

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
CURSO DE DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Camila Lima Carvalho

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO E CORDÃO
UMBILICAL DE SERES HUMANOS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE AS CÉLULAS ESTRELADAS
HEPÁTICAS**

Recife

2016

CAMILA LIMA CARVALHO

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO E CORDÃO
UMBILICAL DE SERES HUMANOS: CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISES
COMPARATIVAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA
SOBRE AS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro
de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do
grau de doutora em ciências.

Orientadora: Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

Coorientadora: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Recife

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- C331c Carvalho, Camila Lima.
Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos: caracterização e avaliação da capacidade imunomodulatória sobre as células estreladas hepáticas / Camila Lima Carvalho. - Recife: [s.n.], 2017.
98 p. : graf., tab.; 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.
Orientadoras: Sílvia Montenegro, Sheilla Andrade de Oliveira.
1. Células-tronco. 2. Células Mesenquimais Estromais. 3. Tecido adiposo. 4. Cordão umbilical. 5. Fibrose hepática. I. Montenegro, Sílvia Maria Lucena. II. Oliveira, Sheilla Andrade de. III. Título.

CDU 577.27

Camila Lima Carvalho

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO E CORDÃO
UMBILICAL DE SERES HUMANOS: CARACTERIZAÇÃO, ANÁLISES
COMPARATIVAS E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE IMUNOMODULATÓRIA
SOBRE AS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro
de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do
grau de doutora em ciências.

Aprovado em: 05/07/2016

Banca examinadora

Dra Silvia Maria Lucena Montenegro

Departamento de Imunologia do CPqAM/Fiocruz

Dra. Zulma Maria de Medeiros

Departamento de Parasitologia do CPqAM/Fiocruz

Dr. Lindomar José Pena

Departamento de Virologia e Terapia Experimental do CPqAM/Fiocruz

Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa

Departamento de Parasitologia do CPqAM/Fiocruz

Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Geraldo (*in memoriam*) e Ivete

Ao meu irmão George

A Erick

Muito obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, meu refúgio e fortaleza
Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
À Maternidade Professor Banderia Filho e Hospital Esperança
À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
Ao Conselho Nacional de Pesquisas.

Especialmente, a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho, a todos pelo conhecimento, torcida, conselhos e experiência transmitidos. Aos colaboradores e amigos que me ajudaram, acreditaram e participaram de todos os modos e em todos os momentos no desenvolvimento deste projeto.

Muito obrigada!

Leve na sua memória, para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença Divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo diante de qualquer obstáculo.

(Chico Xavier)

CARVALHO, Camila Lima. **Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos: caracterização e avaliação da capacidade imunomodulatória sobre as células estreladas hepáticas.** 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

O potencial de imunomodulação das células-tronco mesenquimais (CTM) vem sendo avaliado no reparo e/ou regeneração de tecidos com lesão. As CTM podem ser isoladas de diversos tecidos, entre os quais o tecido adiposo e cordão umbilical, são considerados fontes bastante importantes para obtenção dessas células. Contudo, características biológicas básicas das CTM do tecido adiposo e cordão umbilical ainda precisam ser elucidadas. Uma das promissoras aplicações das CTM é na terapia de doenças hepáticas, mas os mecanismos pelos quais essas células promoveriam a melhora da função do fígado não estão bem elucidados. Nesse contexto, caracterizamos aspectos fenotípicos de CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, analisando o potencial imunomodulador sobre as células estreladas hepáticas (CEH), célula-chave da fibrogênese no fígado. Para isso, a capacidade de diferenciação em linhagens, imunofenotipagem, perfil de ligação de lectinas e características ultraestruturais das CTM foram analisadas. Após o co-cultivo indireto entre as CTM e CEH, a marcação para as células CEH para apoptose foi realizada e o sobrenadante foi coletado para avaliação de citocinas. Na comparação entre as CTM de ambas as fontes, foram observados diferentes aspectos ultraestruturais e intensidade de ligação de lectinas. As CTM do tecido adiposo apresentaram melhor capacidade de diferenciação adipogênica e osteogênica, contudo ambas as CTM apresentaram perfil imunofenotípico e diferenciação condrogênica similares. No co-cultivo indireto, foi observado que as CTM levaram a redução significativa da produção de MCP-1 (citocina considerada relevante para o aumento da resposta inflamatória e fibrogênese no fígado) pelas CEH. Aumento da produção de IL-10 pelas CTM do cordão umbilical e IL-6 pelas CEH foi identificado, o que poderia estar associado à manutenção de um microambiente regulatório. Os resultados demonstraram que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical apresentam consideráveis diferenças fenotípicas. Apesar de ambas as CTM apresentarem ação imunomodulatória *sobre as CEH*, as CTM do cordão umbilical podem representar uma população de células mais promissoras para a aplicação terapêutica nas doenças hepáticas fibrosantes quando comparadas às CTM do tecido adiposo. Esses resultados podem contribuir para o aprimoramento dos estudos na área de terapia celular que avaliem os possíveis efeitos proporcionados pela aplicação das CTM do tecido adiposo e cordão umbilical.

Palavras-chave: Células-tronco. Células Mesenquimais Estromais. Tecido adiposo. Cordão umbilical. Fibrose hepática.

.

.

CARVALHO, Camila Lima. **Mesenchymal stem cells from adipose tissue and umbilical cord of humans**: characterization and evaluation of the immunomodulatory capacity in hepatic stellate cells. 2016. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

The immunomodulation potential of the mesenchymal stem cells (MSCs) has been evaluated in the repair and/ or regeneration of injured tissues. Among the various tissues that MSCs are able to be isolated, adipose tissue and umbilical cord are considered very important, however, there is no consensus as to the similarity of these cells. One of promising applications of MSCs is in therapy of liver diseases, but the mechanisms by which they would promote improved liver function are not well understood. It is possible that one of the actions of MSC occurs on hepatic stellate cells (HSC), a key cell of fibrogenesis in the liver. In this context, we characterize and compare phenotypic aspects of MSCs from adipose tissue and umbilical cord, analyzing their potential immunomodulatory on HSC. The ability to differentiate into lineages, immunophenotyping, ultrastructural analysis and lectin binding profile were analyzed. In the indirect co-culture of MSCs with HSC, marking was carried out with annexin V and propidium iodide, and the supernatant was collected for assessment of cytokines. We identify different ultrastructural aspects, as well as intensity and intracellular profile lectin binding. The adipose tissue MSCs showed better osteogenic and adipogenic differentiation capacity, however both MSCs presented immunophenotypic profile and similar chondrogenic differentiation. In relation to indirect co-cultivation, it was observed that the adipose tissue and umbilical cord MSCs led to significant reduction in production of MCP-1 for the HSC, this cytokine is regarded as relevant to the increased inflammatory response and liver fibrogenesis. The results indicate that there were considerable phenotypic differences between the MSC and adipose tissue cord. Furthermore, adipose tissue and umbilical cord MSCs have immunomodulatory action through paracrine effect on HSC. These results may improve knowledge about the phenotypic characteristics of the adipose tissue and umbilical cord MSCs and understanding of the possible mechanisms involved in the therapeutic effect of MSCs in liver diseases.

Keywords: Stem cells. Mesenchymal stromal cells. Adipose tissue. Umbilical cord. Liver fibrosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Identificação das células-tronco mesenquimais in vitro	17
Figura 2 -	Etapas do isolamento das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical obtidas através do método de migração celular	32
Figura 3 -	Poço de Transwell contendo na câmara superior as CTM e na câmara inferior as CEH. Nos poços contendo os grupos experimentais, o estímulo LPS foi adicionado.	38
Figura 4 -	Cultivo apresentando células aderentes derivadas de tecido adiposo e cordão umbilical	40
Figura 5 -	Imunofenotipagem por citometria de fluxo de células aderentes isolada a partir de tecido adiposo e do cordão umbilical	41
Figura 6 -	Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica de CTM derivadas de tecido adiposo e cordão umbilical	43
Figura 7 -	Eletromicrografias mostrando em detalhes as CTM do tecido adiposo na terceira passagem	45
Figura 8 -	Eletromicrografias de CTM do cordão umbilical na terceira passagem	47
Figura 9 -	Eletromicrografias mostram em detalhe as CTM de tecido adiposo na quinta passagem. A população de células apresentou subtipo I (SIadiposo) e subtipo células II (SIIadiposo)	48
Figura 10 -	Eletromicrografias de CTM derivadas de cordão umbilical na quinta passagem.	50
Figura 11 -	Eletromicrografias das lectinas ligadas às CTM derivadas do tecido adiposo e cordão umbilical	52
Figura 12 -	Eletromicrografias exibem a ligação das lectinas WGA e HPA às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical	53

Figura 13 -	Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4 produzidas por células-tronco mesenquimais do tecido adiposo após co-cultivo indireto com células GRX	55
Figura 14 -	Produção das citocinas IL12p70, IL-10, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e TNF- α produzidas pelas células GRX em co-cultivo indireto com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	57
Figura 15 -	Percentual de apoptose, apoptose tardia e necrose celular das células GRX após co-cultivo com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	58
Figura 16 -	Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4 produzidas por células-tronco mesenquimais do cordão umbilical após co-cultivo indireto com células GRX	60
Figura 17 -	Produção das citocinas IL-12p70, IL-10, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e TNF- α produzidas pelas células GRX em co-cultivo indireto com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	62
Figura 18 -	Gráficos de apoptose, apoptose tardia e necrose celular das células GRX após co-cultivo com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD	Grupos de diferenciação (Cluster of differentiation)
CD4+	Célula T regulatória 4
CEH	Célula estrelada hepática
CT	Células-tronco
CTM	Células-tronco mesenquimal
CEH	Células estreladas hepáticas
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
DMEM	Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
HGF	Fator de crescimento derivado de hepatócito
HPA	<i>Helix pomatia</i>
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LCA	<i>Lens culinaris</i>
MEC	Matriz extra celular
MMP	Metaloproteinases
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Penicilina-estreptomicina
SFB	Soro Fetal Bovino
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
Th	T helper
TIMP	Inibidores de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UEA	<i>Ulex europaeus</i>
WGA	Weat germ agglutinin
α -SMA	Alfa acitina de músculo liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Células-tronco	15
2.2 Células-tronco mesenquimais	16
2.3 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	19
2.4 Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	20
2.5 Terapia celular nas doenças hepáticas	22
2.6 Fibrose e células estreladas hepáticas	24
3 JUSTIFICATIVA	28
4 HIPÓTESE	29
5 OBJETIVOS	30
5.1 Objetivo geral	30
5.2 Objetivos específicos	30
6 METODOLOGIA	31
6.1 Tipo de estudo	31
6.2 Aspectos éticos	31
6.3 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais	31
6.3.1 Isolamento de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	32
6.3.2 Isolamento de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	32
6.4 Cultivo das células estreladas hepáticas: linhagem GRX	33
6.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	33
6.6 Diferenciação adipogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais	33
6.7 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais	34
6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	34
6.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão	35
6.10 Perfil de ligação das lectinas	35
6.11 Co-cultivo indireto de células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas: (GRX)	36
6.11.1 Avaliação do co-cultivo indireto: marcação da apoptose/necrose das células estreladas hepáticas (GRX)	36
6.11.2 Avaliação do co-cultivo indireto: dosagem de citocinas	37

6.12 Análises estatísticas	38
7 RESULTADOS	39
7.1 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical	39
7.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo	40
7.3. Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais	41
7.4. Diferenças ultraestruturais entre as células tronco msenquimais	44
7.5. Perfil de ligação das lectinas às células-tronco mesenquimais	50
7.6 Avaliação do co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas (GRX)	54
7.6.1 Avaliação das citocinas produzidas pelas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	54
7.6.2 Avaliação das citocinas produzidas pela célula GRX	56
7.6.3 Avaliação da taxa de apoptose e necrose da célula GRX	58
7.7 Avaliação do co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e células estreladas hepáticas (GRX)	59
7.7.1 Avaliação das citocinas produzidas pelas células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	59
7.7.2 Avaliação das citocinas produzidas pela célula GRX	61
7.7.3 Avaliação da taxa de apoptose e necrose das células GRX cultivadas com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	63
8 DISCUSSÃO	64
8.1 Características do cultivo, diferenciação e imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical	64
8.2 Estudo ultraestrutural das células-tronco mesenquimais	65
8.3 Perfil de ligação às lectinas das células-tronco mesenquimais	67
8.4 Co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas (GRX)	68
9. CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXO – Certificado Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	90
APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Cordão umbilical	91
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Tecido Adiposo	93

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) podem ser isoladas de quase todos os tecidos do organismo de seres humanos (MEIRELLES et al., 2007; MURRAY; PÉAULT, 2015). Possuem aspectos imunológicos que são considerados importantes para a terapia celular, como baixa imunogenicidade, o que viabiliza transplantes alogênicos (BESSOUT et al., 2014; LE BLANC et al., 2008); e a capacidade de modular células do sistema imune, levando a diminuição da resposta pró-inflamatória, ocasionando a redução do dano tecidual (CASTRO-MANRREZA, 2014; MONTESINOS, 2013; MA et al., 2014). Ademais, as CTM, que têm origem mesodérmica, sob estímulos apropriados, podem se diferenciar tanto *in vitro* quanto *in vivo* em células especializadas (GLENN; WHARTENBY, 2014; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008).

As CTM foram primeiramente isoladas na medula óssea, sendo consideradas as mais bem estudadas e, portanto, melhor caracterizadas, até este momento (DOMINICI et al., 2009; KEATING, 2006; RODIGUEZ-MENOCAL et al., 2015). Entre os vários tecidos que são fontes de CTM, o tecido adiposo e cordão umbilical são considerados dois dos mais importantes, ambos apresentando potencial para a utilização terapêutica na regeneração de tecidos (SI et al., 2011). Em relação ao cordão umbilical, há uma vantagem adicional: o procedimento não invasivo de coleta, já que, trata-se de um material biológico que é normalmente descartado após o parto, por isso sua aquisição ocorre sem causar danos para a mãe ou recém-nascido (SECCO et al., 2008).

Embora tenha havido, nos últimos tempos, grande progresso em estudos sobre a utilização terapêutica das CTM, ainda não foi encontrado, do ponto de vista da identificação celular, um marcador de superfície que seja específico para o reconhecimento dessas células (LV et al., 2014; MEIRELLES et al., 2008), o que tem dificultado a padronização dos estudos envolvendo sua aplicação terapêutica e a compreensão da sua identidade *in vivo* (LIN et al., 2013). Diferenças biológicas importantes entre as CTM podem refletir em diferentes mecanismos de reparação tecidual e, conseqüentemente, no sucesso da terapia celular (DMIETREVA et al., 2012), por isso estudos comparativos são relevantes (DE BARI et al., 2008; MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008; MENNAN et al., 2013).

Alguns trabalhos têm procurado caracterizar as CTM empregando tanto a microscopia óptica quanto a microscopia confocal (COUPLAND et al., 2008; ROLDÁN et al., 2010), mas poucos têm utilizado a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a de transmissão (MET) (RAIMONDO et al., 2006; YOUNG; BLACK, 2004), duas técnicas que poderiam revelar

detalhadamente estruturas que ajudem a caracterizar essas células ultraestruturalmente, contribuindo, assim, para que a sua utilização terapêutica seja mais eficaz (DEB et al., 2012; MANEA et al., 2014).

A capacidade de imunomodulação das CTM vem sendo explorada em estudos que visam ao tratamento de doenças hepáticas, uma vez que essas células produzem moléculas de sinalização capazes de suprimir a resposta inflamatória e contribuir para a resolução do infiltrado inflamatório que pode acarretar o dano tecidual nas hepatopatias (HERRERA et al., 2013; LIN et al., 2011; MAERCKX et al., 2014; NAJIMI et al., 2007). Mudanças notáveis na histopatologia e em marcadores sorológicos da função hepática vêm sendo identificadas após a terapia com as CTM, porém não existe uma clara compreensão dos mecanismos terapêuticos pelos quais essas células agem (WANG et al., 2016). Uma das possíveis respostas poderia estar na atuação das CTM sobre as células estreladas hepáticas (CEH), principais responsáveis pela síntese e conseqüente acúmulo excessivo da matriz extracelular no parênquima do fígado, o que contribui diretamente no processo de formação da fibrose após lesões (FRIEDMAN et al., 1985; SATO; SUZUKI; SENOO, 2003).

Parekadan et al. (2007) realizaram o co-cultivo indireto de CTM isoladas da medula óssea humana com CEH, e observaram que as CTM inibiram *in vitro* a produção e deposição de colágeno, através da secreção do TNF- α e IL-10 e, concomitantemente, induziram a apoptose das CEH ativadas. Apesar de esse estudo contribuir para o entendimento de mecanismos de atuação das CTM da medula óssea, não se sabe se esses resultados poderiam ser extrapolados para as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical.

Diante do exposto, estudamos a diferenciação em linhagens, imunofenotipagem, perfil de ligação com lectinas e as características ultraestruturais das CTM com o objetivo de caracterizar e/ou comparar essas células isoladas do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos. Em seguida, verificamos *in vitro* possíveis mecanismos de inibição das CTM no tecido adiposo e cordão umbilical sobre as CEH, a fim de contribuir para o aprimoramento da abordagem quanto à utilização dessas células na terapia celular das doenças hepáticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Células-tronco

As células-tronco (CT) são uma população de células indiferenciadas, caracterizadas pela propriedade de originar células especializadas e de auto-renovação (uma célula indiferenciada, após divisão celular, gera células com as mesmas características de CT) (CHEUNG; RANDO, 2013; POTTEN; LOEFFLER, 1990; ZAGO, 2006). Acrescenta-se a esses aspectos, a função das CT na organogênese e nos processos de reparação após lesão tecidual, em que podemos identificar diferentes tipos de CT distribuídas por todo o organismo (CHOI et al., 2010; LI; XIE, 2005; RODERFELD et al., 2010).

A diversidade de células que formam o organismo adulto é resultado da divisão e especialização de uma única célula: o zigoto, que tem origem na fecundação de um óvulo por um espermatozoide (ZAGO, 2006). Os blastômeros são as primeiras células que surgem logo após a fecundação e podem originar todas as células das camadas embrionária e extra-embionária, por isso são classificados como células totipotentes (RAFF, 2003). Durante a embriogênese, quando o embrião está no estágio de blastocisto, as células que pertencem à massa celular interna podem originar quaisquer células das três camadas germinativas (endoderma, ectoderma e mesoderma), por isso são reconhecidas como células-tronco pluripotentes (LIN; LEE, 2008; THOMSON et al., 1998). À medida que ocorre a especialização celular, ou seja, as CT se diferenciam e se comprometem em uma determinada linhagem, elas não são mais capazes de originar células de outras camadas germinativas e passam a ser classificadas como multipotentes, também conhecidas como células-tronco adultas (HSU; FUCHS, 2012), e um exemplo clássico dessas células é a CT hematopoiética (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Thomson et al. (1998) foram os primeiros a realizar o isolamento de CT embrionárias humanas. Grande expectativa foi gerada na comunidade científica em torno do potencial terapêutico dessas células, entretanto, a utilização das CT embrionárias para pesquisa e, possível, aplicação clínica levanta considerações éticas e obstáculos jurídicos em diversos países, devido ao fato de ser necessária a utilização de embriões humanos (BROCK, 2006). Acrescenta-se a isso que estudos têm atribuído um potencial oncogênico às CT embrionárias (GROUNDS et al., 2002; HONOLD, et al., 2004; NISHIKAWA; JAKT; ERA, 2007). Assim, as CT residentes no organismo adulto são uma opção para a continuidade de estudos experimentais e ensaios clínicos envolvendo a medicina regenerativa (KÖRBLING;

ESTROV, 2003; MIMEAULT; HAUKE; BATRA, 2007; MINGUELL, et. al., 2011; MUROI et al., 2013).

No organismo, as CT adultas são responsáveis pela manutenção da população de células funcionais e pela reparação de lesões teciduais (BRUNO et al., 2009; KÖRBLING; ESTROV, 2003). Apesar das CT adultas serem tecido-específicas (comprometidas com a diferenciação em células do tecido residente), estudos têm demonstrado que CT localizadas em um tecido podem se diferenciar em células especializadas de outros tecidos, a exemplo, das CT derivadas da medula óssea que podem originar neurônios, células da glia (EGLITIS; MEZEY, 1997; KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999) e hepatócitos (PETERSEN et al., 1999, THEISE et al., 2000).

Dentre todas as CTs adultas estudadas nos dias de hoje, as células-tronco mesenquimais (CTM) são as que possuem maior capacidade de diferenciação, tendo uma distribuição tecidual mais ampla, e podendo ser isoladas de diferentes fontes, além de apresentarem outros aspectos importantes, como alta proliferação celular (ZAGO, 2006), baixa imunogenicidade e função imunomodulatória (LE BLANC; RINGDÉN, 2007). Por causa dessas características, as CTM são consideradas importantes para o desenvolvimento de novas tecnologias baseadas na terapia e reparação tecidual (KESTENDJIEVA et al., 2008).

2.2 Células-tronco mesenquimais

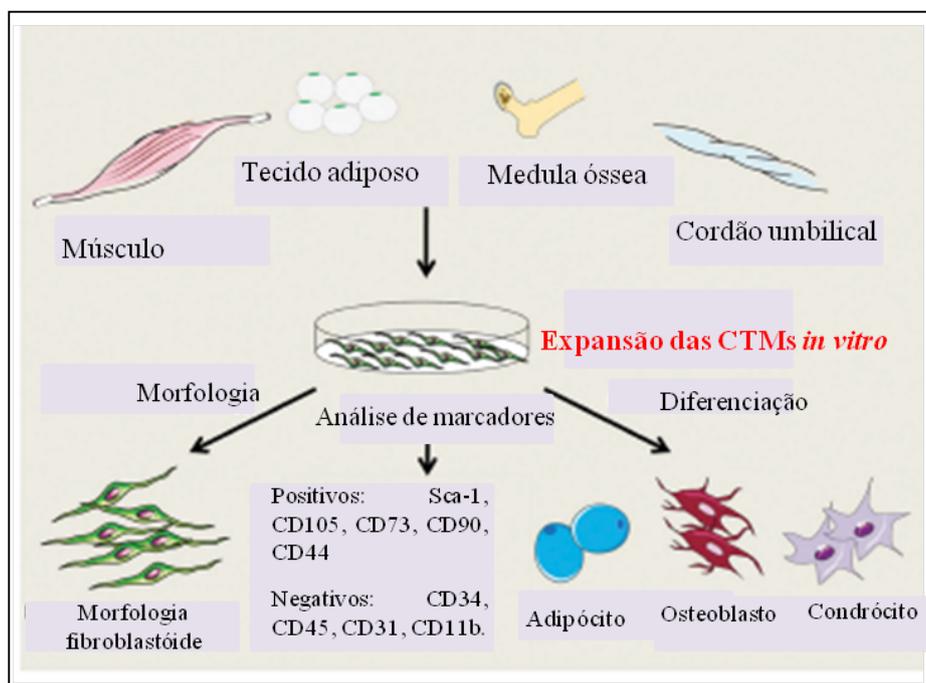
O trabalho descrito por Friedenstein et al. (1974) demonstrou definitiva evidência que a medula óssea possui, além de progenitores hematopoiéticos, uma população de células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F), denominadas posteriormente de CTM (BIANCO; ROBEY; SIMMON, 2008). Essas células, que têm morfologia fibroblastóide, são classicamente definidas pela propriedade de auto-renovação e multipotencialidade (BIANCO; ROBEY; SIMMON, 2008; RICKARD et al., 1996). Na medula óssea, estão inseridas no estroma e têm a função de suportar a hematopoiese, promovendo a maturação das células sanguíneas (ZAGO, 2006). Nos demais tecidos do organismo, o nicho das CTM também ainda não foi elucidado, conseqüentemente existe uma dificuldade para identificar quais são as suas exatas funções *in vivo*, o que representa uma barreira para as abordagens terapêuticas (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2009). Dessa forma, a fim de esclarecer a identidade *in vivo* das CTM, trabalhos vêm sugerindo que essas células possuem uma correlação com os pericitos, e, por isso, poderiam ser encontradas na região perivascular de pequenos e grandes vasos. Essa hipótese explicaria a possibilidade de isolamento das CTM

em quase todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2008; CRISAN et al., 2008; MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011).

Outra dificuldade para realização dos estudos *in vivo* é a falta de um marcador de superfície que seja específico para o reconhecimento das CTM (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Por isso, conforme proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINIC et al., 2006) (Figura 1), essas células têm de ser identificadas pelas seguintes características que apresentam *in vitro*:

- a) Capacidade de adesão à superfície plástica;
- b) Marcação para um conjunto de antígenos de superfície (positiva para marcadores como CD90, CD44, CD73, CD105; negativa para marcadores como CD34, CD45 e CD11b);
- c) Diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, após a adição de agentes indutores em cultura.

Figura 1- Identificação das células-tronco mesenquimais *in vitro*.



Fonte: Adaptado de Ma et al. (2014)

O cultivo de CTM por algumas passagens celulares é necessário para que se possa obter uma população homogênea (PITTENGER et al., 1999), pois outras células aderentes, como macrófagos, células endoteliais e leucócitos também são obtidas durante o isolamento, e

têm a propriedade física de adesão ao plástico de cultura, contudo elas só permanecem nas passagens iniciais do cultivo (DOMINIC et al., 2006; PITTENGER et al., 1999).

A princípio, estudos experimentais envolvendo a terapia com CTM eram baseados unicamente na sua propriedade de diferenciação multipotencial em células do tecido conjuntivo, especialmente na sua especialização em células osteogênicas para o tratamento de fraturas ósseas e osteogênese imperfeita (ISO et al., 2009; LEE et al., 2009). Porém, os resultados benéficos obtidos após a aplicação das CTM evidenciaram que os efeitos angiogênicos, antiapoptóticos, antifibróticos e anti-inflamatórios dessas células não poderiam ser somente atribuídos à diferenciação celular, mas principalmente à secreção de fatores tróficos (FANG et al., 2004; ORTIZ et al., 2003). Portanto, as CTM, quando administradas sistemicamente para terapia celular, migram para o local da lesão, e mesmo em pequena quantidade conseguem criar um microambiente protetor, incitando o reparo das células residentes, através da produção de múltiplas moléculas bioativas, como o fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que têm ação parácrina no tecido com lesão (CAPLAN; DENNIS, 2006; MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

Outra vantagem do uso de CTM para terapia celular é a possibilidade de transplantes alogênicos com baixíssimo risco de rejeição para o indivíduo (CHAMBERLAIN et al., 2007). Esse aspecto imunológico está relacionado a pouca imunogenicidade das CTM, que expressam em sua superfície níveis reduzidos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I e não expressam MHC classe II e moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD90) (LE BLANC et al., 2003a, 2003b), viabilizando também a sua utilização em estudos envolvendo os xenotransplantes (LI et al., 2012).

As CTM possuem outro aspecto relevante que as tornam uma ferramenta promissora para a terapia celular: a capacidade de imunomodulação (LE BLANC; RINGDÉN, 2007; SHI; LIU; WANG et al., 2011). Por isso são importantes para o controle de respostas autoimunes, sendo consideradas uma fonte celular promissora para o tratamento de distúrbios imunológicos, em que ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, como a doença do enxerto versus hospedeiro (LAAR; TYNDALL, 2006; POLCHERT et al., 2008; RASMUSSEN, 2006).

Uma questão importante relacionada às CTM e sua utilização para terapia celular é que, quando obtidas de tecidos diferentes, elas não seriam consideradas idênticas, porém similares (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). Os estudos comparativos de CTM de origem tecidual distinta são necessários, a fim de determinar a eficácia dessas células para aplicações terapêuticas específicas e entender a função que elas possuem em seu sítio de

origem (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008). O conhecimento das características ultraestruturais das CTM poderia representar a base para identificar *in situ* os nichos em que essas células residem, proporcionando um suporte para caracterizá-las nos tecidos adultos (PASQUINELLI et al., 2007).

Dentre os diversos tecidos em que as CTM podem ser isoladas, o tecido adiposo e o cordão umbilical são considerados importantes fontes de CTM com potencial uso para regeneração tecidual (SI et al., 2011). O isolamento e identificação da população de CTM derivadas do tecido adiposo (ZUK et al., 2001) e cordão umbilical (COVAS et al., 2003; ROMANOV et al., 2003) são achados recentes, dessa maneira, a caracterização fenotípica dessas células ainda não está elucidada (MIZUNO; TOBITA; UYSAL, 2012)

2.3 Células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

O tecido adiposo já foi considerado somente um reservatório de energia, mas, atualmente, ele é reconhecido como um órgão endócrino complexo que tem funções fisiológicas e fisiopatológicas importantes, especialmente, na homeostase energética e na inflamação (MAJKA et al., 2011).

O estroma vascular do tecido adiposo contém uma população celular chamada de células estromais aderentes derivadas do tecido adiposo (BOURIN et al., 2013; ZUK et al., 2001). Não existe um consenso quanto à nomenclatura dessas células que podem receber outras denominações como: células processadas do lipoaspirado, pré-adipócitos ou CTM do tecido adiposo (BUNNEL et al., 2008). Essas células apresentariam características necessárias, considerando-se os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular, para classificá-las como CTM. Contudo, existe uma divergência na literatura quanto à nomenclatura, pois as CT do tecido adiposo também possuem algumas características que as diferenciam das CTM da medula óssea (LIN et al., 2008; MITCHEL et al., 2006), que podem ser reflexo dos distintos microambientes em que as CTM residem no organismo (BOURIN et al., 2013).

Kern et al. (2006) realizaram uma análise comparativa de CTM do tecido adiposo, sangue de cordão umbilical e medula óssea, concluindo que todas as células apresentaram características típicas de CTM, contudo somente as células oriundas do tecido adiposo e medula óssea seriam fontes confiáveis para isolamento e expansão de CTM. Nesse contexto, estudos vêm demonstrando que as CTM do tecido adiposo são isoladas em maior quantidade do que as células derivadas da medula óssea (JIN et al., 2013; STREM et al., 2005). Além

disso, dependendo da idade do paciente, especialmente quando idosos, é mais difícil isolar um número suficiente de CTM da medula óssea para expansão celular (IZING et al., 2008).

A coleta da medula óssea é um procedimento de risco para o doador, pois é bastante invasivo, ao contrário da coleta do tecido adiposo subcutâneo que pode ser realizada por lipossucção, método que é mais seguro (COSTEILLA et al., 2011; HOUSMAN et al. 2002). Ressalta-se que o tecido adiposo, descartado em cirurgias plásticas, poderia ser aproveitado como fonte de CTM para transplantes alogênicos, o que é um aspecto importante para as aplicações terapêuticas (BAJEK et al., 2016; GIMBLE; KATZ; BUNELL, 2007). Além disso, as CTM do tecido adiposo proliferariam mais rápido (PENG et al., 2008) e com menor taxa de senescência em cultura do que as CTM da medula óssea (KERN et al., 2006), sendo que as células do tecido adiposo são mais estáveis morfológica e geneticamente em cultivos de longa duração (IZADPANA et al., 2006).

Puissant et al. (2005) foram os primeiros que compararam a propriedade de imunomodulação das CTM do tecido adiposo e medula óssea, concluindo que ambas as populações apresentavam a mesma capacidade de imunossupressão. Esse resultado é divergente de outros estudos que indicam existir uma diferença no perfil imunomodulatório dessas células, sugerindo que as CTM do tecido adiposo são mais imunossupressoras do que as CTM da medula óssea, porém os mecanismos pelos quais as células atuam ainda não estão elucidados (IVANOVA-TODOROVA et al., 2009; NOEL et al., 2008).

Além das vantagens de fácil isolamento, elevada quantidade de células isoladas e rápida proliferação em cultura, as CTM do tecido adiposo possuem propriedades anti-apoptóticas, angiogênicas e de remodelação tecidual, em que essas células promoveriam a regeneração do tecido com lesão, através da produção de citocinas e fatores de crescimento (GIMBLE; BUNELL; GUILAK, 2012). Diante dessas características, as CTM do tecido adiposo vêm sendo amplamente estudadas como alternativa terapêutica para doenças como as neurodegenerativas (SALGADO et al., 2010), autoimunes (CHO et al., 2013; MARIA et al., 2016; VOSWINKEL et al., 2013), isquêmicas (GUO et al., 2016), cardíacas (ALT et al., 2010; CHEN et al., 2014), hepáticas (WINKLER et al., 2015), musculares e ósseas (GUGJOO, et al., 2016; GARIMELLA et al., 2015; PAK, 2011).

2.4 Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

As CTM podem ser isoladas de diversos compartimentos do cordão umbilical, dentre eles a camada subendotelial da veia do cordão, artérias, geléia de Wharton, e também do

sangue, de onde há divergências quanto à possibilidade de isolamento e a densidade de células isoladas (ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; LEE et al., 2004; SECCO et al., 2008a).

Em um estudo comparativo das características das CTM isoladas da veia, artéria e geléia de Wharton do cordão umbilical, foi demonstrado que as células derivadas da veia possuíam maior formação de CFU-F, indicando um alto potencial de CT (ISHIGE et al., 2009). Covas et al. (2003) e Romanov et al. (2003) foram os primeiros a identificar as CTM da veia do cordão umbilical de seres humanos. O isolamento dessas células é considerado rápido e de fácil realização, podendo as mesmas ser expandidas *in vitro*, armazenadas criogenicamente e posteriormente descongeladas (FRIEDMAN et al., 2007; SECCO et al., 2008). Além do que, a coleta de células do cordão umbilical não é um procedimento invasivo e não provoca dor ou danos para a mãe e o recém-nascido (SECCO et al., 2008b).

A avaliação do perfil fenotípico e da capacidade de diferenciação das CTM isoladas do cordão umbilical e da medula óssea de seres humanos demonstrou que essas células têm características similares, porém as células do cordão umbilical possuem um maior potencial de expansão e diferenciação osteogênica *in vitro* (BAKSH; YAO; TUAN, 2007). Assim como as CTM de outros tecidos adultos, as células do cordão umbilical também podem modular a resposta imunológica e escapar do reconhecimento do sistema imune (CHO et al., 2007). Dessa forma, as CTM do cordão umbilical são consideradas uma fonte propícia para os transplantes alogênicos (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007), e para o armazenamento em bancos públicos e privados de cordão umbilical humano (KESTENDJIEVA et al., 2008; SECCO et al., 2008b).

As CTM do cordão umbilical expressam, em níveis mais baixos do que as CT embrionárias, os marcadores de indiferenciação Nanog e OCT-4, esses marcadores não foram identificados nas CTM da medula óssea, indicando que as CTM cordão umbilical possuem características intermediárias de CT embrionárias e adultas (KERMANI; FATHI; MOWLA, 2008). Dessa forma, elas poderiam ser descritas como uma população de células de natureza mais primitiva do que as CTM da medula óssea (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007; KESTENDJIEVA et al., 2008).

Não existe ainda um protocolo padrão para obtenção das CTM do cordão umbilical e a utilização de enzimas para o isolamento dessas células pode acarretar na diminuição da viabilidade, degradação de receptores de superfície e alteração da função celular (HAN et al., 2013; NAGAMURA-INOUE; HE, 2014). Nesses casos, uma alternativa viável é a padronização do isolamento de CTM pelo método de migração celular (DE BRUYN et al., 2011). Esse método é baseado em reduzir o tecido em tamanhos suficientes para que ocorra a

difusão de gases e nutrientes, a fim de que as células migrem para superfície plástica (MAJORE et al., 2011). Assim, uma grande quantidade de CTM pode ser isolada de todo o cordão umbilical de uma maneira simples e reprodutível, destacando-se que a maior parte da população dessas células não expressa HLA-I (MAJORE et al., 2011).

Existem diversas possibilidades de aplicação terapêutica das CT, uma das linhas de pesquisas que vem sendo extensivamente desenvolvida é a aplicação da terapia celular para o tratamento das doenças hepáticas (LI et al., 2008), assim, expectativas surgem em relação à melhora da qualidade de vida dos pacientes hepatopatas (DALGETTY et al., 2009). Por isso, estudos tentam caracterizar a função biológica, efeitos benéficos e segurança da aplicação de diferentes tipos celulares para o tratamento de doenças hepáticas (FORBES; NEWSOME, 2012; OLIVEIRA et al., 2008). Nesse contexto, os resultados obtidos em estudos com CTM para terapia das doenças do fígado têm sido notáveis (PULGLISH et al., 2011; YI-LING et al., 2011).

2.5 Terapia celular nas doenças hepáticas

A capacidade de diferenciação em hepatócitos, a imunomodulação e a secreção de citocinas anti-inflamatórias são apontadas como os prováveis mecanismos de ação das CTM que promovem a melhora da função hepática em trabalhos experimentais e clínicos (LIN et al., 2011; MEIER et al., 2013). Além disso, estudos identificaram que as CTM podem expressar metaloproteinases (MMP), e os altos níveis dessa enzima estão associados à degradação da matriz extracelular (HIGASHIYAMA et al., 2007) e a apoptose das células estreladas hepáticas (CEH) (PAREKKADAN et al., 2007), demonstrando a ação anti-fibrótica das CTM. Sob condições específicas de cultivo, as CTM podem se transdiferenciar em hepatócitos *in vitro*, apresentando semelhanças fenotípicas e genotípicas com essas células (AURICH et al., 2009; BANAS et al., 2007; CAMPARD et al., 2008; LI et al., 2010; ONG et al., 2006; PIRYAEI et al., 2011).

Aurich et al. (2009) diferenciaram *in vitro* CTM do tecido adiposo em hepatócitos e posteriormente trataram camundongo com lesão hepática, resultando em um aumento da população de hepatócitos residentes. Zhao et al. (2012), com o objetivo de verificar qual a melhor via de administração de hepatócitos derivados de CTM, induziram a lesão hepática por tetracloreto de carbono (CCL₄) em ratos, e posteriormente trataram esses animais com os hepatócitos diferenciados *in vitro*, concluindo que a melhora da função hepática poderia ser potencializada pela administração intravenosa dessas células.

Os hepatócitos obtidos *in vitro* após a diferenciação das CTM não possuem todas as funções metabólicas de um hepatócito residente do fígado e podem expressar alguns marcadores que são característicos de CTM, por isso essas células não são consideradas um hepatócito típico (LIN et al., 2011). Outra dificuldade na obtenção dos hepatócitos *in vitro* é a inexistência de um protocolo padrão de isolamento e cultivo das CTM, o que dificulta a reprodutibilidade dos experimentos entre os diferentes grupos de pesquisas e a seleção da fonte tecidual ideal dessas CT que seja mais propensa à diferenciação em hepatócitos (PHINNEY; PROCKOP, 2007). Diante do exposto, são necessários estudos que identifiquem de forma mais acurada os mecanismos envolvidos na diferenciação de CTM em hepatócitos para que essa abordagem possa ser considerada viável para os estudos clínicos (ISHII et al., 2008). Por outro lado, a infusão de CTM em modelos experimentais de lesão hepática indicou que essas células podem originar hepatócitos *in vivo*, gerando a perspectiva de que novas investigações validem o potencial terapêutico das CTM nas doenças hepáticas (WU; TAO, 2012).

Na terapia hepática com CTM, as citocinas e quimiocinas secretadas por essas CT têm ação sobre os hepatócitos ao reduzir a morte celular, ao mesmo tempo em que promovem a resolução da inflamação tecidual (BERARDIS et al., 2014). Devido a esse perfil anti-inflamatório, as CTM têm a capacidade de suprimir a proliferação e diferenciação de células do sistema imune, agindo sobre os linfócitos B (CORCIONE et al., 2006) e T (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; JIANG et al., 2005), células dendríticas (JIANG et al., 2005) e *natural killer* (SPAGGIARI et al., 2006) por contato direto ou indireto. Além de estimular a expansão e a atividade inibitória de células Treg CD4⁺ (BEYTH et al., 2005; MACCARIO et al., 2005).

Von Poll et al. (2008) identificaram que a administração de CTM em ratos com falência hepática fulminante induzida por D-galactosamina promoveu aumento da regeneração hepática com inibição da morte dos hepatócitos e redução da infiltração de leucócitos, esses resultados foram associados com a diminuição significativa das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α e aumento de IL-10, citocina imunossupressora. Apesar do aumento expressivo de estudos com o objetivo de entender as características biológicas das CTM, não existe um consenso sobre o exato mecanismo envolvido na melhora tecidual após a terapia com essas células (AUSILIATRICE et al., 2011). Portanto, estudos *in vitro* são necessários para desvendar os potenciais efeitos benéficos e os riscos envolvidos nas abordagens terapêuticas com CTM (AUSILIATRICE et al., 2011). Com esse objetivo, Parekkadan et al. (2007) realizaram o co-cultivo indireto de CTM da medula óssea e CEH, demonstrando que as CTM induzem a morte e inibem a proliferação de CEH por ação

parácrina das citocinas IL-10 e TNF- α , sugerindo que novos estudos de co-cultivo indireto com maior tempo de duração possam melhorar o entendimento do que ocorre *in vivo* após o tratamento com as CTM das doenças hepáticas crônicas.

2.6 Fibrose e células estreladas hepáticas

A fibrose hepática é uma resposta de cicatrização à lesão crônica do fígado e se caracteriza por acúmulo progressivo de matriz extracelular (MEC), rica em colágeno fibrilar tipo I e III, no parênquima hepático (FRIEDMAN, 2008b). Essa lesão pode ser provocada por diversos agentes infecciosos, como o *Schistosoma mansoni* e vírus da hepatite B e C; químicos, como etanol; desordens metabólicas hereditárias, autoimunes ou esteatose hepática não alcoólica (BATALLER; BRENNER, 2005).

Na fase aguda da doença hepática, a formação de tecido fibroso possui função protetora, pois tem a finalidade de reparar as lesões teciduais (FRIEDMAN, 2004). Nessa fase, as modificações que são provocadas na arquitetura do fígado são somente transitórias, apesar dos mecanismos de fibrogênese estarem ativos (LEE; FRIEDMAN, 2011). Contudo, a persistência dos estímulos agressores desencadeia uma lesão contínua no fígado que pode ser associada a um processo inflamatório intenso com aumento excessivo da deposição da MEC no parênquima hepático (WYNN, 2008). Esse processo crônico de lesão do fígado pode ocasionar uma progressiva substituição do parênquima hepático funcional por tecido de cicatrização, e, como consequência, ocorre uma alteração da estrutura tecidual e perda da função hepática, caracterizando a cirrose, estágio da doença em que os tratamentos disponíveis dificilmente têm um efeito terapêutico efetivo (HERNANDEZ; FRIEDMAN, 2011).

No fígado normal, a produção de MEC é dinâmica e precisamente regulada, resultado de um balanço equilibrado entre fibrogênese (síntese) e fibrólise (degradação) (HENDERSON; FORBES, 2008). Essa MEC é composta por macromoléculas como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas e caracterizada por ter baixa densidade, aspecto que é fundamental para a manutenção das funções fisiológica das células residentes do fígado (SCHUPPAN et al., 2001).

Quando ocorre uma perturbação crônica da homeostase hepática, a fibrogênese se sobrepõe à fibrólise (HERNANDEZ; FRIEDMAN, 2011), ocasionando uma mudança qualitativa (substituição de uma matriz de baixa densidade por uma de alta densidade predominantemente no espaço periportal e perisinusoidal) e quantitativa da MEC

(componente colágeno e não-colágeno, como proteoglicano e fibronectinas, aumentam em até dez vezes) (SCHUPPAN et al., 2001). O aumento da produção associada à falha na degradação dos componentes da MEC são os principais determinantes da progressão da fibrose (FRIEDMAN, 2008b). Nesse processo, uma família de enzimas de metaloproteinases dependente de cálcio (MMP), que degradam tanto o substrato colágeno quanto o não-colágeno, e seus inibidores (TIMP) atuam no remodelamento da MEC (PINZANI; ROMBOUTS, 2004). Nas doenças hepáticas, ocorre uma expressão elevada de TIMP e consequente redução da degradação de MEC pelas MMP (IREDALE, 2007).

Os miofibroblastos, também conhecidos como células fibrogênicas, são as células responsáveis pela produção dos componentes da MEC (FORBES; PAROLA, 2011). Através de sinalização autócrina e parácrina, os miofibroblastos levam a produção de fatores angiogênicos, pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigênio, e dessa forma são capazes de sustentar a fibrogênese hepática (FRIEDMAN, 2008b). Os miofibroblastos podem ser derivados de diferentes populações celulares: fibroblastos portais, fibrócitos da medula óssea, macrófagos e (CEH), que após a transdiferenciação, passam a expressar um fenótipo clássico de miofibroblasto, possuindo marcação positiva para alfa actina de músculo liso (SMA- α) (FORBES; PAROLA, 2011; FRIEDMAN, 2012). A contribuição de cada tipo celular para a origem dos miofibroblastos depende da causa e do grau da lesão no fígado, contudo as CEH são reconhecidas como as principais células produtoras de MEC, e por isso identificadas como as células-chave da fibrogênese hepática (FRIEDMAN 2000, FRIEDMAN 2008c).

As CEH, também conhecidas como lipócitos, células de Ito ou células armazenadoras de gordura, encontram-se em estado quiescente no espaço perisinusoidal de Disse (BRANDÃO et al., 2006; FRIEDMAN et al., 1985). Essas células têm como principal característica o acúmulo de vitamina A em seus vacúolos de gordura citoplasmáticos, totalizando aproximadamente 50-80% dos retinóides de todo organismo (SENOO et al., 2010). Devido a isso, as CEH têm um papel fundamental na manutenção da homeostase dos retinóides (SENOO et al., 2010).

Quando ocorre uma lesão no fígado proveniente de qualquer etiologia, os hepatócitos são as primeiras células a ativar a apoptose, desencadeando a liberação de espécies reativas de oxigênio e recrutamento de células inflamatórias, o que é considerado um importante estímulo para inflamação (KISSELEVA; BRENNER, 2007). Nessa etapa, a liberação de estímulos solúveis, como espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-fibrogênicas, além de corpúsculos apoptóticos provocam a ativação das CEH (LEE; FRIEDMAN, 2011). Essas células são ativadas rapidamente, sofrendo modificações morfológicas e funcionais, que

resultam em perda dos vacúolos lipídicos, expressão de SMA- α e adoção do fenótipo de miofibroblasto, o que as tornam a principal célula produtora de colágeno, especialmente os do tipo I (SENOO et al., 2010). Ao mesmo tempo, as CEH ativas secretam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1, e interagem diretamente com células do sistema imune, através de moléculas de adesão como ICAM-1 e VCAM-1, e dessa maneira, facilitam o recrutamento de células inflamatórias (BATALLER; BRENNER, 2005).

A ativação das CEH pode ser basicamente dividida em duas etapas: iniciação e perpetuação (BATALLER; BRENNER, 2005). Na primeira fase, a iniciação, as CEH apresentam mudanças primárias na expressão gênica que as tornam mais sensíveis a estímulos provenientes de outras células (FRIEDMAN, 2008c). Essas modificações iniciais das CEH são causadas por mediações parácrinas oriundas das células de Kupffer, células endoteliais, hepatócitos e plaquetas, assim como das mudanças sutis que ocorrem na constituição da MEC (BATALLER; BRENNER, 2001). Seguidamente, na fase de perpetuação, as CEH perdem os depósitos de vitamina A e iniciam a proliferação e contratilidade celular (BATALLER; BRENNER, 2001), em que o PDGF é identificado como principal mitógeno de CEH (BORKHAM-KAMPHORST et al., 2004). Ademais, essas células aumentam a produção de quimiocinas e citocinas, destacando-se o TGF- β , que é o mais importante estímulo para produção de colágeno tipo I, especialmente via ação autócrina (KISSELEVA; BRENNER, 2007).

As células do sistema imunológico, principalmente macrófagos e linfócitos T, secretam citocinas com perfil pró-fibrogênico e antifibrogênico, que têm importante ação sobre a função das CEH, apesar disso os mecanismos desse processo ainda não são completamente conhecidos (YI; JEONG, 2013). O aumento de linfócitos T CD4⁺ que produzem IL-17 (células Th17) tem sido identificado como fator estimulador da fibrose hepática (LEMMERS et al., 2009; MENG et al., 2012), e um dos possíveis mecanismos fibrogênicos seria o estímulo à produção de colágeno tipo I pelas CEH (MENG et al., 2012). Por outro lado, as células Th17 também teriam ação antifibrogênica, pois produziriam a citocina IL-22, que atenuaria os efeitos da fibrose ao induzir a senescência das CEH (KONG et al., 2012).

Através da produção das citocinas IL-4 e IL-13, os linfócitos T *natural killer* participariam do processo de ativação das CEH (JIN et al., 2011), apesar disso esses linfócitos teriam ação antifibrogênica nas doenças hepáticas (PARK et al., 2009). As células de Kupffer seriam mais um tipo de célula do sistema imune que participaria de uma polarização da

resposta Th1/Th2, devido à existência de dois grupos de macrófagos que são classificados como M1 (perfil pró-inflamatório) e M2 (perfil anti-inflamatório) (LASKIN et al., 2011). Os macrófagos são importantes para ativação das CEH, pois produzem citocinas, como TGF- β e TNF- α (BATALLER et al., 2003) que causariam a inibição da apoptose das CEH (GEORGE et al., 1999). Por sua vez, a produção de citocinas anti-inflamatórias, a exemplo da IL-10, pelos macrófagos do perfil M2 induziria a apoptose das CEH (MANUELPILLAI et al., 2012), assim como HGF, INF- γ e IL-12 produzidas por linfócitos, que também estariam envolvidas na inibição da fibrose hepática (SHAO et al., 2008; WYNN et al., 2007).

A recuperação da integridade do tecido do fígado durante a resolução da fibrose em modelos experimentais e em seres humanos com doença hepática aguda está associada à redução das CEH, contudo não está elucidado se isso ocorreria devido à morte celular programada e/ou reversão para o fenótipo quiescente pelas CEH (FRIEDMAN, 2013). Nesse contexto, a apoptose dessas células acarretaria a diminuição da produção de elementos da MEC, e concomitante, promoveria a redução dos níveis de TIMP, acarretando o aumento de MMP que leva a degradação da MEC (IREDALE et al., 1998). Por outro lado, a reversão das CEH para o fenótipo quiescente teria participação da citocina IL-10 que contribuiria para redução da inflamação e aumentaria a atividade da colagenase intersticial, promovendo reconstituição da MEC natural, isso levaria a regressão das células ativas para o estado quiescente (WANG et al., 1998).

O conhecimento dos mecanismos de ativação das CEH serviu como embasamento para potenciais estratégias terapêuticas antifibrogênicas, que têm como objetivo a indução da apoptose, diminuição da contratilidade, ativação e proliferação das CEH (LI et al., 2008). Estudos pré-clínicos e clínicos com utilização das CTM para tratamento de hepatopatias de diferentes etiologias têm sido realizados e demonstraram-se seguros e exequíveis, promovendo a melhora de função hepática e diminuição de tecido fibroso.

3 JUSTIFICATIVA

Na área de terapia celular, as CTM representam uma perspectiva para o tratamento de uma grande diversidade de doenças, sendo consideradas atualmente uma das mais relevantes CT estudadas. Ao mesmo tempo em que estudos extensivos em relação à aplicabilidade clínica dessas células são realizados, divergências e desconhecimento persistem quanto às características biológicas das CTM. Como consequência, podemos identificar uma dificuldade na reprodutibilidade dos resultados das pesquisas de fase pré-clínica e clínica. Vale ressaltar que a maior parte dos estudos sobre os aspectos biológicos das CTM e resultados promissores para terapia com essas células são desenvolvidos com as células derivadas da medula óssea, porém a coleta do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos é um procedimento de menor custo e, principalmente, baixo risco para o doador, quando comparada a punção da medula óssea. Além do mais, as CTM oriundas do tecido adiposo e cordão umbilical se destacam por apresentarem melhor potencial de proliferação celular e imunomodulação. Apesar disso, não existem estudos comparativos dos aspectos ultraestruturais dessas CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, ressaltando-se que esses contribuiriam para a caracterização dessas CT, pois podem revelar, em detalhes, estruturas importantes. Nesse contexto, os estudos que vêm utilizando as CTM para o tratamento de hepatopatias possuem limitações, pois não existe um entendimento claro dos possíveis mecanismos envolvidos na melhora hepática, por isso compreender a ação imunomodulatória dessas CTM sobre as CEH é de suma importância na proposição de novas abordagens terapêuticas antifibrosantes nas doenças do fígado.

4 HIPÓTESE

As células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos apresentam características ultraestruturais e fenotípicas diferentes e possuem, *in vitro*, ação imunomodulatória, por efeito parácrino, sobre as células estreladas hepáticas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Caracterizar e comparar aspectos fenotípicos e ultraestruturais das células-tronco mesenquimais (CTM) do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos e analisar o potencial imunomodulador, *in vitro*, sobre as células estreladas hepáticas (CEH).

5.2 Objetivos específicos

- a) Comparar os aspectos morfológicos das CTM do tecido adiposo e cordão umbilical;
- b) Avaliar, comparativamente, a expressão de marcadores de superfície pelas CTM de ambos os tecidos;
- c) Verificar, comparativamente, o potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM do tecido adiposo e cordão umbilical;
- d) Caracterizar e comparar aspectos ultraestruturais das CTM estudadas em diferentes passagens celulares;
- e) Comparar o perfil de ligação de lectinas às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical;
- f) Investigar, *in vitro*, a imunomodulação das CTM de ambos os tecidos sobre as CEH.

6 METODOLOGIA

6.1 Tipo de estudo

O estudo foi do tipo experimental observacional. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

6.2 Aspectos éticos

Todas as etapas realizadas neste estudo foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do CPqAM/FIOCRUZ-PE, parecer nº 353.807 (Anexo A) em consonância com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (CAAE: 07786413.8.0000.5190). Todas as participantes deste projeto assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Apêndice A e B).

6.3 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais

As CTM foram isoladas do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos, esses tecidos corresponderam ao material biológico que seria descartado após cirurgias de lipoaspiração e parto, respectivamente. Ambos os tecidos coletados foram acondicionados em um recipiente estéril, e transportados sob refrigeração para a Sala de Cultura do Departamento de Imunologia do CPqAM-FIOCRUZ.

O cultivo das CTM foi feito em meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) baixa glicose suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, São Paulo, BRA) e 1% de penicilina-estreptomicina (PE) (Sigma, St. Louis, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

Quando as células atingiram a pré-confluência (70-90% de células formando a monocamada em garrafa de cultura), foi realizado o repique celular, utilizando a enzima tripsina a 2% e EDTA a 0,25% (Invitrogen-Gibco[®], USA). Os experimentos foram realizados entre a terceira e quinta passagem celular. A cada repique de uma garrafa de células houve a geração no final do procedimento de mais duas novas garrafas, possibilitando a obtenção de uma quantidade suficiente de células para a realização de todos os experimentos.

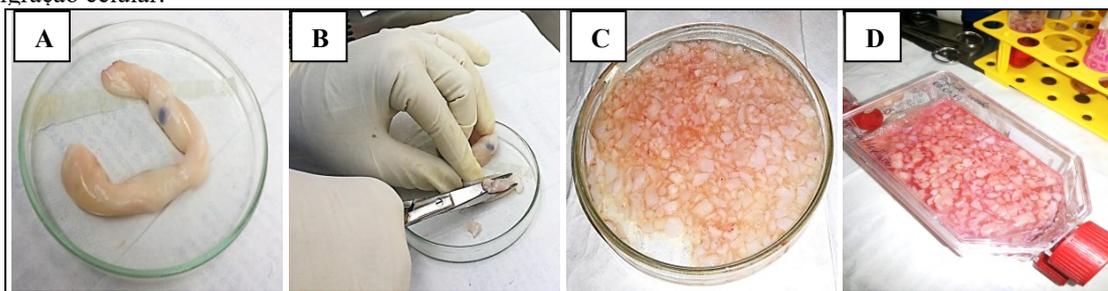
6.3.1 Isolamento de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

O tecido adiposo de seres humanos ($n = 5$, cerca de 50 mL) foi obtido a partir da camada subcutânea da região abdominal após cirurgia de lipoaspiração no Hospital Esperança Hospital-Recife-PE. Na Sala de cultura do Departamento de Imunologia, sob condições estéreis, o tecido adiposo foi seccionado em pequenos fragmentos de cerca de 2cm^2 e lavado com solução salina tamponada com fosfato (PBS). A digestão enzimática foi realizada com 1% de colagenase tipo I (Gibco, Gainthersburg, EUA) durante 30 minutos. Após esse período de incubação, foi realizada uma centrifugação a $500 \times g$ durante 10 minutos, e o sedimento de células foi recuperado em DMEM suplementado com 20% FBS e 1% de PE e colocado em garrafas de cultura de 25cm^2 para o cultivo das células.

6.3.2 Isolamento de células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

Para o isolamento das células do cordão umbilical, padronizamos a técnica de migração celular (Figura 2). Após a coleta do cordão umbilical obtidos de parturientes ($n=5$, com 36 a 40 semanas de idade gestacional, parto normal ou cesárea), na Maternidade Professor Bandeira Filho-Recife-PE, o material foi acondicionado em um recipiente estéril, e transportado sob refrigeração para a Sala de Cultura do Departamento de Imunologia. Em ambiente estéril, o cordão umbilical foi cortado em fragmentos pequenos de aproximadamente 2 cm^2 . Esses fragmentos, também denominados explantes, foram lavados com solução balanceada de Hank's (HBSS) e adicionados em garrafas de cultura de 25 cm^2 . O meio de cultura DMEM a 20% SFB e 1% PE foi trocado a cada 3-4 dias. Aproximadamente após 15 dias de cultivo, os explantes de cordão umbilical foram retirados da garrafa de cultura e as células que se encontravam em pré-confluência foram coletadas pela ação da tripsina a 2% (DE BRUYN et al., 2011).

Figura 2 - Etapas do isolamento das células-tronco mesenquimais do cordão umbilical obtidas através do método de migração celular.



Fonte: a autora

Legenda: A) Cordão umbilical B) Corte do cordão umbilical em fragmentos pequenos C) Lavagem dos fragmentos do cordão com solução de Hank's e D) Cultivo dos explantes do cordão umbilical

6.4 Cultivo das células estreladas hepáticas: linhagem GRX

A célula GRX é uma linhagem imortalizada de CEH oriunda de camundongos esquistosomóticos. Essas células foram adquiridas no Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cultivadas em garrafas de cultura de 25cm² contendo meio DMEM suplementado com 20% SFB e 1% PE. As células foram mantidas em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C. O repique celular foi feito com solução de tripsina a 2% e EDTA a 0,25%.

6.5 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Na terceira e quinta passagem do cultivo celular, a suspensão de CTM do tecido adiposo e cordão umbilical foi corada com azul de tripan e contada em microscópio óptico (LABORSUL BIO-100). A população de células foi distribuída em alíquotas de 1x10⁶ células/ tubos de citometria de poliestireno. No total, foram utilizados seis tubos para cada tipo de CTM (um tubo para cada marcador e um tubo controle). As células foram centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos e adicionou-se PBS-Wash (PBS contendo 0,5% de BSA e 1% de Azida, pH 7,2). Posteriormente, de acordo com as instruções do fabricante, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos específicos: CD34-Alexa Fluor, CD45-aloficocianina (APC), CD90-Phycoerytrin (PE) e CD73-PE (BD Pharmigen, EUA). Em todas as amostras, 10.000 células marcadas foram analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickson Immunocytometry Systems).

6.6 Diferenciação adipogênica e osteogênica das células-tronco mesenquimais

As CTM foram adicionadas em placas de cultura de 24 poços em uma densidade de 1x 10⁴ células/cm². Durante 21 dias, as células foram cultivadas em meio indutor da diferenciação osteogênica (DMEM suplementado com 10% SFB, 10 mM de β-glicerolfosfato, 0,2 mM de ácido ascórbico e 100 mM de dexametasona, Sigma, St. Louis, EUA) ou em meio indutor da diferenciação adipogênica (DMEM suplementado com 10% SFB, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina, 0,1 mM dexametasona, 100mM indometacina, 10 µg/ml de insulina por três semanas, Sigma, St. Louis, EUA). O controle do experimento foi feito com CTM cultivadas em meio DMEM com 10% SFB. Para a confirmação da diferenciação osteogênica,

os depósitos de cálcio foram corados pelo método de Von Kossa. Para diferenciação adipogênica, as células foram coradas com Oil Red O para visualização dos vacúolos lipídicos em vermelho (adaptado de Secco et al., 2008). Todas as amostras foram visualizadas no microscópio óptico LABORSUL BIO-100.

6.7 Diferenciação condrogênica das células-tronco mesenquimais

As CTM do tecido adiposo e cordão umbilical foram centrifugadas a 500 x g por 10 minutos e adicionadas separadamente em tubos de cultura em uma densidade de 1×10^7 células/mL para a formação de uma micromassa de células. As células foram cultivadas em meio de diferenciação condrogênica em conformidade com as instruções do fabricante (Kit StemPro condrogenesis, Gibco, Gaithersburg, EUA), em que o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após 14 dias, as células foram coradas com azul de Alcian (1% de solução de azul de Alcian, Sigma, St. Louis, EUA) com o objetivo de revelar a presença de glicosaminoglicanos na matriz extracelular. As células que foram cultivadas com DMEM, contendo 10% de SFB e 1% de PE, corresponderam ao controle negativo (SECCO et al., 2008). Todas as células foram visualizadas no microscópio óptico LABORSUL BIO-100.

6.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As CTM, na terceira passagem celular, foram colocadas sobre lamínulas estéreis na concentração de 2×10^4 células/mL e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Após um período de 24h, as CTM foram fixadas com solução de 2,5% de glutaraldeído e 4% formaldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2. A etapa de pós-fixação foi realizada, durante 90 minutos, com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M. Em seguida, foram realizadas três lavagens em tampão fosfato 0,1M e posterior desidratação utilizando uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. O ponto crítico foi realizado para substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se a secagem do material para montagem em *stubs* metálicos. A metalização foi realizada com uma fina camada de ouro, para visualização e análise das amostras no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV (BRAYNER et al., 2007).

6.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na terceira e quinta passagem do cultivo celular, após a ação da solução de tripsina-EDTA sobre as CTM, as células em suspensão foram adicionadas em tubo tipo Eppendorf e fixadas com solução contendo 2,5% de glutaraldeído, 4% formaldeído em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7.2). A amostra foi lavada com tampão cacodilato de sódio e pós-fixada com 1% de tetróxido de ósmio durante 1h. A desidratação foi feita em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 3 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa), para posterior infiltração e emblocamento em resina Epon 812. Depois de cortado e contrastado, as grades contendo o material foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão 100CXII JEOL (PASQUINELE et al., 2007).

6.10 Perfil de ligação das lectinas

As grades contendo CTM derivadas de tecido adiposo ou cordão umbilical foram incubadas durante 1 hora em PBS com 1% de albumina e 0,01% de Tween (Sigma, St. Louis, EUA). Em seguida, elas foram incubadas durante 1 hora com os seguintes lectinas conjugadas com ouro coloidal de 10 nm e diluídas em PBS com 1% de albumina (1: 10): *Ulex europaeus* agglutinin (UEA), *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), Wheat germ agglutinin (WGA) e *Helix pomatia* agglutinin (HPA). As lectinas conjugadas a ouro coloidal de 10 nm (Sigma, St. Louis, EUA). Após essa etapa, ocorreu a lavagem das células com PBS contendo 1% de albumina, e a contrastação durante 15 minutos com acetato de uranila. As células foram examinadas utilizando o microscópio eletrônico de transmissão JEOL 100CXII (adaptado de EGUSHI et al., 1989). Como controle negativo foi adicionado à solução de cada lectina o monossacárideo/dissacarídeo ao qual a lectina é específica, a uma concentração de 100 nM. As partículas de ouro coloidal foram visualizadas pela MET como pontos pretos com formato e tamanho uniformes.

Quadro 1 - Lectinas e seus resíduos de carboidratos.

Lectinas	Resíduos de Carboidratos Específicos
<i>Helix pomatia</i> (HPA)	Terminal α GalNAc
<i>Lens culinaris</i> (LCA)	Terminal α -D-Man and α -D-Glc
<i>Ulex europaeus</i> (UEA)	Terminal L-Fuca1,2Galb1,4GlcNAcb
<i>Triticum vulgare</i> or Weat germ agglutinin (WGA)	Terminal bGlcNAc>>NeuNAc
<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA)	Terminal GalNAca1,3(LFuca1,2)Galb1,3/4GlcNAcb1

Fonte: a autora

Abreviações: *Fuc*: fucose; *Gal*, galactose; *GalNAc*: N-acetylgalactosamine; *Glc*: glucose; *GlcNAc*: N-acetylglucosamine; *Man*: mannose; *NeuNAc*: N-acetyl neuraminic (sialic) acid.

6.11 Co-cultivo indireto de células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas (GRX)

Para o co-cultivo indireto, foram utilizadas placas de cultura contendo um inserto de membrana semipermeável (Transwell®, Corning, membrana de policarbonato com poro de 0,4 μ m). Na proporção 1:1 de células, 1,0 x 10⁵ de células GRX foram colocadas na câmara inferior do poço e 1,0 x 10⁵ de CTM do tecido adiposo ou cordão umbilical foram adicionadas sobre o inserto da membrana. As células foram cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB e 1% de PE.

O grupo experimental foi composto por CTM co-cultivadas com GRX, contendo lipopolissacarídeo (LPS, 250 ng/mL) adicionado ao meio de cultura (CTM+GRX+LPS). Para os controles, os seguintes grupos de células foram adicionados aos poços: GRX, GRX+LPS, CTM, CTM+LPS e CTM+GRX. O experimento foi realizado em triplicata e a coleta do sobrenadante (para dosagem de citocinas) e da célula GRX (para avaliação da apoptose/necrose) ocorreu no tempo de 4 dias (PAREKKADAN et al., 2007).

6.11.1 Avaliação do co-cultivo indireto: marcação da apoptose/apoptose tardia/necrose das células estreladas hepáticas (GRX)

Após a realização do co-cultivo indireto no período de 4 dias, as células GRX foram

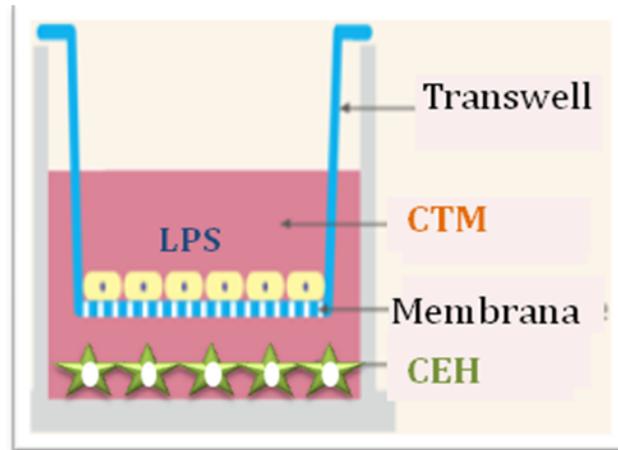
coletadas pela ação da solução de tripsina/EDTA. O percentual de apoptose/necrose das células foi determinado pela utilização do *kit* de detecção de Apoptose Anexina V/Iodeto de propídio (Sigma, St. Louis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a centrifugação a 500 x g por 10 minutos, foi adicionado ao sedimento de células, 400 µL de tampão de ligação, 5 µL de anexina V-FITC e 1 µL de iodeto de propídio. As células foram incubadas a temperatura ambiente por 15min, ao abrigo da luz. A leitura foi realizada no citômetro de fluxo (FACSCalibur - Becton Dickson Immunocytometry Systems).

6.11.2 Avaliação do co-cultivo indireto: dosagem de citocinas

No tempo de 4 dias do co-cultivo indireto, o sobrenadante da cultura foi coletado e a dosagem das citocinas do sobrenadante do co-cultivo foi realizada pela metodologia de *Cytometric Bead Array* (CBA). Foi avaliada a produção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ pelas CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, através da utilização do kit *Human Th1/Th2* (BD, Pharmingen, EUA; n° catálogo: 551809) e das citocinas MCP-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-12p70, e IL-10, utilizando-se o kit *Mouse Inflammation* (BD, Pharmingen, EUA; n° catálogo: 552364) para avaliar a produção das citocinas pelas células GRX. As etapas do experimento foram realizadas de acordo com as orientações sugeridas pelo fabricante.

Primeiramente, 35 µL da mistura de *beads* de captura, marcadas com anticorpos monoclonais com diferentes intensidades de fluorescências foram transferidos para tubos destinados às amostras a serem testadas e ao controle negativo. Em seguida, 25 µL das amostras de sobrenadante e do diluente foram adicionados aos seus respectivos tubos. Subsequentemente foram adicionados às esferas de captura, 25 µL do reagente de detecção contendo anticorpos anti-citocinas humanas conjugadas com PE (FL2). As misturas foram incubadas por 3 horas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 1 mL de solução de lavagem e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado, restando aproximadamente 100 µL em cada tubo, onde foram adicionados 300 µL de solução tampão para ressuspender as esferas e posterior leitura das amostras. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e as análises foram realizadas através do Software BD CBA (Beckton Dickson).

Figura 3 - Poço de Transwell contendo na câmara superior as CTM e na câmara inferior as CEH. Nos poços contendo os grupos experimentais, o estímulo LPS foi adicionado.



Fonte: Adaptado de Corning (2016).

6.12 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados através do software Graph Pad PRISM 5.0 Windows® (EUA). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste ANOVA. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

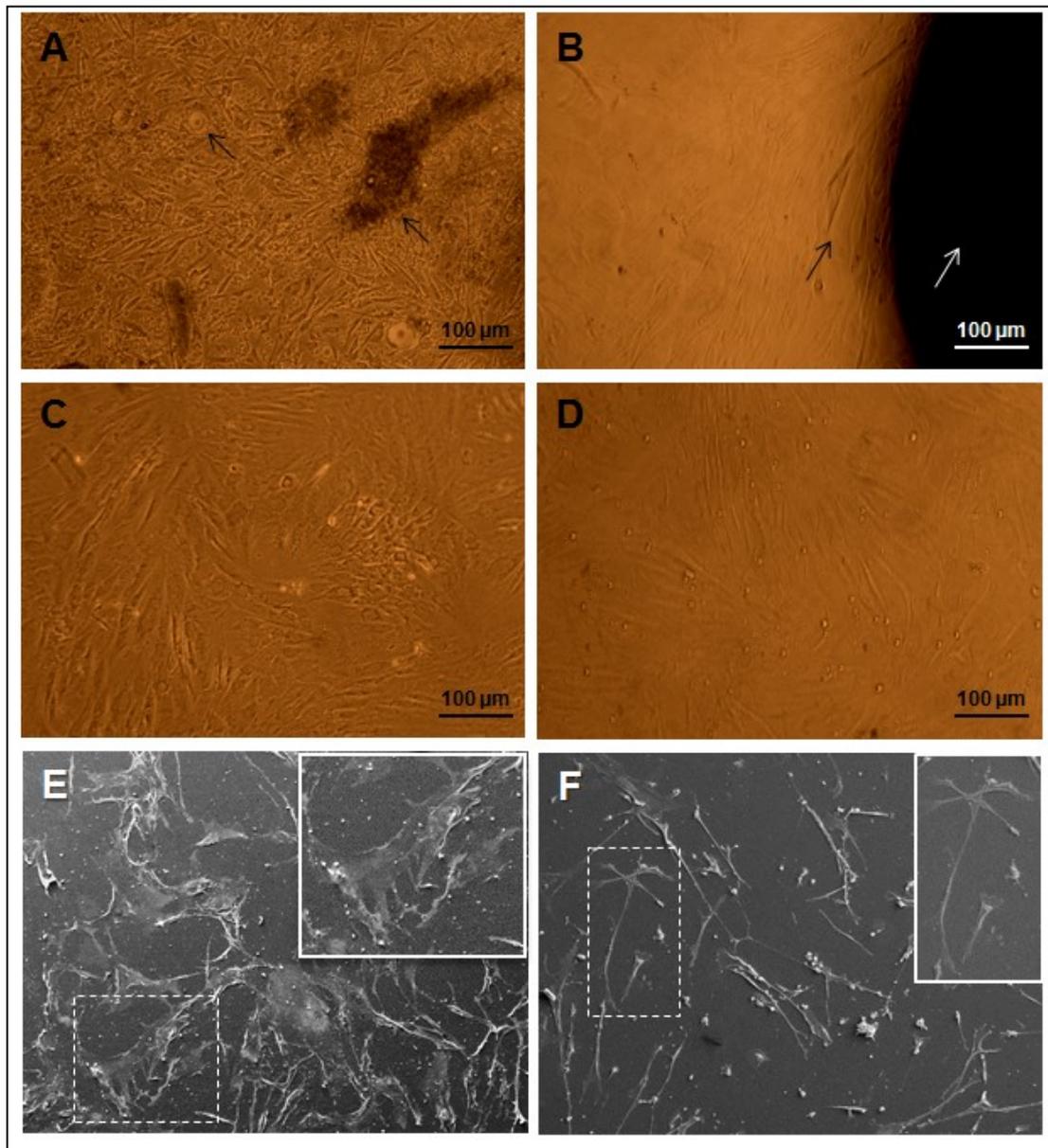
7.1 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical

Após o isolamento das CTM do tecido adiposo, no período entre 24 e 48 horas, as células que aderiram à superfície plástica da garrafa de cultura, iniciaram a proliferação. Essas células, em até 4 dias, já apresentavam morfologia fibroblatóide, e, no intervalo de 15 a 20 dias, encontravam-se no estágio de pré-concluência (70-90% de células formando a monocamada na garrafa de cultura) (Figura 4A), que correspondia o momento ideal para o repique e expansão celular.

A obtenção de células do cordão umbilical com morfologia semelhante a fibroblasto apenas ocorreu em aproximadamente 15 dias desde o início do método de migração celular (Figura 4B), por isso essas células, a princípio, exibiram uma menor capacidade proliferativa na passagem inicial da cultura quando comparadas às células obtidas do tecido adiposo. Uma vez que a primeira passagem da cultura foi estabelecida, a proliferação das CTM do cordão umbilical aumentou.

A análise morfológica das células pela observação no microscópio óptico invertido demonstrou que as CTM do tecido adiposo na terceira passagem do cultivo apresentavam algumas diferenças quando comparadas às CTM do cordão umbilical (Figura 4C-D). A avaliação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) revelou que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical apresentavam-se difusamente dispersas, com poucas variações na morfologia celular dentro da mesma população (Figura 4E-F). Porém, quando comparamos as CTM derivadas das duas fontes teciduais, observamos que as CTM do tecido adiposo eram maiores, mais largas e mais planas, e continham projeções citoplasmáticas mais curtas e ramificadas quando em contato com as células adjacentes (Figura 4E). As CTM do cordão umbilical apresentavam-se menores, mais delgadas e proeminentes, e suas projeções citoplasmáticas eram longas e também realizavam o contato com as células vizinhas (Figura 4F).

Figura 4 - Cultivo apresentando células aderentes derivadas de tecido adiposo e cordão umbilical.



Fonte: a autora

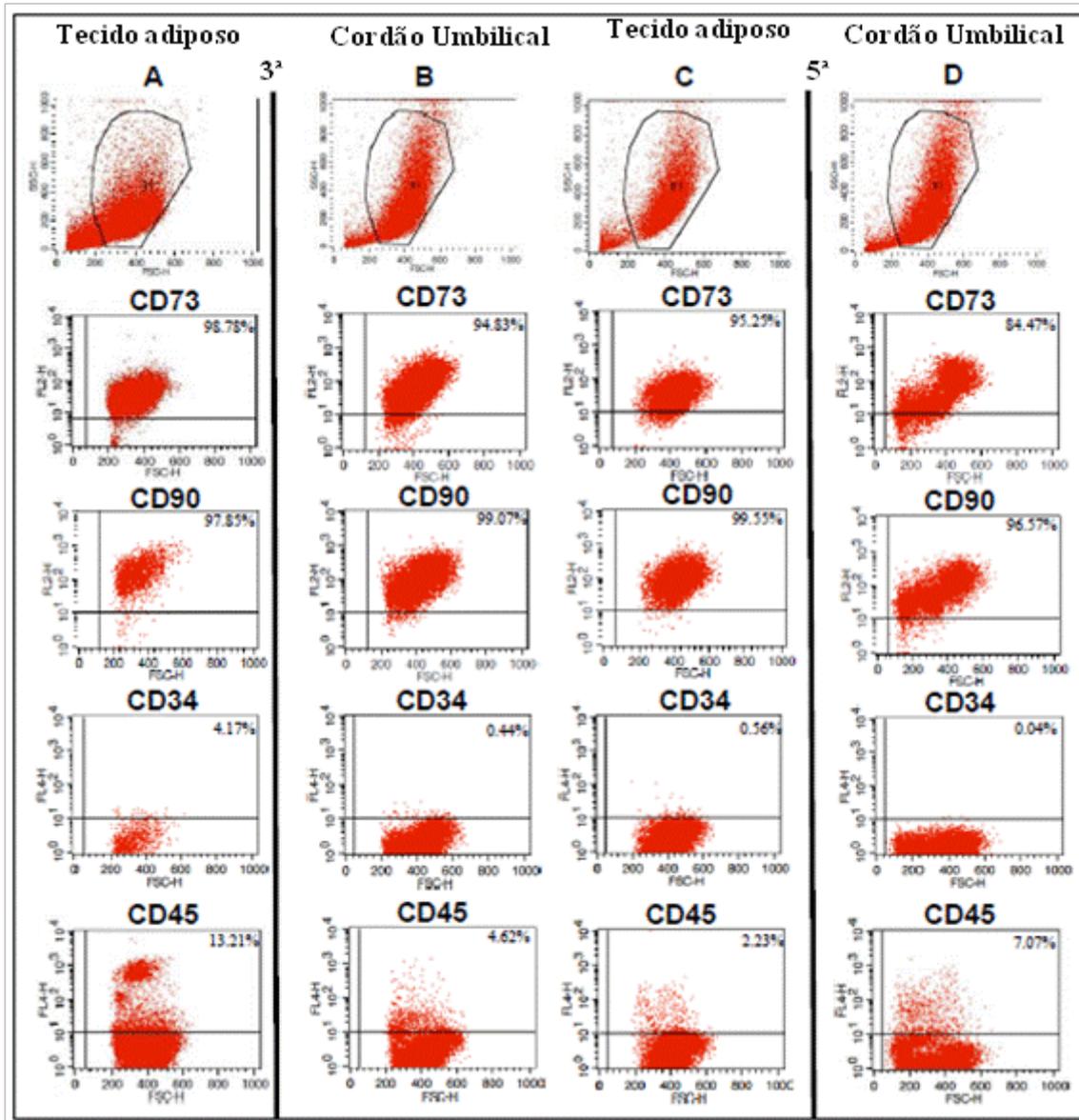
Legenda: (A) As células aderentes derivadas do tecido adiposo e algumas gotículas de lipídeos após 15 dias de isolamento (seta preta). (B) Célula (seta preta) obtida a partir de explantes de cordão umbilical (seta branca). As células aderentes derivadas de tecido adiposo (C) e do cordão umbilical (D) apresentaram morfologia semelhante às CTM durante a terceira passagem. Microscopia eletrônica de varredura das CTM derivadas de tecido adiposo (E) e do cordão umbilical (F).

7.2 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As células aderentes do tecido adiposo e cordão umbilical na terceira e quinta passagem do cultivo celular foram positivas para a marcação de CD73 e CD90, que são antígenos expressos em CTM, e negativas para CD34 e CD45. A análise da expressão de marcadores de superfície demonstrou a presença de um perfil de imunofenotipagem

semelhante entre as células derivadas de tecido adiposo (Figura 5A-C) e do cordão umbilical (Figura 5B-D) nas duas passagens analisadas.

Figura 5 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo de células aderentes isolada a partir de tecido adiposo e do cordão umbilical.



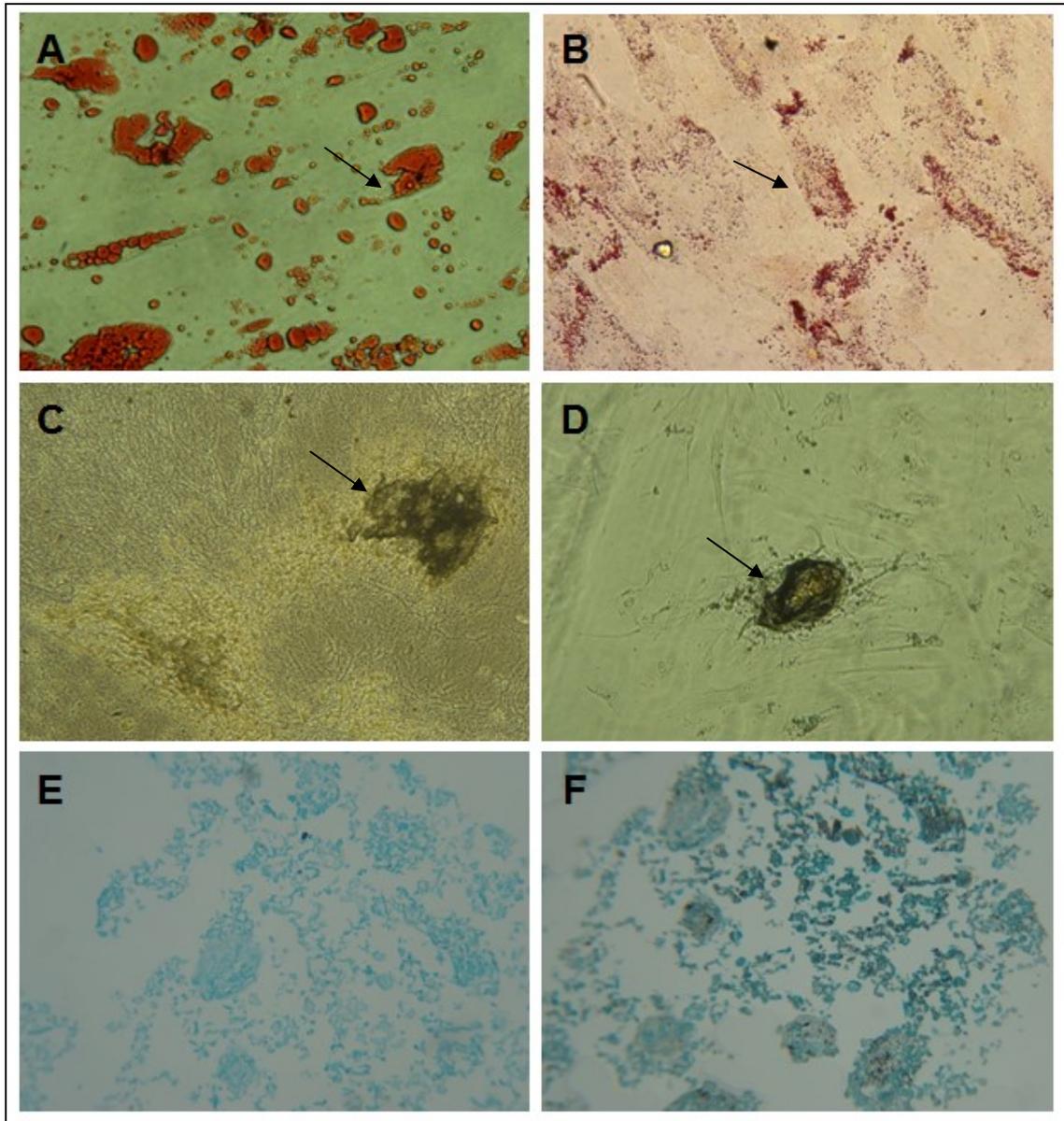
Legenda: Marcação com anticorpos contra antígenos de superfície de células derivadas do tecido adiposo (A) e do cordão umbilical (B) na terceira passagem. As células do tecido adiposo (C) e do cordão umbilical (D) na quinta passagem do cultivo celular. Os gráficos mostram os parâmetros SSC (granulosidade das células) versus FSC (tamanho).

7.3 Potencial de diferenciação das células-tronco mesenquimais

A capacidade de CTM derivadas do tecido adiposo e cordão umbilical para diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica foi confirmada (Figura 6A-H). Durante a avaliação por microscopia óptica, identificou-se claramente que as CTM obtidas de

ambas as fontes teciduais têm distintas capacidades de diferenciação osteogênica e adipogênica. As células do tecido adiposo apresentaram uma maior capacidade de se diferenciar em linhagem celular adipogênica (Figura 6A) e osteogênica (Figura 6C) do que as do cordão umbilical, uma vez que foram visualizadas contendo vacúolos lipídicos mais distendidos do que as células do cordão umbilical (Figura 6B). As células do cordão umbilical (Figura 6D) também formaram menos depósitos de cálcio em comparação com as células do tecido adiposo (Figura 6C).

Figura 6 - Diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica de CTM derivadas de tecido adiposo e cordão umbilical.

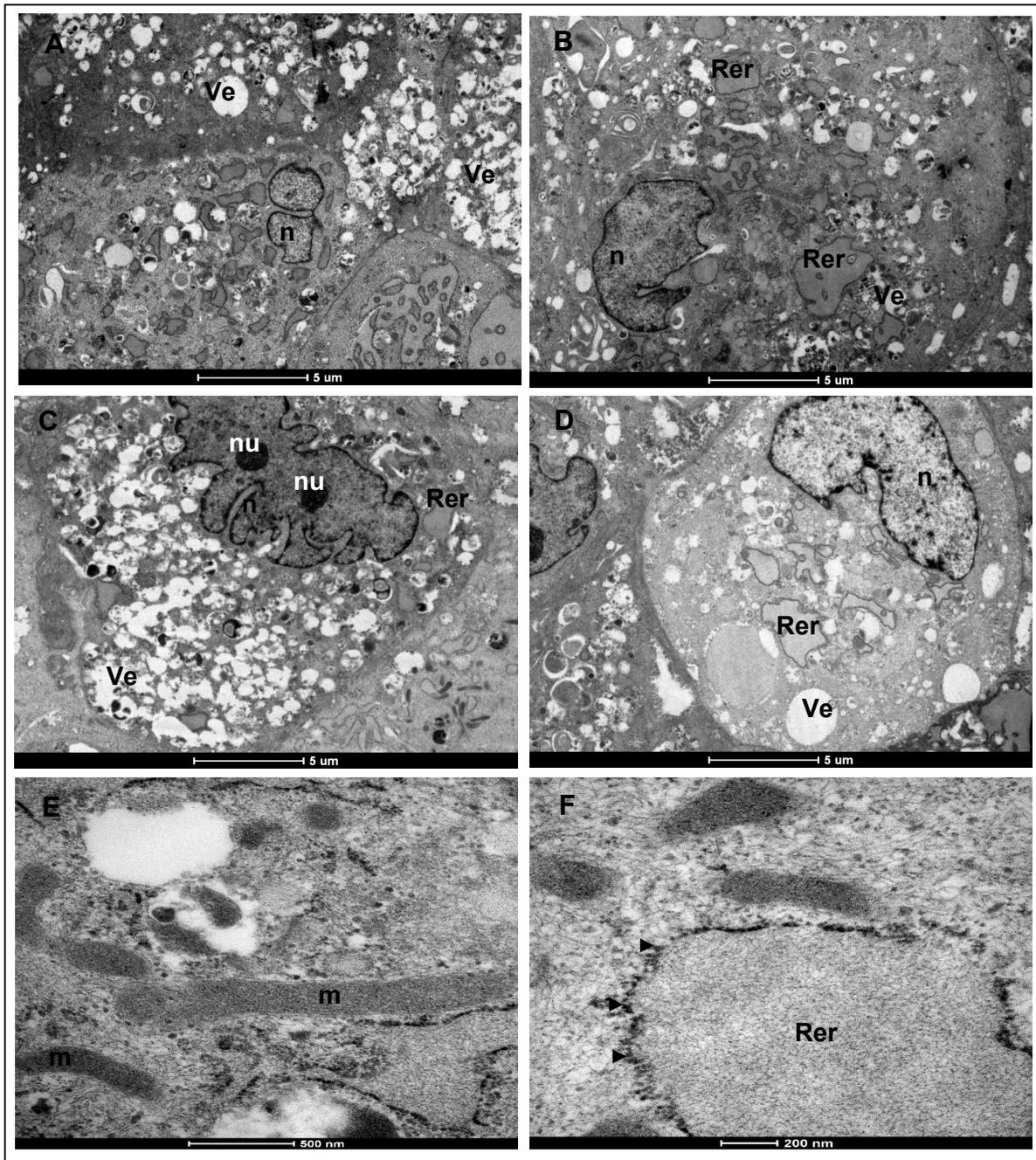


Fonte: a autora.

Legenda: Na diferenciação adipogênica foi observada uma maior intensidade de vacúolos lipídicos (seta preta) nas células do tecido adiposo (A) do que nas células do cordão umbilical (B). Na diferenciação osteogênica, foi demonstrado maior formação de nódulos de cálcio (seta preta) em células do tecido adiposo (C) e em células do cordão umbilical (D). As células derivadas de tecido adiposo (E) e do cordão umbilical (F) após a diferenciação condrogênica.

7.4 Diferenças ultraestruturais entre as células-tronco mesenquimais

Na análise ultraestrutural das CTM obtidas do tecido adiposo, na terceira passagem, as células apresentaram projeções da membrana plasmática e citoplasma contendo um grande número de mitocôndrias. A presença de um retículo endoplasmático rugoso consideravelmente distendido (Rer) contendo uma substância amorfa foi outra característica observada. Os núcleos com muitas formas irregulares possuíam nucléolos proeminentes (Figura 7A-D). As CTM do tecido adiposo exibiam diferentes eletrodensidades dentro de sua própria população e ao analisar a predominância de outras características ultraestruturais, essas células puderam ser subdivididas em dois subtipos: I (SI_{adiposo}) e II (SII_{adiposo}) (Figura 7A). As células mais eletrodensas foram classificadas como SI_{adiposo} (Figura 7B-C). Entre as principais características desse subtipo I, observou-se um citoplasma mais homogêneo, com muitas vesículas contendo material de diferentes eletrodensidades. Por outro lado, as células SII_{adiposo} exibiram citoplasma com uma aparência mais granular, possuindo muitos grânulos e menos vesículas (Figura 7D).

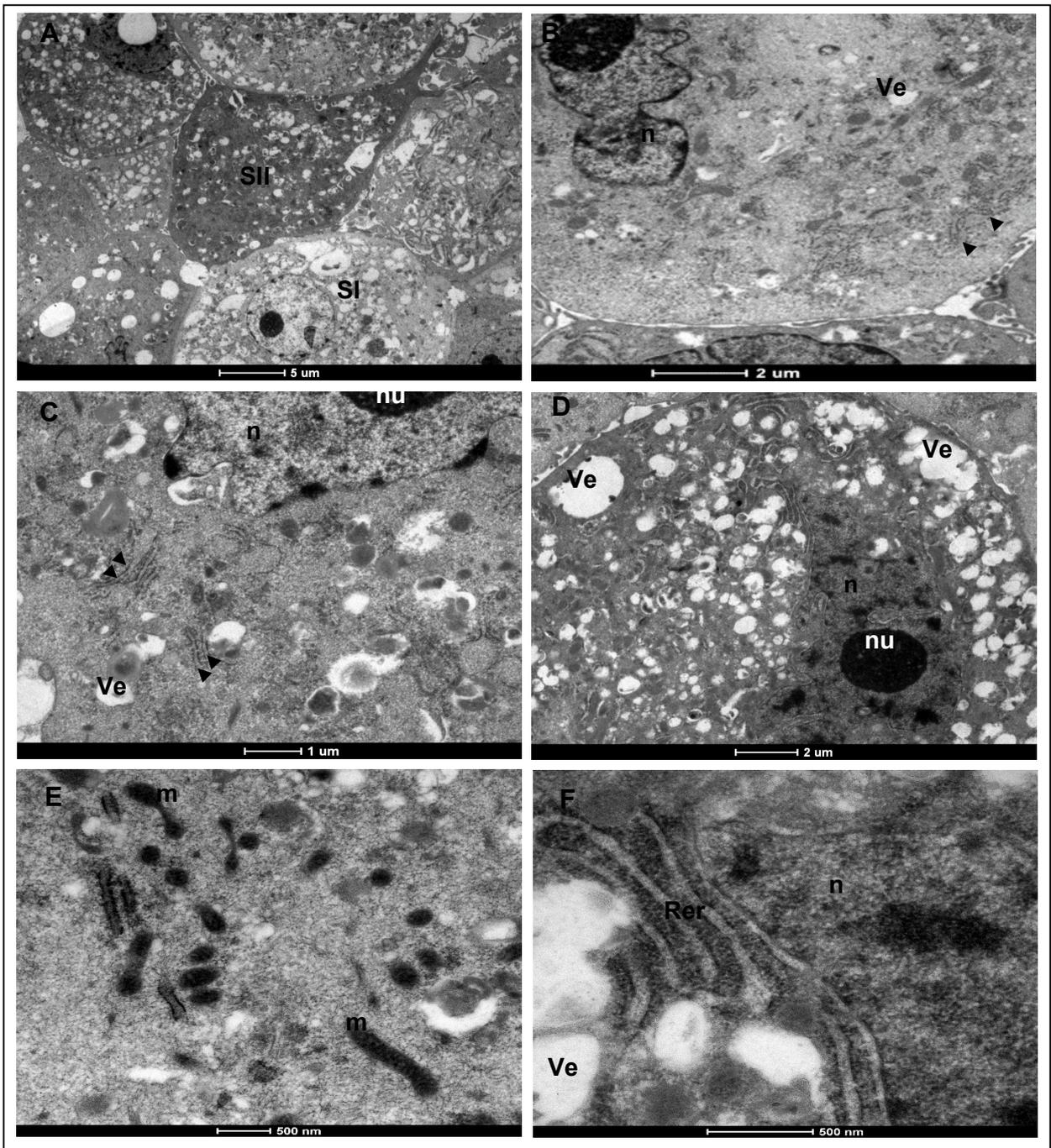
Figura 7- Eletromicrografias mostrando em detalhes as CTM do tecido adiposo na terceira passagem.

Fonte: a autora

Legenda: As células com diferentes eletrodensidade e classificadas como subtipo I (SI) e subtipo II (SII). As células SI e SII exibiram projecções citoplasmáticas e um núcleo excêntrico de formas irregulares (A). Células SI (B-C) e células SII (D). As mitocôndrias (E) e retículo endoplasmático distendido (F) associados aos ribossomos (cabeça de seta). n = núcleo, nu = nucléolo, m = mitocôndrias, Ve = vesículas, Rer = retículo endoplasmático rugoso e cabeça de seta = ribossomos.

As CTM do cordão umbilical na terceira passagem tiveram a presença de pseudópodes e os núcleos excêntricos apresentavam um formato irregular, mas com aspecto diferente quando comparados com as CTM do tecido adiposo. As organelas das células do cordão se encontravam distribuídas por todo o citoplasma com predominância de Rer e

mitocôndria oval, arredondada ou alongada (Figura 8A-D). As CTM do cordão umbilical também foram classificadas como SI_{cordão} e SII_{cordão}, conforme os mesmos critérios usados para as CTM do tecido adiposo. Na terceira passagem, as células do SI_{cordão} se apresentavam mais eletroluscentes com alguns grânulos e vesículas, e um nucléolo com cromatina muito condensada (Figura 8B). Nesse subtipo, o Rer estava disperso todo o citoplasma, mas dispostos como perfis de retículo (Figura 8C). As células SII_{cordão}, mais eletrodensas, tinham vesículas em abundância de de diferentes tamanhos distribuídas por todo o seu citoplasma, a maioria delas fundindo-se entre si, totalmente ou parcialmente preenchidas com material amorfo. Nesse subtipo celular, o Rer contínuo ocupava uma grande parte do citoplasma (Figura 8D). Esses achados diferem do que identificamos nos subtipos das CTM do tecido adiposo.

Figura 8 - Eletromicrografias de CTM do cordão umbilical na terceira passagem

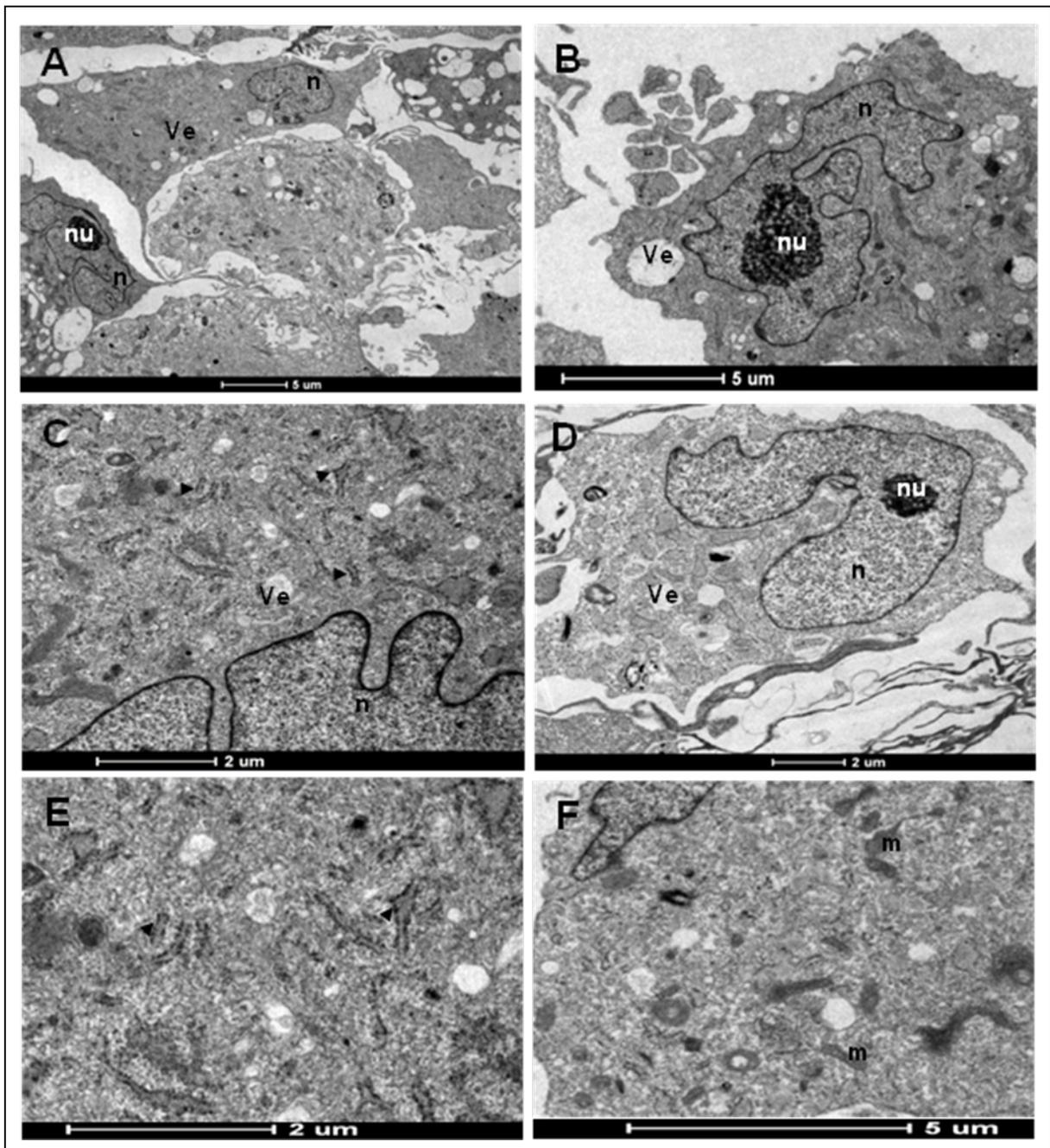
Fonte: a autora.

Legenda: (A). Células SI (B-C) e células SII (D) contendo mitocôndrias (E) e retículo endoplasmático rugoso (F). n = núcleo, nu = nucléolo, m = mitocôndrias, Ve = vesícula e, RER = retículo endoplasmático.

As CTM tecido adiposo, a partir da quinta passagem, também apresentaram células com eletrodensidades diferentes (Figura 9A-D). Em relação aos subtipos celulares, a maioria das células eletrodensas do SI_{adiposo} tiveram uma redução na quantidade de vesículas e um aumento dos grânulos. Além disso, as células apresentaram perfis de Rer notavelmente, menos dilatado e distribuídos por todo o citoplasma, esse possuía uma aparência mais granular (Figura 9B-C). Observou-se que as células SII_{adiposo}, mais eletroluscentes,

apresentaram o mesmo padrão de Rer (Figura 9D). No entanto, o núcleo apresentava uma cromatina menos condensada, e as células tiveram uma diminuição perceptível, dos grânulos em relação às células SII_{adiposo} da terceira passagem.

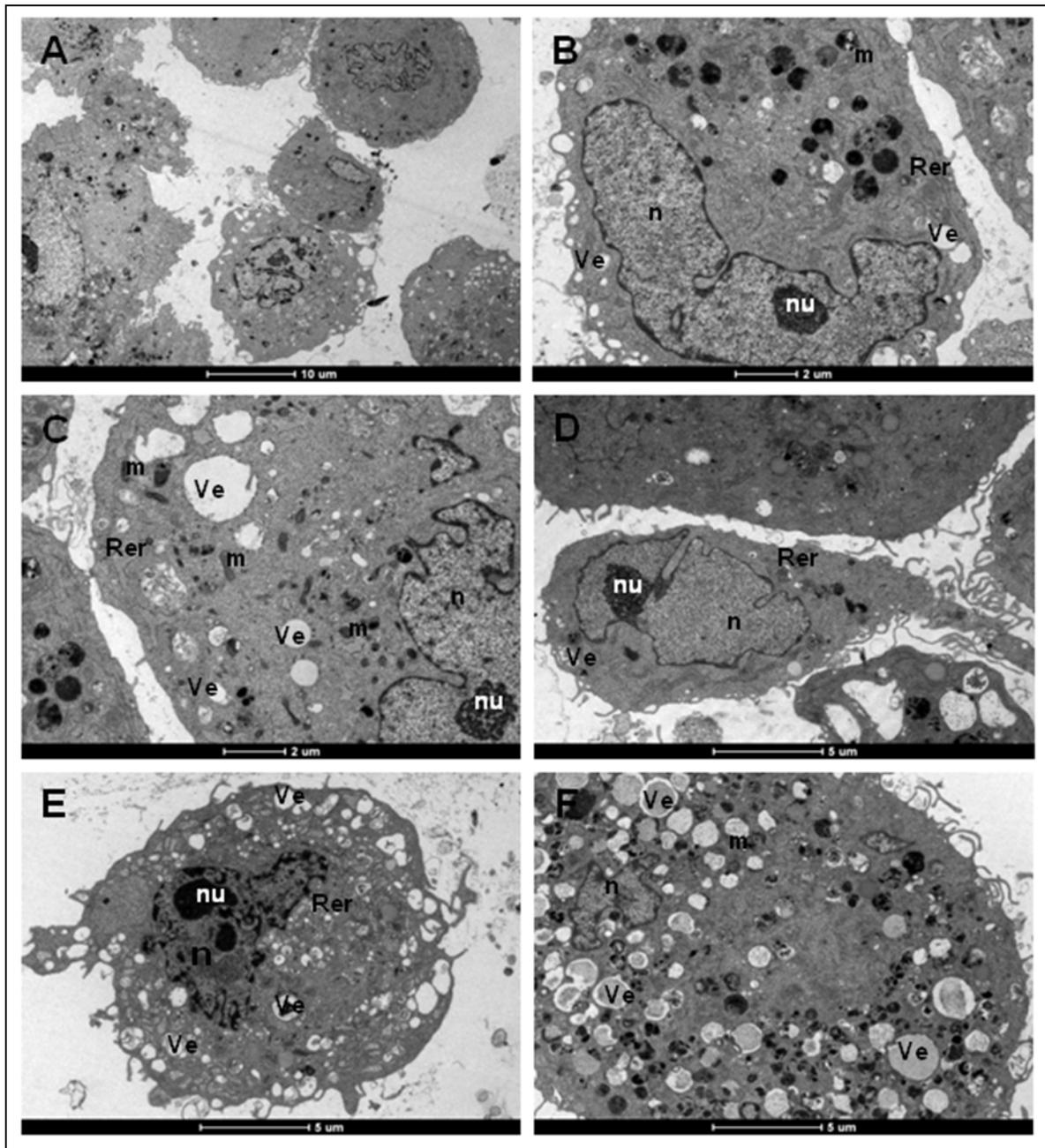
Figura 9 - Eletromicrografias mostram em detalhe as CTM de tecido adiposo na quinta passagem. A população de células apresentou subtipo I (SI_{adiposo}) e subtipo células II (SII_{adiposo}).



Fonte: a autora.

Legenda: (A). células SI_{adiposo} apresentaram maior eletrodensidade e menos vesículas (B-C). As células SII_{adiposo} tiveram menor eletrodensidade e citoplasma menos granular (D). Retículo endoplasmático rugoso (E) e mitocôndrias (M). n = núcleo, nu = nucléolo, m = mitocôndrias, Ve = vesículas, Rer = retículo endoplasmático rugoso.

A avaliação ultraestrutural revelou que as CTM do cordão umbilical, na quinta passagem, mantiveram diferenças quanto a eletrodensidade e outras características celulares (Figura 10A-F). Quando essas células foram comparadas com as CTM do mesmo tecido, mas na terceira passagem, foi observada uma menor predominância de vesículas e modificações na distribuição dos grânulos. Também foi identificada uma conformação irregular do núcleo, bem como a permanência das mitocôndrias de diferentes formatos e Rer distribuído por todo o citoplasma. As células classificadas como SI_{cordão} continham um maior número de grânulos de eletrodensidade distinta e uma diminuição no número de vesículas em relação às células na terceira passagem (Figura 10B-D). No entanto, as células SII_{cordão} exibiram predominância de vesículas e um núcleo com cromatina mais condensada (Figura 10E-F). Diferenças ultraestruturais quando as CTM do tecido adiposo foram comparadas na terceira e quinta passagem foram claramente identificadas. Modificações nas características celulares também ocorreram nas CTM do cordão umbilical entre as duas passagens.

Figura 10 -. Eletromicrografias de CTM derivadas de cordão umbilical na quinta passagem.

Fonte: a autora.

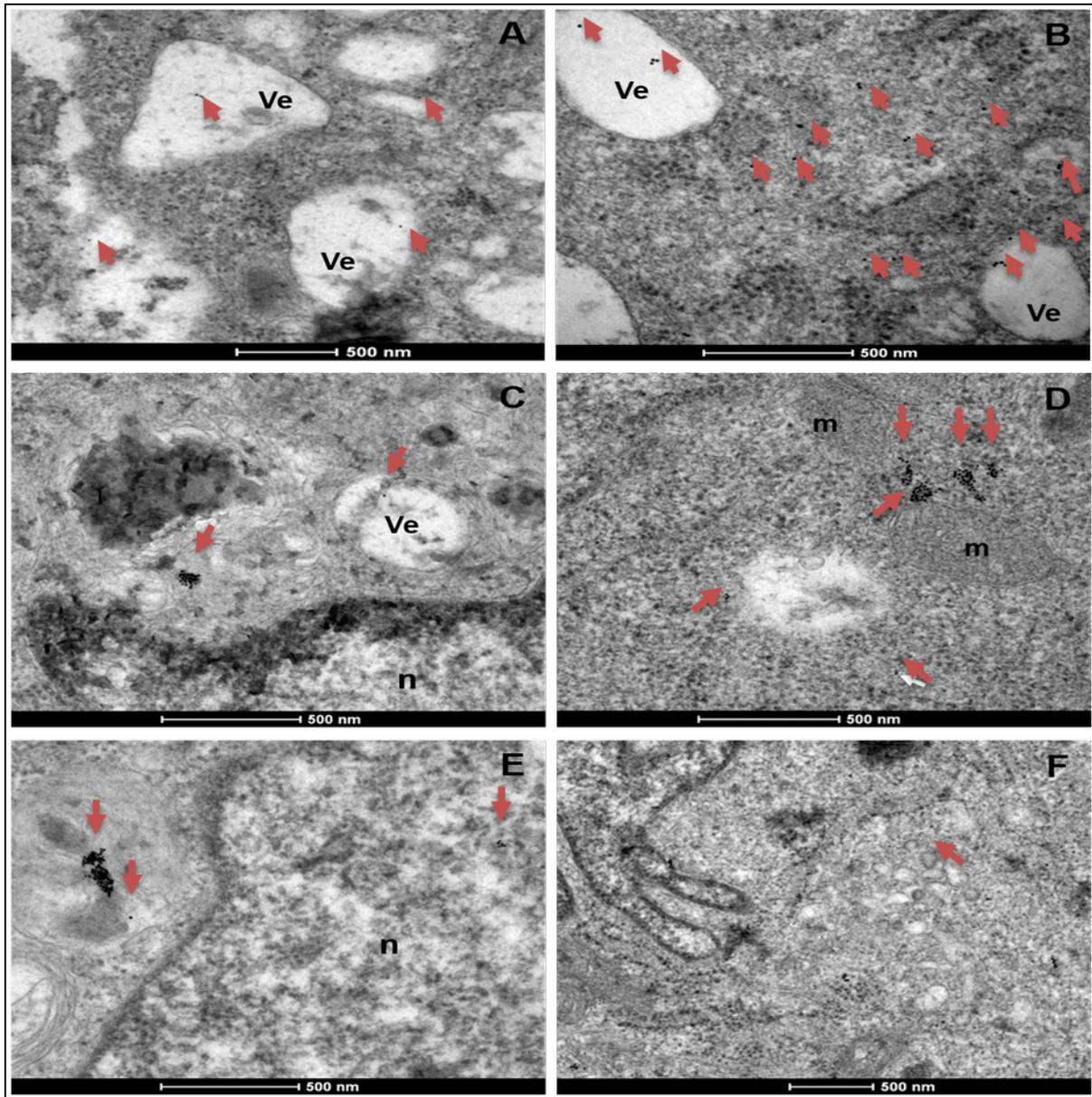
Legenda: Citoplasma com projeções e núcleo excêntrico com formas irregulares (A-F). As células SI_{cordão} apresentaram mais grânulos (B-D), e as células SII mostraram mais vesículas (E-F). n = núcleo, nu = nucléolo, m = mitocôndrias, Ve = vesículas, Rer = retículo endoplasmático.

7.5 Ligação das lectinas às células-tronco mesenquimais

A ligação das lectinas UEA, DBA, LCA, WGA e HPA às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical foi realizada, a fim de identificar e localizar a distribuição de resíduos de carboidratos nessas células, o que revelou alguns aspectos distintos entre essas duas

populações celulares em relação à intensidade e ligação intracelular das lectinas. As lectinas UEA e DBA apresentaram uma intensidade mais elevada de se ligarem às CTM do cordão umbilical do que as CTM derivadas de tecido adiposo. A predominância de ligação da lectina UEA foi observada no citoplasma e vesículas das células do cordão umbilical (Figura 11 A-B). Quanto à lectina DBA, uma predominância de partículas de ouro, dispostas de forma agregada, ocorreu em vesículas, grânulos e citoplasma das CTM do cordão umbilical foram, em relação às células do tecido adiposo, a lectina DBA mostrou uma prevalência de ligação especialmente em grânulos e citoplasma, com partículas de ouro coloidal formando ou não agregados (Figura 11C-D).

Figura 11 - Eletromicrografias das lectinas ligadas às CTM derivadas do tecido adiposo e cordão umbilical.



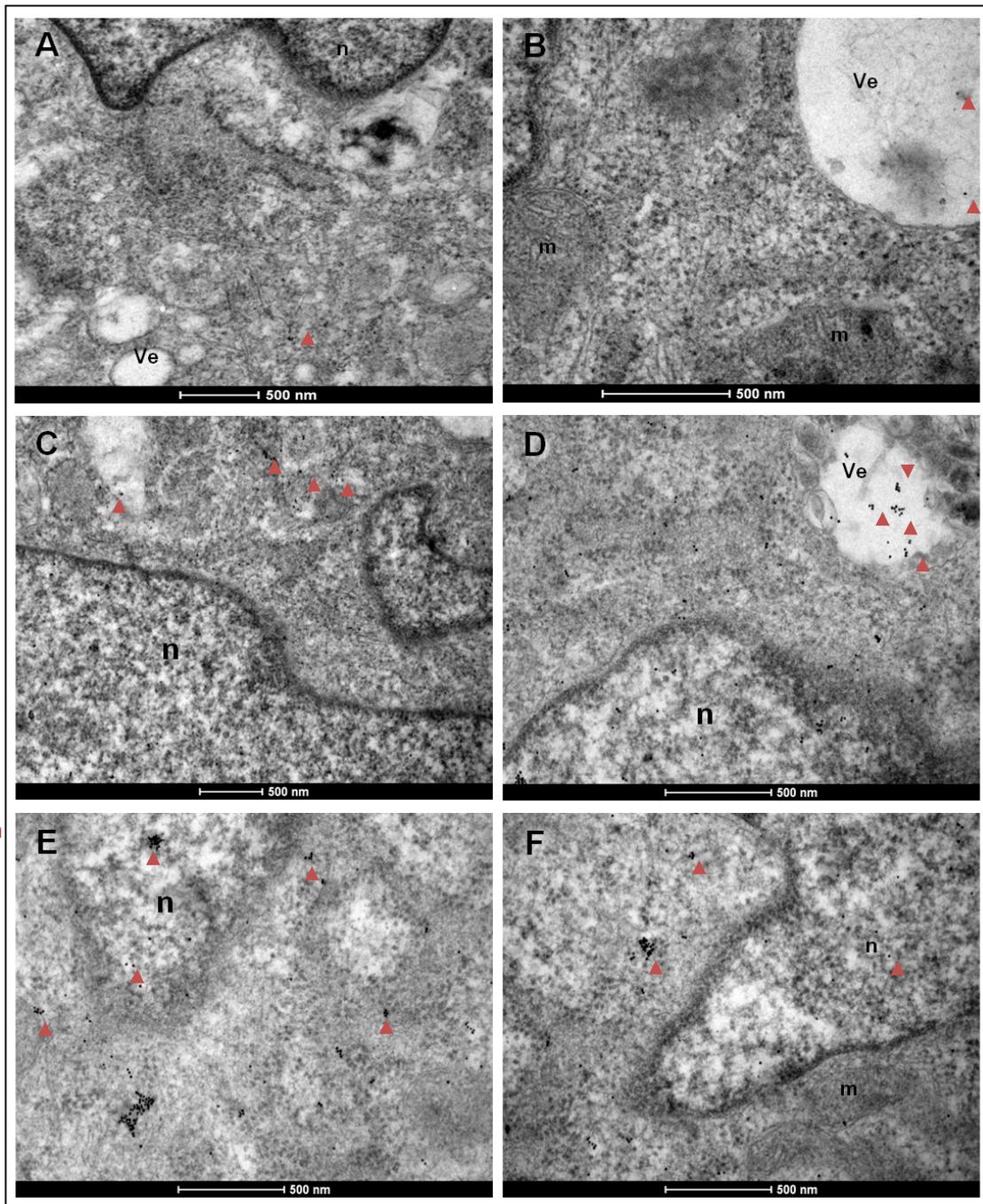
Fonte: a autora.

Legenda: As CTM do tecido adiposo mostraram menor intensidade de ligação às lectinas UEA (A) e DBA (C) do que as células do cordão umbilical quando se ligaram à UEA (B) e DBA (D). A ligação das lectinas LCA às CTM derivadas do tecido adiposo (E) e do cordão umbilical (F) foi semelhante. As partículas de ouro conjugadas às lectinas estão representadas pelos pontos pretos com formato uniforme (seta vermelha). n = núcleo, m = mitocôndrias e Ve = vesículas

Quanto à lectina LCA, foi identificada uma intensidade de ligação semelhante entre as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, ocorrendo predominância de ligação em vesículas, citoplasma e nas regiões próximas ao núcleo, em ambas as populações de células (Figura 11E-F). Em comparação com todas as outras lectinas estudadas, a WGA exibiu uma menor intensidade de

ligação às CTM de ambas as fontes, e um perfil de distribuição intracelular semelhante com predominância das partículas de ouro no citoplasma e vesículas (Figura 12A-B). Em comparação com as outras lectinas estudadas, houve uma maior intensidade de ligação da HPA formando muitos aglomerados de partícula de ouro coloidal, que se encontravam distribuídos de forma difusa em todas as células, incluindo o núcleo (Figura 12C-F).

Figura 12 - Eletromicrografias exibem a ligação das lectinas WGA e HPA às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical.



Fonte: a autora.

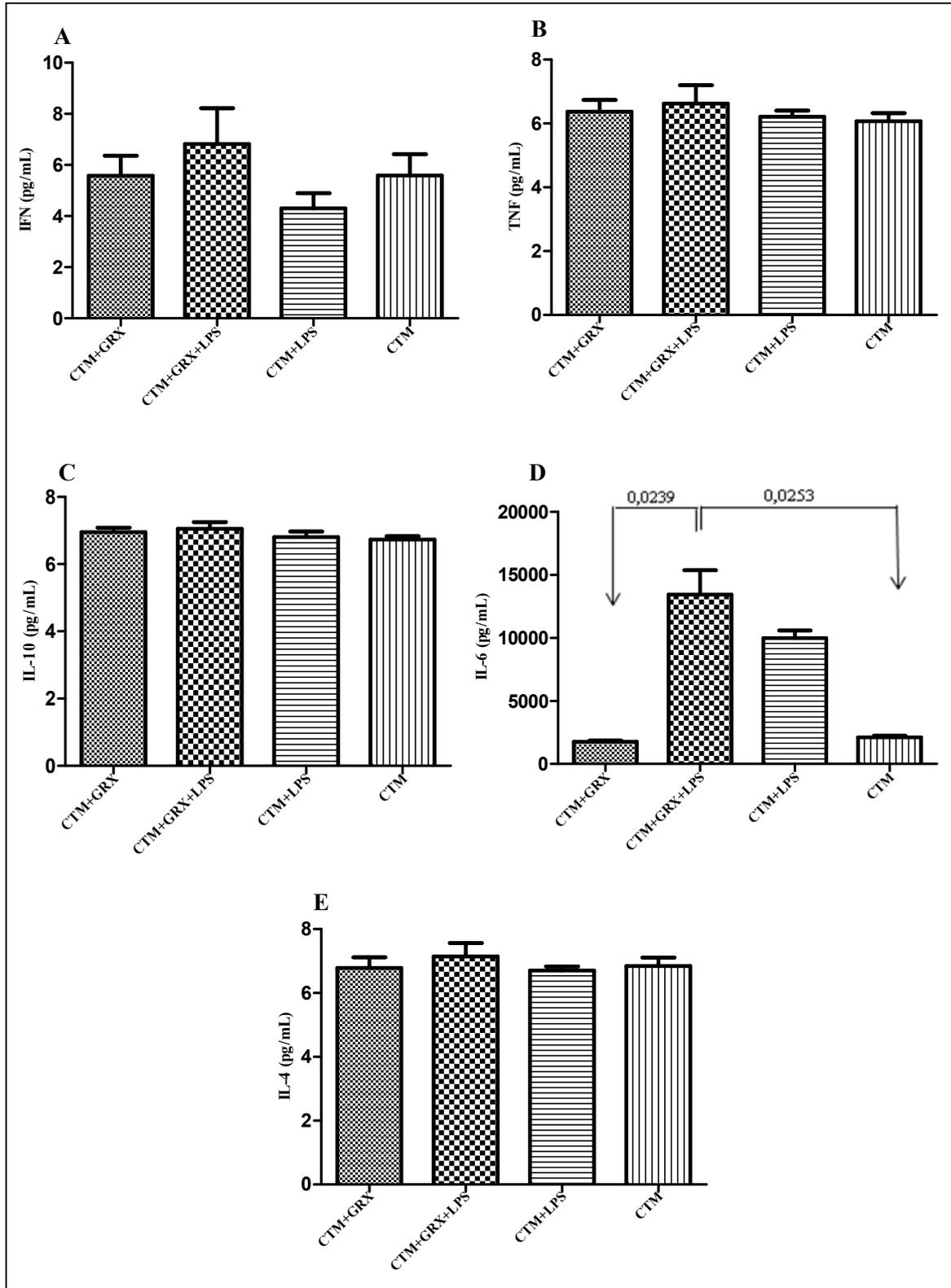
Legenda: A lectina WGA mostrou menos intensidade de ligação às células do tecido adiposo (A) e do cordão umbilical (B), e a HPA apresentou maior intensidade de ligação às células do tecido adiposo (C, E) as do cordão umbilical (D, F), em comparação com todas as lectinas estudadas. As partículas de ouro conjugadas às lectinas estão representadas pelos pontos pretos com formato uniforme. n = núcleo, m= mitocôndria e Ve = vesículas.

7.6 Avaliação do co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e células estreladas hepáticas (GRX)

7.6.1 Avaliação das citocinas produzidas pelas células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

A produção de citocinas do co-cultivo indireto entre CTM do tecido adiposo e células GRX foi avaliada no período de 4 dias. Em relação à produção de citocinas no período pelas CTM do tecido adiposo, não foi evidenciada diferença significativa na produção de IFN- γ , TNF- α , IL-10 e IL-4, entre o grupo experimental CTM+GRX+LPS e seus controles. Contudo, foi evidenciado um aumento significativo na produção de IL-6 na condição CTM+GRX+LPS em relação às condições CTM+GRX e CTM (Figura 13D).

Figura 13 - Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4 produzidas por células-tronco mesenquimais do tecido adiposo após co-cultivo indireto com células GRX.



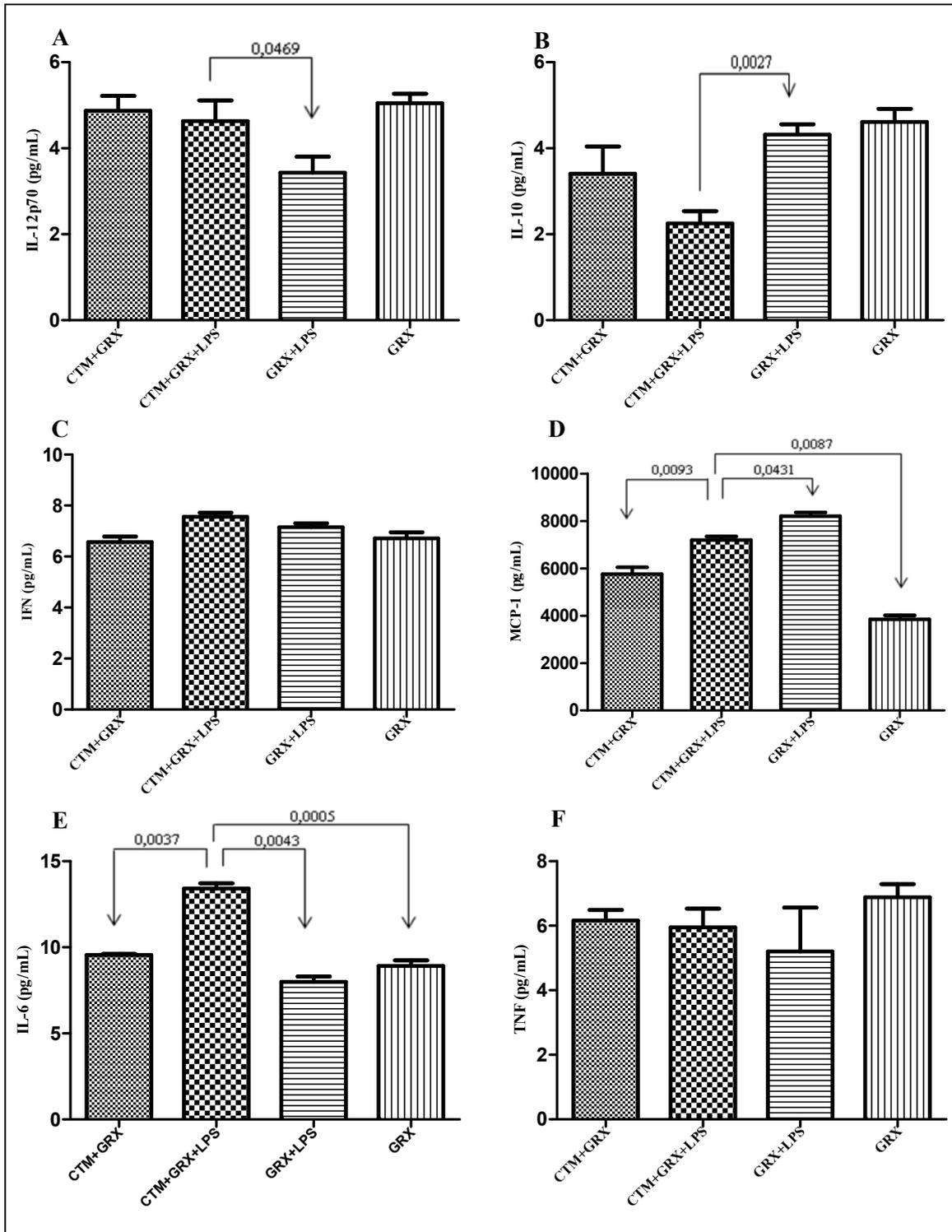
Fonte: a autora.

Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, GRX e lipopolissacarídeo; CTM+LPS – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e lipopolissacarídeo; CTM - células-tronco mesenquimais do tecido adiposo. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

7.6.2 Avaliação das citocinas produzidas pela célula GRX

No sobrenadante do co-cultivo indireto, no período de 4 dias, uma diferença significativa na produção de IL12p70 (Figura 13A) e IL-10 (Figura 14B) foi observada entre o grupo experimental CTM+GRX+LPS quando comparado ao controle GRX+LPS. Para a citocina IFN- γ , somente foi verificado um aumento significativo na sua produção no grupo experimental CTM+GRX+LPS em relação ao controle CTM+GRX (Figura 14C). A produção de MCP-1 apresentou uma redução significativa no grupo CTM+GRX+LPS em relação ao controle GRX+LPS (Figura 14D). A IL-6 teve elevação significativa no grupo experimental CTM+GRX+LPS em relação aos grupos controles (Figura 13E). Entretanto, para a produção de TNF- α não foi identificada nenhuma diferença significativa (Figura 14F).

Figura 14 - Produção das citocinas IL12p70, IL-10, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e TNF- α produzidas pelas células GRX em co-cultivo indireto com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.



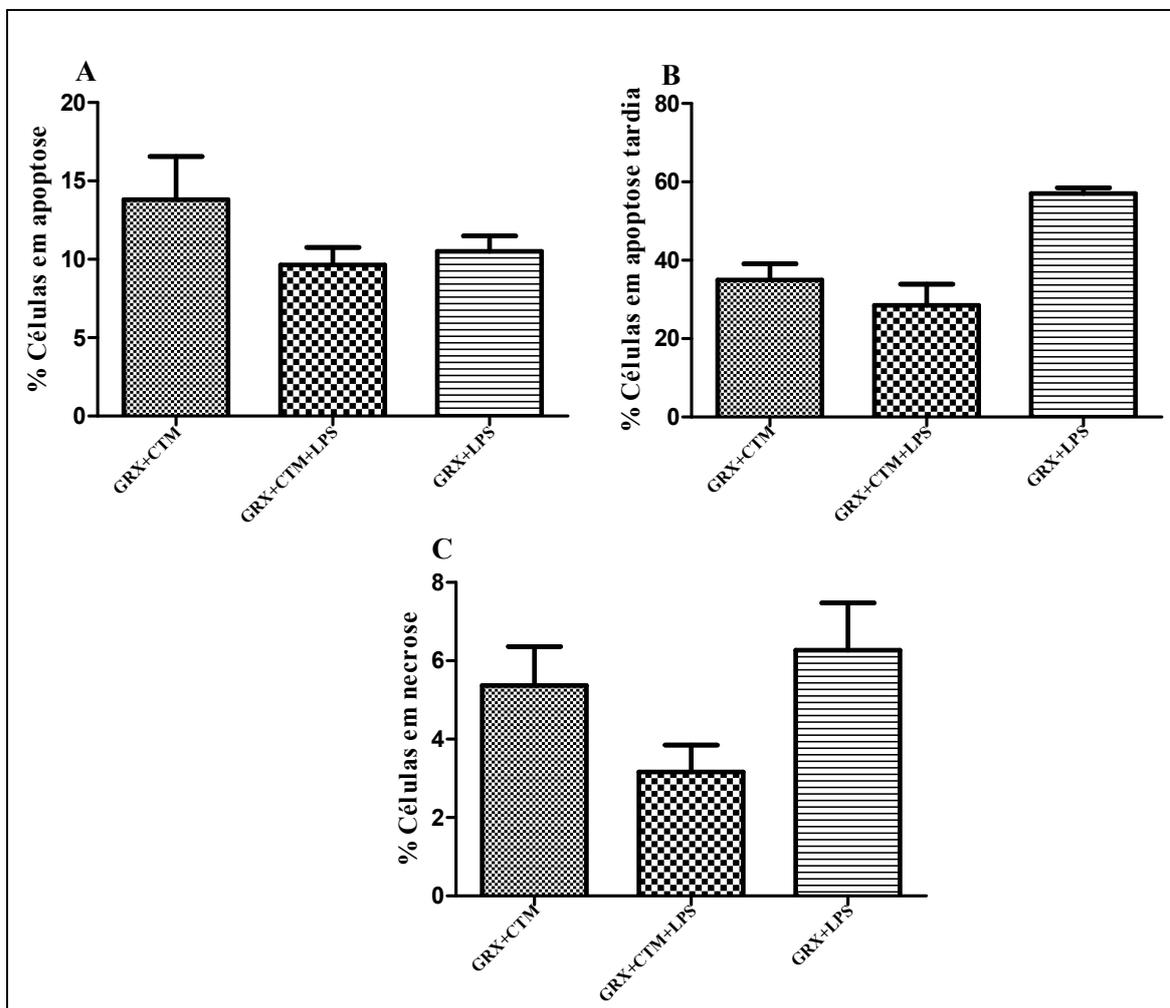
Fonte: a autora.

Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, GRX e lipopolissacarídeo; GRX+LPS – GRX e lipopolissacarídeo. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

7.6.3 Avaliação da taxa de apoptose e necrose das células GRX cultivadas com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Foi realizada a marcação das células GRX com Anexina V/Iodeto de Propídio para observação do efeito parácrino das CTM do tecido adiposo sobre as células estreladas. No período de 4 dias do co-cultivo indireto, não foi verificada diferença significativa em relação a taxa de apoptose, apoptose tardia e necrose das células GRX, quando foi comparado o grupo CTM+GRX+LPS com seus controles (Figura 15).

Figura 15 - Percentual de apoptose, apoptose tardia e necrose celular das células GRX após co-cultivo com células-tronco mesenquimais do tecido adiposo.



Fonte: a autora.

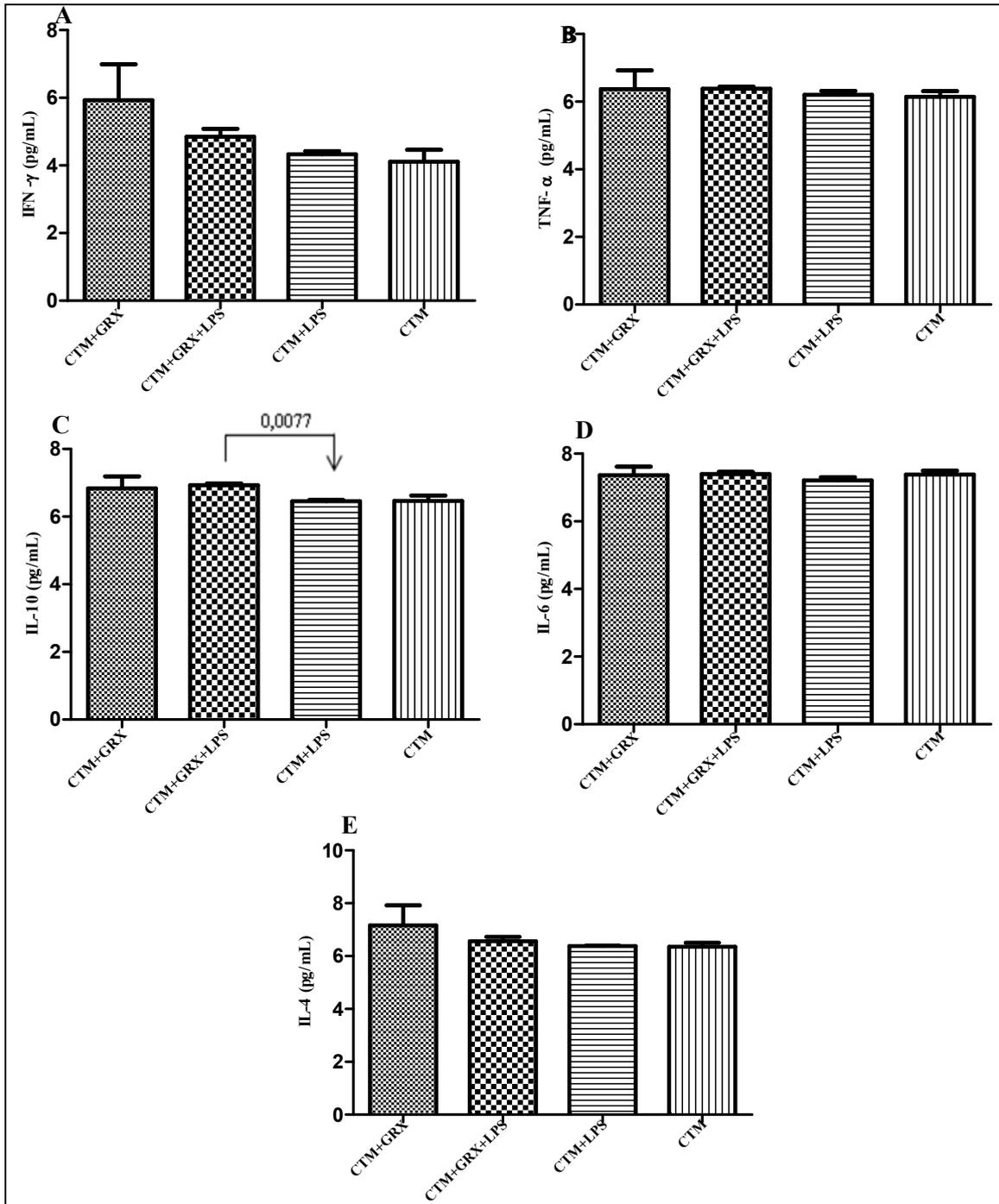
Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do tecido adiposo, GRX e lipopolissacarídeo; GRX+LPS – GRX e lipopolissacarídeo. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

7.7 Avaliação do co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e células estreladas hepáticas (GRX)

7.7.1 Avaliação das citocinas produzidas pelas células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

A dosagem de citocinas no sobrenadante do co-cultivo indireto entre CTM do cordão umbilical e células GRX foi realizada no período de 4 dias. Foi observado um aumento significativo quanto à produção de IL-10 quando o grupo experimental CTM+GRX+LPS foi comparado ao controle CTM+LPS (Figura 16C).

Figura 16 - Produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4 produzidas por células-tronco mesenquimais do cordão umbilical após co-cultivo indireto com células GRX.



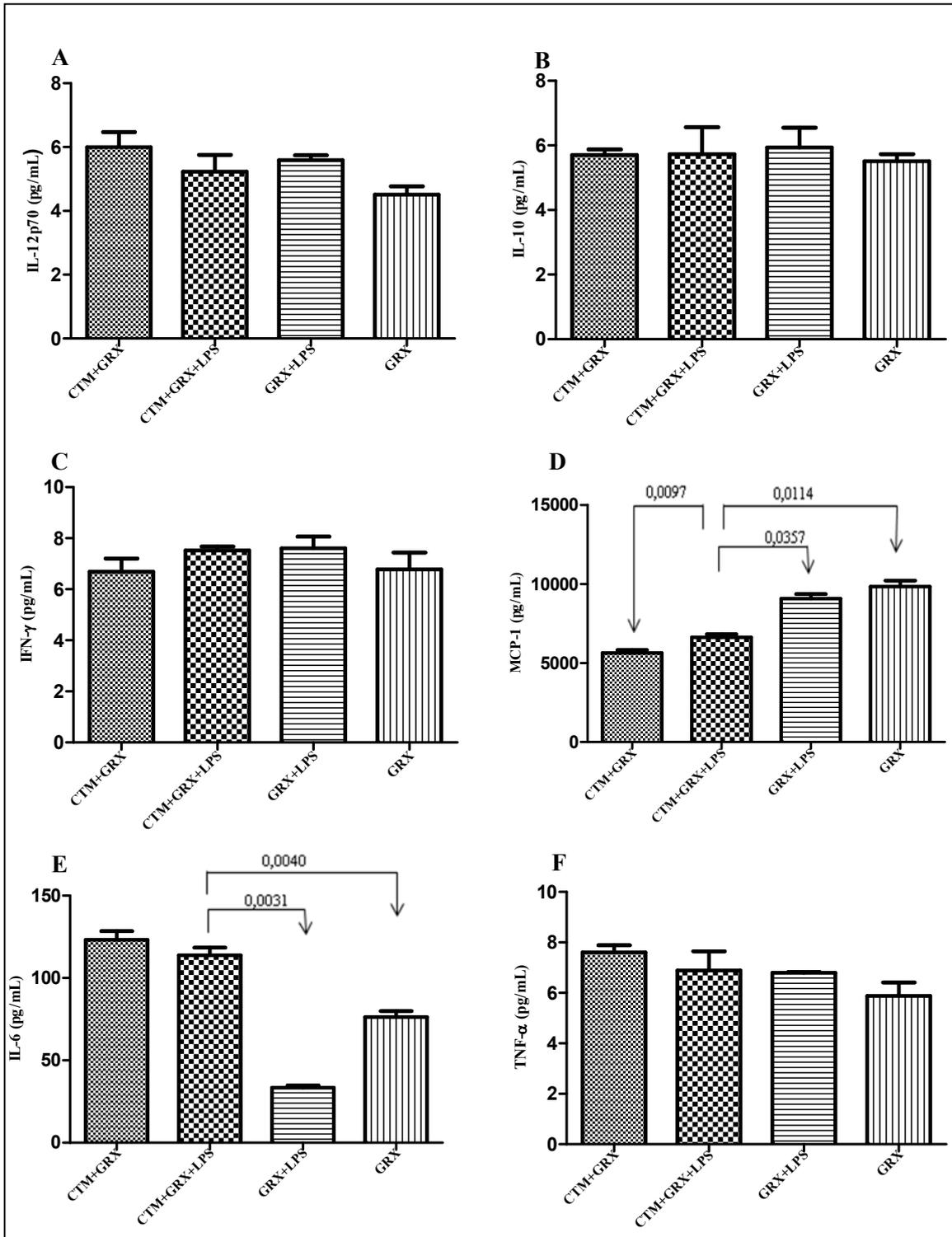
Fonte: a autora.

Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, GRX e lipopolissacarídeo; CTM+LPS – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e lipopolissacarídeo; CTM - células-tronco mesenquimais do cordão umbilical. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

7.7.2 Avaliação das citocinas produzidas pela célula GRX

Em relação às dosagens de citocinas produzidas pelas células GRX, foi observada uma redução significativa na produção de MCP-1 no grupo experimental CTM+GRX+LPS quando comparado aos controles GRX+LPS e GRX, porém, verificou-se uma redução significativa no grupo controle CTM+GRX em relação ao grupo experimental CTM+GRX+LPS (Figura 17D). A produção da citocina IL-6 foi também significativamente mais elevada no grupo CTM+GRX+LPS em relação aos controles GRX+LPS e GRX (Figura 17E).

Figura 17 - Produção das citocinas IL-12p70, IL-10, IFN- γ , MCP-1, IL-6 e TNF- α produzidas pelas células GRX em co-cultivo indireto com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical.



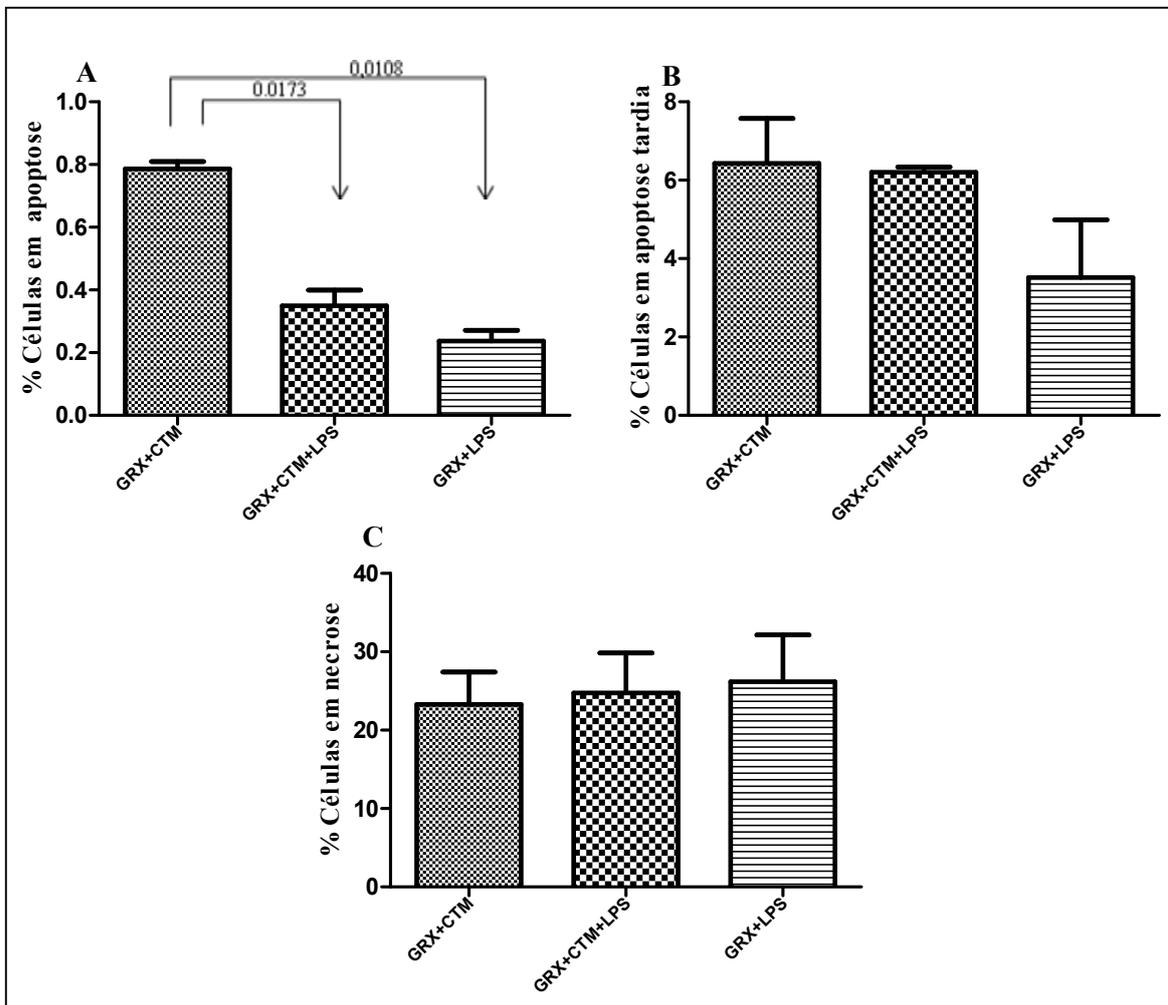
Fonte: a autora.

Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, GRX e lipopolissacarídeo; GRX+LPS – GRX e lipopolissacarídeo. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

7.7.3 Avaliação da taxa de apoptose e necrose das células GRX cultivadas com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical

No período de 4 dias, após o co-cultivo indireto das CTM do cordão umbilical com as células GRX, foi avaliada a taxa de apoptose tardia e necrose das células GRX, não ocorrendo diferença significativa entre os grupos estudados. Contudo, foi identificado um aumento significativo de apoptose das células GRX no grupo controle CTM+GRX em relação ao grupo experimental CTM+GRX+LPS e o controle GRX+LPS (Figura 17A).

Figura 18 - Gráficos de apoptose, apoptose tardia e necrose celular das células GRX após co-cultivo com células-tronco mesenquimais do cordão umbilical.



Fonte: a autora.

Legenda: CTM+GRX – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical e GRX; CTM+GRX+LPS – células-tronco mesenquimais do cordão umbilical, GRX e lipopolissacarídeo; GRX+LPS – GRX e lipopolissacarídeo. As barras horizontais representam a média aritmética e o desvio padrão. Diferenças significativas com $p \leq 0,05$ para comparações entre as condições são indicadas por setas.

8 DISCUSSÃO

8.1 Características do cultivo, diferenciação e imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e cordão umbilical

As CTM tornaram-se uma ferramenta atrativa no campo da medicina regenerativa principalmente devido à facilidade de isolamento, propriedades de diferenciação e capacidade de imunomodulação dessas células (AKYUREKLI et al., 2015). Neste estudo, foram avaliadas características das CTM obtidas do tecido adiposo e do cordão umbilical, a fim de identificar aspectos dessas células que pudessem fornecer informações que contribuam para o aprimoramento das abordagens na área de terapia celular. Na avaliação morfológica durante o cultivo das CTM de ambas as fontes teciduais foi possível verificar a presença de células com aspectos fibroblastóides nas populações celulares estudadas. Resultados morfológicos similares foram encontrados descritos em outros estudos que avaliaram CTM isoladas do tecido adiposo e cordão umbilical (BAKSH; YAO; TUAN, 2007; HENDIJANI; SADEGHI-ALIABADI; JAVANMARD, 2014; MORI et al., 2015).

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi observada uma diferença na forma e disposição das projeções citoplasmáticas das CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, uma vez que nas células do tecido adiposo as projeções foram mais delgadas e nas células do cordão umbilical mais largas e achatadas. Segundo Bajada et al. (2008) as projeções citoplasmáticas são importantes para proliferação celular, e, embora, neste estudo, diferenças quanto as projeções tenham sido identificadas entre CTM do tecido adiposo e cordão umbilical foi observado que esse aspecto não representou diferenças na proliferação dessas células durante o cultivo de longa duração.

Apesar do crescente estudo das propriedades terapêuticas das CTM para o tratamento de diferentes doenças, ainda não existe um marcador de superfície específico que possibilite a identificação dessa população celular (MITRA et al., 2015). A caracterização imunofenotípica para um conjunto de antígenos de superfície celular, juntamente com a avaliação de outras características que as CTM possuem, é primordial para a identificação dessas células *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). Neste estudo, as células isoladas do tecido adiposo e cordão umbilical apresentaram expressão negativa de CD34 e CD45, marcadores da linhagem hematopoiética, e positiva para CD73 e CD90. Esse perfil imunofenotípico foi semelhante entre as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical oriundas da terceira e quinta passagem do cultivo celular. Esses resultados estão de acordo com os parâmetros de identificação de CTM

estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006), em que as CTM não podem apresentar positividade para marcadores da linhagem hematopoiética. Embora, no nosso trabalho, tenha sido identificada uma marcação similar entre CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, esse resultado não significa que diferenças quanto à expressão de outros antígenos de superfície não possam existir. De Ugarte et al. (2003) demonstraram que as CTM do tecido adiposo e medula óssea apresentariam distinções no perfil da marcação imunofenotípica, a exemplo da marcação para CD106, em que as CTM do tecido adiposo foram positivas e as CTM da medula óssea negativas, apesar de ambas as populações celulares apresentarem similaridades na expressão de antígenos de superfície, a exemplo de CD73 e CD90. Em outro estudo, Choi et al. (2010) identificaram que as CTM da medula óssea não apresentavam variações em marcadores de superfície durante o cultivo celular, contudo modificações quanto a outros aspectos celulares, como a produção de citocinas, foram identificados.

Outro requisito para que uma população de células seja classificada como CTM é a capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006). No presente estudo, ambas as populações apresentaram essa propriedade, entretanto, foi notável que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical tiveram distintas intensidades de diferenciação, em que as células do tecido adiposo apresentaram maior capacidade de se diferenciarem em adipócitos e osteoblastos. Estudos comparativos entre CTM oriundas de diferentes fontes teciduais vêm indicando resultados similares aos que foram identificados neste estudo (KERN et al 2006; JIN et al 2014).

8.2 Estudo ultraestrutural das células-tronco mesenquimais

Na análise ultraestrutural, as CTM do tecido adiposo na terceira passagem do cultivo apresentavam: projeções da membrana plasmática, citoplasma contendo várias mitocôndrias, e retículo endoplasmático rugoso (Rer) distendido com substância amorfa em seu interior, o que também foi descrito por Ryu et al. (2013) e Pasquinelli et al. (2007) em estudos envolvendo CTM do tecido adiposo. Neste estudo, foram observadas células do tecido adiposo com núcleos contendo nucléolos proeminentes e com diferentes formatos irregulares. De forma semelhante, Manea et al. (2014) identificaram essas características em CTM do tecido adiposo após avaliação ultraestrutural, porém esses autores ainda observaram a presença de células que possuíam o núcleo com formato regular. Essa diferença em relação aos núcleos poderia estar associada com modificação nas células durante o cultivo de longa

duração, contudo não pudemos fazer essa relação, já que Manea et al. (2014) não descreveram em qual passagem do cultivo as CTM foram estudadas.

Neste estudo, foi possível identificar que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical de seres humanos, na terceira e quinta passagem do cultivo, teriam diferentes subpopulações de células. Em contrapartida, o estudo ultraestrutural de Raimondo et al. (2006) sugeriu que as CTM-GFP (*green fluorescent protein*) positivas isoladas a partir da medula óssea de ratos representavam uma população homogênea de células em cultura. Interessantemente, quando estudos posteriores sobre CTM da medula óssea usaram outras metodologias para avaliação dessas células, eles detectaram a presença de subpopulações (KIM et al 2012; ROSTOVSKAYA; ANASTASSIADIS, 2012). Quanto à identificação de subpopulações em CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, poucos estudos sobre esse aspecto importante dessas células têm sido publicados. Estudos realizados por Levi et al. (2011) e Rada et al. (2011) relataram que subpopulações de CTM poderiam apresentar uma capacidade distinta de diferenciação em linhagens, portanto, a seleção da subpopulação celular que possua as melhores características para aplicação em terapia baseada em células tem sido sugerida.

Majore et al. (2009) foram os primeiros a identificar a existência de subpopulações em CTM do cordão umbilical, sugerindo que há uma relação entre o aumento da heterogeneidade celular e a manutenção de culturas de longa duração dessas células. As CTM podem ser isoladas de diferentes regiões do tecido do cordão umbilical, utilizando-se princípios metodológicos variados (HASS et al., 2011). Todavia, os trabalhos de Ishige et al. (2009) e Mennan et al. (2013) indicaram que de acordo com a região do cordão umbilical em que as CTM são obtidas, diferenças quanto a aspectos celulares, a exemplo da capacidade de diferenciação e proliferação em cultivo, poderiam ocorrer. As CTM do cordão umbilical que vêm sendo isoladas para estudos na área da terapia celular são obtidas com maior frequência pela metodologia enzimática (HASS et al., 2011), entretanto, o isolamento pelo método de migração celular, que foi realizado neste trabalho, permitiria a obtenção de CTM que proporcionaria maior segurança para o paciente durante a aplicação terapêutica, já que não é necessária a utilização de enzimas derivadas de bactérias (HAN et al., 2013), por isso a caracterização dessas células é relevante.

Neste estudo, foram identificadas diferenças ultraestruturais nas CTM do tecido adiposo e cordão umbilical nas diferentes passagens do cultivo celular. Em um estudo de Choi et al. (2010), as CTM derivadas da medula óssea de paciente com esclerose lateral amiotrófica tiveram alterações significativas na produção de citocinas e capacidade de diferenciação durante as passagens celulares (CHOI et al., 2010), sugerindo que a passagem ideal de CTM

da medula óssea precisaria ser avaliada previamente antes dos estudos de terapia celular. Nesse contexto, é importante ressaltar que ainda não há um protocolo que defina qual seria essa passagem ideal de CTM para utilização terapêutica (CARRANCIO et al., 2011; GIORDANO; GALDERISI; MARINO, 2007; SOTIROPOULOU et al., 2006).

Embora existam semelhanças ultraestruturais entre CTM derivadas do tecido adiposo e cordão umbilical, no presente estudo, também foram identificadas diferenças fenotípicas quando as populações de células foram comparadas. Esses achados indicam que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical não podem ser consideradas idênticas mas, apresentam similaridades, o que tem sido relatado em estudos comparativos com CTM de outras fontes teciduais (STANKO et al., 2013; STRIOGA et al., 2012). Essa falta de equivalência biológica pode indicar que o sucesso da terapia utilizando CTM poderia estar associado à fonte tecidual a partir da qual as células são isoladas (ELMAN et al., 2014).

8.3 Perfil de ligação às lectinas das células-tronco mesenquimais

Existem poucos trabalhos que têm abordado o perfil de ligação de lectinas às CTM. Neste estudo, a ligação das lectinas UEA e DBA foi mais intensa nas células do cordão umbilical quando comparada às do tecido adiposo. O estudo de Wang et al. (2011) indicou que a lectina UEA pode ser usada como um marcador para as CT pluripotentes que são positivas para o antígeno embrionário estágio específico 4 (SSEA-4). Da mesma maneira, a lectina DBA foi indicada como um marcador para identificação de células pluripotentes, pois durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, o resíduo de carboidrato α -N-acetilgalactosamina que é reconhecido pela DBA, diminui consideravelmente durante o comprometimento das CT embrionárias em células da linhagem ectodérmica (NASH et al., 2007). No nosso estudo, uma ligação mais intensa das lectinas UEA e DBA às CTM do cordão umbilical pode estar associada a um estágio mais primitivo apresentado por essas CT, que foi identificado quando as CTM do cordão umbilical foram comparadas com outras CTM adultas (HASS et al., 2011; TROYER; WEISS, 2008).

Uma intensidade de ligação semelhante da lectina LCA às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical foi observada. Já a WGA foi a que apresentou uma menor capacidade de ligação às CTM de ambos os tecidos em comparação com as outras lectinas estudadas. A ligação de CTM da medula óssea às lectinas WGA e LCA já foi visualizada pela metodologia da imunofluorescência (FREUND et al., 2010), porém não foi possível identificar trabalhos sobre o perfil de ligação das lectinas às CT utilizando-se a microscopia eletrônica de

transmissão (MET). A análise ultraestrutural de ligação de lectinas proporciona a visualização com detalhes onde ocorreu a ligação das lectinas à célula, sendo relevante quando é necessário comparar o fenótipo de diferentes populações celulares. As semelhanças e diferenças que foram identificadas na ligação de lectinas às CTM do tecido adiposo e cordão umbilical complementam os resultados obtidos da análise ultraestrutural, indicando também que essas células não podem ser classificadas como equivalentes.

8.4 Co-cultivo indireto entre células-tronco mesenquimais e células estreladas hepáticas (GRX)

O efeito terapêutico promovido pelas CTM durante o reparo tecidual está especialmente relacionado à sua função imunomoduladora (MA et al., 2014). Existe a perspectiva de utilização de CTM para tratamento de doenças do fígado, o que exige uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nos efeitos terapêuticos dessas células (MA et al., 2014). As CTM teriam um efeito antifibrogênico na doença hepática crônica, e um dos mecanismos seria a inibição da atividade das CEH, principal célula produtora de matriz extracelular (JANG; LIM; BAE, 2015; LIN et al., 2009; PAREKKADAN et al., 2007).

Neste estudo, foi avaliado se as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical poderiam induzir a apoptose, apoptose tardia ou necrose das CEH. O grupo experimental CTM+GRX+LPS em relação ao controle GRX+LPS não apresentou aumento significativo das taxas de apoptose, apoptose tardia ou necrose celular para as CTM derivadas de ambas as fontes teciduais. Contudo, o grupo correspondente às CTM do cordão umbilical co-cultivadas somente com GRX (CTM+GRX) apresentou um aumento significativo de células estreladas em apoptose. Parekkadan et al. (2007) identificaram um aumento significativo da apoptose de células estreladas após o co-cultivo indireto com CTM da medula óssea de seres humanos após 4 dias de cultura, sugerindo que o efeito imunomodulatório das CTM estaria diretamente relacionado a apoptose.

Em relação à detecção de citocinas no sobrenadante do co-cultivo indireto, as CTM do tecido adiposo apresentaram um aumento significativo na produção de IL-6 na condição experimental CTM+GRX+LPS quando comparada aos controles CTM+GRX e CTM. A IL-6 é classicamente reconhecida como uma citocina pró-inflamatória, mas que poderia ter atividade anti-inflamatória (SCHELLER; KREBSBACH, 2011). Essa citocina é importante principalmente na indução de uma resposta de fase aguda após o dano hepático e também um fator importante para a regeneração do fígado (GALUN et al., 2002). As CTM secretam

constitutivamente IL-6 que juntamente com HGF e TNF- α , durante a lesão hepática, estimulariam a proliferação e manutenção da função dos hepatócitos residentes (KISS et al., 2008). No estudo de Nasir et al. (2013), foi verificado que a infusão de IL-6 em camundongos com lesão hepática crônica, seguida do tratamento com CTM da medula óssea potencializou a redução da fibrose hepática, indicando que a IL-6 promoveria um microambiente favorável que potencializaria os efeitos terapêuticos das CTM. Parekkadan et al. (2007), ao realizarem o co-cultivo indireto entre CTM da medula óssea e CEH, identificaram um microambiente dinâmico entre essas duas células, em que a secreção de IL-6 pelas células estreladas, induziria o aumento significativo na produção de IL-10 pelas CTM, que teria ação sobre as CEH, reduzindo a síntese de colágeno e proliferação celular.

As CEH do grupo experimental CTM+GRX+LPS, após co-cultivo indireto com as CTM do tecido adiposo, apresentaram um aumento significativo na produção de IL-6 quando comparada às células dos grupos controles. Esse resultado é semelhante ao que Parekkadan et al. (2007) identificaram nas CTM da medula óssea. Entretanto, no nosso estudo, quando foi avaliada a produção de IL-10 pelas CTM do tecido adiposo, diferenças significativas não foram observadas. Por outro lado, as CTM do cordão umbilical tiveram um aumento significativo dos níveis de produção da citocina IL-10, ao mesmo tempo em que foi identificado elevados níveis de produção de IL-6 pelas CEH do grupo experimental em relação às condições controles GRX+LPS e GRX. Esse achado indicaria a existência de um microambiente dinâmico entre CTM e CEH, corroborando, portanto, os resultados do trabalho de Parekkadan et al. (2007). Nesse contexto, novos estudos seriam relevantes, a fim de avaliar se as CTM do cordão umbilical também teriam ação inibitória na proliferação e síntese de colágeno pelas CEH. Uma vez que, a ação das CTM não seria restrita apenas a indução da apoptose, mas também a diminuição da proliferação e ativação das CEH (MEIER et al., 2013).

Outra importante citocina avaliada neste estudo foi a MCP-1, que é denominada proteína quimiotática de monócitos-1 e também conhecida como CCL2. Essa citocina é considerada um potente fator quimiotático produzido pelas CEH e macrófagos (BAECK et al., 2012). Como consequência do aumento da produção de MCP-1, os macrófagos são recrutados para o local da lesão hepática, participando diretamente da ativação das CEH (FRIEDMAN, 2008b). Por sua vez, as células estreladas ativadas produzem mais MCP-1, aumentando o recrutamento de macrófagos (FRIEDMAN, 2008b) e CEH (ELPEK, 2014). Nesse contexto, a produção de MCP-1 estaria diretamente relacionada à amplificação da resposta inflamatória e fibrogênese hepática. Dessa forma, a inibição ou redução da via

quimiotática orquestrada pela citocina MCP-1 pode representar uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento da fibrose do fígado (SEKI et al., 2009; BAECK et al., 2012).

A análise do sobrenadante do co-cultivo indireto entre CEH e CTM do tecido adiposo demonstrou uma redução significativa na produção de MCP-1 pelas CEH da condição experimental CTM+GRX+LPS em relação ao grupo controle GRX+LPS. Da mesma forma, no co-cultivo com CTM do cordão umbilical, as CEH do grupo experimental CTM+GRX+LPS tiveram uma diminuição significativa dos níveis de MCP-1 em relação aos grupos controles GRX+LPS e GRX. Esses resultados indicam que tanto as CTM do tecido adiposo quanto as do cordão umbilical poderiam ter uma relevante ação inibitória na produção de MCP-1 pelas CEH.

Após co-cultivo indireto com as CTM do tecido adiposo, foi identificada uma diminuição significativa dos níveis da citocina IL-10 produzida pelas CEH, ao mesmo tempo em que ocorreu um aumento significativo de IL-12p70 no grupo experimental CTM+GRX+LPS quando comparado ao grupo controle GRX+LPS. A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que tem a função de regular e suprimir citocinas pró-inflamatórias como IL-1 α e TNF- α , participando de um controle endógeno na tentativa de evitar a progressão da doença hepática (SZIKSZ al., 2015). A inibição da produção da citocina IL-10, *in vitro*, está associada ao aumento da secreção de colágeno pelas células estreladas (WANG et al., 1998). Portanto, estudos posteriores que avaliem o impacto do co-cultivo indireto entre CTM do tecido adiposo e CEH sobre a produção de colágeno são importantes. É relevante ressaltar que não foi identificada alteração significativa quanto a produção de IL-10 e IL-12p70 pelas CEH co-cultivadas com as CTM do cordão umbilical, indicando que essas células mesenquimais poderiam ter maior efeito modulatório sobre as CEH.

A IL-12p70 é uma forma bioativa da citocina IL-12 e tem a função de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IFN- γ (REA; MCNERLAN; ALEXANDER, 2000). Dependendo do agente causador da doença hepática, a IL-12 estaria associada a uma função protetora ou não (HAMMERICH; TACKE, 2014). Neste estudo, não foram identificadas modificações significativas na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ pelas CEH, o que poderia estar relacionado à capacidade das CTM em inibir a secreção dessas citocinas. Apesar grupo experimental CTM+GRX+LPS quando comparado ao grupo controle CTM+GRX apresentar um aumento significativo na produção de IFN- γ pelas CEH, esses dados não poderiam ser considerados tão relevantes, pois esse grupo representa o controle do LPS. Por outro lado, a IL-12 vem sendo indicada como um potente

inibidor da diferenciação de células precursoras da medula óssea em fibrócitos, que são células associadas ao aumento da fibrose hepática devido à produção de MEC (SHAO et al., 2008).

Os resultados obtidos indicam que as CTM do tecido adiposo e cordão umbilical têm efeito imunomodulatório, por ação parácrina, sobre as CEH. Ressalta-se a importância de mais estudos comparativos entre as CTM derivadas de diferentes fontes teciduais, pois, como foi verificado, apesar de CTM do tecido adiposo e cordão umbilical apresentarem similaridades quanto aos mecanismos de modulação das CEH e nos estudos de caracterização celular, diferenças importantes entre essas populações de CTM puderam ser identificadas. Vale destacar que de acordo com os resultados obtidos, as CTM do cordão umbilical, podem representar uma população de CT mais promissoras para a aplicação terapêutica nas doenças hepáticas fibrosantes quando comparadas às CTM do tecido adiposo. Estudos posteriores são necessários, a fim de investigar, se as CTM do cordão umbilical, além de reduzir os níveis de citocinas que estão relacionadas aos efeitos fibrogênicos das CEH, poderiam inibir a proliferação celular e/ou a síntese de colágeno por essas células.

9 CONCLUSÕES

- a) Existem diferenças nos aspectos morfológicos e ultraestruturais entre CTM do tecido adiposo e cordão umbilical, bem como, na população das CTM, quando comparadas em diferentes fases do cultivo celular, onde subpopulações foram identificadas;
- b) As CTM do tecido adiposo e cordão umbilical não induziram o aumento da apoptose das CEH no grupo experimental, contudo podem induzir, por efeito parácrino, uma imunomodulação dessas células;
- c) As CTM do tecido adiposo e cordão umbilical promoveram uma redução significativa da quimiocina MCP-1, indicando que a ação inibitória pode estar associada a efeitos anti-inflamatórios e antifibrogênicos dessas CTM;
- d) O aumento da produção de IL-6 pelas CTM do tecido adiposo e cordão umbilical sugere que essas células possam estar associadas a um possível mecanismo de reparação do tecido hepático com lesão;
- e) O aumento da produção de IL-10 pelas CTM do cordão umbilical e IL-6 pelas CEH pode estar associado à manutenção de um microambiente dinâmico regulatório;
- f) As CEH apresentaram diminuição significativa da produção de IL-10 e aumento de IL-12p70 após co-cultivo com as CTM do tecido adiposo, o que poderia ser associado à elevação da produção de colágeno pelas CEH.

REFERÊNCIAS

- AERTS, F.; WAGEMAKER, G. Mesenchymal Stem Cell Engineering and Transplantation. In: NOLTA, J. A.(Ed.). **Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells**. 1ed. Dordrecht: Springer, 2006. cap. 1, p. 1-44.
- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, New York, v.105, n. 4, p.1815–1822, 2005.
- AKYUREKLI, C. et al. A Systematic Review of Preclinical Studies on the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, v. 11, n.1, p. 150–156.
- AURICH, H. et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, London, v. 58, n. 4, p. 570-581, 2009.
- BAJADA, S. et al. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, Chichester, v. 2, n. 4, p. 169-183, 2008.
- BAKSH, D.; YAO, R.; TUAN, R. S. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells**, Dayton, v.25, n. 6, p. 1384 –1392, 2007.
- BANAS, A. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. **Hepatology**, Baltimore, v. 46, n. 1, p.219-228, 2007.
- BATALLER, R.; DAVID A. BRENNER, D. A. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, n.3, p. 437-451, 2001.
- BATALLER, R.; DAVID A. BRENNER, D. A. Liver Fibrosis. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, n. 2, v.115, p.209-218, 2005.
- BERARDIS, S. et al. Gene expression profiling and secretome analysis differentiate adult derived human liver stem/progenitor cells and human hepatic stellate cells. **PLoS One**, San Francisco, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906387/pdf/pone.0086137.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.
- BESSOUT, R. et al. Mesenchymal stem cell therapy induces glucocorticoid synthesis in colonic mucosa and suppresses radiation-activated T cells: new insights into MSC immunomodulation. **Mucosal Immunology**, New York, v. 7, n.3, p. 656–669, 2014.
- BEYTH, S. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. **Blood**, New York, v.105, n. 5, p. 2214–2219, 2005.

BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 2, n. 4, p.313-319, 2008.

BORKHAM-KAMPHORST, E. et al. Dominant-negative soluble PDGF-receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 84, p. 766–777, 2004.

BORKHAM-KAMPHORST, E. et al. Dominant-negative soluble PDGF-receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 84, n.6, p. 766–777, 2004.

BOURIN, P. 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 and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, Oxford, v. 15, n. 6, p. 641-648, 2013.

BRANDÃO, D. F. et al. Liver cirrhosis and hepatic stellate cells. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v21s1/31369.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

BROCK, D. W. Is a consensus possible on stem cell research? Moral and political obstacles?. **Journal of Medical Ethics**, London, v. 32, n.1, p. 36-42, 2006.

BRUNO, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. **Journal of the American Society of Nephrology**, Baltimore, v. 20, p. 1053–67, 2009.

BUNNELL, B.A. et al. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. **Methods**, San Diego, v.45, n. 2, p. 115-120, 2008.

CAMPARD, D. et al. Native Umbilical Cord Matrix Stem Cells Express Hepatic Markers and Differentiate Into Hepatocyte-like Cells. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 134, n. 3, p.833-848, 2008.

CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 25, n. 11, p. 2886-2895, 2007.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.8, n.5, p. 1076-1084, 2006.

CAPLAN, A. I. All MSCs are pericytes? **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 3, n.3, p. 229-230, 2008.

CARRANCIO, S. et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Improving Hematopoietic Function: An In Vitro and In Vivo Model. Part 2. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 10, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0026241&type=printable>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

CASSIMAN, D. et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers. **Journal Hepatology**, Copenhagen, v. 36, n. 2, p.200-209, 2002.

CASTRO-MANRREZA, M. E. et al. Human Mesenchymal Stromal Cells from Adult and Neonatal Sources: A Comparative In Vitro Analysis of Their Immunosuppressive Properties Against T Cells. **Stem Cells and Development**, New York, v. 23, n. 11, p.1217-1232, 2014.

CHAMBERLAIN, G. et al. Mesenchymal Stem Cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, Dayton, v. 25, n. 11, p. 2739 – 2749, 2007.

CHEN, L. et al. Application of Adipose-Derived Stem Cells in Heart Disease. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, New York, v. 7, n. 7, p.651-663, 2014.

CHEUNG, T.H.; RANDO, T.A. Molecular regulation of stem cell quiescence. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 14, n.6, p. 329–340, 2013.

CHO, P. S. et al. Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. **Blood**, New York, v.111, n. 1, p. 430–438, 2007.

CHO, Y.B. et al. Autologous adipose tissue-derived stem cells for the treatment of Crohn's fistula: a phase I clinical study. **Cell Transplantation**, New York, v. 22, n. 2, p. 279–285, 2013.

CHOI, M. R. et al. Selection of optimal passage of bone marrow derived mesenchymal stem cells for stem celltherapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 472, n. 2, p. 94-98, 2010.

CORCIONE, A. et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, New York, v. 107, n. 1, p. 367–372, 2006.

COUPLAND, P.G. et al. Internalisation of polymeric nanosensors in mesenchymal stem cells: analysis by flow cytometry and confocal microscopy. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 115-120, 2008.

COVAS, D. P. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

CRISAN, M. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 3, n. 3, p.301-313, 2008.

DALGETTY, D. M. et al. Progress and future challenges in stem cell-derived liver technologies. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 297, n. 2, p. 241- 248, 2009.

DE BARI, C. et al. A biomarker-based mathematical model to predict bone forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 58, n.1, p.240-250, 2008.

DE BRUYN, C. et al. A Rapid, Simple, and Reproducible Method for the Isolation of Mesenchymal Stromal Cells from Wharton's Jelly without Enzymatic Treatment. **Stem cells Development**, Larchmont, v. 20, n. 3, 547 -557, 2011.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, London, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DOMINICI, M. et al. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. **Transplantation**, Baltimore, v. 87, n.9, p. 36-42, 2009.

EGLITIS, M. A.; MEZEY, E. Hematopoietic cells differentiate into microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 94, n. 8, p. 4080–4085, 1997.

ELMAN, J. S. et al. Pharmacokinetics of Natural and Engineered Secreted Factors Delivered by Mesenchymal Stromal Cells. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3931832/pdf/pone.0089882.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 109, n. 1, p. 235-242, 2000.

FANG, B. et al. Systemic infusion of FLK1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. **Transplantation**, Baltimore, v. 78, p. 83–88, 2004.

FORBES, S. J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Clinical Gastroenterology**, London, v. 25, n.2, p. 207-217, 2011.

FORBES, S.J.; NEWSOME, P.N. New horizons for stem cell therapy in liver disease. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 56, n. 2, p. 496-499, 2012.

FRIEDENSTEIN, A.J; DERIGLAZOVA, U.F. KULAGINA, N.N. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Experimental Hematol**, Copenhagen, v. 2, p. 83-92, 1974.

FRIEDMAN, S. L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 7, n.8, p. 425 – 436, 2010.

FRIEDMAN, S.L. Fibrogenic cell reversion underlies fibrosis in liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n.24, 2012.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic fibrosis - Overview. **Toxicology**, Amsterdam, v. 254, n. 3, p.120-129, 2008a.

FRIEDMAN, S.L. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America**, Washington, v. 82, n. 24, p.8681-8685, 1985.

- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.88, n.1, p. 125 – 172, 2008c.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 1, n.2, p. 98 - 105, 2004.
- FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 134, n.6, p. 1655-1669, 2008b.
- FRIEDMAN, S.L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n.4, p.2247-2250, 2000.
- GARIMELLA, M. G. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Prevent Systemic Bone Loss in Collagen-Induced Arthritis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 195, n. 11, p. 5136-5148, 2015.
- GEORGE, J. et al. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n 22, p. 12719-12724, 1999.
- GIMBLE, J. M.; BUNNELL, B. A.; GUILAK, F. Review Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. **Regenerative medicine**, London, v. 7, n. 2, p. 225-235, 2012.
- GIMBLE, J. M.; KATZ, A. J; BUNNELL, B. A. Adipose derived stem cells for regenerative medicine. **Circulation Research**, Baltimore, v.100, n.9, p. 1249–1260, 2007.
- GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to the patient's bedside: An update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, n. 1, p.27-35, 2007.
- GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World Journal of Stem Cells**, Beijing, v. 6, n. 5, p. 526-39, 2014.
- GROUNDS, M. D.et al. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Baltimore, v. 50, n. 5, p. 589–610, 2002.
- GUGJOO, M. B. et al. Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells alongwith growth factors and scaffolds. **The Indian Journal of Medical Research**, Mumbai, v. 144, n. 3, p. 339-347, 2016.
- GUO, L.Z. et al. Angio-Vasculogenic Properties of Endothelial-Induced Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Adipose Tissue. **Circulation Journal**, Kyoto, v. 80, n. 4, p. 998-1007, 2016.
- HAN, Y. et al. Optimization of human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and culture methods. **Cytotechnology**, Dordrecht, v. 65, n. 5, p.819-827, 2013.

HASS, R. et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, London, p. 9-12, 2011. Disponível em: <<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/1478-811X-9-12>> Acesso em: 20 jan. 2016.

HENDERSON, N. C.; FORBES, S. J. Hepatic fibrogenesis: from within and outwith. **Toxicology**, Amsterdam, v. 254, n.3, p. 130-135, 2008.

HENDIJANI, F.; SADEGHI-ALIABADI, H.; JAVANMARD, S. H. Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. **Cell and Tissue Banking**, Dordrecht, v. 15, n. 4, p.555-565, 2014.

HERRERA, M. B. et al. Human liver stem cells improve liver injury in a model of fulminant liver failure. **Hepatology**, Baltimore, v. 57, n.1, p. 311–319, 2013.

HIGASHIYAMA, R. et al. Bone marrow derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 45, n.1, p. 213–222, 2007.

HONOLD, J. et al. Stem cell therapy of cardiac disease: an update. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 19, n. 7, p. 1673-1677, 2004.

HOUSMAN, T. S. et al. The safety of liposuction: results of a national survey. **Dermatologic Surgery**, New York, v. 28, n. 11, p. 971–978, 2002.

HSU, Y.C; FUCHS, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 13, n. 2, p. 103-14, 2012.

IREDALE, J. P. et al. Mechanisms of Spontaneous Resolution of Rat Liver Fibrosis. Hepatic Stellate Cell Apoptosis and Reduced Hepatic Expression of Metalloproteinase Inhibitors. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 1, n. 3, p. 538-549, 1998.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 117, n. 3, p. 539-548, 2007.

ISHIGE, I. et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. **International Journal Hematology**, Limerick, v. 90, n. 2, p. 261-269, 2009.

ISHII, K. et al. Hepatic Differentiation of Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells by Tetracycline-Regulated Hepatocyte Nuclear Factor 3beta. **Hepatology**, Baltimore, v. 48, n. 2, p. 597-606, 2008.

IVANOVA-TODOROVA, E. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Immunology Letters**, Amsterdam, v. 126, n. 2, p. 37–42, 2009.

IZADPANA, R. et al. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 99, n. 5, p. 1285–1297, 2006.

JANG, K.; LIM, H.; BAE, J. Mesenchymal Stem Cells for Enhancing Biologic Healing after Anterior Cruciate Ligament Injuries. **Current Stem Cell Research & Therapy**, Sharjah, v. 10, n. 6, p.535-547, 2015.

JIANG X. X. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, New York, v. 105, n. 10, p. 4120– 4126, 2005.

JIN, H.J. et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as sources of cell therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 9, p. 17986-18001, 2013.

JIN, Z. et al. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells. **Hepatology**, Baltimore, v. 53, n. 1, p. 219-229, 2011.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 13, n.6, p. 419-425, 2006.

KERMANI, A. J.; FATHI, F.; MOWLA, S. J. Characterization and genetic manipulation of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells: potential application in cell-based gene therapy. **Rejuvenation Research**, Larchmont, v. 11, n. 2, p. 379-386, 2008.

KERN, S. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, Dayton, v. 24, n. 5, p.1294-1301. 2006.

KESTENDJIEVA, S. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. **Cell Biology International**, London, v. 32, n. 7, p. 724-732, 2008.

KIM, S. et al. Amniotic Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing in Diabetic NOD/SCID Mice through High Angiogenic and Engraftment Capabilities. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 7, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3398889/pdf/pone.0041105.pdf>> Acesso em: 20 jan. 2016.

KISS, J. et al. Mesenchymal stem cells and the immune system – Immunosuppression without drugs. **Orvosi Hetilap**, New York, v. 149, n. 8, p.339-346, 2008.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Boston, v. 22, p. 73-78, 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1746.2006.04658.x/epdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

KONG, X. et al. Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 56, n. 3, p 150–159, 2012.

KOPEN G. C.; PROCKOP J. D.; PHINNEY D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal

mouse brains. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 96, n.19, p.10711–10716, 1999.

KÖRBLING, M.; ESTROV Z. Adult stem cells for tissue repair — A new therapeutic concept? **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

LAAR, J. M.; TYNDALL, A. Adult stem cells in the treatment of autoimmune diseases. **Rheumatology**, Basel, v. 45, n. 10, p. 187–1193, 2006.

LANGE, C. et al. Liver-specific gene expression in mesenchymal stem cells is induced by liver cells. **World Journal Gastroenterology**, Beijing v. 11, n. 29, p. 4497–4504, 2005.

LASKIN, D.L. et al. Macrophages and tissue injury: agents of defense or destruction? **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 51, p. 267-288, 2011.

Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3670679/pdf/nihms453639.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

LE BLANC, K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 31, n. 10, p. 890-896, 2003a.

LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 57, n. 1, p. 11-20, Jan. 2003b.

LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

LE BLANC, K. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, London v. 371, n. 9624, p.1579-1586, 2008.

LEE, J. W. et al. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of E. coli endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. **Proceedings of The National Academy Of Sciences**, Washington, v. 106, n. 38, p.16357-16362, 2009.

LEE, O. K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, New York, v. 103, n. 5, p. 1669-1675, 2004.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S.L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Best Practice and Research Clinical Gastroenterology**, London, v. 25, n.2, p. 195–206, 2011.

LEMMERS, A. et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. **Hepatology**, Baltimore, v. 49, n.2, p. 646–57, 2009.

LEVI, B. et al. CD105 Protein Depletion Enhances Human Adipose-derived Stromal Cell Osteogenesis through Reduction of Transforming Growth Factor 1 (TGF- 1) Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 286, n. 45, p.39497-39509, 2011.

- LI, J. T. et al. Molecular mechanism of hepatic stellate cell activation and antifibrotic therapeutic strategies. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 43, n. 5, p. 419-428, 2008.
- LI, J.; EZZELARAB, M. B.; COOPER, D. K. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. **Xenotransplantation**, Copenhagen, v. 19, n. 5, p. 273- 285, 2012.
- LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 21, n.2, p. 605-631, 2005.
- LIM, Y. S.; KIM, C.W. R. The global impact of hepatic fibrosis and end-stage liver diseases. **Clinics in Liver Disease**, Philadelphia, v. 12, n. 4, p.733-746, 2008.
- LIN, C. et al. Commonly used mesenchymal stem cell markers and tracking labels: Limitations and challenges. **Histology and Histopathology**, Murcia, n. 28, n.9, p.1109-1116, 2013.
- LIN, G. et al. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v.17, n.6, p.1053–1064, 2008.
- LIN, H. et al. Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. **Cellular and Molecular Immunology**, Beijing, v.1, n.8 19–22, 2011.
- LIN, N. et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. **Life Science**, Oxford, v. 85, n.8, p. 291–295, 2009
- LV, F. et al. Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 32, n. 6, p.1408-1419, 2014.
- MA, S. et al. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death and Differentiation**, London, v. 21, n. 2, p. 216-225, 2014.
- MACCARIO, R. et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype, **Haematologica**, Pavia, v. 90, n. 4, p. 516–525, 2005.
- MAERCKX, C. et al. Human liver stem/progenitor cells decrease serum bilirubin in hyperbilirubinemic Gunn rat. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 20, n.30, p. 10553–10563, 2014.
- MAJORE, I. et al. Growth and Differentiation Properties of Mesenchymal Stromal Cell Populations Derived from Whole Human Umbilical Cord. **Stem Cell Reviews**, Totowa, v. 7, n. 1, p.17-31, 2011.
- MAJORE, I. et al. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. **Cell Communication and Signaling**, London, v. 7, n. 1, p.6-11, 2009.

MANEA, C. M. et al. Ultrastructural features of human adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, Bucuresti, v. 55, n. 4, p.1363-1369, 2014.

MANUELPILLAI, U. et al. Human amniotic epithelial cell transplantation induces markers of alternative macrophage activation and reduces established hepatic fibrosis. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 6, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0038631&type=printable>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MARIA, A. T. et al. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune Disorders: State of the Art and Perspectives for Systemic Sclerosis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Totowa, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-016-8552-9>> Acesso em: 20 jan. 2016.

MEIER, R.P et al. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? **Stem Cell Research**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 1348-1364, 2013.

MEIRELLES, L. da Silva. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London v. 119, n. 11, p.2204-2213,2006.

MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, n. 9, p. 2287–2299, 2008.

MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues, **Journal of Cell Science**, London, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELLES, L.;CHAGASTELLES P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MENG, F. et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 143, n. 3, p. 765–776, 2012.

MENNAN, C. et al. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. **BioMed Research International**, New York, 2013. Disponível em:< <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12016-016-8552-9>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MENOCAL-RODRIGUEZ, L. et al. Role of whole bone marrow, whole bone marrow cultured cells, and mesenchymal stem cells in chronic wound healing. **Stem Cell Research & Therapy**, Sharjah, v. 6, n. 24, p. 1-11, 2015.Disponível em: < <https://stemcellres.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13287-015-0001-9?site=stemcellres.biomedcentral.com>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics—Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative

Medicine and Cancer Therapies. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, St. Louis, v. 81, n. 3, p. 252-264, 2007.

MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem Cells: A Revolution in Therapeutics—Recent Advances in Stem Cell Biology and Their Therapeutic Applications in Regenerative Medicine and Cancer Therapies. **Clinical pharmacology and therapeutics**, St. Louis, v. 82, n. 3, p.252-264, 2007.

MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n. 8, p. 881-887, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjmbr/v33n8/3850m.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MITRA, N. K. et al. Investigating Cell Surface Markers and Differentiation Potential of Compact Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells. **International Journal of Stem Cell Research and Transplantation**, Delaware, v.1, n. 3, p. 91-95, 2015.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A.C. Concise review: Adipose derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. **Stem Cells**, Dayton, v. 30, n. 5, p. 804- 810, 2012.

MOHAMADNEJAD, M. et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. **Archive Iran Medical**, Tehran, v. 10, n.4, p. 459–466, 2007.

MONTESINOS, Juan J. et al. In Vitro Evidence of the Presence of Mesenchymal Stromal Cells in Cervical Cancer and Their Role in Protecting Cancer Cells from Cytotoxic T Cell Activity. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v. 22, n. 18, p. 2508-2519, 2013.

MORI, S. et al. Enhanced Expression of Integrin $\alpha\beta 3$ Induced by TGF- β Is Required for the Enhancing Effect of Fibroblast Growth Factor 1 (FGF1) in TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) in Mammary Epithelial Cells. **Plos One**, San Francisco, v. 10, n.9, 2015. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0137486&type=printable>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

MURACA, Maurizio. Evolving concepts in cell therapy of liver disease and current clinical perspectives. **Digestive And Liver Disease**, Roma, v. 43, n. 3, p.180-187, 2011.

MUROI, K. et. al. Unrelated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells for steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a phase I/II study. **International Journal of Hematology**, Amsterdam, v. 98, n.2, p. 206-213, 2013.

NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World Journal Stem Cells**, Beijing, v. 6, n. 2, p. 195-202, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999777/pdf/WJSC-6-195.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

NAJIMI, M. et al. Adult derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? **Cell Transplant**, New York, v. 16, n.7, p. 717–728, 2007.

NASH, M. E. et al. Thermoresponsive Substrates used for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells and the Preservation of Immunophenotype. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, n. 2, p.148-157, 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12015-013-9428-5>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

NISHIKAWA, S.; JAKT, L.M.; ERA, T. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology. **Nature reviews. Molecular cell biology**, London, v. 8, n. 6, p. 502-507, 2007.

NOEL, D. et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. **Experimental cell research**, New York, v.314, n.7, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482707005897>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN; L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v.12, n.2, p. 126-131, 2011.

OLIVEIRA, S. A. et al. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n.38, p. 5842-5850, 2008. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751894/pdf/WJG-14-5842.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

ONG, S. et al. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 27, n. 22, p.4087-4097, 2006.

ORTIZ, L. A. et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 100, n. 14, p.8407-8411, 2003.

ORTIZ, L.A. et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, Washington, v. 104, n.26, p. 11002–11007, 2007.

PAK, J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. **Journal of Medical Case Reports**, London, v. 5, n. 1, p.296-302, 2011. Disponível em: <<https://jmedicalcasereports.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-1947-5-296>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

PAREKKADAN, B. et al. Immunomodulation of hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical**, New York, v. 363, n. 2, p. 247–252, 2007.

PARK, O. et al., Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. **Hepatology**, Baltimore, v. 49, n.5, p. 1683-1694, 2009.

PASQUINELLI, G. et al. Ultrastructural characteristics of human mesenchymal stromal (stem) cells derived from bone marrow and term placenta. **Ultrastructural Pathology**, New York, v. 31, n. 1, p. 23-31, 2007.

PENG, L. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v.17, n. 4, p. 761-773, 2008.

PETERSEN, B.E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, Washington, v. 284, n. 5417, p. 1168–1170, 1999.

PHINNEY, Donald G. Biochemical Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cell Populations: Clues to their Therapeutic Efficacy. **Cell Cycle**, Philadelphia, v. 6, n. 23, p.2884-2889, 2007.

PINZANI, M; ROMBOUTS, K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. **Digestive and Liver Disease**, Roma, v. 36, n. 4, p. 231-241, 2004.

PIRYAEI, A. et al. Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells on Nanofibers and Their Transplantation into a Carbon Tetrachloride-Induced Liver Fibrosis Model. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, v.7, n. 1, p.103-118, 2011.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, Washington, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

POLCHERT, D. et al. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. **European journal of immunology**, Weinheim, v. 38, n. 6, p. 1745-1755, 2008.

POTTEN, C. S.; LOEFFLER, M. Stem cells: attributes, cycles, turner, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. **Development**, Cambridge, v. 110, n. 4, p. 1001–1020, 1990.

PUGLISI, M.A. et al. Therapeutic Implications of Mesenchymal Stem Cells in Liver Injury. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Ohio, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250695/pdf/JBB2011-860578.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

PUISSANT, B. et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 129, n. 1, p. 118-129, 2005.

MURRAY, I.; PÉAULT, B. Q&A: Mesenchymal stem cells — where do they come from and is it important?. **BMC Biology**, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656175/pdf/12915_2015_Article_212.pdf> Acesso em: 20 jan. 2016.

RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Distinct Stem Cells Subpopulations Isolated from Human Adipose Tissue Exhibit Different Chondrogenic and Osteogenic Differentiation Potential. **Stem Cell Reviews and Reports**, Totowa, v. 7, n. 1, p.64-76, 2010.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: Fact or Artifact? **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 19, n. 1, p. 1-22, 2003.

RAFFAGHELLO, L. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, n. 1, p.151-162, 2008.

RAIMONDO, S. et al. Morphological characterization of GFP stably transfected adult mesenchymal bone marrow stem cells. **Journal of Anatomy**, London, v. 208, n.1, p. 3-12, 2006.

RASMUSSEN, I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 312, n. 12, p. 2169-2179, 2006.

REA, I.; MCNERLAN, S.; ALEXANDER, H. Total serum il-12 and il-12P40, but not il-12P70, are increased in the serum of older subjects; relationship to cd3+and nk subsets. **Cytokine**, San Diego, v. 12, n. 2, p.156-159, 2000.

RICKARD, D. J. et al. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 11, n. 3, p. 312-324, 1996.

RODERFELD, M. et al. Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in Abcb4^{-/-} mice. **Hepatology**, Baltimore, v. 51, n. 1, p.267-276, 2010.

ROLDÁN, J.C. et al. Quantifying migration and polarization of murine mesenchymal stem cells on different bone substitutes by confocal laser scanning microscopy. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, New York, v. 38, n. 8, p. 580-588, 2010.

ROMANOV, Y.A. et al. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. **Stem Cells**, Dayton, v. 21, n.1, p.105-110, 2003.

ROSTOVSKAYA, M.; ANASTASSIADIS, K. Differential Expression of Surface Markers in Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations with Distinct Lineage Commitment. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 12, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0051221&type=printable>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

SALGADO, A. J. et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Current stem cell research & therapy**, Sharjah, v. 5, n. 2, p. 103–110, 2010.

SATO, M.; SUZUKI, S.; SENOO, H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. **Cell Structure and Function**, Okayama, v. 28, n.2, p. 105–112, 2003.

SCHELLER, E. L.; KREBSBACH, P. H. The use of soluble signals to harness the power of the bone microenvironment for implant therapeutics. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, Lombard, v. 26, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3936784/pdf/nihms489044.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

SCHUPPAN, D. et al. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. **Seminars in Liver Disease**, New York, v. 21, n.3, p.351–372, 2001.

SECCO, M. et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord: Do not discard the cord! **Neuromuscular Disorders**, Oxford, v.18, n. 1, p. 17-18, 2008b.

SECCO, M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, Dayton, v. 261, n. 1, p.146–150, 2008a.

SENOO, H. et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future. **Cell Biology International**, London, v. 34, n. 12, p. 1247 – 1272, 2010.

SHAO, D.D. et al. Pivotal advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 83, n. 6, p. 1323-1333, 2008.

SHI, M.; LIU, Z.W.; WANG, F.S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 164, n. 1, p. 1–8, 2011.

SI, Y. et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. **Ageing Research Reviews**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 93 – 103, 2011.

SOTIROPOULOU, P. A. et al. Cell Culture Medium Composition and Translational Adult Bone Marrow-Derived Stem Cell Research. **Stem Cells**, Dayton, v. 24, n. 5, p. 1409-1410, 2006.

SPAGGIARI, G.M. et al. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. **Blood**, New York, v. 107, n. 4, p.1484 –1490, 2006.

STANKO, P. et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký**, Prague, v. 158, n.3, p. 373-377, 2013.

STREM, B.M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **The Keio Journal of Medicine**, Tokyo, v. 54, p.132–141, 2005.

STRIOGA, M. et al. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. **Stem Cells And Development**, Larchmont, v. 21, n. 14, p.2724-2752, 2012.

SZIKSZ, E. et al. Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. **Mediators of Inflammation**, New York, v. 4, n. 2, p. 11-26, 2015.

TERAI, S. et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. **Stem Cells**, Dayton, v. 24, n. 10, 2292–2298, 2006.

THEISE, N. D. et al. Liver from Bone Marrow in Humans. **Hepatology**, Baltimore, v. 32, n. 1, p. 11-16, 2000.

THOMSON, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Washington, v. 282, n.5391, p. 1145-1147, 1998.

TODA, K. et al. Induction of hepatic stellate cell proliferation by LPS-stimulated peripheral blood mononuclear cells from patients with liver cirrhosis. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 35, n. 3, p.214-220, 2000.

TOYODA, M. et al. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. **Genes Cells**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2011.

TROYER DL, WEISS ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. **Stem Cells**, Dayton, v. 26, n. 3, p. 591-599, 2008.

UGARTE, D. A. et al. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 174, n. 3, p.101-109, 2003.

Voswinkel, J. et al. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. **Clinical reviews in allergy & Immunology**, Totowa, v. 45, n. 2, p. 180–192, 2013.

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

WANG, H. S. et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's Jelly of the human umbilical cord. **Stem Cells**, Dayton, v. 22, n.7, p.1330–1337, 2004.

WANG, S.C. et al. Expression of interleukin-10 by in vitro and in vivo activated hepatic stellate cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 1, p. 302-308, 1998.

WANG, X. et al. Cell fusion is the principal source of bone marrow- derived hepatocytes. **Nature**, London, v. 422, n. 6394, p.897-901, 2003.

WANG, Y. J. et al. Efficacy and Durability in Direct Labeling of Mesenchymal Stem Cells Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Organosilica, Dextran, and PEG Coatings. **Materials**, Basel, v. 4, n. 12, p.703-715, 2011.

WINKLER, S. et al. Mouse white adipose tissue-derived mesenchymal stem cells gain pericentral and periportal hepatocyte features after differentiation in vitro, which are preserved in vivo after hepatic transplantation. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 215, n. 2, p. 89-104, 2015.

WU, X. B.; TAO, R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, Qingchunru, v. 11, n. 4, p. 360-371, 2012.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, London, v. 2, p. 199-210, 2008.

WYNN, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **American Society for Clinical Investigation**, New Haven, v. 117, n.3, 524-529, 2007.

YI, H.S.; JEONG, W. I. Interaction of hepatic stellate cells with diverse types of immune cells: foe or friend? **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Boston, 2013.
Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jgh.12017/epdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

YOSHIJI, H. et al. Amelioration of liver fibrogenesis by dual inhibition of PDGF and TGF- β with combination of Imatinibmesylate and ACE inhibitor in rats. **International Journal of Molecular Medicine**, Atenas, v. 17, n.5, p. 899–904, 2006.

YOUNG, H.E; BLACK, A.C. J. Adult stem cells. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 276, n.1, p. 75-102, 2004.

ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. (Eds.). **Células-tronco: a Nova Fronteira da Medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. cap.1, p. 2-20.

ZHAO, W. et al. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 18, n. 10, p. 1048 -1058, 2012.
Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3296978/pdf/WJG-18-1048.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

ZHOU, P. et al. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. **Hepatology**, Baltimore, v. 49, p. 1992–2000, 2009.

ZUK, P. A. et al. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue engineering**, New York, v. 7, n.2, p. 213-228, 2001.

ANEXO – Certificado Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)



Título do Projeto: "Células-tronco mesenquimais: estudo in vitro e in vivo do potencial terapêutico na fibrogênese hepática"

Pesquisador responsável: Camila Lima Carvalho

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 22/04/2013

Registro no CAAE: 07786413.8.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 353.807

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 12 de agosto de 2016.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 08 de abril de 2014.

Vice-Coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hildeburg Nobre de V. Silva
Análise de Gestão em Saúde
Vice-Coordenador
Mat. SAPE 1538906
CEP/CPqAM/Fiocruz

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido – Cordão umbilical



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Ministério da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Células-tronco mesenquimais: estudo *in vitro* e *in vivo* do potencial terapêutico na fibrogênese hepática

Local do Estudo: Laboratório de Biologia Molecular e Immunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz e Maternidade Professor Bandeira Filho.

Responsável pela Pesquisa: Msc. Camila Lima Carvalho

Telefone: (81) 2101-2525/8737-1778

Endereço: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) - Fiocruz, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP. 50670-420 - Recife, PE – Brasil.

Você está sendo convidada a participar desta pesquisa que tem como objetivo o estudo de células-tronco mesenquimais na terapia celular das doenças do fígado. Sua participação no estudo, caso conceda, será de doadora do cordão umbilical humano. A **participação como doadora de cordão é voluntária**. O cordão umbilical doado para este estudo é um material que seria descartado após o parto.

A doação do cordão umbilical não causará dor, danos físicos ou riscos para a doadora e o recém-nascido. Porém, no momento do convite para a participação da pesquisa, a senhora poderá se sentir desconfortável por estar no momento de pós-parto. Na **condição de doadora do cordão umbilical, você e o recém-nascido não terão benefícios diretos com esta pesquisa, mas poderão contribuir com os resultados para futura melhoria da saúde das pessoas. Contudo, sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a pesquisadora, com a Fiocruz /PE ou com a Maternidade Bandeira Filho.**

O cordão umbilical doado será coletado na Maternidade Bandeira Filho. Após a coleta, o cordão umbilical será acondicionado em um frasco e transportado dentro de um isopor com gelo para o Laboratório de Biologia Molecular e Immunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (CPqAM-Fiocruz), onde as células-tronco mesenquimais serão isoladas do cordão umbilical e a possível aplicação dessas células para o tratamento de doenças do fígado será avaliada. Ao final dessa etapa, o cordão umbilical será devidamente acondicionado e destinado ao sistema de descarte de material biológico do CPqAM/Fiocruz. As células-tronco isoladas serão utilizadas somente para este estudo, dessa forma não iremos realizar armazenamento das células para estudos posteriores. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para fins de ensino e pesquisa e apresentados em reuniões científicas e revistas médicas que estarão acessíveis na biblioteca do CPqAM/FIOCRUZ.

Ao participar do estudo a Senhora estará contribuindo para melhorar a pesquisa na área de terapia celular e tem garantido os seus direitos:

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca de todos os procedimentos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isto traga nenhum prejuízo a sua pessoa;



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ
Ministério da Saúde

3. A segurança de que não será identificado em hipótese alguma e que será mantido o caráter confidencial da informação que seja prestada.

Se a senhora concordar em participar, pedimos que assine este papel em duas vias, dizendo que entendeu as explicações e que está concordando. Uma dessas vias ficará em seu poder e a outra deverá ficar com o pesquisador responsável pela pesquisa.

Em caso de dúvidas, a senhora poderá procurar a pesquisadora:

Camila Lima Carvalho. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE. Av. Profª Moraes Rego, S/N. Campus da UFPE. Recife/PE.
E-mail: camilacarvalho@cpqam.fiocruz. Fone: 21012525

_____	_____	_____
(Nome da Paciente)	(Assinatura da paciente)	(Data)
_____	_____	_____
(Nome da Responsável)	(Assinatura do Responsável)	(Data)
_____	_____	_____
(Nome do Pesquisador)	(Assinatura do Pesquisador)	(Data)

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Tecido Adiposo



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



Fiocruz
Ministério da Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Células-tronco mesenquimais: estudo *in vitro* e *in vivo* do potencial terapêutico na fibrogênese hepática

Local do Estudo: Laboratório de Biologia Molecular e Imunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz e Hospital Esperança.

Responsável pela Pesquisa: Msc. Camila Lima Carvalho

Telefone: (81) 2101-2525/8737-1778

Endereço: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) - Fiocruz, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP. 50670-420 - Recife, PE – Brasil.

Você está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que tem como objetivo o estudo de células-tronco mesenquimais na terapia celular das doenças do fígado. Sua participação no estudo, caso conceda, será de doador(a) do tecido adiposo humano. **A participação como doador(a) de tecido adiposo é voluntária.**

Não teremos nenhum contato com o doador(a) durante a cirurgia, pois o tecido adiposo que iremos coletar trata-se de material que seria descartado após o procedimento de lipos aspiração realizado pelo médico. Por isso, a coleta do material não provoca riscos ou danos físicos para o doador(a). Contudo, no momento do convite para a participação da pesquisa, o senhor(a) poderá se sentir desconfortável por estar no momento do pré-operatório. **Na condição de doador(a) do tecido adiposo, você não terá benefícios diretos com esta pesquisa, mas poderá contribuir com os resultados para futura melhoria da saúde das pessoas. Porém, sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a pesquisadora, com a Fiocruz /PE ou com o Hospital Esperança.**

O tecido adiposo doado será coletado no Hospital Esperança-Recife. Após a coleta, o tecido adiposo será acondicionado em um frasco e transportado dentro de um isopor com gelo para o Laboratório de Biologia Molecular e Imunopatologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz (CPqAM-Fiocruz), onde as células-tronco mesenquimais serão isoladas do tecido adiposo e a possível aplicação dessas células para o tratamento de doenças do fígado será avaliada. Ao final dessa etapa, o tecido adiposo será devidamente acondicionado e destinado ao sistema de descarte de material biológico do CPqAM/Fiocruz. As células-tronco isoladas serão utilizadas somente para este estudo, dessa forma não iremos realizar armazenamento das células para estudos posteriores. Os resultados obtidos poderão ser utilizados para fins de ensino e pesquisa e apresentados em reuniões científicas e revistas médicas que estarão acessíveis na biblioteca do CPqAM/FIOCRUZ.

Ao participar, do estudo o Senhor(a) estará contribuindo para melhorar a pesquisa na área de terapia celular e tem garantido os seus direitos:

1. A garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca de todos os procedimentos e benefícios relacionados com a pesquisa;
2. A liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isto traga nenhum prejuízo a sua pessoa;



Centro de Pesquisas
AGGEU MAGALHÃES



FIOCRUZ
Ministério da Saúde

3. A segurança de que não será identificado em hipótese alguma e que será mantido o caráter confidencial da informação que seja prestada.

Se o senhor(a) concordar em participar, pedimos que assine este papel em duas vias, dizendo que entendeu as explicações e que está concordando. Uma dessas vias ficará em seu poder e a outra deverá ficar com o pesquisador responsável pela pesquisa.

Em caso de dúvidas, o senhor(a) poderá procurar a pesquisadora:

Camila Lima Carvalho. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ-PE. Av. Profª Moraes Rego, s/n. Campus da UFPE. Recife/PE.
E-mail: camilacarvalho@cpqam.fiocruz.br. Fone: 21012525

_____	_____	_____
(Nome do Paciente)	(Assinatura do paciente)	(Data)
_____	_____	_____
(Nome do Pesquisador)	(Assinatura do Pesquisador)	(Data)