

PROPOSIÇÃO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

A NEW METHODOLOGY PROPOSITION FOR ISOLATION AND CULTURE OF ADIPOSE-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Natalia Langenfeld Fuoco*, Monica Yonashiro Marcelino*, Talita Stessuk*, Milton Artur Ruiz**, Elenice Deffune***, Juliane Campos Inácio***, João Tadeu Ribeiro-Paes****

RESUMO

Introdução: As células-tronco mesenquimais (CTM) têm despertado interesse de vários grupos de pesquisa em função do grande potencial de aplicabilidade em terapia celular e medicina regenerativa. Nesse contexto, o tecido adiposo vem recebendo grande destaque como importante fonte para obtenção de CTM. Os protocolos utilizados atualmente para o isolamento das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) empregam, de forma geral, o método de digestão enzimática com colagenase extraída de bactéria (*Clostridium histolyticum*), que pode conter contaminantes, como endotoxinas e outros peptídeos que, eventualmente, poderão resultar em reações adversas nos procedimentos de terapia celular em pacientes humanos. Objetivo: Pretendeu-se no presente estudo adequar e propor uma nova abordagem empregando a metodologia de dissociação mecânica para isolamento de CTM derivadas de tecido adiposo de ratos. Métodos: As células cultivadas foram analisadas quanto ao potencial de adesão, proliferação e tempo de duplicação celular, por meio de uma curva de crescimento. As células isoladas e cultivadas a partir do tecido adiposo foram também analisadas quanto ao potencial de diferenciação *in vitro* nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica. Resultados: Os resultados mostraram que o tempo de duplicação (velocidade de crescimento) da população celular isolada por dissociação mecânica é mais expressivo quando comparado com a técnica de digestão enzimática. As células isoladas do tecido adiposo apresentaram potencial de diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica. Conclusão: Os resultados obtidos permitem concluir que a metodologia de dissociação mecânica apresenta-se como uma alternativa viável, de baixo custo e, como tal, extremamente promissora no sentido de permitir que a colagenase de origem bacteriana (*Clostridium histolyticum*) torne-se um componente prescindível para isolamento e cultivo de células provenientes do tecido adiposo.

PALAVRAS-CHAVE

Células-tronco mesenquimais. Tecido adiposo. Dissociação mecânica. Colagenase. Células-tronco. Metodologia.

ABSTRACT

Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) have attracted interest of several research groups due to the large potential applicability in cell therapy and regenerative medicine. In this context, adipose tissue has received high profile as an important source in order to obtain MSC. The protocols currently suggested for the isolation and culture of adipose-derived stem cells (ADSC) utilize, in general, the enzymatic digestion method with bacterial collagenase (*Clostridium histolyticum*) which may contain contaminants such as endotoxin and other peptides that eventually may result in adverse reactions in the cell therapy procedures in human patients. Objective: In this context, it was intended in this study to propose a new methodological approach of mechanical dissociation for isolating and culture of adipose-derived mesenchymal stem cells. Methods: The cultured cells were analyzed for potential adhesion, proliferation and cell doubling time, through a growth curve lineages. The cells were also analyzed according to potential for differentiation in adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. Results: The results showed that the doubling time of the cell population isolated by mechanical dissociation is faster when compared to the enzymatic digestion technique. The isolated cells from adipose tissues showed potential for differentiation in cell lineages osteogenic, adipogenic and chondrogenic. Conclusion: The obtained results allow us to conclude that the methodology of mechanical dissociation, presented in this paper, is a viable, low cost and therefore an extremely promising alternative in order to permit that the bacterial collagenase, from *Clostridium histolyticum*, become a dispensable component for isolation and cultivation of adipose-derived stem cells.

KEYWORDS

Mesenchymal Stem Cell. Adipose Tissue. Mechanical Dissociation. Collagenase. Stem Cells. Methodology.

Correspondence author: João Tadeu Ribeiro-Paes. jtrpaes@yahoo.com.br; labcel.tronco@gmail.com. Laboratório de Genética e Terapia Celular (GenTe Cel), Unesp, Avenida Dom Antonio, 2100, Assis, São Paulo, Brasil, CEP: 19806-900.
* Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
** Unidade de Transplante de Medula Óssea – Associação Portuguesa de Beneficência. São José do Rio Preto, SP.

*** Hemocentro – Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP.

**** Departamento de Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista. Assis, SP.
Received: 11/2015
Accepted: 01/2016

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco adultas de origem não hematopoiética foram pioneiramente descritas por Friedenstein e colaboradores em uma série de trabalhos iniciados no final dos anos 1960 e início dos anos 1970 (FRIEDENSTEIN et al., 1966; FRIEDESTEIN et al., 1968; FRIEDESTEIN et al., 1970). Os autores observaram, em culturas de células oriundas da medula óssea de camundongo, populações celulares que apresentavam capacidade de adesão aos frascos de cultura e morfologia semelhante a fibroblastos e, por isso, foram inicialmente denominadas de Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F). Desde então, a partir dos trabalhos pioneiros de Friedenstein e colaboradores (FRIEDENSTEIN, 1990), uma série de estudos passaram a ser realizados com a finalidade de identificar e caracterizar as células oriundas de tecidos mesenquimais, com propriedade de adesão à superfície dos frascos de cultura e de aspecto fibroblastoide (OWEN, 1988; PROCKOP, 1997; ZUCK et al., 2001; HORWITZ et al., 2005). A população de células aderentes de aspecto fibroblastoide recebeu, ao longo dos anos, diferentes denominações, sendo que o termo célula-tronco mesenquimal (CTM) foi pioneiramente proposto por Caplan em 1991. Em 2005, foi proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy – ISCT) um posicionamento visando esclarecer e estabelecer critérios de nomenclatura mais coerentes com as propriedades biológicas para as células de aspecto fibroblastoide e aderentes à superfície plástica. Foi proposta, então, a terminologia células estromais mesenquimais multipotentes (multipotent mesenchymal stromal cells), sendo recomendada a manutenção do acrônimo MSC (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006). Apesar da proposta para padronização da nomenclatura, pela ISCT a terminologia células-tronco mesenquimais (CTM) continua sendo correntemente empregada.

As células estromais mesenquimais multipotentes ou CTM têm, desde então, despertado grande interesse em função do potencial de aplicabilidade em terapia celular e medicina regenerativa. Podem ser obtidas de diferentes tecidos, como medula óssea, polpa dentária, placenta, cordão umbilical e tecido adiposo. Além disso, podem ser facilmente expandidas *in vitro* e apresentam baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade (HLA) (BAKSH et al., 2004; BYDLOWSKI et al., 2009; YARAK;

OKAMOTO, 2010; DARIOLLI, 2011; LINDROOS et al., 2011; ALVES-DE-MORAES et al., 2013; BIEBACK et al., 2012; BAER; GEIGER, 2012; REN et al., 2012; RIBEIRO-PAES et al., 2012; FARIA et al., 2013; FRENETTE et al., 2013; LONGHINI-DOS-SANTOS et al., 2013).

Embora a medula óssea tenha sido classicamente empregada como a principal fonte para a obtenção de CTM, o tecido adiposo vem, mais recentemente, recebendo grande destaque em função de uma série de vantagens, como a possibilidade de ser extraído em quantidades abundantes, por meio de cirurgias eletivas como abdominoplastias e lipoaspirações, que apresentam baixos índices de morbimortalidade (BAER; GEIGER, 2012; BYDLOWSKI et al., 2009; SOUZA et al., 2010; YARAK; OKAMOTO, 2010; DARIOLLI, 2011; LINDROOS et al., 2011; BOURIN et al., 2013; ESCOBEDO-LUCEA et al., 2013).

Os protocolos classicamente empregados para o isolamento das células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM) utilizam, de forma geral, a enzima colagenase, extraída de bactérias *Clostridium histolyticum* (RODBELL, 1966; ZUK et al., 2001; BOURIN et al., 2013; LINDROOS et al., 2011; YARAK; OKAMOTO, 2010). Deve-se, no entanto, ressaltar que a colagenase de origem bacteriana pode conter contaminantes, como endotoxinas e outros peptídeos, que podem, eventualmente, causar reações imunológicas ao paciente (CARVALHO et al., 2013; ESCOBEDO-LUCEA et al., 2013; GIMBLE et al., 2011; WILLIAMS et al., 1995). Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa – RDC nº 9, de 14 de março de 2011) recomenda que o uso de produtos de origem xenobiótica devam ser evitados em culturas de células que tenham por finalidade a aplicação em protocolos de terapia celular em pacientes humanos.

Nesse contexto, pretendeu-se com o presente estudo a proposição de uma nova abordagem metodológica, com emprego da dissociação mecânica para isolamento de células-tronco mesenquimais oriundas do tecido adiposo que prescindia do emprego de colagenase, em consonância com as recomendações da Anvisa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados 5 ratos albinos machos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, com 12 semanas de idade

e peso entre 350 e 400g. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno forradas com serragem, em sala com temperatura e luminosidade controladas (22 ± 2 °C; ciclos claro/escuro de 12 horas, recebendo dieta sólida (Nuvilab[®]; Paraná, Brasil) e água *ad libitum*.

2.2 EXTRAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO

Os animais foram sacrificados com dose letal (400mg/Kg) de tiopental sódico (Cristália[®], SP, Brasil), por via intraperitoneal. Aproximadamente 2g de tecido adiposo subcutâneo foram extraídos da região inguinal de cada animal.

Após a extração, o tecido adiposo foi submetido a um processo de desinfecção no qual foi mantido em meio RPMI 1640, tamponado com Hepes (Gibco[®], New York, USA) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®], New York, USA) e 2% de antibiótico – antimicótico (penicilina, streptomina e fungizona; Gibco[®], New York, USA) onde permaneceu por 24 horas a 4°C.

2.3 ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

Posteriormente ao processo de desinfecção, cerca de 10g de tecido adiposo obtido dos 5 animais foram colocados em uma placa de Petri, contendo meio RPMI 1640 (Gibco[®], New York, USA) suplementado com 2% de antibiótico – antimicótico (penicilina, streptomina e fungizona; Gibco[®], New York, USA) e dissociado mecanicamente com o auxílio de duas agulhas de seringa (BD[®], New Jersey, USA). As agulhas foram dobradas em formato de “L”, para melhor fragmentação do tecido adiposo. Após fragmentação, o meio de cultura, contendo as células dissociadas, foi transferido para seringas que permaneceram em posição vertical por cerca de 10 minutos, para que ocorresse a separação por diferença de densidade entre os restos de tecido adiposo e adipócitos maduros com o restante das células dissociadas no meio. Em seguida, a solução celular foi filtrada em um filtro de 70µm (Cell Strainer – BD Falcon[®], New Jersey, USA), para a separação de restos celulares. O material coletado foi centrifugado à temperatura ambiente, durante 10 minutos a 900g. O precipitado obtido foi ressuspenso em 1mL de meio ALPHA-MEM (Gibco[®], New York, USA) suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF –Gibco[®], New York,

USA) e 1% de antibiótico/antimicótico. Uma alíquota de 10µL foi retirada para contagem em câmara de Neubauer e mensuração da viabilidade celular utilizando azul de tripan. Após a contagem, as células foram semeadas em frascos de cultura de 25cm² a uma concentração de 1×10^5 células/cm², na presença de meio ALPHA-MEM (Gibco[®], New York, USA) suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

2.4 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES

A primeira troca do meio de cultura ocorreu 72 horas após as células terem sido semeadas nos frascos. As trocas seguintes ocorreram a cada 48 horas e, ao atingirem 70-80% de confluência, as células foram dissociadas com a utilização de Tryple[®] (Gibco[®], New York, USA) e novamente semeadas em novos frascos de cultivo na concentração de 1×10^5 cel/cm². A cultura celular foi mantida até a quinta passagem.

2.5 VIABILIDADE CELULAR E CURVA DE CRESCIMENTO

Para verificação da viabilidade e contagem celular foi empregada câmara de Neubauer com 10µL de azul de tripan e 10µL de suspensão celular.

As células-tronco derivadas do tecido adiposo foram analisadas quanto à proliferação e tempo de duplicação da população celular (PDT) por meio de uma curva de crescimento realizada durante dez dias. Para isso, após a quinta passagem, as células foram inoculadas, em triplicata, na densidade de aproximadamente 1×10^3 células/cm² em placas de cultura de 24 poços (BD Falcon[®], New Jersey, USA) com meio ALPHA-MEM suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico – antimicótico. A dissociação celular foi realizada a cada 24 horas, e a concentração celular determinada em câmara de Neubauer. Os valores obtidos foram plotados em um gráfico linear (dias x número de células). Com base no gráfico obtido, foi determinado o tempo de duplicação da população (*population doubling time* –PDT), conforme proposto por Janz (2010), empregando a seguinte fórmula: $T/(\log(N/N_0) \times 3,31)$, onde T: tempo (horas), N: número de células final e N₀: número de células inicial.

2.6 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NAS LINHAGENS CONDRÓGÊNICA, ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA

Para induzir as diferenciações osteogênica, condrogênica e adipogênica, as CTM foram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células/cm² e cultivadas em meio ALPHA-MEM suplementado com 20% de SFB e 1% de antibiótico/antimicótico, até atingirem uma confluência de 60-80%. Em seguida, as células foram cultivadas na presença dos kits de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica StemPro® (Gibco®, New York, USA), segundo a metodologia proposta pelo fabricante. Para a diferenciação osteogênica, as células foram plaqueadas na concentração de 1×10^4 células/cm² e cultivadas por 21 dias em meio de diferenciação StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco®, New York, USA), a confirmação da diferenciação foi realizada pela análise da coloração com Alizarin Red S (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Para a diferenciação condrogênica, as células foram plaqueadas em três gotas de 5µL na concentração de $1,6 \times 10^7$ células/mL, cultivadas por 14 dias em meio de diferenciação StemPro® Chondrogenic Differentiation Kit (Gibco®, New York, USA) e a confirmação da diferenciação foi realizada pela análise da coloração com Alcian Blue (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Por fim, para a diferenciação adipogênica, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/cm² e cultivadas por 7 dias na presença de meio de diferenciação adipogênica StemPro® Adipogenic Differentiation Kit (Gibco®, New York, USA) e posteriormente corada com Oil Red O (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA).

2.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Assis, Assis, SP (Registro n° 012/2011).

3 RESULTADOS

Com o propósito de avaliar as características de isolamento, proliferação e expansão das CTM, as células isoladas do tecido adiposo foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/cm². Após 48 horas, confirmou-se a aderência celular e a primeira troca de meio foi realizada sem perdas

significativas de células de interesse (pré-adipócitos). A partir do 3° ao 5° dia de cultura, foi possível notar a presença de colônias celulares e de pequenas células com aspecto fusiforme. No 7° dia de cultura, foi observada uma grande quantidade de células alongadas com formato fibroblastoide (Figura 1-A). A cultura primária atingiu confluência de 70-80% após, aproximadamente, 11 dias do início da cultura (Figura 1-B). No período inicial de cultivo, foram observadas células não aderentes, tais como hemácias e adipócitos maduros, que foram eliminadas após sucessivas trocas do meio de cultura.

Posteriormente à cultura primária, evidenciou-se uma aceleração progressiva do crescimento celular, à medida que as células foram inoculadas em novos frascos (passagem). A confluência da população de células de 70-80% na placa de cultura foi obtida entre 3 e 4 dias (Figura 1-C). Após a terceira passagem, a cultura apresentou características de monocamada homogênea de células com morfologia fibroblastoide (Figura 1-D). As células foram cultivadas até a 5ª passagem e mantiveram o mesmo padrão morfológico. A viabilidade foi medida em cada uma das passagens, obtendo-se uma média de aproximadamente 99% de viabilidade celular.

Para investigar o potencial de proliferação e o tempo de duplicação da população (PDT) das CTM, foi realizada uma curva de crescimento durante 10 dias, conforme expresso na Figura 2. Verifica-se, pela análise da curva, que o início da proliferação ocorre imediatamente após a semeadura das células. A cultura atingiu a fase de *plateau* após, aproximadamente, 2 dias do início do cultivo, conforme apresentado na Figura 2. O cálculo do PDT, um importante indicador da capacidade de proliferação, mostrou que a população celular duplicou a cada 24,2 horas.

A fim de validar se as células oriundas do tecido adiposo correspondiam a uma população de células mesenquimais, foi investigado o potencial de diferenciação das células isoladas em adipócitos, osteócitos e condrócitos, confirmando um dos critérios básicos que caracterizam e definem as CTM (DOMINICI et al., 2006). A diferenciação osteogênica foi verificada mediante coloração da matriz óssea com Alizarin Red S (Figura 3-A). A condrogênese foi confirmada mediante coloração com corante Alcian Blue, sendo que o azul indica a síntese de proteoglicanos pelos condrócitos (Figura 3-B). Finalmente, confirmou-se a diferenciação adipogênica por meio da presença de vacúolos lipídicos indicados pela coloração com Oil Red O (Figura 3-C).

4 DISCUSSÃO

O transplante de CTM desponta como uma nova opção terapêutica com grande potencial de aplicabilidade no reparo e regeneração de órgãos e/ou tecidos lesados (ESLAMINEJAD et al., 2011; BOURIN et al., 2013). Diversos autores têm relatado uma série de protocolos para isolamento e expansão de CTM oriundas do tecido adiposo por meio de digestão enzimática (ZUK et al., 2001; CHOI et al., 2012; BOURIN et al., 2013; BROCCAIOLI et al., 2013; FAN et al., 2013; LESLIE et al., 2013). Entretanto, como anteriormente mencionado, o emprego dessa técnica apresenta restrições, como o emprego de colagenase, uma enzima xenobiótica de origem bacteriana, e que, portanto, segundo as recomendações da Anvisa, deve ser evitada no cultivo de células para posterior infusão em pacientes humanos. Diante disso, a técnica de dissociação mecânica, apresentada no presente trabalho, surge como uma alternativa metodológica promissora para a substituição da técnica usual de digestão enzimática para isolamento de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo.

Os resultados obtidos para isolamento e posterior cultivo de CTM empregando-se a dissociação mecânica indicam que se trata de uma metodologia viável e reprodutível para o isolamento de CTM. A curva de crescimento (Figura 2) obtida a partir do isolamento por dissociação mecânica apresentou um tempo de dobramento de 24,2 horas. Na literatura são relatados períodos muito mais longos para que se obtenha a duplicação da população celular (PDT). Nos trabalhos de Peng et al. (2008) e Arrigoni et al. (2009), que empregaram colagenase para isolamento e posterior cultivo de CTM, foram obtidos PDT de 45,5 horas e 74,19 horas, respectivamente. Esses resultados correspondem a valores aproximadamente duas ou três vezes superiores ao valor obtido com a metodologia de dissociação mecânica para isolamento das CTM oriundas de tecido adiposo de ratos, ou seja com emprego de colagenase o crescimento celular foi duas a três vezes mais lento. Desta forma, esses resultados permitem associar uma série de vantagens à metodologia de dissociação mecânica, como um menor tempo para duplicação da população celular (PDT), que caracteriza um aspecto relevante, pois implica na redução do tempo para obtenção de número adequado de células em protocolos de terapia celular em modelos animais e pacientes humanos.

A viabilidade celular observada com a técnica de dissociação mecânica foi de 99%. Esse resultado caracteriza-

se mais expressivo do que aqueles obtidos por Peçanha et al. (2008), que obtiveram viabilidade celular de 95% empregando a metodologia de isolamento de CTM por digestão enzimática com colagenase de origem bacteriana.

As células em cultura na 7ª passagem foram induzidas *in vitro* à diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, conforme um dos critérios preconizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), para validação e confirmação de que as células em cultivo correspondem, realmente, a uma população de células estromais mesenquimais multipotentes ou CTM (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006; BYDŁOWSKI et al., 2009; PINTO FILHO et al., 2013; PATRIKOSK et al., 2013). A diferenciação das células isoladas e cultivadas a partir da metodologia de dissociação mecânica do tecido adiposo de ratos, conforme os resultados apresentados na Figura 3, comprovam a diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, evidenciando que a população celular oriunda do tecido adiposo de ratos corresponde a uma população de células estromais mesenquimais multipotentes.

Em síntese, o parâmetro mais evidente em termos de uma representação da vantagem para o emprego da dissociação mecânica em relação à digestão enzimática refere-se ao tempo de dobramento da população celular. Como se apreende dos resultados apresentados na Figura 2, o valor obtido para a dissociação mecânica foi abaixo daquele encontrado na literatura para a digestão enzimática, ou seja, as células isoladas por dissociação mecânica apresentam um crescimento inicial muito maior relativamente aos dados reportados na literatura para a digestão enzimática (PENG et al., 2008; ARRIGONI et al., 2009). Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas. Tal observação confere a este estudo um aspecto original e altamente relevante, uma vez que a metodologia apresentada mostra a viabilidade e eficiência de um método para isolamento e cultivo de CTM derivadas do tecido adiposo, que prescinde, em consonância com as recomendações da Anvisa, do emprego de um reagente xenobiótico, a colagenase extraída da bactéria.

5 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos neste trabalho, é lícito propor que a metodologia de dissociação mecânica apresenta-se como uma alternativa viável, de baixo custo

e, como tal, extremamente promissora no sentido de permitir que a colagenase de origem bacteriana (*Clostridium histolyticum*) torne-se um componente prescindível para isolamento e cultivo de células provenientes do tecido adiposo, particularmente quando se tem por finalidade o emprego de CTM em protocolos clínicos de terapia celular em pacientes humanos.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Prefeitura Municipal de Assis e ao Consórcio Intermunicipal do Vale do Paranapanema (CIVAP/Saúde) pelo apoio financeiro. Natalia Langenfeld Fuoco e Monica Yonashiro Marcelino foram apoiadas financeiramente pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes, Brasil).

7 REFERÊNCIAS

- ALVES-DE-MORAES, L. B.; RIBEIRO-PAES, J. T.; LONGOC, B. M.; FERRAZOLI, E. G.; ANDRADE, T. G. A. C. S. Effect of the bone marrow cell transplantation on elevated plus-maze performance in effect of the bone marrow cell transplantation. **Behavioural Brain Research**, v. 248, p. 32-40, 2013.
- ARRIGONI, E.; LOPA, S.; GIROLAMO, L.; STANCO, D.; BRINI, A. T. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. **Cell Tissue Research**, v. 338, p. 401-411, 2009.
- BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells International**, v. 2.012, p. 1-11, 2012.
- BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 301-316, 2004.
- BIEBACK, K.; HECKER, A.; SCHLECHTER, T. et al. Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. **Cytotherapy**, v. 14, n. 5, p. 570-583, 2012.
- BOURIN, P.; BUNNELL, B. A.; CASTEILLA, L. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, p. 641-648, 2013.
- BROCCAIOLI, E.; NIADA, S.; RASPERINI, G. et al. Mesenchymal stem cells from bichat's fat pad: in vitro comparison with adipose-derived stem cells from subcutaneous tissue. **BioResearch Open Access**, v. 2, n. 2, p. 107-117, 2013.
- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M. F.; JANZ, E. L. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CARVALHO, P. P.; GIMBLE, J. M.; DIAS, I. R.; GOMES, M. E.; REIS, R. L. Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells. **Tissue Engineering**, v. 19, n. 6, p. 473-478, 2013.
- CHOI, Y. S.; VINCENT, L. G.; LEE, A. R.; DOBKE, M. K.; ENGLER, A. J. Mechanical derivation of functional myotubes from adipose-derived stem cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 8, p. 2.482-2.491, 2012.
- DARIOLLI, R. Caracterização de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de porcos criopreservadas e a sua responsividade ao shear stress. 2011. Dissertação (mestrado)–FM-USP, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, São Paulo, 2011.
- DIRETORIA COLEGIADA BRASIL. Resolução RDC nº 9, 14 de março de 2011. Dispõe sobre o funcionamento dos centros de tecnologia celular para fins de pesquisa clínica e terapia e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, 16 mar. 2011
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
- ESCOBEDO-LUCEA, C.; BELLVER, C.; GANDIA, C. et al. A xenogeneic-free protocol for isolation and expansion of human adipose stem cells for clinical uses. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2013.
- ESLAMINEJAD, M. B.; MARDPOUR, S.; EBRAHIMI, M. Mesenchymal stem cells derived from rat epicardial versus epididymal adipose tissue. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 14, n. 1, p. 25-34, 2011.
- FAN, J.; TAN, Y.; JIE, L.; WU, X.; YU, R.; ZHANG, M. Biological activity and magnetic resonance imaging of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeled adipose-derived stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 2, p. 44-54, 2013.

- FARIA, C. A.; KOZMA, R. H.; STESSUK, T.; RIBEIRO-PAES, J. T. Experimental basis and new insights for cell therapy in chronic obstructive pulmonary disease. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, p. 1.236-1.244, 2012.
- FRENETTE, P. S.; PINHO, S.; LUCAS, D.; SCHEIERMANN, C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 285-316, 2013.
- FRIEDENSTEIN, A. J. Osteogenic stem cells in the bone marrow. **Bone Min. Res.**, v. 7, p. 243-272, 1990.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p. 230-247, 1968.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology & Experimental Morphology**, v. 16, p. 381-390, 1966.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and splee cells. **Cell Tiss. Kinet**, v. 3, n. 4 p. 393-403, 1970.
- GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A.; CHIU, E. S.; GUILAK, F. Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. **Stem Cells**, v. 29, p. 749-754, 2011.
- HORWITZ, E.; LE, B. K.; DOMINICI, M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, p. 393-395, 2005.
- JANZ, F. L. Características de expansão, diferenciação e criopreservação de células-tronco mesenquimais obtidas do líquido amniótico no segundo trimestre de gestação. 2010. Tese (Doutorado)–FM-USP, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, São Paulo, 2010.
- LESLIE, S. K.; COHEN, D. J.; SEDLACZEK, J.; PINSKER, E. J.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Controlled release of rat adipose-derived stem cells from alginate microbeads. **Biomaterials**, v. 30, p. 1-13, 2013.
- LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews Reports**, v. 7, p. 269-291, 2011.
- LONGHINI-DOS-SANTOS, N.; BARBOSA-DE-OLIVEIRA, V. A.; KOZMA, R. H. et al. Cell therapy with bone marrow mononuclear cells in elastase-induced pulmonary emphysema. **Stem Cell Reviews**, v. 2, p. 210-218, 2013.
- OWEN, M. Marrow stromal stem cells. **Journal of Cell Science**, Supplement, v. 10, p. 63-76, 1988.
- PATRIKOSKI, M.; JUNTUNEN, M.; BOUCHER, S.; CAMPBELL, A.; VEMURI, M. C.; MANNERSTRÖM, B.; MIETTINEN, S. Development of fully defined xeno-free culture system for the preparation and propagation of cell therapy-compliant human adipose stem cells. **Stem Cell Res Ther**, 2013, v. 4, n. 2, p. 27-42.
- PEÇANHA, R. Investigação do potencial regenerativo das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo (AT-MSCs) em lesão muscular esquelética de ratos. 2008. Dissertação (Mestrado)–UFRJ, IBCCF, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Rio de Janeiro, 2008.
- PENG, L.; JIA, Z.; YIN, X. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem Cells and Development**, v. 17, p. 761-774, 2008.
- PINTO FILHO, S. T. L.; TREICHEL, T. L. E.; ARAMBURÚ JUNIOR, J. S. et al. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. **Veterinária Zootecnia**, v. 20, p. 49-59, 2013. (Edição comemorativa).
- PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5.309, p. 71-74, 1997.
- REN, G.; CHEN, X.; DONG, F.; LI, W. et al. Concise review: Mesenchymal stemcells and translational medicine: emerging issues. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, p. 51-58, 2012.
- RIBEIRO-PAES, J. T.; STESSUK, T.; KOZMA, R. L. H. Cell therapy in chornic obstructiv pulmonary disease: state of the art and perspectives. In: ONG, Kian-Chung (Ed.). **Chronic obstructive pulmonary disease: current concepts and practice**. In Tech: Rijeka, 2012. p. 455-474.
- RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects off phospholipase c (clostridium perfringens alph toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 24, p. 130-139, 1966.
- WILLIAMS, S. K.; MCKENNEY, S.; JARRELL, B. E. Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion. **Cell Transplantation**, v. 4, n. 3, p. 281-289, 1995.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 647-656, 2010.

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

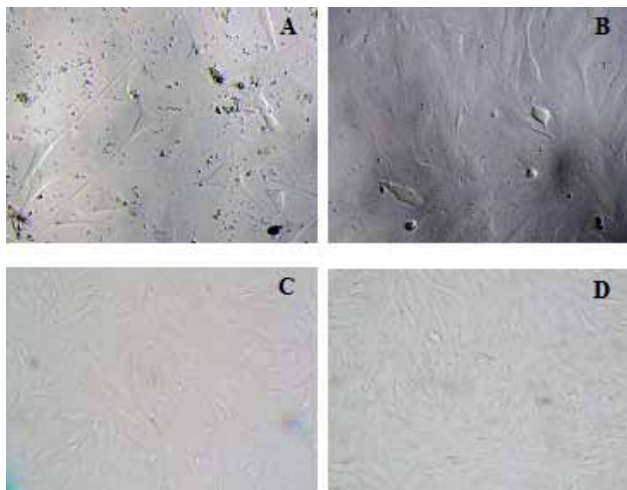


Figura 1. Características das células isoladas do tecido adiposo. **A** – 7 dias; **B** – 11 dias; **C** – 13 dias; **D** – 25 dias de cultura (3ª passagem). Aumento (20X).

Curva de Crescimento Celular

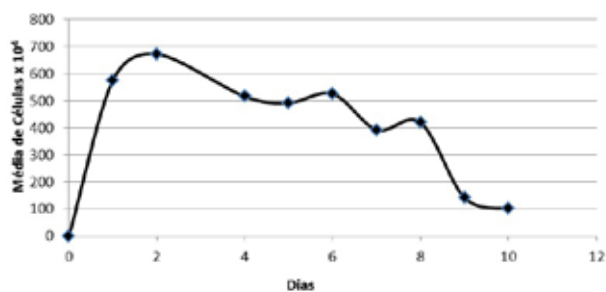


Figura 2. Curva de crescimento das CTM realizada por 10 dias com densidade inicial de 1×10^3 células/cm². Em ordenada foi colocada a média do número de células resultantes de culturas em triplicata.

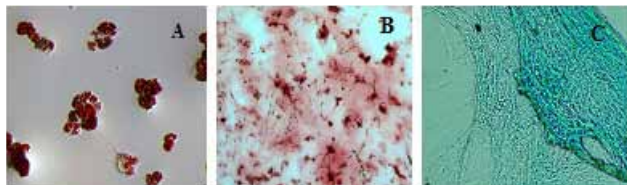


Figura 3. A) Diferenciação adipogênica das CTM ressaltando vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (20X); B) Diferenciação osteogênica das ASC evidenciando a matriz óssea corada com Alizarin Red S (20X); C) Diferenciação condrogênica das ASC, onde os proteoglicanos produzidos pelos condroblastos estão corados com Alcian Blue (20X).