal, com subsequente analgesia local pelo uso de cloridrato de lidocaína (Xylestesin 2%), para posterior incisão da pele na região da linha alba (~ 2 cm) e extração de uma pequena amostra de tecido adiposo subcutâneo (~ 0,5 cm²). Após sutura, os animais receberam 2 mg/kg de anti-inflamatório e analgésico (Ketofen 1%) por via IM, a cada 8 horas durante 3 dias, e curativo local, trocado uma vez ao dia.

As amostras foram acondicionadas em frasco de coleta estéril contendo meio composto por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, USA), contendo ainda antibiótico e antimicótico (1%), e pH balanceado com Bicarbonato de sódio e HEPES (HEPES, Gibco, USA), posteriormente, os frascos foram transportados para o Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas (IEC) refrigerados em caixa isotérmica, para processamento das CTM-TA.

Isolamento

A digestão enzimática do tecido adiposo transcorreu com base no protocolo descrito por Zuk et al. [11]. A amostra foi transferida para um tubo cônico com 2 mL de colagenase

tipo IV (Collagenase type IV, 4,5 mg/mL, Gibco, USA) e incubada a 37°C por 1 hora. Em seguida, para inativação da enzima foram adicionados 5 mL de meio completo, composto pela mesma proporção de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) e Ham's F12 Nutrient Mixture (F12, Gibco, USA), preparados com 2% de Bicarbonato de sódio à 2,8% (0,56mg/mL), 1% de Hepes (HEPES, 2,38 mg/mL, Gibco, USA) e 1% de antibiótico-antimicótico (Penicilina G sódica 100UI/mL, Sulfato de estreptomicina 50 µg/mL, Sulfato de gentamicina 50 µg/mL e Fungizone 2,5 µl/mL, Gibco, USA), e suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, USA), e posteriormente centrifugado por 10 min a 556 g, sendo este procedimento repetido mais uma vez.

O precipitado celular foi ressuspendido em 5 mL de meio completo e mantido em frasco de cultivo de 25 cm² (Sarstedt, USA) em estufa a 37°C, com 5% CO₂. Após 24 horas o meio de cultivo foi trocado e o sobrenadante plaqueado novamente, visando aumentar o rendimento do número de células isoladas.

Cultivo

Para manutenção da cultura, o meio completo (DMEM:F12 com 20% de SFB) foi trocado a cada 2-3 dias, e os frascos observados ao invertoscópio (Axiovert 200, Zeiss, Alemanha) para avaliação da morfologia e do crescimento da monocamada de células. Quando as culturas atingiam cerca de 75-80% de confluência era realizada a passagem (P) celular, utilizando-se 1 mL de Tripsina-EDTA (Trypsin-EDTA, Gibco, USA) concentrada em Hank's (1,25% tripsina e EDTA 0,02%) para dissociação das células do frasco de cultivo.

Visando um maior número de células, a fim de contemplar os procedimentos de caracterização, além de verificar a capacidade de manutenção das características biológicas após descongelamento, as células foram criopreservadas em 90% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, EU Approved) e 10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO anidro, Molecular Probes, USA), utilizando dispositivos próprios para congelamento (Mr. Frosty) mantidos por 24 horas à temperatura de -80°C. Para descongelamento, cada criotubo foi aquecidos rapidamente em banho-maria a 37°C, seguido de diluição do conteúdo em 15 mL de meio completo, com troca após 24 horas, mediante aderência celular, para eliminação do DMSO.

A viabilidade celular foi verificada a cada passagem por meio do teste de exclusão pelo corante azul de Tripán, preparando-se uma mistura contendo 20µl da suspensão celular e 20µl da solução de azul de Tripán 0,4% (Sigma, USA) para contagem das células utilizando-se câmara de Neubauer.

Curva de crescimento

Para determinação da proliferação celular, células em cultivo (P4) foram transferidas para placa de 12 poços (Cell Wells, USA), a uma densidade de 10×10^3 células/poço, e cultivadas em meio completo a 37°C , com 5% CO_2 . A cada dois dias, as células de cada poço foram quantificadas em câmara de Neubauer e ao final de 20 dias a curva de crescimento foi representada graficamente. O tempo de duplicação da população (PDT - Population Doubling Time) foi calculado com base na curva de crescimento gerada, de acordo com a equação $\text{PDT} = \text{tempo de cultura (TC)} / \text{NDP}$ como previamente descrito [12]. Sendo que o número de duplicação da população (NDP) foi calculado de acordo com a fórmula $\text{NDP} = \log N / N_0 \times 3,31$, no qual, N é o número de células no final do período de cultura e N_0 o número de células no início da cultura.

Diferenciação Osteogênica

Para diferenciação osteogênica, uma densidade de 5×10^3 células/poço (P8) foi cultivada em placa de 24 poços por 48 horas. Após este período o meio completo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação osteogênica (STEMPRO Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), trocado a cada 2 dias durante 14 dias, seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se no controle negativo o meio completo. O potencial de diferenciação osteogênica foi avaliado pela coloração com solução de Alizarin Red S 2% por 5 min, após fixação com paraformaldeído 4% por 20 min à temperatura ambiente.

Diferenciação Adipogênica

Para diferenciação adipogênica, uma densidade de 10×10^3 células/poço (P8) foi cultivada em placa de 24 poços por 48 horas. Após este período o meio completo foi substituído pelo meio de indução de diferenciação adipogênica (STEMPRO Adipogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), trocado a cada 2 dias durante 14 dias, seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se no controle negativo o meio completo. O potencial de diferenciação adipogênica foi avaliado pela coloração com solução de Oil Red O 1,25% por 5 min, após fixação com paraformaldeído 4% por 1 hora à temperatura ambiente.

Diferenciação Condrogênica

Para diferenciação condrogênica, $5,7 \times 10^7$ células (P8) sob alta densidade celular (micromassa) foram transferidas para placa de 24 poços, mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após este período foi adicionado o meio de indução de diferenciação condrogênica (STEMPRO Chondrogenesis Differentiation Kit, Gibco, USA), trocado a cada 2 dias durante 21 dias, seguindo recomendações do fabricante, e mantendo-se no controle negativo o meio completo. O potencial de diferenciação condrogênica foi avaliado pela coloração com solução de Alcian Blue 1% por 5 min, após fixação com paraformoldeído (PFA) 4% por 20 min à temperatura ambiente.

Imunocitoquímica

Células em P8 foram transferidas para chamber slides (Lab-Tek, USA) e mantidas em cultivo por 24 horas para aderência celular. Foi feita fixação com paraformoldeído 4% por 15 min à temperatura ambiente, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 5 min e bloqueio de proteínas inespecíficas com 10% de Albumina Sérica Bovina (BSA) em PBS por 30 min, sendo cada etapa intercalada por uma lavagem em PBS por 5 min. Em seguida, as células foram incubadas overnight com anticorpos primários de rato anti-humano diluídos em PBS (anti-CD105 - 1:100, anti-CD90 - 1:100, anti-CD73 - 1:50, anti-CD34 - 1:50 e anti-CD79 - 1:100) (ABCAM, USA) em ambiente úmido.

Para detecção foi utilizado kit comercial (LSAB 2 System HRP kit, DAKO, USA), sendo o tempo de incubação de 30 min para cada reagente, intercaladas com duas lavagens em PBS por 5 min, e as reações reveladas com solução de substrato cromogênico (DAB, 3,3'-diaminobenzidina) por 1 min. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz e as imagens capturadas utilizando-se o programa LAS V4.4 (Leica, Alemanha).

Cariotipagem

Foram utilizadas culturas nas passagens P4, P6 e P8 para obtenção de metáfases, incubando-se com colchicina 0,016% (KaryoMax Colcemid, Gibco, USA) (100µl para cada 5 mL de meio) a 37°C por 1 hora, após verificação de um bom número de divisões mitóticas. As células foram colhidas de acordo com procedimento padrão de dissociação e tratadas com 5

mL de solução hipotônica 0,075M (KCl) em estufa a 37°C por 10 min, e feita fixação com Solução Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético).

Para bandeamento G, lâminas contendo material foram mantidas em estufa a 37°C durante 4 a 10 dias. Depois desse período foram incubadas em 2xSSC a 45°C por 2 min, lavadas em água corrente e coradas com solução Wright diluído em tampão fosfato p.H 6.8 (10%) por 2,5 min.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Leica Dm-1000, em objetiva de 100x e ocular 10x de aumento, e as melhores metáfases (~30 de cada passagem) capturadas utilizando-se a plataforma GenAsis (Applied Spectral Imaging - ASI), também utilizada para montagem do cariótipo, seguindo o padrão de bandas G, onde os cromossomos foram ordenados segundo o seu tamanho e a posição dos centrômeros [13].

FISH (Fluorescent in Situ Hybridization)

A pintura cromossômica foi realizada com a utilização de sondas cromossômicas humanas (1-22 e X) desenvolvidas por citometria de fluxo no Cambridge Resource Centre for Comparative Genomics (Cambridge, United Kingdom). As sondas foram marcadas por DOP-PCR com a utilização de fluoresceína, biotina e digoxigenina. As sondas marcadas por biotina foram detectadas por avidina-CY3 ou avidina CY5, e as sondas marcadas por digoxigenina foram detectadas por anti-digoxigenina-rodamina (Roche, USA). Foram utilizadas metáfases de CTM-TA de *Saimiri sciureus* em P8 previamente obtidas, e os protocolos de hibridização in situ e detecção, realizados como anteriormente descrito [14]. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Imager2), em objetiva de 63x e ocular 10x, e as imagens capturadas por meio do programa AxioVision Rel. 4.8.2 (Zeiss, Alemanha).

Resultados

Após as primeiras 24 horas de cultivo, foi observada a presença de poucas células aderidas à superfície plástica do frasco, as quais obtiveram confluência (>95%) com 8 dias de cultivo, consistindo em uma população heterogênea de células.

Com as trocas de meio sendo realizadas a cada dois dias, após a segunda passagem as CTM-TA de *Saimiri sciureus* propagaram-se rapidamente como uma população homogênea com morfologia fibroblastoide, a qual se manteve ao longo das passagens analisadas (P1-8).

Foi observado que o cultivo sob alta confluência celular ocasionava a ocorrência de alterações morfológicas e diminuição da capacidade proliferativa ao longo das passagens, o que nos levou a optarmos pela realização do subcultivo em confluência de 75-80% durante a realização deste estudo (Fig. 1).

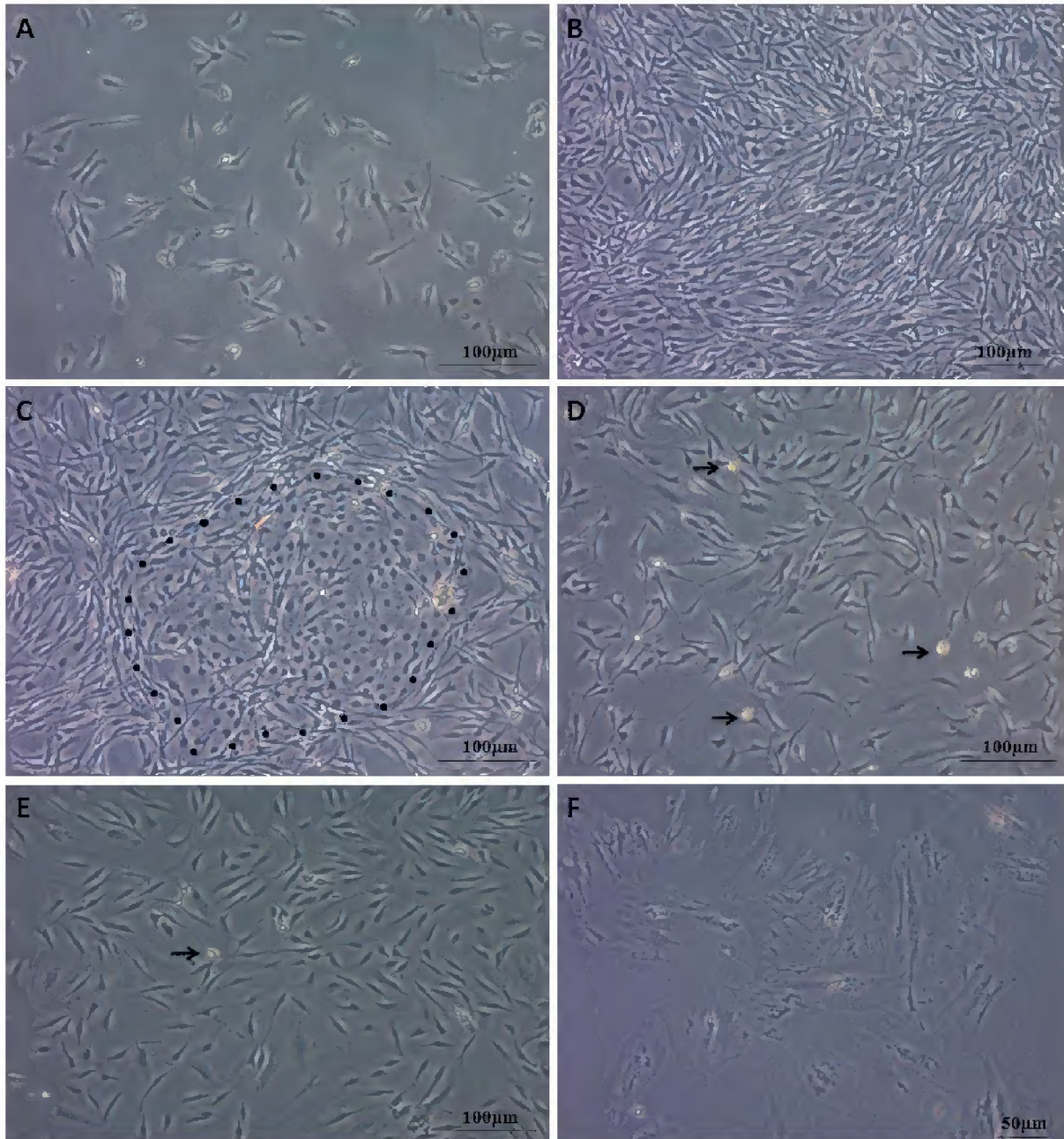


FIG. 1. Fotomicrografia da cultura de CTM-TA de *S. sciureus* demonstrando morfologia típica de CTM. (A) Células em P0 com quatro dias de cultivo após isolamento. (B) Confluência celular após 8 dias de isolamento. (C) População celular com morfologia heterogênea em P1. (D) e (E) Cultivo em P4 e P8, respectivamente, mostrando manutenção da morfologia fibroblástóide e divisões mitóticas (setas). (F) Células pavimentosas com citoplasma abundante, ocasionalmente encontradas após formação de confluência exarcebada. Barra de escala: 100 µm e 50 µm.

A viabilidade celular das CTM-TA de *S. sciureus*, verificada por meio do teste de exclusão pelo corante azul de Tripán, mostrou valor mínimo de 73% (P8) e máximo de 94% (P4), mantendo média acima de 80% de viabilidade entre as passagens analisadas (Fig. 2). A curva de crescimento das CTM-TA de *S. sciureus* seguiu o padrão típico sigmoidal, tornando possível observar a fase de adaptação (lag) entre os dias 2-4, fase de crescimento exponencial (log) entre os dias 4-10, fase estacionária (platô) entre os dias 10-14 e declínio do crescimento celular entre os dias 14-20 (Fig. 3). O tempo de duplicação da população, calculado com base na curva de crescimento gerada até o décimo dia, foi de $54,06 \pm 2,26$ horas.

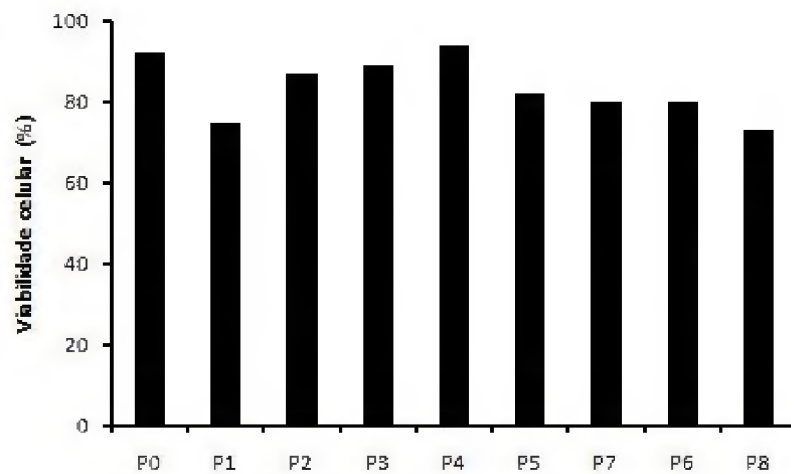


FIG. 2. Viabilidade de CTM-TA de *S. sciureus* avaliada pelo teste azul de Tripán em diferentes passagens.

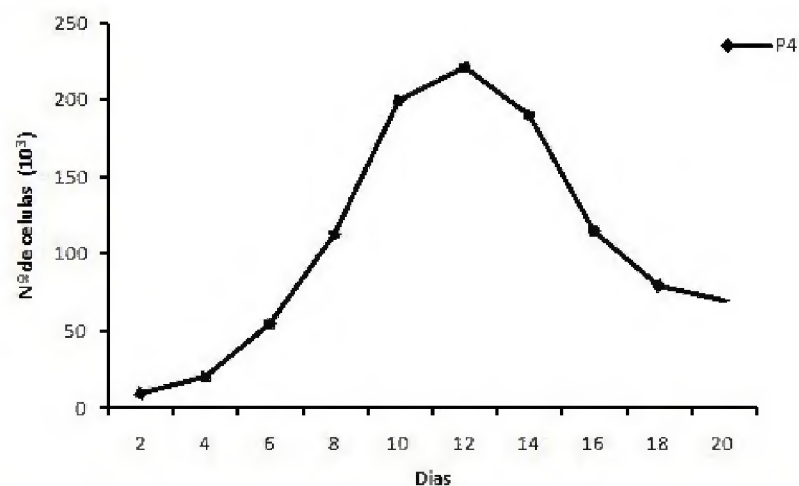


FIG. 3. Curva de crescimento de CTM-TA de *S. sciureus* quantificadas a cada 48 horas durante 20 dias, podendo-se observar a fase lag (2-4), fase log (4-10), fase platô (10-14) e declínio celular (14-20).

As CTM-TA de *S. sciureus* foram analisadas quanto ao potencial de diferenciação osteogênico, adipogênico e condrogênico.

Após 14 dias de incubação em meio de indução osteogênica, foram observadas mudanças na morfologia das CTM-TA e produção de matriz de cálcio extracelular identificada em vermelho pela coloração Alizarin Red (Fig. 4 A). Após incubação em meio adipogênico, as CTM-TA tornaram-se arredondadas, e ao longo de 14 dias foi possível observar um aumento gradual da presença de gotículas lipídicas intracitoplasmáticas, observáveis em microscopia de luz, as quais posteriormente se agregavam formando pequenas gotas evidenciadas pela coloração Oil Red O (Fig. 4 B). Na diferenciação condrogênica, realizada em sistema de cultura em micromassa, após 21 dias de indução as células formaram um botão visível bem definido, então corado em azul pela coloração Alcian Blue, devido sua sensibilidade na detecção de proteoglicanos (Fig. 4 C).

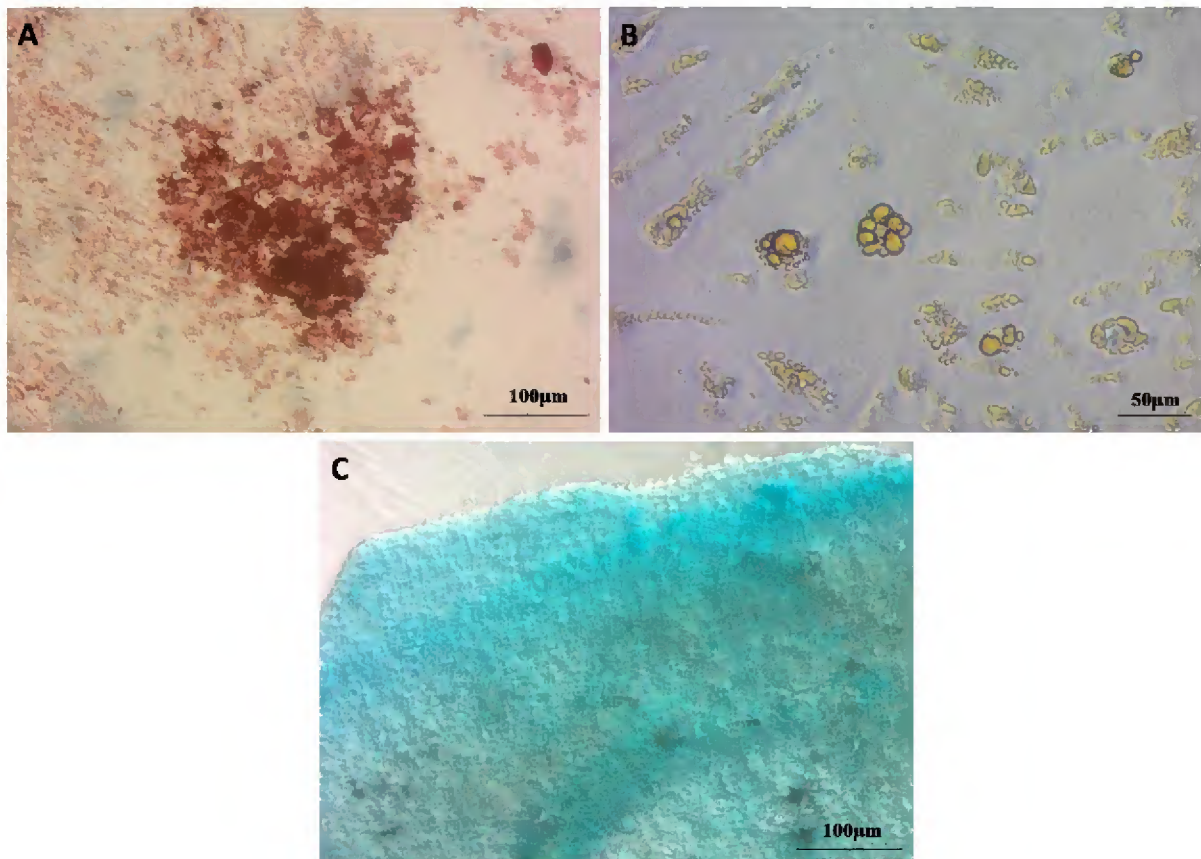


FIG. 4. Diferenciação celular de CTM-TA de *S. sciureus* em P8. (A) Osteogênica, demonstrando matriz de cálcio extracelular pela coloração Alizarin Red. (B) Adipogênica, demonstrando gotículas lipídicas pela coloração Oil Red O. (C) Condrogênica, demonstrando proteoglicanos corados em azul pelo Alcian Blue. Barra de escala: 100 μm e 50 μm.

Quanto à caracterização imunocitoquímica, as CTM-TA de *S. sciureus* apresentaram imunomarcagem positiva para os marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais CD105, CD90 e CD73 observada pela coloração acastanhada, e ausência de marcação para os CD34 e CD79, marcadores de células hematopoiéticas (Fig. 5).

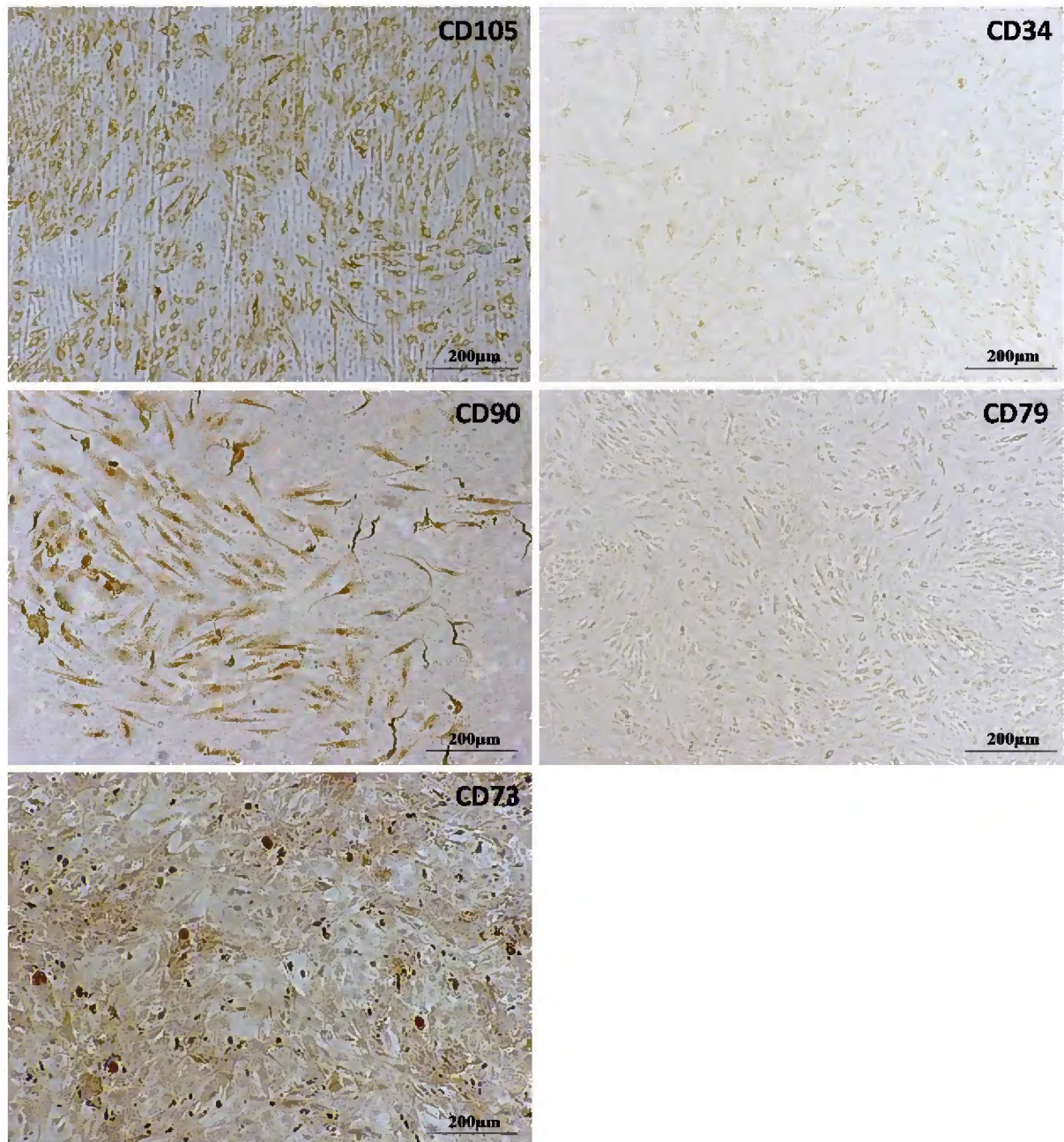


Fig. 5. Caracterização imunocitoquímica de CTM-TA de *S. sciureus* em P8, podendo-se observar células com morfologia fibroblastoide com imunomarcagem positiva para CD105, CD90 e CD73 e negativa para CD34 e CD79. Barra de escala: 200 µm.

As análises citogenéticas das CTM-TA de *S. sciureus* mostraram a manutenção do número diploide de 44 cromossomos, constituído por 14 pares de cromossomos de dois braços e 7 autossomos acrocêntricos (Fig. 6). A análise por bandeamento G permitiu observar que o padrão morfológico dos cromossomos foi mantido ao longo das passagens analisadas. Além disso, considerando que a morfologia cromossômica é utilizada na citotaxonomia do gênero *Saimiri*, a presença de 7 pares de autossomos acrocêntricos confirma a classificação dos animais na subespécie *Saimiri sciureus sciureus*, segundo Hershkovitz [15].

Adicionalmente, a aplicação de sondas cromossomo-específicas humanas comprovou a integridade citogenômica nas células analisadas, mostrando que não ocorreu nenhum tipo de rearranjo complexo, que porventura não tivesse sido detectado pelo bandeamento G, como inversões paracêntricas cripticas ou translocação de pequenos segmentos. Os resultados da pintura cromossômica em cromossomos metafásicos de CTM-TA de *S. sciureus*, estão resumidos na fig. 7 e exemplificados na fig. 8.

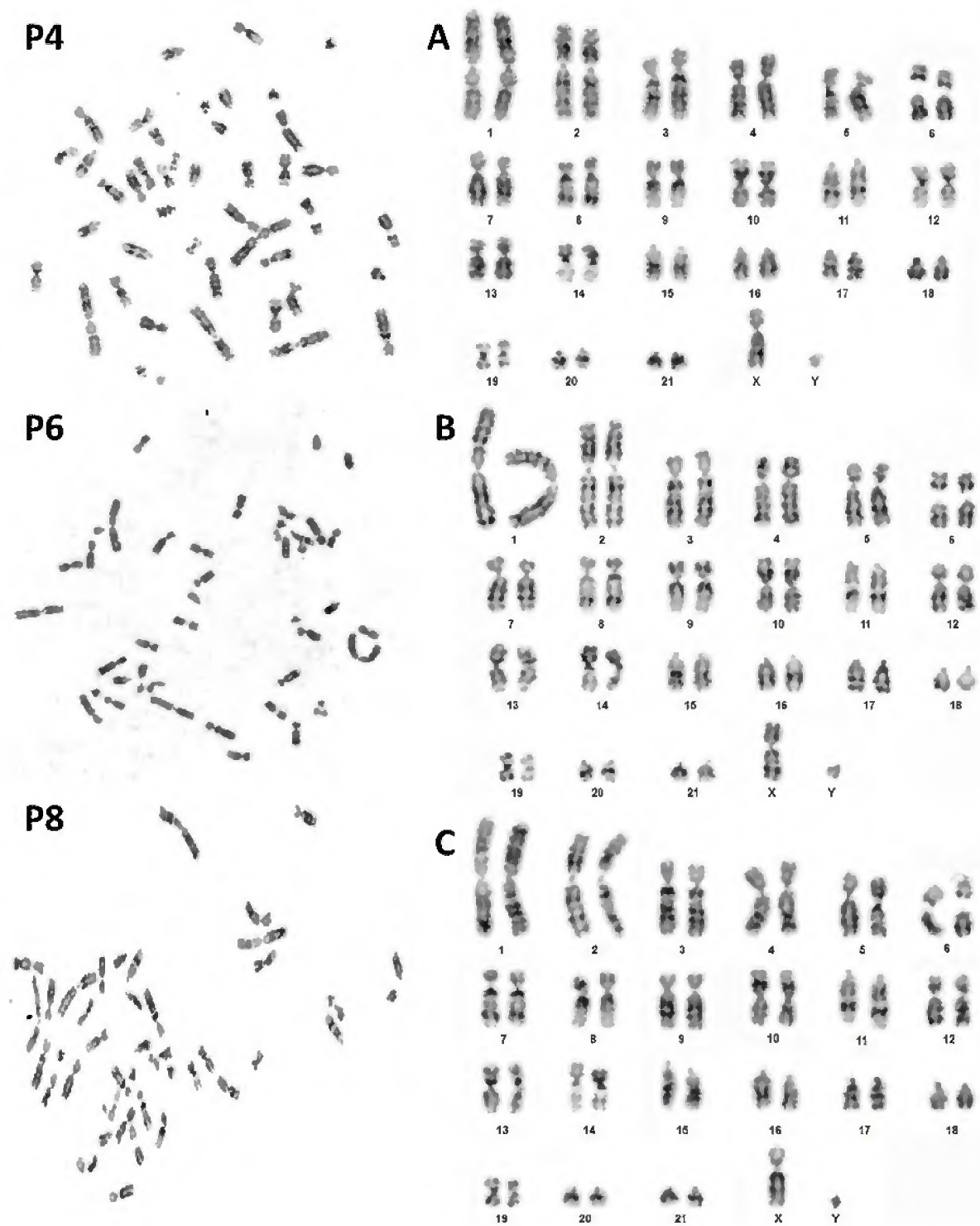


FIG. 6. Cariótipo banda G de CTM-TA de *S. s. sciureus*: metáfases (esquerda) e cariótipos das passagens 4 (A), 6 (B) e 8 (C), mostrando $2n=44$ cromossomos (♂).

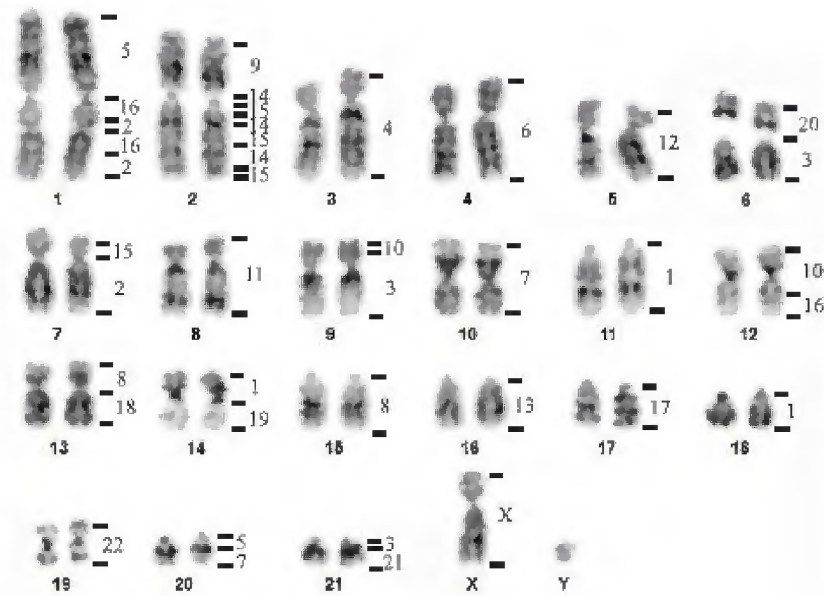


FIG. 7. Cariótipo de CTM-TA de *S. s. sciureus* demonstrando à direita o padrão de hibridização dos cromossomos humanos.

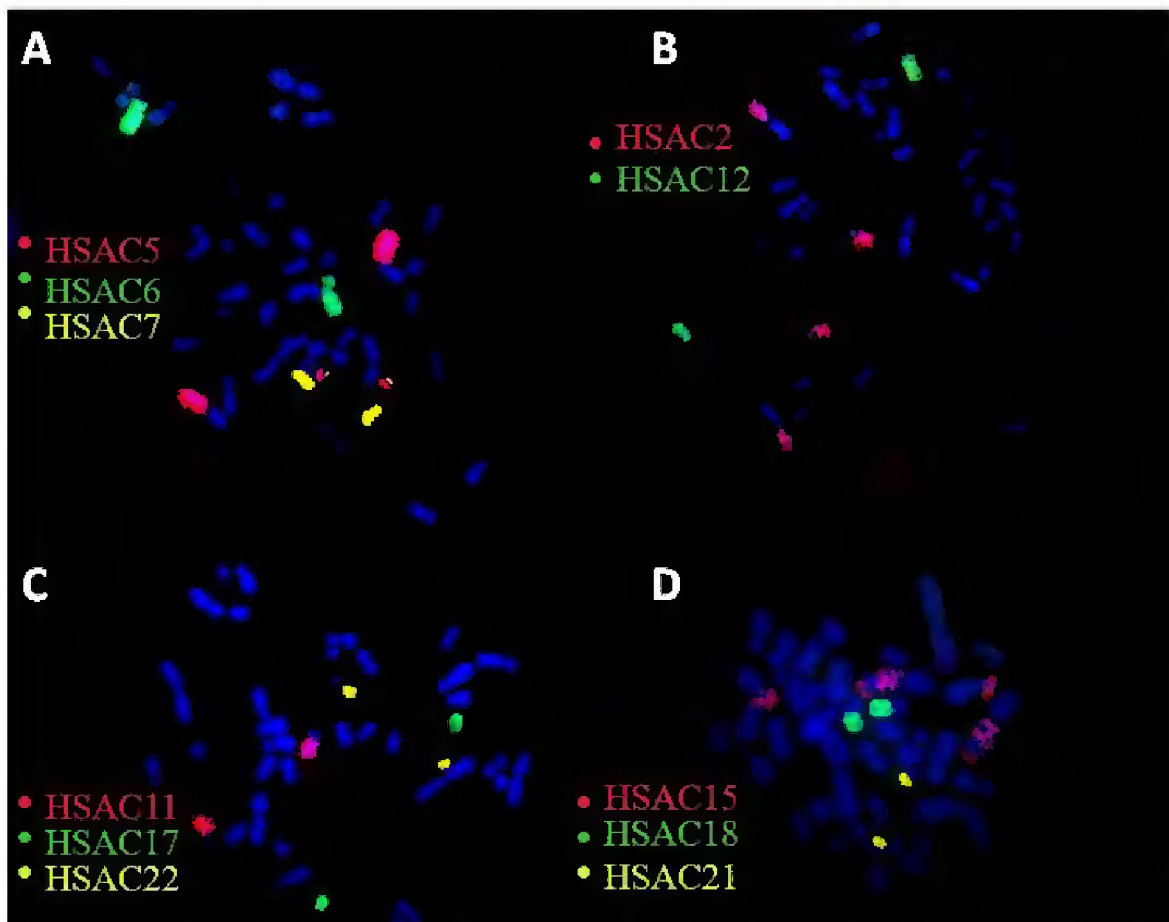


FIG. 8. Imagens representativas de algumas hibridizações com sonda de *Homo sapiens* (HSA) em metáfases de CTM-TA de *S. s. sciureus*.

Discussão

Os macacos-de-cheiro estão entre as espécies de primatas neotropicais mais comumente utilizadas na pesquisa biomédica, e visto que, CTM derivadas de primatas não humanos podem se tornar ferramenta valiosa para investigação pré-clínica em estudos envolvendo terapia celular [16], nossa pesquisa visou contribuir com futuros estudos em que possa se utilizar o *Saimiri sciureus* como modelo experimental em medicina regenerativa e terapia celular.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) de humanos foram caracterizadas, pela primeira vez, por Zuk et al. [11], a partir de amostras provenientes de lipoaspiração cirúrgica estética, desde então, a literatura científica tem destacado a crescente utilização de CTM-TA, para possíveis aplicações clínicas, em função da maior taxa de sucesso de isolamento e rendimento em relação à medula óssea, e da facilidade de coleta, com mínimo de desconforto para o paciente [3].

Em nosso estudo, a contenção química e a anestesia local foram suficientes para realização da coleta por meio de lipectomia. Mesmo com baixo armazenamento de tecido adiposo subcutâneo, característica inerente à espécie *S. sciureus*, foi possível a coleta de uma quantidade razoável de tecido, que, com os métodos empregados para isolamento e cultivo foi satisfatória para obtenção e expansão de CTM-TA em quantidade suficiente para a realização deste estudo e ainda para criopreservação visando futuras utilizações.

Após a primeira passagem, as células propagaram-se rapidamente constituindo uma população homogênea com morfologia alongada semelhante a fibroblasto, a qual é consistente com CTM-TA de humanos [11] e de demais animais já estudados, como ratos [17, 18], camundongos [19], coelhos [20, 21], cães [22], ovinos [23], porcos [24, 25], equinos [26], e primatas não humanos como rhesus [27, 28].

O cultivo das CTM-TA de *S. sciureus* em meio DMEM:F12 com 20% de SFB, a 37°C com 5% CO₂, submetidas à repique com 75-80% de confluência, permitiu a observação da sua capacidade de crescimento e expansão *in vitro*, manutenção da morfologia fibroblastoide até a última passagem analisada (P8), viabilidade celular média acima de 80% ao longo do cultivo, curva de crescimento com padrão típico de CTM e tempo de dobramento populacional de 54,06 horas, consistente com o obtido em CTM-TA de outros modelos animais [29].

Nossos dados demonstram a manutenção das características das CTM-TA de *S. sciureus* após processo de criopreservação, e estão de acordo com os resultados em CTM-TA

de humanos [30] e de modelos animais [29], onde foram mostrados a manutenção das características biológicas mesmo após longos períodos de congelamento. Esse fator, somado às propriedades imunológicas das CTM-TA, possibilitam o uso de células de fontes alogênicas para aplicação terapêutica, as quais podem ser mantidas criopreservadas até sua utilização [31].

Os critérios mínimos para caracterização de CTM humanas, de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), incluem adesão ao plástico, diferenciação *in vitro* em três linhagens celulares diferentes e expressão de marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90 e ausência de marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11, CD19 ou CD79 e moléculas de superfície HLA-DR [32].

As CTM-TA de *S. sciureus* mostraram potencial de diferenciação *in vitro* nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, após cultivo em meios de indução específicos, o que confirma o sucesso no isolamento de CTM a partir de amostra de tecido adiposo, de acordo com CTM-TA humanas [11].

Um dos grandes desafios para os diversos grupos de pesquisa tem sido a ausência de marcadores específicos de CTM para caracterização imunofenotípica [1], o que dificulta a comparação entre resultados e retarda o progresso nesse campo [29]. Somado a isso, há também uma grande dificuldade em estudos envolvendo modelos animais e em medicina veterinária, devido à baixa disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos de espécies animais [33]. Em nosso estudo, as CTM-TA de *S. sciureus* apresentaram imunomarcagem positiva para CD105, CD90 e CD73 e negativa para CD34 e CD79, de acordo com o preconizado pela ISCT, devendo-se ressaltar que a metodologia utilizada, baseada em avaliação qualitativa, considera a necessidade de uma avaliação mais acurada, quantitativa, como a citometria de fluxo.

Nossos resultados corroboram com estudos envolvendo CTM de primatas não humanos do Velho Mundo, isoladas da medula óssea em babuínos [34, 35], rhesus [36, 37] e macacos-cinomolgo [16, 38], e de tecido adiposo em rhesus [27, 28], os quais mostraram que estas possuem potencial de diferenciação em multilinhagens, e são fenotípica e funcionalmente semelhantes as suas homólogas humanas.

Para utilização em terapia celular, existe um consenso de que CTM devem ser utilizadas apenas em baixas passagens, devido indício de episódios de senescência replicativa, perda de função e modificações cromossômicas, como resultado de cultura prolongada [39, 40]. Em contra partida, para aplicação terapêutica é imprescindível à obtenção de um grande número células, tornando a expansão *in vitro* necessária [41].

As células-tronco, além do potencial de diferenciação em uma variedade de tipos celulares, são definidas por uma capacidade de auto-renovação [2]. No entanto, as CTM apresentam certo grau de dificuldade no estabelecimento de culturas, pois o que ocorre no processo de auto-renovação, não é a geração de células idênticas à mãe, e sim, células com diferentes capacidade proliferativa, devido a perda progressiva do telômero a cada divisão celular, por perda da expressão da enzima telomerase, o que pode, por sua vez, conduzir à senescência replicativa [41].

Wagner et al. [40] demonstraram em CTM humanas diversas alterações associadas à senescência celular, observadas em passagens mais tardias (entre P7 e P12), como, anormalidades morfológicas, diminuição da proliferação, alterações na expressão de marcadores específicos e no potencial de diferenciação em multilinhagens, o que não foi observado nas CTM-TA de *S. sciureus* até a oitava passagem, apesar, também, da idade avançada dos animais utilizados (10 e 14 anos), visto que células de animais senis apresentam um declínio da adesão e proliferação celular [42].

Outra questão mais atual e intrigante dos pesquisadores é se o suposto potencial de divisão das células-tronco, cultivadas por um determinado período de tempo, poderia levar ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, resultando em processo neoplásico [41].

Considerando que um dos principais indicadores de instabilidade genômica é a ocorrência de alterações cromossômicas, em nosso estudo, foi utilizado para avaliação cariotípica, além da análise citogenética clássica, o método de pintura cromossômica utilizando-se sondas humanas, como uma ferramenta para a detecção de possíveis rearranjos cromossômicos estruturais, de difícil detecção por bandeamento. Os dados obtidos confirmaram que os grupos sintênicos observados nas células analisadas correspondiam ao mapeamento cromossômico dessa espécie descrito por Stanyon et al. [15], mesmo nas passagens mais elevadas, comprovando sua integridade cariotípica.

CTM-TA de *S. sciureus* mantiveram cariótipo normal (44, XY) estável ao longo das passagens analisadas, demonstrando a viabilidade na sua utilização, até a oitava passagem, para a eficácia terapêutica em estudos futuros. Em CTM da medula óssea de macaco-cinomolgo, também foi demonstrado cariótipo normal, sem aberrações numéricas ou estruturais clonais, até a passagem 11 [38].

Izadpanah et al. [43], estudando o efeito da expansão *in vitro* na biologia de CTM, compararam culturas derivadas da medula óssea e do tecido adiposo de humanos e de macacos rhesus, e encontraram alterações citogenéticas somente em células derivadas de macacos a partir da passagem 20, mas não em células humanas, estando de acordo com

Bernardo et al. [44], que demonstraram por análise citogenética e array-CGH (array-Comparative Genomic Hybridization, array-CGH) a inexistência de alterações cromossômicas em CTM humanas até a passagem 25. Entretanto, a estabilidade cariotípica em CTM ainda gera controvérsia mediante a publicação de diversos estudos evidenciando a ocorrência de alterações genéticas e alta susceptibilidade à transformação maligna quando infundidas em camundongos [39, 45].

A cariotipagem das CTM-TA de *S. sciureus* também permitiu a identificação dos animais como pertencentes à subespécie *Saimiri sciureus sciureus*, de acordo com Hershokovitz [15], por meio da análise da morfologia cromossômica. Segundo Ward e Vallender [9], a não compreensão concreta acerca da filogenia do gênero *Saimiri* e a existência de variabilidade genética entre as populações, têm sido a principal dificuldade em sua utilização na pesquisa científica, tendo se tornado comum na literatura, a não identificação ou má identificação de espécies e subespécies de macacos-de-cheiro, por negligência da comunidade biomédica onde são valiosos modelos.

Conclusão

Os procedimentos adotados permitiram fácil isolamento e expansão de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Saimiri sciureus*, mantendo alta viabilidade e padrão morfológico ao longo do cultivo (P1-8), plasticidade e imunofenotipagem características de CTM e integridade citogenômica até a última passagem analisada (P8). Essas características, somadas às propriedades terapêuticas das CTM, demonstram segurança para transplante autólogo em ensaios clínicos, em que possam se utilizar esta espécie como modelo biológico na pesquisa biomédica.

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro Nacional de Primatas (CENP) pela disponibilização dos animais, e ao Laboratório de Cultura de Tecidos e Citogenética do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio na realização deste trabalho.

Referências

1. Keating A. (2012). Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. Cell Stem Cell 20:709-716.
2. Ong WK, S Sugii. (2013). Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. Int J Biochem Cell Biol 45:1083-1086.
3. Kokai LE, K Marra, JP Rubin. (2013). Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. Transl Res 1-10.
4. Gneccchi M, Z Zhang, A Ni, VJ Dzau. (2008). Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. Circ Res 103:1204-19.
5. Ryu HH, JH Lim, YE Byeon, JR Parque, MS Seo, YW Lee, WH Kim, KS Kang, OK Kweon. (2009). Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adiposederived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. J Vet Sci 10:273-84.
6. Ikegame Y, K Yamashita, S Hayashi, H Mizuno, M Tawada, F You, K Yamada, Y Tanaka, Y Egashira, S Nakashima, S Yoshimura, T Iwama. (2011). Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. Cytotherapy 13(6):675-685.
7. Marconi S, G Castiglione, E Turano, G Bissolotti, S Angiari, A Farinazzo, G Constantin, G Bedogni, A Bedogni, B Bonetti. (2012). Human adipose-derived mesenchymal stem cells systemically injected promote peripheral nerve regeneration in the mouse model of sciatic crush. Tissue Eng Parte A, v18:1264-72.
8. Marconi S, M Bonaconsa, I Scambi, GM Squintani, W Rui, E Turano, D Ungaro, S D'Agostino, F Barbieri, S Angiari, A Farinazzo, G Constantin, U Del Carro, B Bonetti, R Mariotti. (2013). Systemic treatment with adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorates clinical and pathological features in the amyotrophic lateral sclerosis murine model. Neuroscience 248:333-343.
9. Ward JM, EJ Vallender. (2012). The resurgence and genetic implications of New World primates in biomedical research. Trends Genet 28(12): 586-91.
10. Platt DM, G Carey, RD Speakman. (2012). Models of Neurological Disease (Substance Abuse): Self-Administration in Monkeys. NIH-PA Author Manuscript: Curr Protoc Pharmacol p. 2-23.
11. Zuk PA, M Zhu, H Mizuno, J Huang, JW Futrell, AJ Katz, P Benhaim, HP Lorenz, MH Hedrick. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 7(2):211-28.
12. Lotfy A, M Salama, F Zahran, E Jones, A Badawy, M Sobh. (2014). Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. Int J Stem Cells 7(2):135-142.

13. Guerra M, Ed Introdução a citogenética geral. (1989). Editora Guanabara. Rio de Janeiro, 142p.
14. Stanyon R, S Consigliere, S müller, A Morescalchi, M Neusser, J wienberg. (2000). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Maps Chromosomal Homologies Between the Dusky Titi and Squirrel Monkey. Am J Primatol 50:95-107.
15. Hershkovitz P. (1984). Taxonomy of squirrel monkeys genus Saimiri (Cebidae, Platyrrhini): A preliminary report with description of a hitherto unnamed form. Am J Primatol 7(5):155-210.
16. Ke H, P Wang, W Yu, X Liu, C Liu, F Yang, FF Mao, L Zhang, X Zhang, BT Lahn, AP Xiang. (2009). Derivation, characterization and gene modification of cynomolgus monkey mesenchymal stem cells. Differentiation 77:256-262.
17. Tholpady SS, AJ Katz, RC Ogle. (2003). Mesenchymal stem cells from rat visceral fat exhibit multipotential differentiation in vitro. Anat Rec 272:398-402.
18. Yoshimura H, T Muneta, A Nimura, A Yokoyama, H Koga, I Sekiya. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. Cell Tissue Res 327(3):449-62.
19. Ogawa R, H Mizuno, A Watanabe, M Migita, T Shibata, H Hyakusoku. (2004). Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice. Biochem Biophys Res Commum 313(4):871-7.
20. Rangappa S, C Fen, EH Lee, A Bongso, EK Sim. (2003). Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. Ann Thorac Surg 75(3):775-9.
21. Peptan IA, L Hong, JJ Mao. (2006). Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. Plast Reconstr Surg 117:1462-1470.
22. Neupane M, CC Chang, M Kiupel, V Yuzbasiyan-Gurkan. (2008). Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. Tissue Eng Part 14(6):1007-15.
23. Fadel L, BR Viana, MLT Feitosa, ACM Ercolin, KCS Roballo, JB Casals, NCG Pieri, FV Meirelles, DS Martins, MA Miglino, CE Ambrósio. (2011). Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep. Acta Cir Bras 26(4):267-273.
24. Qu CQ, GH Zhang, LJ Zhang, GS Yang. (2007). Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 43:95-100.
25. Williams KJ, AA Picou, SL Kish, AM Giraldo, RA Godke. (2008). Bondioli, K. R. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. Cells Tissue Organs 188(3):251-258.

26. Vidal MA, E Kilroy, MJ Lopez, JR Johnson, RM Moore, JM Gimble. (2007). Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. Vet Surg 36:613–622.
27. Kang SK, LA Putnam, J Ylostalo, IR Popescu, J Dufour, A Belousov, BA Bunnell. (2004). Neurogenesis of Rhesus adipose stromal cells. J Cell Sci 177(18): 4289-99.
28. Gagliardi C, BA Bunnell. (2011). Isolamento e cultura de células-tronco derivadas de tecido adiposo rhesus. Methods Mol Biol 702: 3-16.
29. Arrigoni E, S Lopa, L DE Girolamo, D Stanco, AT Brini. (2009). Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. Cell Tissue Res 338(3):401-411.
30. Thirumala S, JM Gimble, RV Devireddy. (2010). Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. Stem Cells Dev 19(4):513-522.
31. Nauta AJ, WE Fibbe. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. Blood 110(10):3499-506.
32. Dominici M, LE Blanc, K Mueller, SR Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop, EM Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. Cytotherapy 8:315–317.
33. Carvalho AM, ALG Alves, MA Golim, A Moroz, CA Hussni. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. Vet Immunol Immunop 132(2-4):303-306.
34. Bartholomew A, C Sturgeon, M Siatskas, K Ferrer, K McIntosh, S Patil, W Hardy, S Devine, D Ucker, R Deans, A Moseley, R Hoffman. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol 30:42-48.
35. Devine SM, C Cobbs, M Jennings, A Bartholomew, R Hoffman. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. Blood 101:2999-3001.
36. Lee CC, F Ye, AF Tarantal. (2006). Comparison of growth and differentiation of fetal and adult rhesus monkey mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 15:209-220.
37. Kim BS, CC Lee, JE Christensen, TR Huser, JW Chan, AF Tarantal. (2008). Growth, differentiation, and biochemical signatures of rhesus monkey mesenchymal stem cells. Células-tronco Dev 17(1):185-98.
38. Berman DM, MA Willman, D Han, G Kleiner, NM Kenyon, JA Karl, RW Wiseman, DH O'Connor, AM Bartholomew, NS Kenyon. (2010). Mesenchymal Stem Cells Enhance Allogeneic Islet Engraftment in Nonhuman Primates. Diabetes 59(10):2558-2568.

39. Miura M, Y Miura, HM Padilla-Nash, AA Molinolo, B Fu, V Patel, BM Seo, W Sonoyama, JJ Zheng, CC Baker. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. Stem Cells 24:1095-1103.
40. Wagner W, P Horn, M Castoldi, A Diehlmann, S Bork, R Saffrich, V Benes, J Blake, S Pfister, V Eckstein. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. PLoS One 3:2213.
41. Payão SLM, R Segato, RR Santos. (2009). Controle genético das células-tronco humanas cultivadas. Rev Bras Hematol Hemoter 31:15-18.
42. Freitas ML, DML Pinheiro, F Ginani, M Portela, V Barreto, CAG Barboza. (2012). Influência do envelhecimento no rendimento in vitro de células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos. Health Sci Inst 30(2):103-6.
43. Izadpanah R, D Kaushal, C Kriedt, F Tsien, B Patel, J Dufour, BA Bunnell. (2008). Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. Cancer Res 68:4229-4238.
44. Bernardo ME, N Zaffaroni, F Novara, AM Cometa, MA Avanzini, A Moretta. (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. Cancer Res 67:9142-9149.
45. Ren Z, J Wang, W Zhu, Y Guan, C Zou, Z Chen, YA Zhang. (2011). Spontaneous transformation of adult mesenchymal stem cells from cynomolgus macaques in vitro. Exp Cell Res 317(20):2950-7.

ANEXOS



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Número : 42808-1 | Data da Emissão : 30/01/2014 17:22 | Data para Revalidação*: 01/02/2016 |
| * De acordo com o art. 23 da IN 154/2007, 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 e ao envio do pagamento do Selo no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|---|--------------------------|
| Nome: Carla Pereira Branco | CPF: 124.222.813-02 |
| Título do Projeto: Cultura, rastreamento e difusão genética de colônias híbridas manganíferas da localidade de Serra do Urucú | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO AMAPÁ | CNPJ: 05.200.001/0001-01 |

Cronograma de atividades

| P | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|--|------------------|---------------|
| 1 | Coleta de tecidos alpinos, colônias eoparitas. | 01/2014 | 04/2014 |
| 2 | Monitoramento, coleta e criação de colônias híbridas. | 04/2014 | 12/2014 |
| 3 | Caracterização fenotípica. | 01/2015 | 04/2015 |
| 4 | Análise dos resultados e relatório final com projeto de artigo científico. | 04/2015 | 12/2015 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | As atividades de campo serão realizadas por pessoas autorizadas (incluindo estrangeiros), que deverão estar devidamente autorizadas pelo MMA, tanto por objeto coletado (se, for o caso, espécies biológicas e minerais), quanto por área a ser visitada (se, for o caso, áreas protegidas, unidades de conservação e ecossistemas sensíveis), além de serem autorizadas pelo MMA e pelo ICMBio. |
| 2 | Foi autorizado pelo ICMBio o acesso aos locais de coleta de amostras de colônias híbridas manganíferas para fins de coleta de tecidos alpinos, colônias eoparitas e colônias híbridas manganíferas, bem como o acompanhamento de pesquisas de campo, públicas ou privadas, desde que realizadas de acordo com o plano de manejo, incluindo o registro das atividades realizadas em campo. |
| 3 | Foi autorizada a coleta de amostras de colônias híbridas manganíferas para fins de coleta de tecidos alpinos, colônias eoparitas e colônias híbridas manganíferas, bem como o acompanhamento de pesquisas de campo, públicas ou privadas, desde que realizadas de acordo com o plano de manejo, incluindo o registro das atividades realizadas em campo. |
| 4 | O titular de licença de autorização de pesquisa científica deve apresentar ao órgão ambiental o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo. |
| 5 | O titular de licença de autorização de pesquisa científica deve apresentar ao órgão ambiental o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo. |
| 6 | O titular de licença de autorização de pesquisa científica deve apresentar ao órgão ambiental o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo. |
| 7 | Foi autorizada a coleta de amostras de colônias híbridas manganíferas para fins de coleta de tecidos alpinos, colônias eoparitas e colônias híbridas manganíferas, bem como o acompanhamento de pesquisas de campo, públicas ou privadas, desde que realizadas de acordo com o plano de manejo, incluindo o registro das atividades realizadas em campo. |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador deverá apresentar ao órgão ambiental o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo, bem como o plano de manejo das atividades de campo. |

Equipe

| P | Nome | Função | CPF | Loc. Matrícula | Endereço |
|---|---------------------------------|--------------|---------------|-------------------|----------|
| 1 | Luana Lopes Ribeiro | pesquisadora | 915.221.64248 | 979661-5/0001-00 | Brasília |
| 2 | Rafaela Borges Almeida da Silva | pesquisadora | 265.261.22843 | 265222-2/0001-00 | Brasília |
| 3 | Luana de Fátima Lima de Souza | pesquisadora | 619.156.79348 | 1791667-9/0001-00 | Brasília |
| 4 | Carla Rita de Lima | pesquisadora | 265221.66447 | 126221-5/0001-00 | Brasília |

Locais onde as atividades de campo serão executadas

| P | Município | UF | Descrição do local | Estado |
|---|-------------|----|------------------------------------|----------------|
| 1 | Brasília/DF | DF | Campo Verde/da Serra - Brasília/DF | Foto de ICMBio |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi gerado com base na Instrução Normativa nº 154/2007. Atente para o código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do SISAIBIO no Internet (www.icmbio.gov.br/sisaibio).

Código de autenticação: 63522949



Página 1/3



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 : 43203-1 | Data da Emissão : 20/01/2014 17:28 | Data para Renovação*: 01/03/2016 |
| * De acordo com o art. 39 da IN 154/2007, 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 e ser enviada por meio do Sistema no prazo de até 30 dias a contar da data de encerramento das atividades. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Érika Pereira Branco | CPF: 134.322.873-52 |
| Título do Projeto: Coleta, isolamento e preservação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de Sorex acutus | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAPÁ | CNPJ: 05.200.001/0001-01 |

Atividades X Taxões

| # | Atividade | Taxões |
|---|--|-------------|
| 1 | Coleta e transporte de amostra Biológica etc etc | 5/2014/2015 |

Materiais e métodos

| | | |
|---|--------------------------------------|---|
| 1 | Exercício Biológico (Prática) | Exercício de tecnologia |
| 2 | Método de captura de Sorex (Prática) | Outros métodos de captura de mamíferos de pequeno porte, preservação de Células Adiposas Práticas - Exemplos de Sorex |
| 3 | Método de preservação (Prática) | Técnicas de Sorex |

Destino do material biológico coletado

| # | Instituição Destino | Tipo Coleta |
|---|--------------------------|-------------|
| 1 | Instituto Evandro Chagas | |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi gerado de acordo com a Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sistema ICMBio no Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 63522949



Página 39



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

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|---|------------------------------------|----------------------------------|
| Número : 42802-1 | Data de Emissão : 20/01/2014 17:22 | Data para Renovação*: 01/02/2016 |
| * De acordo com o art. 29 da IN 154/2007, 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 Sistema de Autorização e Normas em Biodiversidade - SISBIO, até 30 dias antes da data de encerramento de sua execução. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Carlos Renato Branco | CPF: 124.222.873-52 |
| Título do Projeto: Cultura, isolamento e diferenciação de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo de <i>Sciurus aureus</i> | |
| Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE ARACAJÓ | CNPJ: 05.200.001/0001-01 |

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do Relatório de Atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

| Nºseq** | Qtd. | Tipo de amostra | Qtd. | Data |
|---------|------|-----------------|------|------|
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

** Denota o seqüência no nível taxonômico populacional.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi gerado de acordo com todas as Instruções Normativas nº154/2007. Atente ao código de autenticação abaixo, qualquer dúvida poderá ser feita a autoridade ou reguladora deste documento, por meio da página do Sistema ICMBio no Internet (www.icmbio.gov.br/portal).

Código de autenticação: 63522949



Página 2/2