



BRUNA MARIA MANZINI

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CÉLULAS
MESENQUIMAIS OBTIDAS DE SANGUE DE
CORDÃO UMBILICAL, TECIDO ADIPOSEO E DE
MEDULA ÓSSEA HUMANOS NA
DIFERENCIAÇÃO EM HEPATÓCITOS**

Campinas

2014



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

BRUNA MARIA MANZINI

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CÉLULAS MESENQUIMAIS
OBTIDAS DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL, TECIDO ADIPOSEO E
DE MEDULA ÓSSEA HUMANOS NA DIFERENCIAÇÃO EM
HEPATÓCITOS**

Orientadora: Profa. Dra. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para
Obtenção do título de Mestra em Ciências*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA BRUNA MARIA MANZINI E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Notação	<p>Manzini, Bruna Maria, 1981- Avaliação da capacidade de células mesenquimais obtidas de sangue de cordão umbilical, tecido adiposo e de medula óssea humanos na diferenciação em hepatócitos / Bruna Maria Manzini. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.</p> <p>Orientador : Ângela Cristina Malheiros Luzo. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Terapia baseada em transplante de células e tecidos. 2. Células mesenquimais estromais. 3. Doença hepática terminal. I. Luzo, Ângela Cristina Malheiros. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
---------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue, umbilical cord blood and bone marrow : ability to differentiate into functional hepatocytes

Palavras-chave em inglês:

Cell- and tissue-based therapy

Mesenchymal stem cells

End stage liver disease

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Ângela Cristina Malheiros Luzo [Orientador]

Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

Ana Cristina Aoun Tannuri

Data de defesa: 25-02-2014

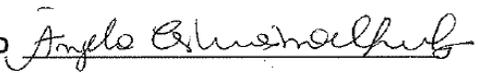
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNA MARIA MANZINI

Orientador (a) PROF(A). DR(A). ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO 

2. PROF(A). DR(A). ANA CRISTINA AOUN TANNURI 

3. PROF(A). DR(A). ILKA DE FÁTIMA SANTANA FERREIRA BOIN 

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 25 de fevereiro de 2014

Agradecimentos

Agradeço a Deus por essa conquista, pela minha saúde, pela minha família abençoada, por ter conhecido as pessoas abaixo citadas e por me guiar.

À minha mãe Marimil, ao meu pai Mauricio (*in memorian*), à minha avó Maria Antonieta, ao meu avô Milton (*in memorian*), à tia Nelly e toda família Nastari, ao meu tio Augusmar, ao meu tio Vilmar (*in memorian*), à tia Harriet e toda família Angelotte por serem quem são e me oferecerem tanto apoio, amor e carinho. Agradeço pelo incentivo nos momentos de incertezas e por compartilharem de minhas conquistas e alegrias.

À minha orientadora Prof. Dra. Ângela Luzo, por me receber em sua equipe, pela confiança, por me orientar na realização deste trabalho. Agradeço pela oportunidade a mim concedida e pelo privilégio de trabalhar ao seu lado. A finalização deste trabalho é fruto de sua orientação.

À minha amiga Dra. Adriana da Silva Santos Duarte, que participou de todo o processo desse trabalho e na minha formação profissional. Obrigada pelo constante incentivo, por dividir sua vasta experiência e por me ensinar. Obrigada pelos momentos de amizade.

Às minhas amigas Amanda, Maria Augusta, Raquel, Silvia e Vivian, por sempre estarem presentes (ainda que distantes fisicamente) nos momentos de alegria e dificuldades.

Aos amigos de trabalho Aline, Bruno e Raphael, pela ajuda na minha formação e pela presença nos momentos alegres e difíceis. Obrigada por me ajudar nos experimentos e pelos momentos de amizade.

Aos alunos, funcionários e a toda a equipe de trabalho do laboratório que me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho. Agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e por todo o carinho.

Resumo

Introdução: Cirrose e hepatite fulminante ocasionam diminuição severa da função hepática. Recentes avanços em terapia celular podem ser uma alternativa de tratamento. Objetivo desse estudo é analisar se MSCs obtidas de tecido adiposo (TA), sangue de cordão umbilical (SCU) e medula óssea (MO) se diferenciam em hepatócitos funcionais.

Materiais e Métodos TA foi obtido de lipoaspiração, SCU do Banco Público de Cordão Umbilical e MO da Unidade de Transplante de Medula Óssea. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos. TA foi submetido à digestão por colagenase, SCU e MO ao gradiente de Ficoll. As células obtidas foram cultivadas (DMEM meio baixa glicose, SFB) por 3 dias. As células aderentes foram tratadas com tripsina e cultivadas com meio acima, caracterizadas na quarta passagem por citometria de fluxo, microscopia confocal e diferenciadas para linhagem mesodermal para confirmação da diferenciação em MSCs. Tumorigênese foi avaliada por atividade da enzima Telomerase (TEA) e cariótipo. Diferenciação para hepatócitos: $1,0 \times 10^3$ MSCs foram semeadas em DMEM, HGF, bFGF, nicotinamida (7 dias), quando receberam meio de maturação (oncostatina, dexametasona e ITS) por 36 dias. A hepatogênese foi analisada por morfologia, expressão gênica (PCR-TR dos genes albumina (Alb), Alpha- fetoproteína (AFP), tirosina amino-transferase (TAT) e glutamina sintetase (GS) nos dias 9, 18, 25 e 36); funcionalidade (detecção da reserva de glicogênio, marcação PAS), absorção de Indocianina Verde e transplante (Tx) em camundongos BALB/SCID submetidos à hepatite fulminante (injeção peritoneal de tetracloreto de carbono, CCL₄). Tx: Infusão de MSCs indiferenciadas e diferenciadas em hepatócitos derivadas de TA e MO 48 hrs após injeção de CCL₄. Animais, sacrificados no 7º e 15º dias pós Tx. Avaliação da regeneração: análise histopatológica e marcação para albumina e ck19 humanos.

Resultados: MSCs foram obtidas das três fontes. Análises de telomerase e de cariótipo ausência de tumorigênese. MSCs adquiriram morfologia cubóide, semelhantes à hepatócitos. Expressão de albumina subiu progressivamente (3.7 no dia 9; 10 no dia 25). AFP inicialmente alta (4.5 dia 9; 5.0 no dia 18), diminuindo depois do dia 18 (3.0 dia 25 e 1.5 dia 36). GS aumentou 3 vezes mais durante processo de diferenciação. TAT foi maior que 6.6 (dia 25 e 36). Houve armazenamento de glicogênio e absorção de ICG. Apesar de ambas as MSCs diferenciadas e indiferenciadas serem capazes de regenerar o parênquima hepático, as indiferenciadas foram mais efetivas. Os hepatócitos regenerados foram positivos para albumina e ck19 humanos.

Conclusões: Embora

MSCs das três fontes sejam capazes de se diferenciarem em hepatócitos funcionais, quando transplantadas, as MSCs indiferenciadas foram mais efetivas. A demora na fase inicial de expansão das MSCs-SCU faz com o tecido adiposo e a medula óssea sejam fontes de células tronco mais adequadas para a regeneração hepática.

Abstract

Introduction: Liver cirrhosis and fulminant hepatitis greatly diminishes liver function. Cell therapy could be a new tool for treatment. This study aimed analyze whether mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from adipose tissue (AT), umbilical cord blood (UCB) and bone marrow (BM) could differentiate into functional hepatocytes. **Material and Method:** Adipocyte tissue (AT) was obtained from lipoaspiration, umbilical cord blood from Umbilical Cord Blood Bank and bone marrow (BM) from BM Transplantation Unit donors. All patients and donors signed free informed consent. AT was submitted to collagenase digestion, UCB and BM to Ficoll gradient. Cells were cultured (DMEM low glucose medium, SFB) for 3 days. Detached adherent cells, at passage four, were characterized as MSCs by flow cytometry, mesodermal lineages differentiation. Tumorigenicity was analyzed by telomerase enzyme activity and karyotype analyses. Hepatocyte differentiation protocol was: DMEM, HGF, bFGF, nicotinamide for 7 days; addition of maturation medium (oncostatin, dexamethasone and ITS) during 36 days. Hepatogenesis was analyzed by morphology and gene expression (RT-PCR) of albumin, AF, TAT and GS genes on day 9, 18, 25 and 36. Functionality by glycogen storage detection, indocyanine green (ICG) absorption and transplantation procedure. Undifferentiated-MSCs and hepatocyte-like cells derived from AT and BM-MSCs were injected 48 hrs post fulminant hepatitis performed by CCl₄ intraperitoneal injection in BALB/SCID mice. Animals were sacrificed at 7 and 15 days post transplantation for histopathological analyses. Human MCs origin was demonstrated by human albumin and CK19 markers positivity. **Results:** Despite UCB-MSCs expansion was low, all MSCs acquired cuboid form as hepatocyte-like cells, stored glycogen and absorbed ICG demonstrating functionality. Albumin expression gradually increased (3.7 on day 9, 10 on 25). AFP expression was high at the beginning (4.5 day 9; 5.0 on day 18), decreasing after day 18 (3.0 and 1.5 on day 25 day 36). GS expression increased 3 times during the differentiation process. TAT expression was greater than 6.6 on day 25 and 36. Transplantation results showed that meanwhile undifferentiated MSCs (U-MSCs) and derivate hepatocyte –like cell from BM and AT regenerated liver injury, U-MSCs was better. Regenerated hepatocytes were positive for human albumin and CK19. **Conclusion:** AT, BM and UCB-MSCs differentiated into functional hepatocytes, when transplanted, AT and BM-MSCs promoted better liver regeneration and might be a useful tool for regenerative medicine in liver injuries improving cell therapy in this field.

Lista de Abreviaturas

MSCs	Células tronco mesenquimais
TA	Tecido adiposo
AT-MSCs	Células tronco mesenquimais de tecido adiposo
SFB	Soro fetal bovino
CT	Células tronco
HLA	Sistema de histocompatibilidade
HSC	Célula tronco hematopoiética
SCU	Sangue de cordão umbilical
DMEM	Meio de Cultura de baixa glicose
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GCSF	Fator Estimulante de Crescimento
BSA	Albumina Sérica Bovina
TGF-β3	Fator de Crescimento Transformador β 3
ITSA	Insulina-Transferrina- Selenium
RNA	Ácido Ribonucléico
IBMX	3- isobutil- metilxantina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TS	Oligonucleotídeo de substrato
PR	Primer Reverso
H- CFU-C	Unidades Formadoras de Colônias de Haptócitos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GAPDH	Gliceraldeído- 3- fosfatodesidrogenase
HPRT	Hipoxantina Guanina Fosforribosil Transferase
AFP	Alfa Fetoproteína
GS	Glutamina Sintetase
TAT	Tirosina Amino Transferase

Lista de tabelas

TABELA 1. MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTOS PARA INDUÇÃO DA LINHAGEM MESODÉRMICA.....	26
--	----

Lista de figuras

FIGURA 1. IMUNOFENOTIPAGEM DAS MSCs POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
FIGURA 2. ANÁLISE MORFOLÓGICA- DIFERENCIAÇÃO PARA MSCs.....	37
FIGURA 3. MICROSCOPIA ÓPTICA E DE IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	38
FIGURA 4. DIFERENCIAÇÃO PARA LINHAGEM MESODÉRMICA	39
FIGURA 5. ATIVIDADE DA ENZIMA TELOMERASE.....	40
FIGURA 6. CARIÓTIPO	41
FIGURA 7. DIFERENCIAÇÃO HEPATOCÍTICA: ASPECTOS MORFOLÓGICOS	42
FIGURA 8. AVALIAÇÃO DO DEPÓSITO DE GLICOGÊNIO (COLORAÇÃO PAS) E ABSORÇÃO DE INDOCIANINA VERDE (ICG).....	43
FIGURA 9. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS GENES ALBUMINA, ALFA FETOPROTEÍNA, GLUTAMINA SINTETASE E TIROSINA AMINO TRANSFERASE	45
FIGURA 10. PARACETAMOL (300 μ L/KG PESO).....	46
FIGURA 11. CCL ₄ (250 E 500 μ L/KG PESO) 24 HORAS.....	47
FIGURA 12. TRANSPLANTE DE MSCs DE TA E MO INDIFERENCIADAS (7° DIA).....	48
FIGURA 13. TRANSPLANTE DE MSCs DE TA E MO INDIFERENCIADAS (15° DIA).....	49
FIGURA 14. TRANSPLANTE DE MSCs DIFERENCIADAS EM HEP OBTIDAS DE MO E TA (7° DIA).....	50
FIGURA 15. TRANSPLANTE DE MSCs DIFERENCIADAS EM HEP OBTIDAS DE MO E TA (15° DIA).....	51
FIGURA 16. CONFIRMAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA POR CÉLULAS HUMANAS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PARA ALBUMINA HUMANA.....	52
FIGURA 17. CONFIRMAÇÃO DA REGENERAÇÃO HEPÁTICA POR CÉLULAS HUMANAS: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA PARA CK19 HUMANO.....	53

Lista de quadros

QUADRO 1. SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	32
---------------------------------------	----

Lista de esquemas

ESQUEMA 1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSO.....	24
--	----

SUMÁRIO

Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Lista de Abreviaturas	X
Lista de tabelas	XI
Lista de figuras	XI
Lista de quadros.....	XI
Lista de esquemas.....	XI
SUMÁRIO	XII
1. Introdução	14
2. Objetivos	20
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1 Fontes de obtenção de células mesenquimais	23
3.2 Extração de células mesenquimais e cultura celular	23
3.2.1 Tecido adiposo	23
3.2.2 Sangue de Cordão e Medula Óssea	24
3.3 Caracterização das MSCs	25
3.3.1 Imunofenotipagem das MSCs através de citometria de fluxo	25
3.3.2 Diferenciação Mesodérmica “in vitro”	25
3.3.3 Citoquímica das MSCs	27
3.3.4 Investigação de capacidade tumorigênica	28
3.4 Diferenciação para linhagem hepatocítica.....	29
3.4.1 Concentração celular.....	29
3.4.2 Meio de cultura	29
3.4.3 Confirmação da diferenciação e da funcionalidade das células diferenciadas, “ <i>hepatocyte –like</i> ”.	30
3.4.4 Desenho do experimento.....	30
3.5 Experimento animal: Transplante em camundongos SCID/Balb-c	31
3.5.1 Camundongos	31
3.5.2 Anestesia.....	31

3.5.3	Agente hepatotóxico	31
3.5.4	Infusão celular	32
3.5.5	Primeiro experimento.....	33
3.5.6	Segundo experimento.....	33
3.6	Determinação da presença de células humanas no processo de regeneração hepática.....	34
3.7	Análise estatística	34
4.	Resultados	35
4.1	Caracterização das MSCs	36
4.1.1	Imunofenotipagem das MSCs por Citometria de Fluxo	36
4.1.2	Análise Morfológica	37
4.1.3	Diferenciação para linhagem mesodérmica	39
4.2	Investigação da capacidade tumorigênica.....	40
4.2.1	Atividade da enzima Telomerase.....	40
4.2.2	Citogenética.....	41
4.3	Diferenciação para Linhagem hepatocítica	41
4.3.1	Morfologia.....	41
4.3.2	Estudos funcionais.....	43
4.3.3	Análise de expressão gênica por RT-PCR:.....	44
4.4	Experimento Animal.....	46
4.4.1	Agente hepatotóxico	46
4.4.2	Transplante de camundongos.....	47
4.4.3	Determinação da presença de células humanas no processo de regeneração hepática.	52
5.	Discussão.....	54
6.	Conclusão	61
7.	Referências Bibliográficas	63
8.	Anexos.....	71

1. Introdução

O fígado possui uma capacidade regenerativa notável em resposta a uma lesão aguda, mas em situações onde a lesão hepática é muito severa como nas hepatites fulminantes, ou nas hepatopatias crônicas em decorrência da história natural das doenças de base, sua capacidade de regeneração fica comprometida. Em tais condições, o fígado é incapaz de manter a sua funcionalidade, sendo o transplante de fígado a opção terapêutica mais adequada. (Puglisi et al, 2011). No entanto, o baixo número de doadores de órgãos é um fator limitante considerável. De acordo com os dados da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos até junho de 2013, na nossa região há 739 pacientes na fila, aguardando uma doação. O tempo de espera está ao redor de 18 meses, o que para alguns pacientes é incompatível com a vida. A espera por um órgão diminuiu com a aplicação do escore MELD. O transplante de fígado entre doadores vivos contorna parcialmente a escassez de órgãos para transplante.

No final da década de 70, surgiram alguns estudos utilizando infusão de hepatócitos isolados, na tentativa de regenerar tecido hepático em pacientes portadores de hepatopatias, com insuficiência hepática grave (Mito *et al*, 1979; Overturf *et al*, 1999; Shafritz, 2000; Spangrude *et al*, 1988). Estes experimentos, inicialmente realizados em ratos, demonstraram que hepatócitos maduros, cultivados em tecido hepático danificado, são capazes de proliferar até o aparecimento de áreas de tecido hepático normal (Overturf *et al*, 1999; Spangrude *et al*, 1988). Estas células, com capacidade de proliferação e diferenciação apresentavam a mesma morfologia já descrita por Kinosita e Faber (1956) e também foram chamadas de células ovais por Shiojiri *et al*, 1991. Dependendo do micro ambiente onde estas células se encontram, podem originar hepatócitos, epitélio biliar, pancreático e intestinal tendo recentemente sido caracterizada como célula tronco de linhagem hepatocítica (Arkadopoulus *et al*, 1998; Onodera *et al*, 1994; Sell *et al*, 1984; Baumann *et al*, 1999; Matsusaka *et al*, 2000; Roskans *et al*, 1998; Strain, 2000).

Atualmente, as técnicas para o isolamento de hepatócitos maduros nem sempre apresentam resultados positivos quanto à sua viabilidade e não há procedimentos padronizados para avaliar a qualidade das mesmas. Além disso, os hepatócitos adultos podem ser expandidos por no máximo duas vezes *in vitro*, na presença de HGF, sendo que também são difíceis de manter em cultura e de criopreservar, podendo sofrer danos no processo de congelamento e descongelamento (Dianat et al, 2013).

Nos últimos anos, com o advento da medicina regenerativa, vários estudos, a partir de células tronco, vêm demonstrando a viabilidade de diferenciação para outras linhagens destas células (Huebert et al, 2014). As células tronco apresentam grande capacidade de autogeração, proliferação, expansão e diferenciação podendo inclusive reconstituir tecidos lesados e até formar um novo órgão (Guillot et al, 2007; Oertel et al, 2008). As principais fontes de obtenção de células tronco são o embrião e a linhagem hematopoiética. As de origem embrionária são células primordiais totipotentes, onde a capacidade de autogeração e diferenciação são infinitas, podendo se diferenciar em células das três linhagens germinativas.

A utilização de células embrionárias em protocolos terapêuticos ainda esbarra em vários problemas a serem resolvidos. A difícil manipulação, necessidade de compatibilidade, possibilidade de derivarem para teratocarcinogênese devido à totipotência e aos questionamentos éticos, com relação aos métodos utilizados em sua obtenção, dificultam a sua utilização clínica em médio prazo.

A inter-relação entre as linhagens hematopoiética e hepatocítica é motivo de estudo há vários anos. A própria ontogenia da linhagem hematopoiética, que tem o fígado como um dos locais de hemopoese no período entre a 12^a e 16^a semanas de vida fetal é prova desta inter-relação (Chui et al, 1975). Em 1985, Grossi et al demonstraram em camundongos a presença persistente de tecido hematopoiético no fígado, nas duas primeiras semanas após o nascimento. No final da primeira semana, houve reorganização das células hematopoiéticas que apresentavam distribuição difusa de células das linhagens eritróide, mielóide e linfóide que se organizaram em pequenas colônias, já comprometidas com uma determinada linhagem entre os cordões e parênquima hepático.

A célula tronco de linhagem hepatocítica foi descrita pela primeira vez em 1937 por Kinoshita et al que detectaram a presença de uma célula pequena oval em fígado de rato submetido a um corante carcinogênico. A célula oval apresenta pequeno núcleo ovóide com alta relação núcleo-citoplasmática. Tem capacidade de proliferação em região periportal do fígado de rato e de infiltração do parênquima, na vigência de lesão hepática (Faber et al, 1956). Em 1991 Shiojiri et al designou estas células de células ovais, dependendo do micro ambiente onde estas células se encontram, podem originar hepatócitos, epitélio biliar, pancreático e intestinal tendo recentemente sido caracterizada como célula tronco de linhagem hepatocítica. As células ovais do fígado expressam CD

49F e CD 29 ($\alpha 6$ e $\beta 1$ subunidades de integrinas) confirmando sua origem hepática (Suzuki et al, 2000), mas podem também apresentar marcadores de superfície presentes em linhagem hematopoiética como c-kit ligante e CD34⁺ sugerindo a origem comum destas linhagens (Arkadopoulos et al, 1998; Baumann et al, 1999; Blakolmer et al 1995; Lemmer et al, 1998; Matsusaka et al, 2000; Omori et al, 1997; Onodera et al, 1994; Petersen et al, 1998; Roskans et al, 1998; Sell et al, 1984; Strain et al, 2000).

Recentemente, observou-se que ratos submetidos a transplante de medula óssea, na vigência de quadro de falência hepática aguda, apresentavam regeneração. Também se descreveu após transplante de medula de doador do sexo masculino em paciente do sexo feminino, aparecimento de hepatócitos com cromatina sexual masculina, no fígado da paciente transplantada. (Alison et al, 2000; Peterson et al, 1999; Thiese et al, 2000). Em 2003, Kollet et al demonstraram que a injúria hepática levaria a um aumento do fator estimulante de crescimento de hepatócitos (HGF), e de fator 1 derivado de estroma (SDF-1) que em sinergismo com CXCR4, determinaria a migração das células precursoras CD34⁺ da medula óssea para o fígado lesado, reparando o tecido. Recentemente, vários grupos vêm descrevendo que a trans-diferenciação das células precursoras hematopoiéticas da medula óssea para outras linhagens ocorre por fusão celular e não por diferenciação propriamente dita (Alvarez-Dolado, et al 2003; Wang et al, 2003; Willenbring et al, 2004).

As células de linhagem hematopoiética são utilizadas há vários anos em procedimentos de terapia celular. O transplante de medula óssea é realizado há 40 anos. A dificuldade na sua utilização em terapia celular regenerativa se relaciona com a necessidade de total compatibilidade ao sistema de histocompatibilidade, HLA, e a dificuldade em se conseguir doadores compatíveis, mesmo com a existência dos grandes bancos internacionais de medula óssea.

A obtenção de células tronco periféricas, mobilizadas através do fator estimulante de crescimento de linhagem granulocítica (GCSF), parece não ser efetiva nos protocolos de diferenciação para outras linhagens. Elas seriam mais comprometidas com a linhagem hematopoiética. Entretanto, trabalhos sobre mobilização de pacientes hepatopatas com infusão de fator estimulante de crescimento de linhagem granulocítica (GCSF) vêm sendo publicados desde 2004. A estreita inter-relação entre a linhagem hematopoiética e a hepática faz com que este procedimento ainda hoje seja objeto de estudo (DeSilvestro et

al, 2004 Huiling et al, 2004; Quintana-Bustamante et al, 2006; Khan et al, 2008; Lemoli et al, 2006; Yanaki et al, 2005; Spahr et al, 2008). O G-CSF estimularia a mobilização e liberação para periferia, de células tronco da medula óssea, relacionadas com linhagem hepatocítica. Estas células se dirigiriam ao fígado lesado, mediadas por sinalizadores de migração trans-endotelial (SDF1, CXCR4) aonde se diferenciariam em hepatócitos. Este procedimento já foi relado na literatura em camundongos demonstrando regeneração hepática (Banas *et al*, 2009; Quintana-Bustamante *et al*, 2006, Lee *et al*, 2004; Liu *et al* 2006, Kakinuma *et al*, 2007; Taléns-Visconti *et al*, 2006 e 2007).

Nas últimas duas décadas, o sangue de cordão umbilical humano vem sendo exaustivamente estudado. A facilidade de obtenção, coleta, manipulação e as características de suas células precursoras indicam que elas possam ser bem utilizadas em terapia celular. Kakinuma *et al* 2003 e Newsome *et al*, 2003, demonstraram recentemente que o sangue de cordão pode ser utilizado para reconstituir linhagem hepática sem fusão. A imaturidade da linhagem linfóide do sangue de cordão umbilical humano permitindo a sua utilização em transplantes sem a total compatibilidade ao sistema de histocompatibilidade, HLA, e o advento dos bancos públicos de sangue de cordão, facilitaria a sua utilização em terapia regenerativa. O aparecimento de novas técnicas possibilitou uma melhor avaliação das células transplantadas, demonstrando a presença de células do doador em outros órgãos que não a medula (cérebro, fígado, coração, pele, pulmão, rim). Este fato deu origem à hipótese de que, células tronco de linhagem hematopoiética possuiriam plasticidade para, além de reconstituir linhagem hematopoiética, se diferenciarem em outras linhagens (Chiu *et al*, 2003; Beltrami *et al*, 2007).

Recentemente, estudos demonstraram que as células mesenquimais (MSCs), teriam capacidade para se diferenciar em células originárias de linhagem mesodérmica (osso, gordura, cartilagem, tendões) assim como das linhagens endo e ectodérmica podendo originar cardiomiócitos, neurônios, células hepáticas dentre outras (Anghileri *et al*, 2008; Chang *et al*, 2007; Weir *et al*, 2008; Yamamoto *et al*, 2008). Apesar de sua principal fonte de obtenção ser a medula óssea, pode ser obtida de outros tecidos como sangue de cordão, fígado fetal, líquido amniótico, polpa dentária e tecido adiposo. Entretanto, a utilização da medula óssea, como fonte de obtenção de células mesenquimais, talvez na diferenciação para linhagem hepatocítica, não seja adequada. Recente estudo publicado demonstrou que células mesenquimais derivadas de medula

óssea não foram capazes de regenerar o fígado de ratos submetidos a uma hepatite fulminante (Popp *et al*, 2007). A obtenção de MSC de tecido adiposo gera uma maior quantidade de células além de ser um procedimento de fácil realização.

Estudos de caracterização demonstraram que as MSCs não expressam antígenos de histocompatibilidade, HLA, classe II, de moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 nem marcadores da linhagem hematopética CD45, CD3, CD31. Expressam em pouca quantidade HLA classe I. Possuem também capacidade de imunomodulação. Dependendo do estímulo imunossuprimem ou estimulam. As células mesenquimais mediarão secreção de fatores antiproliferativos, inibindo a proliferação de linfócitos T e a ação citotóxica. Atuam também em linfócitos NK e impedem a maturação e a função de células dendríticas. Na presença de Interferon gama, as mesenquimais acabam liberando para superfície os antígenos HLA classe I intranucleares aumentando a imunogenicidade (Locatelli *et al*, 2007; Chamberlain, *et al*, 2007). Devido a capacidade de imunomodular resposta imune e conduzir regeneração tecidual, vários estudos em modelos animais estão avaliando a potencialidade destas células no tratamento de doenças auto-imunes, como esclerose múltipla, diabetes, lupus eritematoso sistêmico, dentre outras (Locatelli *et al*, 2007). A utilização das MSC no tratamento da doença enxerto versus hospedeiro vem demonstrando resultados animadores (Locatelli *et al*, 2007). A fácil obtenção de tecido adiposo através de procedimentos de lipoaspiração torna as células mesenquimais derivadas de tecido adiposo em fonte ideal para terapia celular de diferenciação. O estabelecimento nos últimos anos de uma política pública de bancos de sangue de cordão facilita também a sua utilização como fonte de MSC.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar a capacidade das células mesenquimais obtidas de sangue de cordão umbilical (SCU), tecido adiposo (TA) e medula óssea (MO), humanos, em se diferenciarem em hepatócitos.

Verificar se as células diferenciadas são funcionais através da análise da capacidade de estocarem glicogênio e de absorverem indocianina verde e através de experimento animal onde camundongos serão submetidos à hepatite fulminante.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar a efetividade das fontes de obtenção de células mesenquimais no processo de diferenciação para a linhagem hepática.

Verificar se as a capacidade das células mesenquimais indiferenciadas e diferenciadas em células semelhantes à hepatócitos teriam capacidade de regenerar parênquima hepático de camundongos SCID/Balb-c submetidos à hepatite fulminante.

3. Material e Métodos

3.1 Fontes de obtenção de células mesenquimais

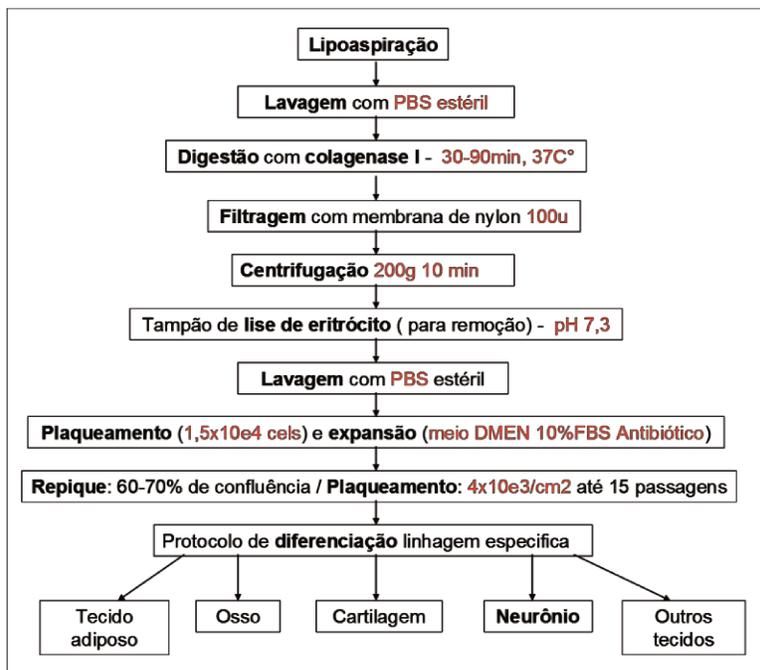
As células mesenquimais foram obtidas das seguintes fontes: tecido adiposo de 03 pacientes, do sexo feminino, hígdas submetidas à cirurgia de lipoaspiração com anestesia geral e ou local; sangue de cordão umbilical humano de 03 gestantes doadoras, do banco público de sangue de cordão do Hemocentro da Unicamp, que não tenham atingido volume ou celularidade suficientes para serem congeladas para o banco e de medula óssea de 03 doadores do serviço de transplante de medula óssea do Hemocentro da Unicamp. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado a todos os pacientes submetidos à lipoaspiração que tenham concordado com a doação, aos doadores de medula óssea e às mães doadoras de sangue de cordão umbilical.

3.2 Extração de células mesenquimais e cultura celular

3.2.1 Tecido adiposo

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com PBS (“phosphate-buffered saline”) para remover traves de tecido conjuntivo e hemácias. Para cada 10 g de tecido, a proporção das substâncias para o tampão de digestão, que foi adicionado a seguir, é 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de albumina sérica bovina (BSA), 20ml de DMEM baixa glicose e 10µl de gentamicina. A mistura foi tratada em banho-maria à 37°C por 30 minutos, agitando o recipiente a cada 5 minutos. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida com 10 ml de soro fetal bovino (SFB). A seguir, foi centrifugada por 15 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet re-suspenso em 10 ml de DMEM baixa glicose com 10% do volume de SFB. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 3 dias consecutivos e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atinjam a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. Foi realizada então a passagem das células, ou seja, elas foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e expandidas até a 4ª passagem da cultura, quando foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Esquema 1).

Esquema 1. Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo



3.2.2 Sangue de Cordão e Medula Óssea

O sangue de cordão coletado e medula óssea foram diluídos 1:2 em meio DMEM baixa glicose e as células mononucleares foram separadas por centrifugação a 700g (1500 rpm) por 30 minutos e TA, em gradiente de Ficoll-Hypaque de densidade 1.077g/ml. Após a centrifugação, o anel celular na interface entre as fases orgânicas (Ficoll-Hypaque, fase inferior) e aquosa (fase superior) foi recolhido com pipeta Pasteur e transferido para um tubo limpo. As células mononucleares foram lavadas duas vezes por meio de centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O botão de células foi ressuspenso em meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de SFB e as células foram incubadas em estufa umidificada a 37°C contendo 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por 3 dias consecutivos e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atingiram a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células então foram retiradas da garrafa por adição de uma solução de tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), à esse procedimento dá-se o nome de passagem. As células foram expandidas até a 4^a passagem da cultura.

3.3 Caracterização das MSCs

3.3.1 Imunofenotipagem das MSCs através de citometria de fluxo

Após a purificação e expansão das células mesenquimais indiferenciadas estas foram caracterizadas fenotipicamente por meio de citometria de fluxo empregando um conjunto de anticorpos monoclonais específicos. Foram utilizados os anticorpos CD90 (Thy-1), CD105 (SH-2/endogлина), CD73 (SH3/SH4) e Stro-1 que correspondem aos antígenos de superfície expressos pelas células mesenquimais. Os marcadores não expressos como CD34, CD45, CD14, CD31 e HLA-DR também foram utilizados.

Foram utilizadas 1×10^5 células diluídas em 100 μ L de PBS e 5 μ L de anticorpo específico em cada reação de marcação. Esta mistura foi mantida a 4°C por 30 minutos e protegida da luz. As células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS por meio de centrifugação a 1500rpm por 5 minutos e fixadas em 500 μ L de paraformaldeído 1%. Foram mantidas em geladeira até o momento da aquisição.

Os controles negativos foram realizados a partir de amostras de células sem marcação para verificação de auto-fluorescência e para os controles positivos, células marcadas com isotipos controles correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur e a análise dos dados foi realizada utilizando o programa CellQuest.

3.3.2 Diferenciação Mesodérmica “in vitro”

Para comprovar a obtenção de células mesenquimais, as células obtidas pelos procedimentos acima foram diferenciadas em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso, utilizando protocolos e meios específicos conforme descrito na literatura (Chang et al, 2007; Hisanaga et al, 2008). Na Tabela 1 os meios de cultura e suplementos para indução de adipogênese, osteogênese e condrogênese são descritos.

Tabela 1. Meios de cultura e suplementos para indução da linhagem mesodérmica.

<i>Diferenciação</i>	<i>Meio</i>	<i>Suplementos</i>
<i>Adipogênese</i>	DMEM Alta Concentração de Glicose 10%FSB	<u>Dexametasona</u> – 5×10^{-8} M 3-isobutil- <u>metilxantina</u> – $4,5 \times 10^{-4}$ M Insulina – 5ug/ml Indometacina – 3×10^{-4} M
<i>Osteogênese</i>	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	<u>Dexametasona</u> – 5×10^{-8} M Ácido Ascórbico – $2,8 \times 10^{-4}$ M β -glicerol-fosfato – 10^{-2} M
<i>Condrogênese</i>	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	Ácido Ascórbico – 50 ug/ml TGF β 3– 25ng/ml Insulina – 6,25ug/ml <u>Dexametasona</u> – 1mM Albumina Humana- L- <u>prolina</u> 0,4mM

3.3.2.1 Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação em condrócitos, cerca de 1×10^6 células mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram transferidas para um tubo Falcon de 15ml com o meio indutor e centrifugadas a 800rpm por 5 minutos para permitir a formação do botão celular. O meio indutor da diferenciação condrogênica consistiu em meio DMEM baixa glicose sem SFB, suplementado com 100ng/mL de Transforming Growth Factor- β 3 (TGF- β 3), 100nM de piruvato de sódio, 1mM de dexametasona, 50nM de ácido ascórbico, 0,5X insulina-transferrina-selenium A (ITSA) e 0,2% de albumina humana. A cada três dias metade do meio de cultivo foi trocado, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação condrogênica varia de 14 a 25 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

3.3.2.2 Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação em osteócitos, 1×10^5 células/cm² mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de SBF, suplementado com 0,1mM de dexametasona, 200 mM de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato. A cada três dias foi trocado o meio de cultivo, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação osteogênica varia de 25 a 30 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

3.3.2.3 Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação em adipócitos, 1×10^5 células/cm² mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 15% de SBF, suplementado com 1mM de dexametasona, 10mg/ml de insulina, 0,45mM de 3-isobutil-metilxantina (IBMX) e 100 mM de indometacina. A cada três dias foi trocado o meio de cultivo, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação adipogênica é de 14 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

3.3.3 Citoquímica das MSCs

A análise citoquímica das células mesenquimais diferenciadas foi realizada por meio da marcação com corantes celulares específicos e observação por microscopia óptica convencional.

Para a diferenciação adipogênica, as de células foram coletadas, fixadas com uma solução de formaldeído 1X durante 30 minutos e coradas com uma solução de Oil Red O a 0,3% durante 20 minutos e contracoradas com hematoxilina. O Oil Red O permite a visualização de acúmulo intracelular de lipídeos.

Para a diferenciação osteogênica, as células coletadas foram fixadas em etanol 50% durante 15 minutos a 4°C e coradas com uma solução de Alizarin Red S 1% sob agitação constante por 45 minutos. O corante permite observar a calcificação na matriz extracelular.

Células submetidas à diferenciação condrogênica foram coletadas e marcadas com Azul de Toluidina a 1%. Após a retirada do corante as células ficaram expostas à temperatura ambiente por 2 horas e fixadas durante 1 minuto em soluções de etanol 70%, 90% e 100% respectivamente. Este tipo de marcação permitiu a visualização de uma matriz extracelular rica em proteoglicanos.

3.3.4 Investigação de capacidade tumorigênica

3.3.4.1 Atividade da enzima telomerase

A verificação da atividade da enzima telomerase foi realizada com células em 3 passagens distintas: 4^a, 8^a e 12^a. A metodologia adotada seguiu protocolo do kit TRAPeze® Telomerase Detection Kit, S7700 (Chemicon International, USA). O procedimento consiste em dois sistemas enzimáticos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na primeira etapa da reação, a telomerase adiciona um número de repetições teloméricas (GGTTAG) para a terminação 3' de um oligonucleotídeo de substrato (TS). Na segunda etapa, o material é amplificado por PCR usando o TS e primer reverso (RP), gerando uma escada de produtos com base de 6 incrementos a partir de 50 nucleotídeos: 50, 56, 62, 68, etc. Utiliza-se um modelo (TSK1) para amplificação de um padrão interno de 36 pb positivo, o que torna possível quantificar a atividade da enzima telomerase com mais precisão e identificar amostras falso-negativas que contêm inibidores de Taq polimerase.

3.3.4.2 Citogenética

A obtenção das metáfases cromossômicas foi obtida através de células em ativo processo de divisão celular, em culturas com 70% a 80% de confluência. Tratadas com colchicina (10µg/mL) em concentração de 100µL/mL, adicionada diretamente à cultura e

incubadas overnight a 37 °C. As células foram removidas da placa com uso de solução de tripsina/EDTA por 3 min a 37 °C, lavado com tampão PBS 1X, coletado em tubos cônicos de 15mL e agrupadas por centrifugação a 1200g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensão em 5mL de solução de KCl 0,075 mol/L a 37 °C por 12 min. As células foram fixadas com solução de metanol/ácido acético (3:1) e analisadas pela técnica de bandeamento G.

As lâminas foram analisadas sob um microscópio ótico em objetivas de 10x e 100x. Imagens das metáfases individuais foram capturadas e cariotipadas utilizando um sistema automatizado de imagem de citogenética ASI (Applied Spectraltral Imaging, Printed - Israel), através do Software BAND VIEW® 5.5.

3.4 Diferenciação para linhagem hepatocítica

3.4.1 Concentração celular

Foram semeadas 1×10^3 células/cm² mesenquimais obtidas da quarta passagem de expansão/poço em placas de cultura revestidas com colágeno tipo 1 (Becton e Dickson, San Jose, California).

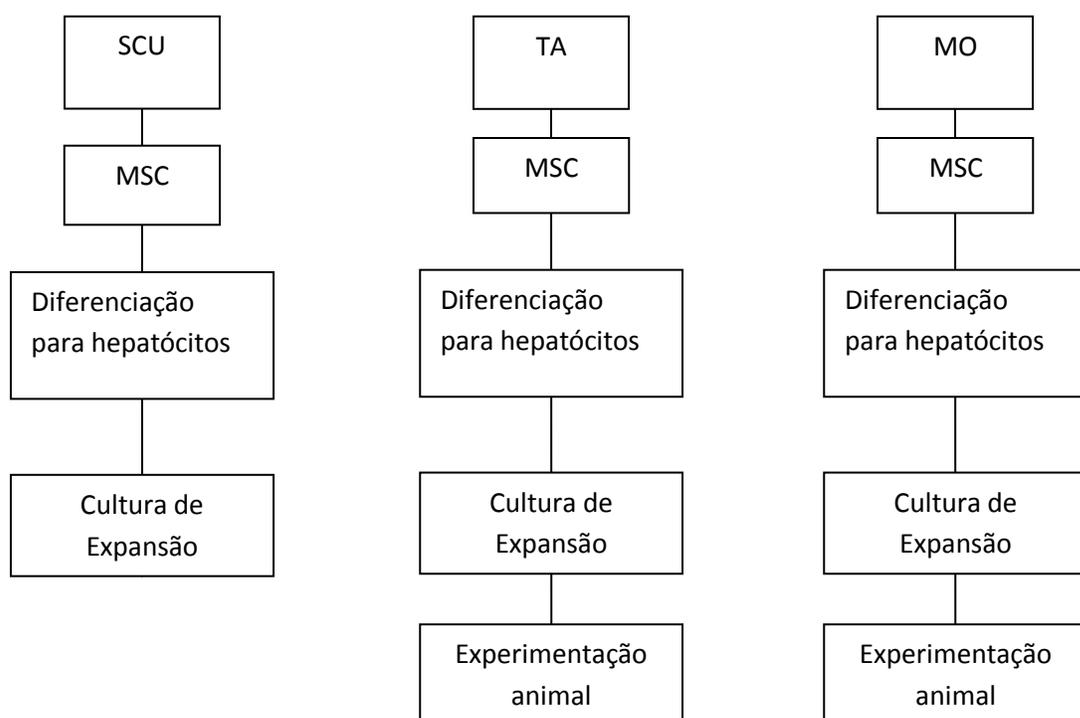
3.4.2 Meio de cultura

As MSCs-TA, MSCs-SCU e MSCs-MO antes de serem submetidas ao protocolo de diferenciação, foram semeadas em discos de cultura contendo colágeno tipo I. Ao atingirem confluência eram submetidas à privação de soro por 2 dias na presença de 20ng/mL de EGF e 10ng/mL bFGF. Após as células foram submetidas ao meio de diferenciação que consistia de 20ng/mL de HGF, (PeproTech, Inc Rocky Hill - New Jersey – USA); 10ng/mL de bFGF, 0.61g/L de nicotinamida (US Biological, Swampscott - Massachusetts – USA); 20ng/mL de oncostatin humano (PeproTech, Inc Rocky Hill - New Jersey – USA), 1µmol/L de dexametasona (CALBIOCHEM, CN Corporation, La Jolla - California – USA) e 50mg/mL de ITS premix (GIBCO ,Invitrogen Corporation, Grand Island - New York - USA. O meio era trocado duas vezes na semana. A cultura teve duração de 36 dias.

3.4.3 Confirmação da diferenciação e da funcionalidade das células diferenciadas, “*hepatocyte-like*”.

A diferenciação para linhagem hepatocítica foi confirmada através de análise morfológica por microscopia óptica e da análise funcional através de três métodos: método de Ácido Periódico de Schiff (PAS), que analisa a presença de depósitos de glicogênio, uma das principais funções hepáticas; pelo método da absorção de indocianina verde, corante absorvido exclusivamente por hepatócitos, observado por microscopia óptica; e através da expressão de genes relacionados com o processo de diferenciação hepatocítica (albumina, glutamina sintetase e tirosina amino transferase) por PCR em tempo real (RT-PCR). Os genes gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) e hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HPRT) foram utilizados com controle interno. Os estudos funcionais com a coloração de PAS e a absorção de indocianina verde foram realizados nas diferentes fases da cultura de diferenciação, aos 9, 18, 25 e 36 dias de cultura.

3.4.4 Desenho do experimento



3.5 Experimento animal: Transplante em camundongos SCID/Balb-c

3.5.1 Camundongos

Os experimentos foram realizados com camundongos imunossuprimidos SCID/Balb-c, livres de patógenos específicos, do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP e de colônias do CEMIB. Foram utilizados animais de sexo masculino com idade entre 8 e 12 semanas de vida. Os níveis de imunoglobulinas dos camundongos foram determinados pelo método de Immunoblot (Gordon et al, 1991) apresentando nível de imunoglobulina sérica inferior a 2,5 µL/mL. Os animais foram mantidos sob condições assépticas pré-determinadas pelo CEMIB em isoladores contendo de 4 a 6 animais, no biotério do Hemocentro UNICAMP, onde foram fornecidos maravalha e água previamente esterilizadas e ração, sendo as colônias monitoradas pela Seção de Controle de Qualidade Sanitária do CEMIB, com metodologias descritas por Gilioli et al, 1996 e Gilioli et al, 2000. Todos os procedimentos com os camundongos foram realizados em ambiente estéril de fluxo laminar.

3.5.2 Anestesia

Para a realização dos experimentos, os animais foram anestesiados previamente com Ketamina, 80mg/Kg de peso do animal e Xylazina 10 mg/kg de peso do animal, diluído em PBS estéril, via intraperitoneal.

3.5.3 Agente hepatotóxico

No intuito de descobrir qual seria o agente hepatotóxico mais adequado para realização da hepatite fulminante pré-transplante nos camundongos, foi realizado um experimento inicial para padronização da dose e averiguação das lesões provocadas pelo

tetracloreto de carbono (CCl₄) e Paracetamol após 24 e 48 horas da administração desses agentes hepatotóxicos.

Os animais foram submetidos à anestesia previamente ao procedimento e foram separados em 7 grupos com 3 animais cada: Controle negativo, CCl₄ 250µL/kg peso de animal (24 horas), CCl₄ 250µL/kg peso de animal (48 horas), CCl₄ 500µL/kg peso de animal (24 horas), CCl₄ 500µL/kg peso de animal (48 horas), Paracetamol 300µL/kg peso de animal (24 horas) e Paracetamol 300µL/kg peso de animal (48 horas). Para preparo das soluções dos agentes hepatotóxicos, foi utilizado como veículo oleoso azeite de oliva quantidade suficiente para 100µL de solução/animal. Nos controles negativos não foi administrada nenhuma solução. Após o tempo determinado para cada grupo (24 ou 48 horas), os animais foram sacrificados por destroncamento espinal, os fígados foram retirados e encaminhados para confecção das lâminas histopatológicas.

3.5.4 Infusão celular

As células foram injetadas em veia orbitária dos camundongos e totalizando 1x10⁶ células/camundongo. Devido a dificuldade de expansão das células derivadas de sangue de cordão umbilical, os experimentos contaram somente com as células derivadas de tecido adiposo e de medula óssea. Os animais foram subdivididos em 10 grupos conforme quadro abaixo, segundo as células a serem infundidas e o tempo para sacrifício após transplante. O grupo de controle negativo (CCL₄) recebeu o agente indutor de lesão, mas não houve infusão celular.

Quadro 1. Infusão Celular

Avaliação	TA		MO		CCL ₄
	Hep	MSCs	Hep	MSCs	
Sacrifício D 07	3 C	3 C	3 C	3 C	1 C
Sacrifício D 15	2C	2 C	2 C	2 C	2 C

Legenda: **TA**: tecido adiposo humano; **MO**: medula óssea; **MSCs**: células tronco mesenquimais; **C**: camundongo SCID/Balb-c.

3.5.5 Primeiro experimento

O experimento foi realizado com 5 grupos:

G1 (Controle negativo): 1 animal

G2 (MSCs-MO): 2 animais;

G3 (MSCs-TA): 2 animais;

G4 (HEP-MO): 2 animais;

G5 (HEP-TA): 2 animais

O peso dos animais variou da seguinte forma: 05 animais com peso médio de 19,2g, 2 animais com peso médio de 24g, 03 animais com peso médio de 10,7g. Os animais de 19,2g receberão 9,6 μ L de tetracloreto + 90,4 μ L de azeite, via intra peritoneal. Os animais de 24g receberam cada um 12 μ L de tetracloreto + 88 μ L de azeite, via intra peritoneal. Os animais de 10,7g receberam 5,34 μ L de tetracloreto + 94,66 μ L de azeite, via intra peritoneal. Após 48h da injeção de CCL₄, foram infundidas as células DMEM na concentração $1 \times 10^6/100\mu\text{L}/\text{animal}$. Os animais foram sacrificados após 07 dias do transplante de células.

3.5.6 Segundo experimento

O experimento foi realizado com 5 grupos de animais:

G1 (Controle de CCL₄)= 02 animais;

G2 (MSCs-MO) = 03 animais;

G3 (MSCs-TA)= 03 animais;

G4 (HEP-MO)= 03 animais;

G5 (HEP-TA)= 03 animais.

O peso dos animais variou da seguinte forma: 01 animal com 15g, 2 animais com peso médio de 18g, 01 animal com 25g. O animal de 15g recebeu então 7,5 μ L de

tetracloreto + 92,5µL de azeite, via intra peritoneal. Os animais de 18g receberam cada um 9,0µL de tetracloreto + 91,0µL de azeite, via intra peritoneal. O animal de 25g recebeu 12,5µL de tetracloreto + 87,5µL de azeite, via intra peritoneal. Após 48h da indução da lesão hepática, foram infundidas as células suspensas em DMEM na concentração $1 \times 10^6/150\mu\text{L}/\text{animal}$. Um animal de cada grupo foi sacrificado no 7º dia pós infusão, o restante pós 15 dias.

3.6 Determinação da presença de células humanas no processo de regeneração hepática

A determinação da presença de células humanas no processo de regeneração hepática foi realizada através da análise histopatológica dos animais transplantados. Os animais foram sacrificados por destroncamento espinal e o fígado de cada camundongo foi coletado. As amostras foram fixadas em solução de formalina tamponada durante 24 horas e depois processadas em banhos sucessivos de álcool e xilol por 1 hora em cada banho a 60°C e imersas em dois banhos sucessivos de parafina na mesma temperatura. Posteriormente foram emblocadas e cortadas em micrótomo com espessura de 5µm até fixação e confecção dos blocos em parafina para realização dos cortes histológicos. As lâminas foram confeccionadas e coradas com corante para albumina humana (Santa Cruz®, diluição do reagente 1/600 em EDTA) e CK19 humano (Santa Cruz®, diluição do reagente 1/200 em Citrato de Sódio). Essas lâminas foram analisadas por microscopia óptica.

3.7 Análise estatística

A expansão celular nas culturas e a porcentagem de células diferenciadas foram analisadas pelo teste estatístico de Wilcoxon.

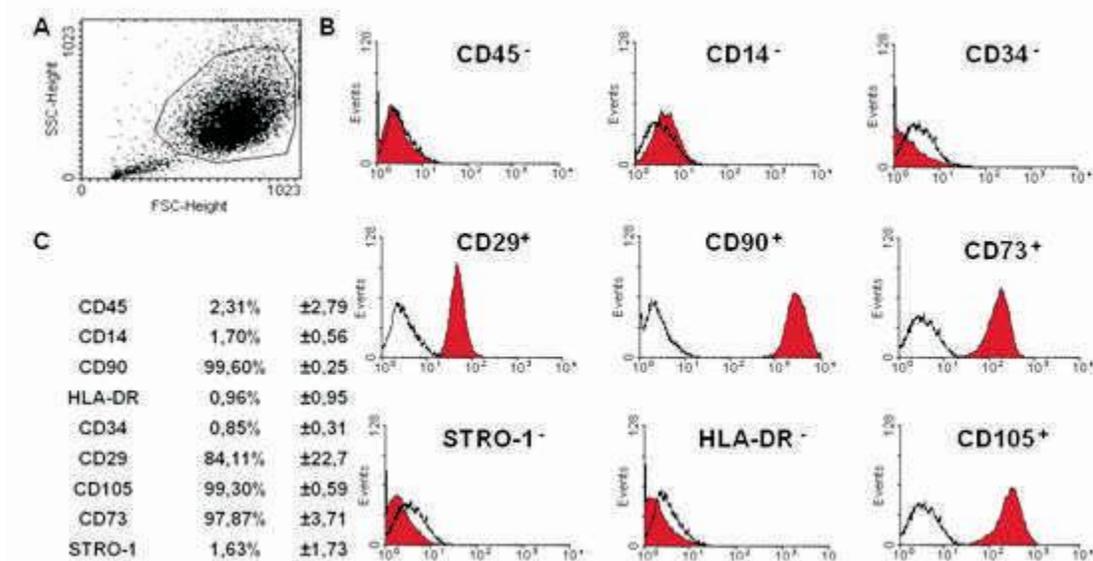
4. Resultados

4.1 Caracterização das MSCs

4.1.1 Imunofenotipagem das MSCs por Citometria de Fluxo

As células analisadas apresentaram homogeneidade quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e possuíam o mesmo perfil de expressão dos marcadores descrita; CD90 (99,60% \pm 0,25), CD105 (99,30%), CD73 (97,85% \pm 3,71) e CD29 (99,52% \pm 2,27), sendo que o marcador CD90 apresentou marcação mais intensa em todos os experimentos, enquanto os marcadores CD34 (0,85% \pm 0,31), CD45 (2,31% \pm 2,79) e HLA-DR (0,96% \pm 0,95) mostraram baixa expressão (Figura 04).

Figura 1. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

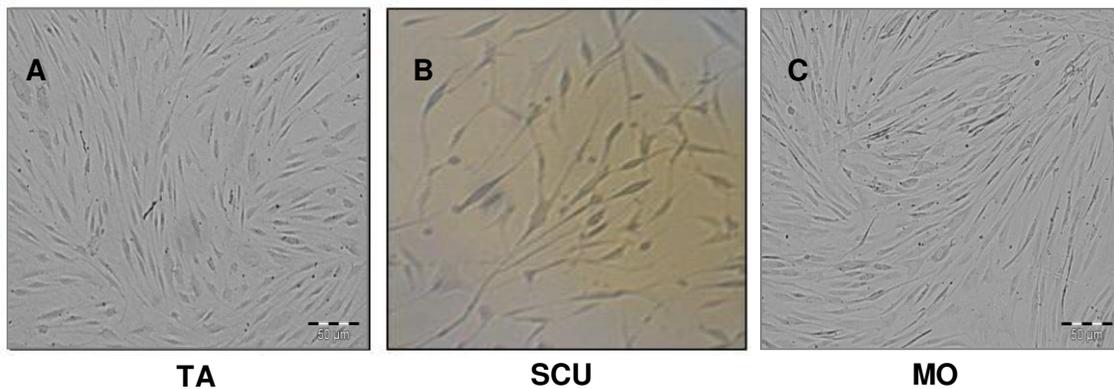


Legenda: **A:** Dot-Plot das células e a região na qual as MSC se encontram, mostrando característica homogênea dessa população. **B:** Painel de histogramas dos marcadores positivos (CD105, CD90, CD29 e CD73) e de marcadores negativos (HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e CD34) em vermelho indica o marcador específico e em branco esta representado o controle (IgG com fluoro cromo) **C:** Tabela com as medias das porcentagem dos marcadores positivos e negativos das MSC.

4.1.2 Análise Morfológica

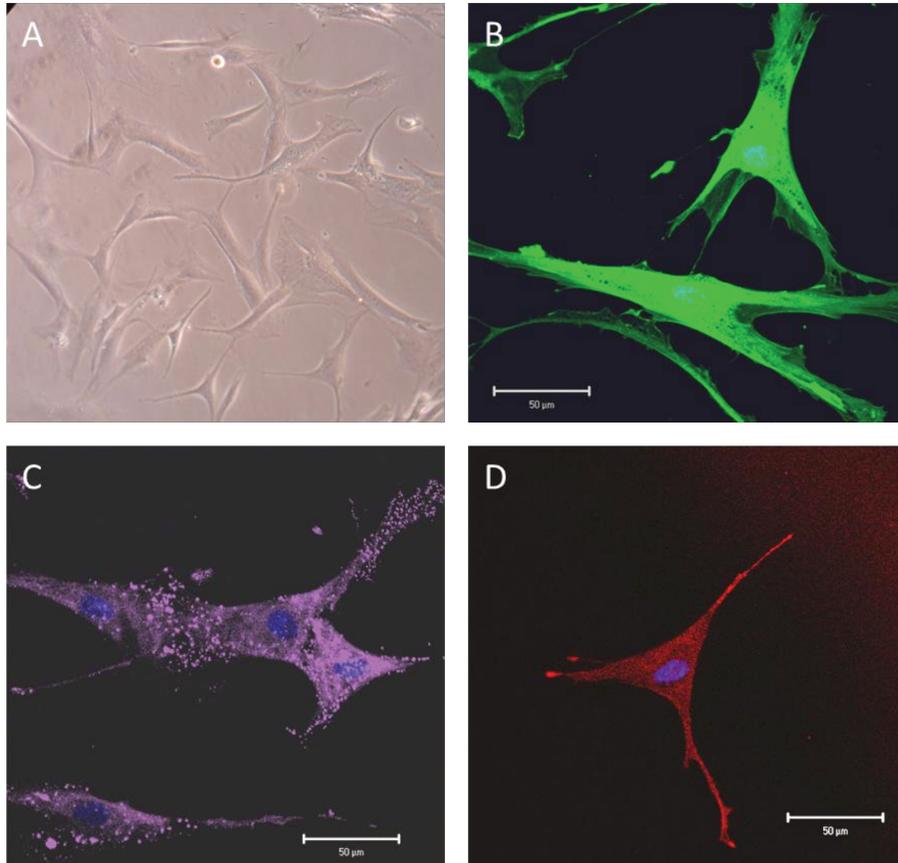
A partir do terceiro dia de cultura já foi possível observar células aderidas na placa de cultura, com morfologia fusiforme semelhante à fibroblasto, compatível com células mesenquimais (figura 1- A, B, C). Na quarta passagem, foi possível observar uma população homogênea com morfologia fibroblástica, citoplasma extenso e achatado e prolongamentos não ramificados (Figura 2A).

Figura 2. Análise morfológica- diferenciação para MSCs



Legenda: A: Células aderentes obtidas de tecido adiposo na quarta passagem de expansão apresentando morfologia fibroblastóide (aumento de 10x). B: Células aderentes obtidas de sangue de cordão umbilical, após a quarta passagem de expansão, apresentando morfologia fibroblastóide, aumento de 10x. C: Células aderentes obtidas de medula óssea, após a quarta passagem de expansão, apresentando morfologia fibroblastóide, aumento de 10x.

Figura 3. Microscopia óptica e de imunofluorescência

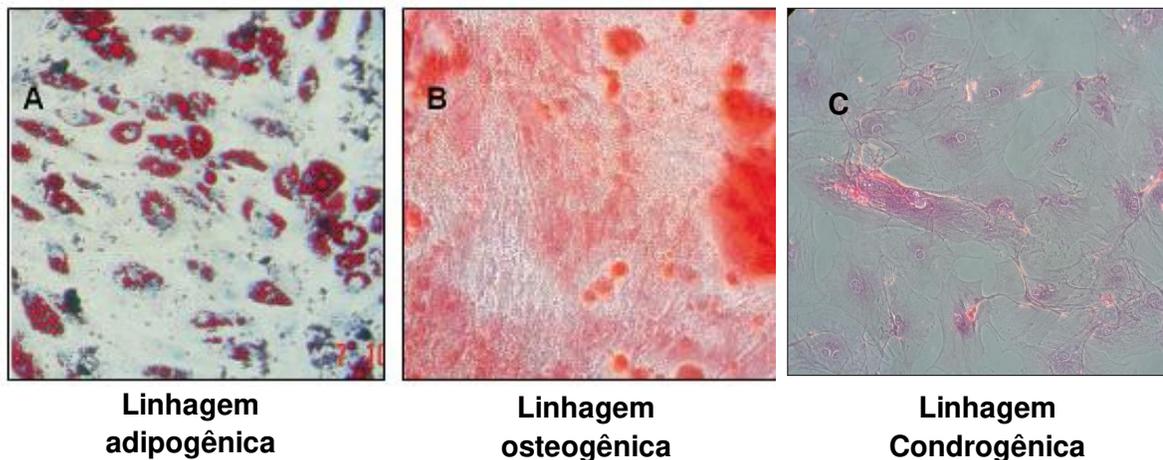


Legenda: Microscopia óptica e de imunofluorescência de AT-MSC na quarta passagem, aumento de 40X. **A)** foto de microscopia óptica com aumento de 10x. **B-D)** Imunocitoquímica das AT-MSC dos marcadores CD73(verde), CD90 (roxo), CD105 (vermelho) e nuclear (DAPI) em aumento de 40x.

4.1.3 Diferenciação para linhagem mesodérmica

Quando estas células foram submetidas aos protocolos de diferenciação com meios específicos para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica (linhagem mesodérmica) descritos em materiais e métodos, foram capazes de se diferenciar em adipócitos, osteócitos e condrócitos, demonstrando sua multipotência celular e comprovando que realmente são células tronco mesenquimais. (figura 3 A, B e C).

Figura 4. Diferenciação para linhagens mesodérmicas



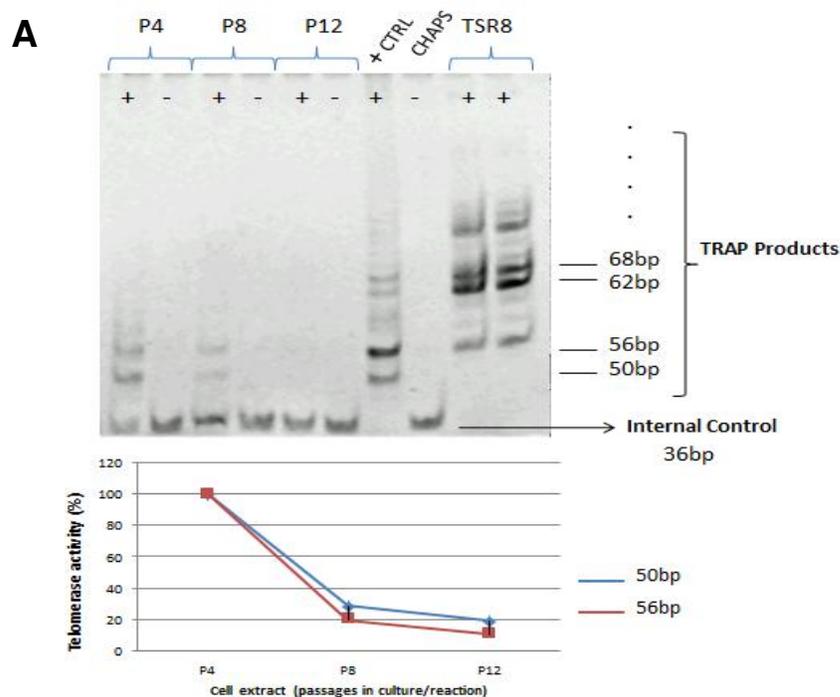
Legenda: **A:** Após a diferenciação adipogênica, as MSCs das três fontes apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com Oil Red. Elas perderam sua morfologia fibroblástica e adquiriram forma redonda e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos. **B:** a imagem apresenta regiões avermelhadas em volta das células diferenciadas, as quais se supõem que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. As células fibroblásticas alteraram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrimo toda placa de cultura e em alguns lugares formando aglomerados celulares. **C:** Após três semanas, as MSCs induzidas para diferenciação condrogênica foram coradas com Alcian blue. As células das três fontes apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento do citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada.

4.2 Investigação da capacidade tumorigênica

4.2.1 Atividade da enzima Telomerase

O resultado da análise da atividade da enzima telomerase foi possível observar o padrão de normalidade com 100% de atividade da telomerase em P4 e o decréscimo de atividade nas passagens mais tardias, P8 e P12 para as células mesenquimais derivadas de TA, SC e MO (Figura 4 A e B).

Figura 5. Atividade da enzima telomerase

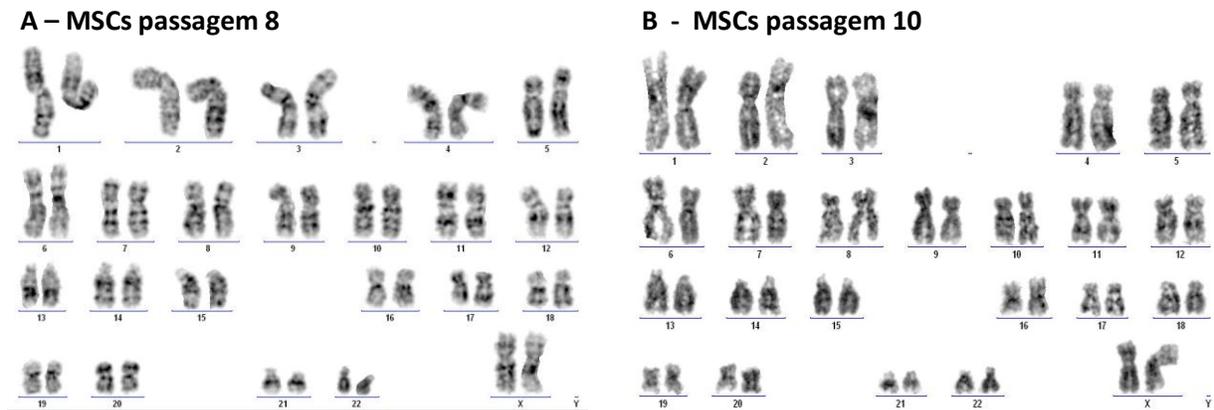


Legenda: As células foram testadas em três diferentes passagens, “*in vitro*” (P4, P8 e P12) em relação a expressão da atividade da enzima telomerase através de “*TRAP assay*”. A atividade de telomerase foi detectada utilizando duas bandas de concentrações diferentes. O ensaio tem como controles positivos internos TSR8 e uma linhagem celular como control +. O controle negativo foi realizado com amostras do mesmo período a ser analisado, aquecidas 85°C, no intuito de negativar a enzima telomerase. O tampão de lise CHAPS também foi utilizado como controle negativo. As MSCs na P4 demonstraram a presença de bandas com 56 bp e 50 bp que se relacionaram com uma atividade de 100%. Houve diminuição das bandas no decorrer das passagens, P8 e P12, com respectiva diminuição na atividade de telomerase.

4.2.2 Citogenética

O resultado da análise de estabilidade cromossômica das MSCs derivadas de tecido adiposo, sangue de cordão umbilical e medula óssea demonstrou que não houve anomalias e os cromossomas se mantiveram estáveis, conforme demonstrado na Fig. 6.

Figura 6. Cariótipo

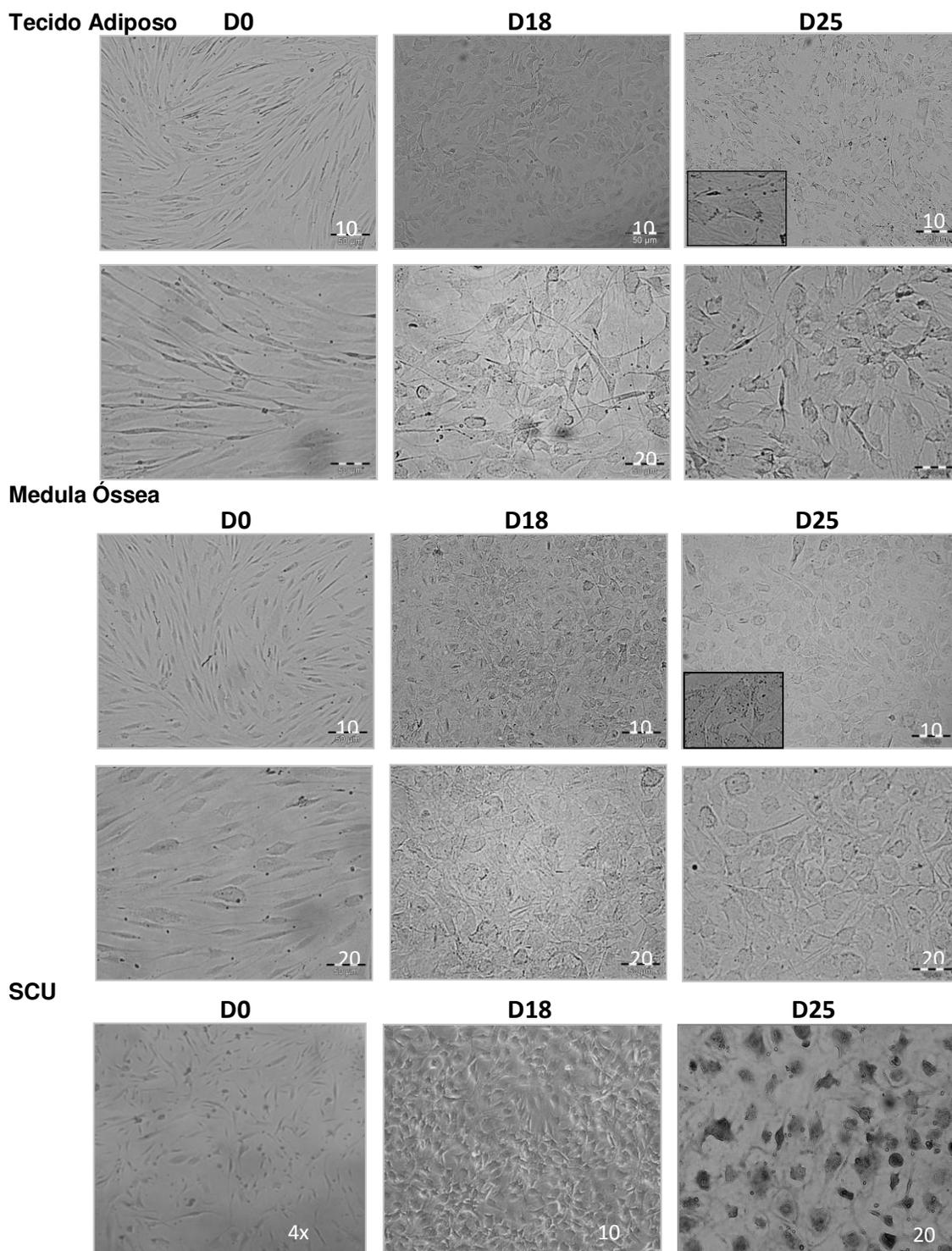


4.3 Diferenciação para Linhagem hepatocítica

4.3.1 Morfologia

As células mesenquimais das três fontes (TA, SC e MO) perderam a morfologia semelhante a fibroblastos e se transformaram em cubóides, com características de hepatócitos, a partir do nono dia de cultura na presença do meio de diferenciação da fase I do protocolo de diferenciação. (Figura 7)

Figure 7. Diferenciação hepatocítica: aspectos morfológicos

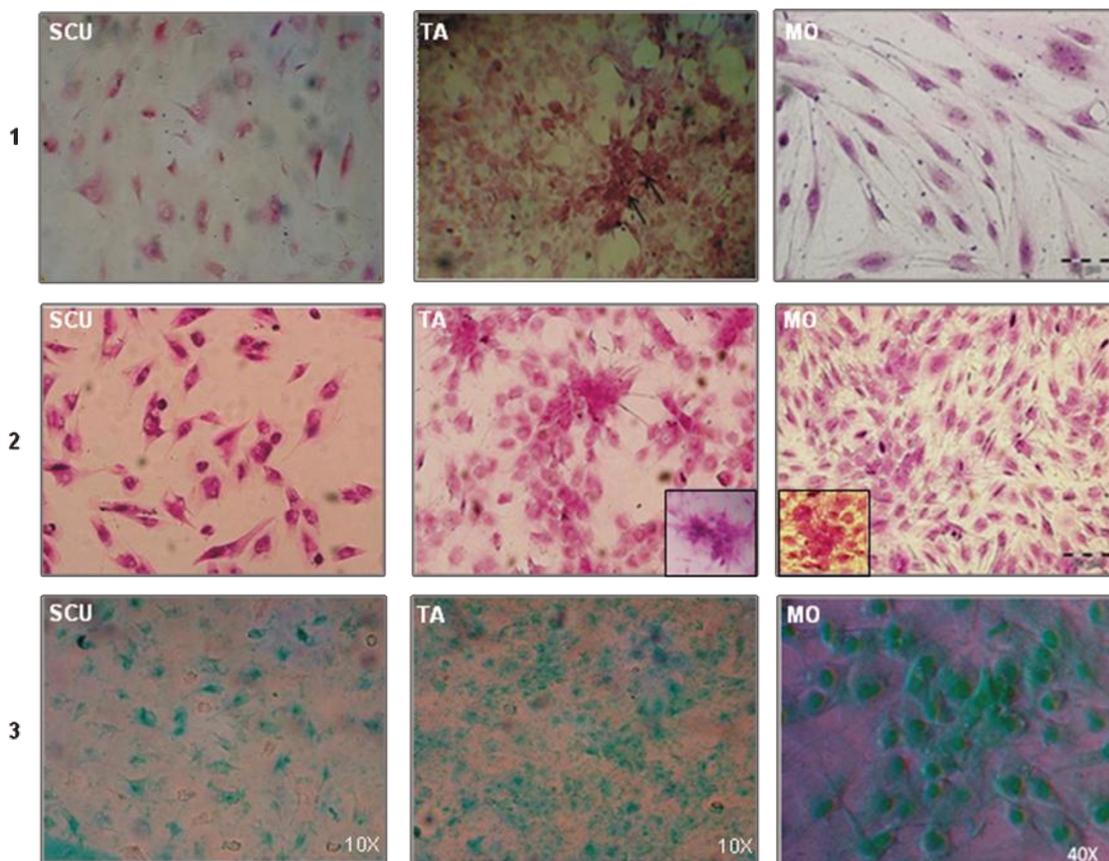


Legenda: **D0:** As três fontes apresentam células com características fibroblásticas. **D18:** No dia 18 as três fontes foram capazes de se diferenciar e as células mudaram de forma, perdendo o aspecto alongado fusiforme, adquirindo aspecto cubóide, núcleo central com aumento de citoplasma, semelhantes a hepatócitos. **D25:** No dia 25 do processo de diferenciação na presença de oncostatin M dexametasona e ITSA, as células cubóides semelhantes a hepatócitos proliferaram.

4.3.2 Estudos funcionais

As análises funcionais demonstraram que as MSCs diferenciaram-se para linhagem hepática e a funcionalidade destas células.

Figura 8. Avaliação de depósitos de glicogênio (coloração de PAS) e absorção de indocianina verde (ICG).



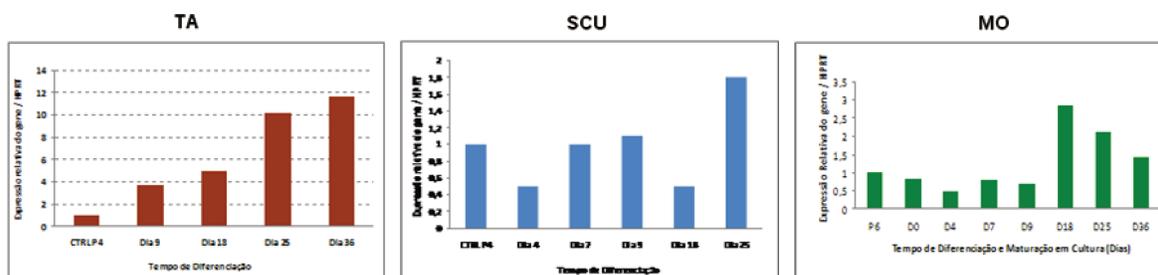
Legenda: A partir do dia 9 de cultura, na vigência do meio de diferenciação, as células das três fontes quando submetidas a coloração de PAS, começaram a adquirir coloração avermelhada indicando a presença de depósitos de glicogênio. **2:** Houve aumento progressivo com o tempo de cultura e no dia 25 elas começaram a se agrupar, proliferando em “clusters” semelhantes a hepatócitos. **3:** As células durante o processo de diferenciação, a partir do nono dia de cultura, foram submetidas ao corante catiônico, orgânico e atóxico, indocianina verde, que só é metabolizado por hepatócitos maduros, sendo considerando excelente marcador de função hepática. As células captaram o corante, apresentando coloração esverdeada à microscopia óptica e de fase, demonstrando que as células diferenciadas assim como hepatócitos apresentaram capacidade de captar a indocianina verde.

4.3.3 Análise de expressão gênica por RT-PCR:

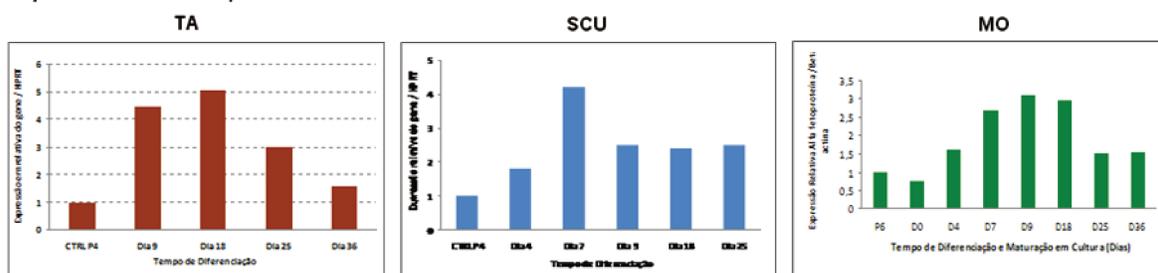
A análise da expressão dos genes relacionados com o processo de diferenciação para hepatócitos demonstraram que os resultados foram semelhantes ao esperado para esse processo. A albumina apresentou aumento de expressão durante todo o processo de diferenciação. A alfa fetoproteína (AFP) aumentou no início do processo de diferenciação diminuindo no final do processo. Houve aumento de expressão de 4.5x no dia 9 e 5.0x no dia 18 da cultura de diferenciação, em hepatócitos derivados de MSCs-TA. Houve diminuição após (3.0x no dia 25 e 1.5 no dia 36). Os hepatócitos derivados de SCU-MSC, o aumento ocorreu no sétimo dia da cultura de diferenciação caindo após. Para os hepatócitos derivados de MSCs-MO o valor máximo (3.0) foi encontrado no dia 9. A glutamina sintetase (GS) apresentou uma elevação na expressão de 3x à expressão inicial, durante o processo de diferenciação nos hepatócitos derivados das três fontes. A tirosina amino transferase (TAT), que está relacionada com hepatócitos maduros (aparece apenas no final do processo de diferenciação) apresentou baixa expressão no início do processo, aumentando a expressão de forma importante nos dias 25 e 36 da cultura (6,6 x nos dias 25 e 36) nos hepatócitos derivados das três fontes.

Figura 9. Análise da expressão gênica dos genes, albumina, alfa feto proteína, glutamina sintetase e tirosina amino transferase.

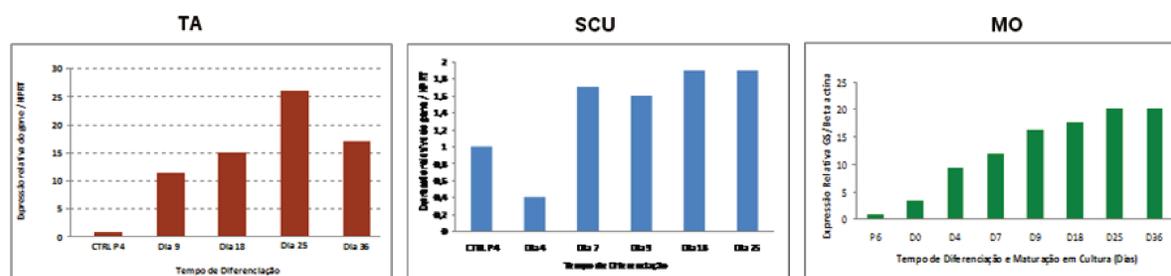
Expressão de Albumina



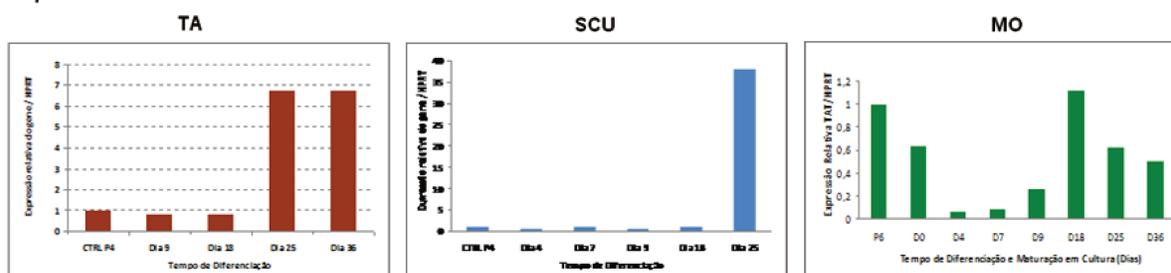
Expressão de Alfa feto proteína



Expressão de Glutamina Sintetase



Expressão de Tirosina amino transferase



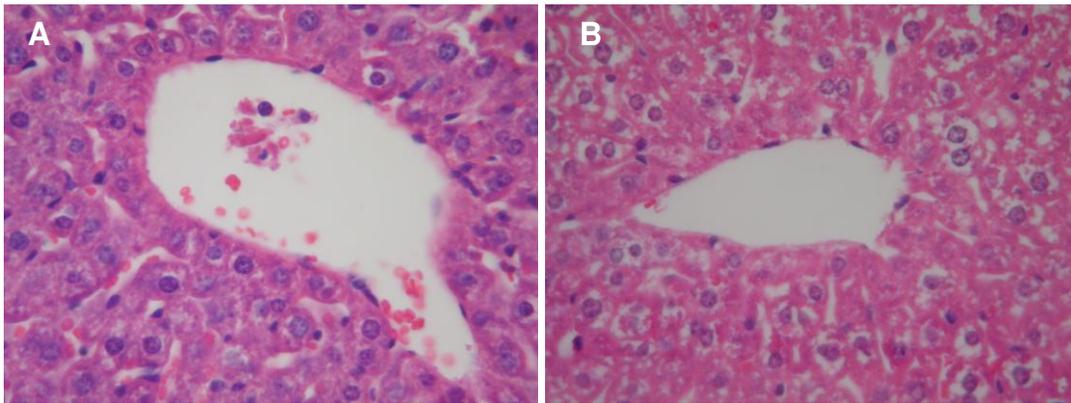
Legenda: 1: A expressão do gene albumina apresentou aumento progressivo durante todo o processo de diferenciação com todas as fontes. **2:** AF apresentou expressão elevada no início do processo (4.5 dia 9), diminuindo após dia 18 (3.0 dia 25) em todas as fontes. **3:** GS apresentou aumento 3x de expressão durante o processo de diferenciação. **4:** TAT, marcador de final de diferenciação, apresentou expressão elevada nos dias 25 e 36 quando as fontes foram SC e TA, MO houve aumento no dia 18, diminuindo nos dias 25 e 36, o que não era esperado.

4.4 Experimento Animal

4.4.1 Agente hepatotóxico

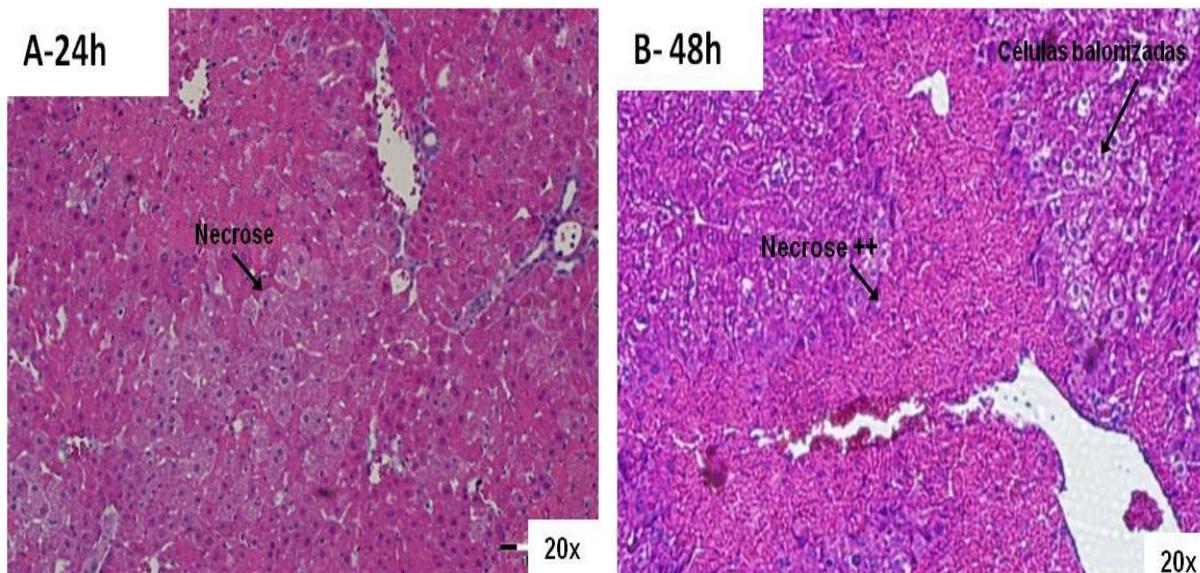
O CCL₄ mostrou-se mais eficaz na indução de lesão hepática aguda com relação ao Paracetamol, que não apresentou alteração durante o período analisado.

Figura 10. Paracetamol (300µg /kg peso)



Legenda: **A e B** correspondem a corte histológico de fígado de animal submetido a injeção de paracetamol a 300ug/kg peso após 24 e 48 horas, respectivamente. 100% dos hepatócitos encontram-se com morfologia e aspectos normais (400x).

Figura 11. CCL₄ (250 e 500 µg /kg peso)

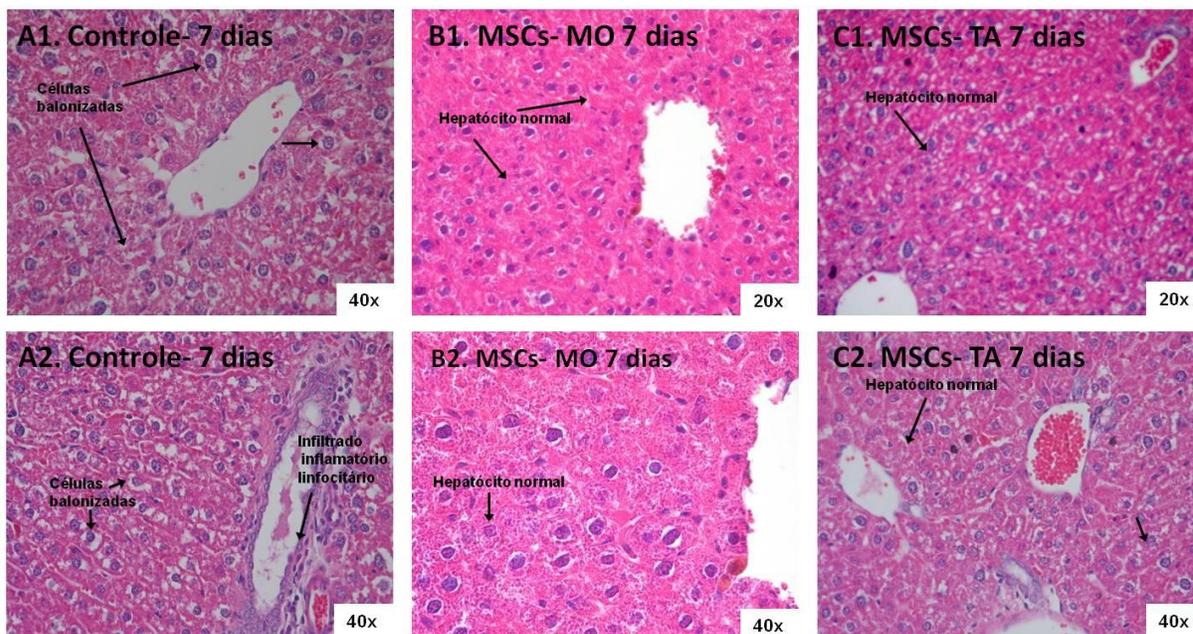


Legenda: **A:** Necrose confluyente extensa, acometendo zonas 2 3 acinares. Em todos os campos observados a veia centro apresentava necrose. **B:** Além das características descritas na figura A, o corte histológico apresenta presença de células balonizadas e necrose zonal correspondendo a 50% dos campos lidos.

4.4.2 Transplante de camundongos

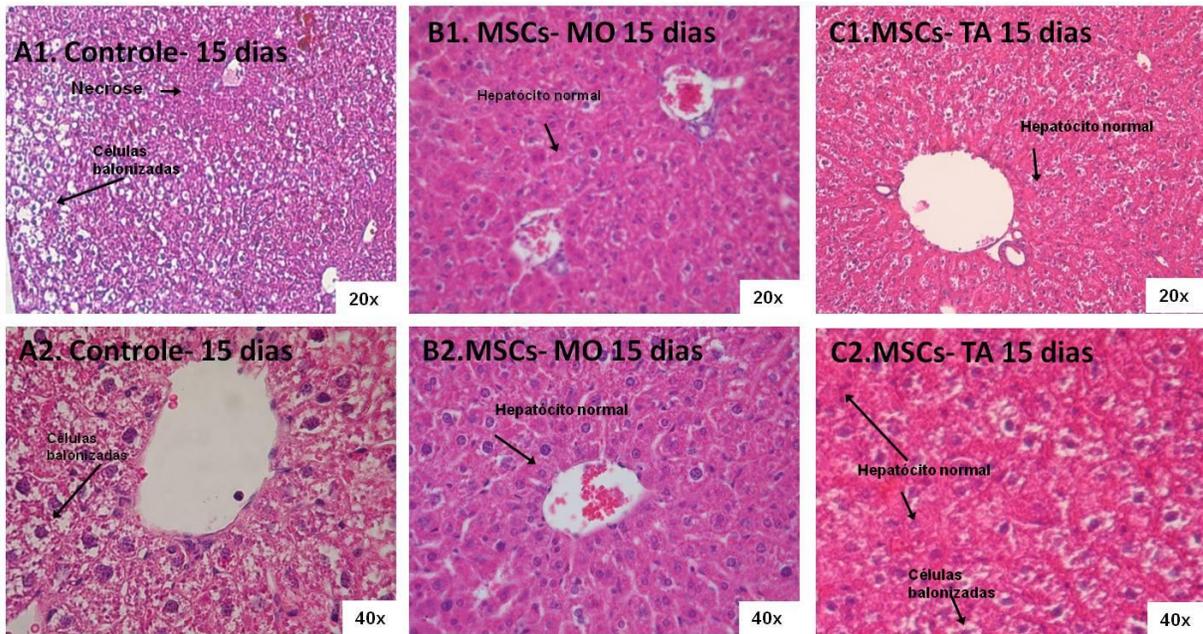
No primeiro experimento, perdeu-se 03 animais: 02 do grupo de HEP-TA e 01 do MSCs-TA. Essa perda pode estar vinculada a três motivos: excesso de droga anestésica, volume de solução celular infundido (100µL), temperatura da solução celular (estava em banho de gelo). O segundo experimento ocorreu sem intercorrências.

Figura 12. Transplante de MSCs de TA e MO indiferenciadas (7º dia)



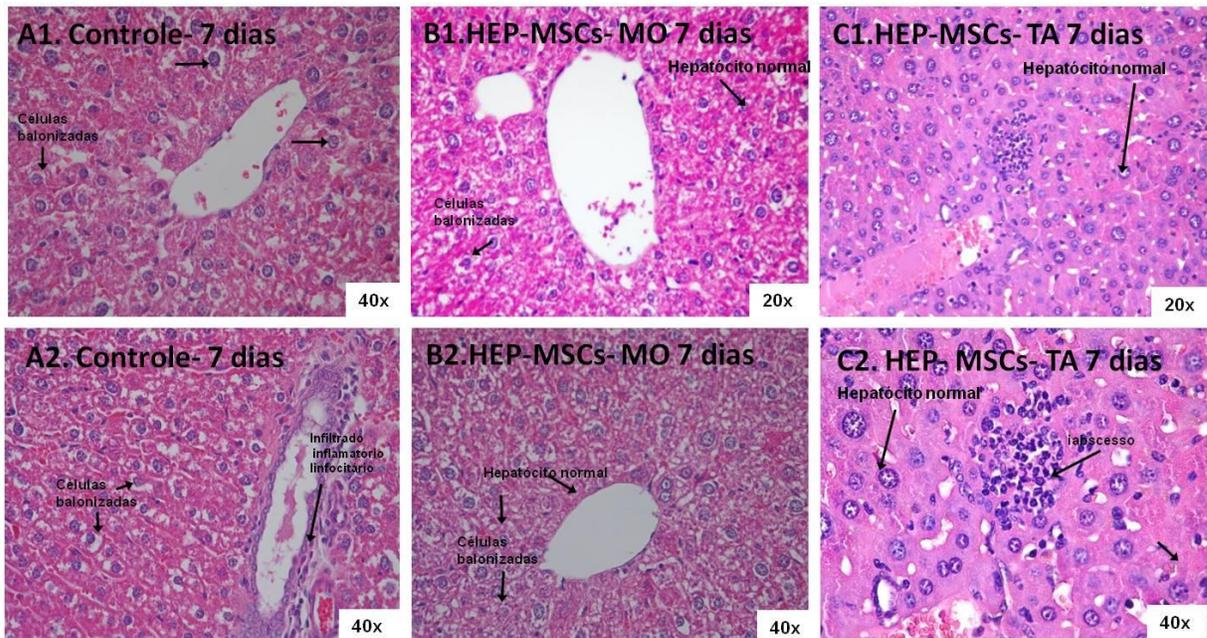
Legenda: Cortes histológicos de fígado demonstrando; A1) Controle CCL4, presença de células balonizadas, zonas 3 e 2 acinares, 40X. A2) Controle CCL4 presença de células balonizadas e infiltrado linfocitário periportal, 40X. B1) Regeneração das lesões, demonstrando presença de hepatócitos de morfologia normal, 20x. B2) Tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, 40x. C1) 100% do tecido regenerado pós transplante, hepatócitos com morfologia normal, 20x. C2) 100% do tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, raras células balonizadas.

Figura 13. Transplante de MSCs de TA e MO indiferenciadas (15° dia)



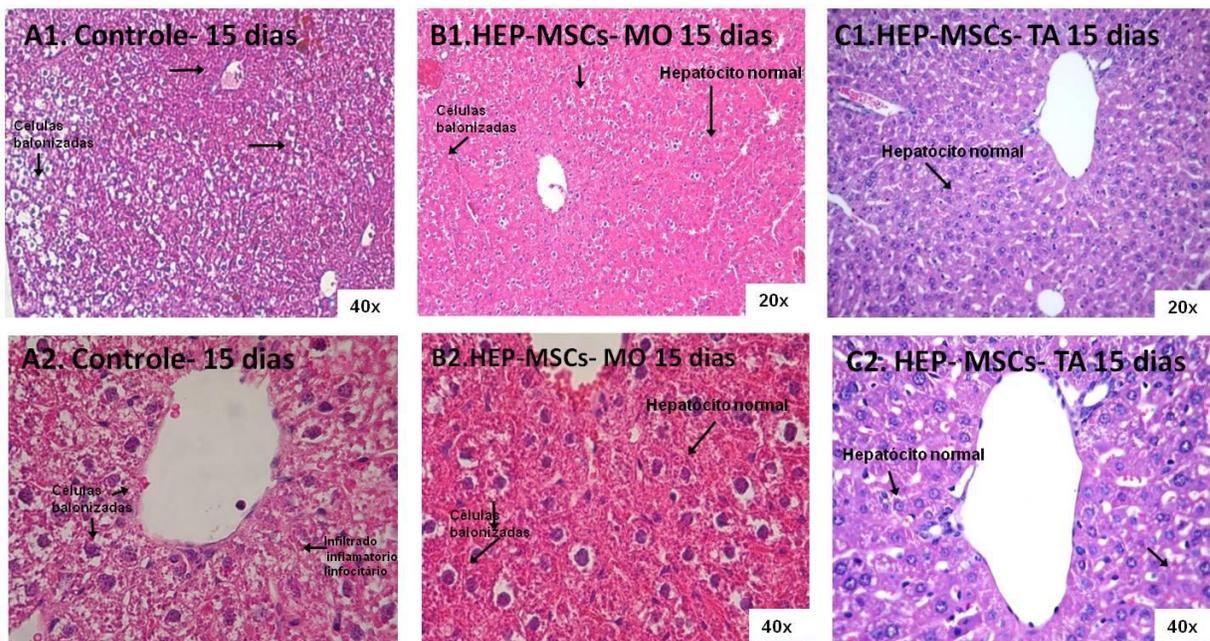
Legenda: Cortes histológicos de fígado demonstrando; A1) Controle CCL₄, 15 dias pós infusão, grande presença de células balonizadas, zonas 3 e 2 acinares, necrose peri acinar em 50% dos campos lidos. 20X. A2) Controle CCL₄, 15 dias, presença de células balonizadas periacinar, 40X. B1) Regeneração das lesões, demonstrando presença de hepatócitos de morfologia normal, 20x. B2) Tecido regenerado em todos os campos lidos, hepatócitos com morfologia normal, 40x. C1) 100% do tecido regenerado pós-transplante, hepatócitos com morfologia normal, 20x. C2) Tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, raras células balonizadas, 40x.

Figura 14. Transplante de MSCs diferenciadas em HEP obtidas de MO e TA (7^o dia)



Legenda: Cortes histológicos de fígado demonstrando; A1) Controle CCL₄, presença de células balonizadas, zonas 3 e 2 acinares, necrose zonal, 40X. A2) Controle CCL₄ presença de células balonizada, 40X. B1) Regeneração das lesões, demonstrando presença de hepatócitos de morfologia normal em 20% dos campos, mas ainda com células balonizadas e presença de necrose confluenta na zona 3 acinar. 20x. B2) Tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, mas ainda com células balonizadas. 40x. C1) Tecido regenerado pós-transplante, hepatócitos com morfologia normal, espaço periportal, porém mais de 80% das veias centro lobulares apresentam necrose. 20x. C2) Tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, presença de micro abscesso e de necrose na zona 3 acinar (80%) 40x.

Figura 15. Transplante de MSCs diferenciadas em HEP obtidas de MO e TA (15^o dia)



Legenda: Cortes histológicos de fígado demonstrando; A1) Controle CCL₄, 15 dias pós infusão, grande presença de células balonizadas, zonas 3 e 2 acinares, necrose peri acinar, 20X. A2) Controle CCL₄, 15 dias, presença de células balonizadas peri acinar, 40X. B1) Regeneração das lesões, demonstrando presença de hepatócitos de morfologia normal em 100% dos campos observados, 20x. B2) 100% do tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, 40x. C1) Tecido regenerado pós-transplante, hepatócitos com morfologia normal em 100% dos campos, 20x. C2) Tecido regenerado, hepatócitos com morfologia normal, raras células balonizadas encontradas na periferia do corte, 40x.

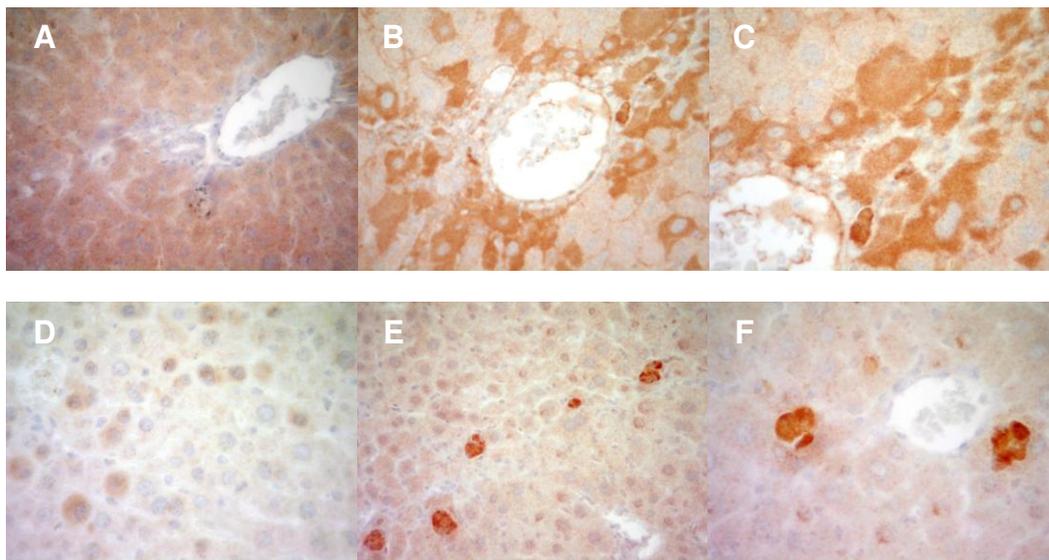
4.4.3 Determinação da presença de células humanas no processo de regeneração hepática.

As lâminas coradas com corante específico para Albumina humana foram positivas para as amostras dos camundongos que receberam transplante de MSC-MO, MSC-TA, HEP-MO e HEP-TA.

A marcação realizada com CK19 foi positiva para as lâminas das amostras dos camundongos transplantados com MSC de tecido adiposo e também de medula óssea, resultado este mais expressivo (+++).

Os controles negativos utilizados não apresentaram reatividade, conforme esperado.

Figura 16. Confirmação da regeneração hepática por células humanas: análise histopatológica para Albumina humana.



Legenda: **A:** Controle negativo. **B e C:** MSCs-MO (7 dias) foi o resultado mais expressivo (3/3+), onde se observou que mais de 90% do corte apresentou positividade no leito sinusoidal. Hepatócitos periportais corando positivamente para albumina humana em aproximadamente 50% dos espaços porta. **D:** MSCs-TA apresentaram positividade 1/3+ e os hepatócitos marcados positivamente não apresentam distribuição acinar, não são periportais (7 dias), **E:** HEP-MO, apresentou positividade de 1/3+ (7 dias) e **F:** HEP-TA foi positivo em 1/3+ (7 dias).

Figura 17. Confirmação da regeneração hepática por células humanas: análise histopatológica para Ck19 humana.



Legenda: **A:** controle negativo. **B:** MSCs-MO (7 dias) que também apresentou o resultado mais expressivo (3/3+), com 50% dos espaços porta apresentando células coradas positivamente em áreas periportais e nos leitos sinusoidais de maneira difusa. **C:** MSCs-TA também apresentou positividade, porém menos expressiva de 1/3+ (7 dias).

5. Discussão

Embora o fígado apresente uma elevada capacidade de regeneração, a insuficiência hepática (aguda e crônica), leva a um quadro de cirrose irreversível, fazendo do transplante desse órgão a única opção para sobrevivência do paciente. No entanto, muitas vezes essa alternativa é considerada limitada, devido à baixa disponibilidade de doadores de órgãos em relação ao número de pacientes aguardando pelo transplante, sendo insuficientes para atender à demanda e também por ser um procedimento que apresenta alta taxa de mortalidade (cerca de 40%).

Esses fatores levaram a realização de pesquisas experimentais e clínicas na área de medicina regenerativa. A partir desta perspectiva, espera-se muito sobre o uso de células-tronco e o desenvolvimento de tecnologias para induzir a sua diferenciação em células que possuam funções hepáticas. O transplante de células pode estimular a regeneração tecidual ou pelo menos garantir o funcionamento do fígado até que o transplante possa ser realizado, aliviando os sintomas do paciente. Esrefoglu et al (2013) verificou que os transplantes de linhagens celulares envolvidas na regeneração do fígado podem ser benéficos no tratamento da insuficiência hepática.

As células-tronco são uma ferramenta promissora para a utilização em terapia celular devido a suas propriedades de autorrenovação e amplo potencial de diferenciação em vários tipos celulares. Nesse aspecto, já foi demonstrado que as células mesenquimais (MSCs) apresentam capacidade de diferenciação para linhagem mesodérmica e outras linhagens. Alguns estudos relataram a habilidade dessas células em se diferenciar para linhagem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, mioblastos e cardiomiócitos, além de vários outros tecidos derivados como neural e hepáticos. Além disso, elas podem ser amplamente expandidas *in vitro*, sendo de fácil obtenção a partir de várias fontes, tais como a medula óssea, tecido adiposo, líquido amniótico, cordão e o sangue de umbilical, placenta, dentre outros. Para fins terapêuticos em aplicações clínicas, as MSCs se tornam uma boa alternativa de células-tronco (Prasajak et al, 2013).

Além disso, por não expressarem o MHC II (Complexo de Histocompatibilidade Maior classe II) são consideradas imunomoduladoras, apresentando baixo risco de rejeição, e como tal, fonte particularmente promissora de células para o tratamento de doenças hepáticas agudas, doenças degenerativas e imunológicas (Oshiya et al, 2010).

A escolha das três fontes de obtenção de MSCs utilizadas nesse estudo deu-se devido às vantagens que apresentam. A medula óssea foi a primeira fonte de obtenção, é considerada uma das principais fontes de células mesenquimais. No caso do sangue de cordão umbilical, em comparação com as MSCs de outras fontes, as MSCs-SCU têm vantagens quanto a coleta não invasiva. As células de tecido adiposo, coletadas por um procedimento de lipoaspiração, apresentam grande heterogeneidade de células com alta capacidade proliferativa (Seo et al, 2005).

As células mononucleares de medula óssea e de sangue de cordão umbilical e as adiposas foram submetidas à cultura e pudemos isolar as células de interesse e comprovar que eram realmente células mesenquimais. A caracterização seguiu as normas da Sociedade Internacional de Terapia Celular com relação à morfologia, aderência ao plástico, imunofenotipagem e diferenciação para linhagem mesodérmica. As células apresentaram positividade para os marcadores CD 73, CD 13, CD 90, CD29 e CD 105 e foram negativos para os associados à linhagem hematopoética e ao sistema de histocompatibilidade HLA, CD11b/14, CD19/17 α , CD45, HLA-DR como esperado. Mostraram também aderência ao plástico da garrafa de cultura., morfologia semelhante à fibroblasto e capacidade de se se diferenciarem nas linhagens mesodermas (adipogênica, osteogênica e condrogênica). Os resultados foram homogêneos e reprodutíveis para as células das três fontes, corroborando os resultados obtidos por Gimble et al (2008), Taléns-Visconti et al (2006) e por Hu et al (2013).

A fim de destinar MSCs para uso clínico torna-se necessário a investigação de provável capacidade de tumorigênese destas células durante o processo de expansão. Esta análise foi realizada através de estudo de cariótipo e da análise da atividade da enzima telomerase. Na análise cariotípica das células mesenquimais das três fontes utilizadas neste estudo não foram encontradas anormalidades, os cromossomas se mantiveram estáveis, em conformidade com o postulado por Fidler et al, 2012 que diz que células não- metastáticas são mais estáveis fenotipicamente e genotipicamente, quando comparadas às metastáticas, sugerindo que quanto antes for detectada a instabilidade cromossômica, menor a chance metastática. Em 2005, Rubio et al relatou pela primeira vez que as MSCs derivadas de tecido adiposo podem transformar-se espontaneamente como resultado da cultura de longa duração in vitro. Essas células demonstraram instabilidade cromossômica (Wong et al, 2009). As células humanas têm dois pontos de controle que regulam a sua viabilidade in vitro, as fases de senescência e

de crise. A senescência está associada ao encurtamento dos telômeros. Se as células ignoraram esta etapa, elas continuam a crescer, entrando em fase de crise, caracterizada pela instabilidade cromossômica generalizada, o que provoca a apoptose em massa não sendo indicadas para utilização clínica.

Os resultados da atividade da enzima telomerase demonstraram atividade normal dessa enzima, que possui papel fundamental na perpetuação celular, participando ativamente da mitose. Embora Robart et al (2009) tenha descoberto que doentes afetados por uma enfermidade congênita rara, a disqueratose congênita, tinham níveis de telomerase anormalmente baixos, muitos desses pacientes morriam de câncer gastrointestinal. Sabe-se que a agressividade das células tumorais está relacionada a altos níveis de telomerase e que a atividade dessa enzima está presente na grande maioria dos processos neoplásicos, ela pode ter um papel importante no diagnóstico e tratamento do câncer, tornando-se um dos alvos para investigação e terapia.

As células obtidas então foram submetidas ao processo de diferenciação hepatocítica, pelo protocolo de diferenciação para linhagem hepatocítica já estabelecido na literatura por Lee et al (2004) e Seo et al (2005), no entanto esse processo foi realizado durante 36 dias, ao passo que os pesquisadores acima citados utilizaram processos de 14 e 28 dias, respectivamente.

As MSCs foram submetidas à análise morfológica, gênica e de funcionalidade. As células começaram a apresentar alteração na morfologia semelhante a fibroblasto, para células com aspecto cuboide, típica das células hepatocíticas a partir do 18º dia, sendo que no 25º dia todas as células em cultura já apresentavam essa morfologia semelhante a hepatócito. Lee et al, em 2005, ao comparar a diferenciação de MSCs derivadas de medula óssea e de sangue de cordão umbilical, verificou resultados mais tardios na alteração da morfologia dessas células, que começaram a alterar seu aspecto a partir da 6ª semana.

A análise da expressão de genes classicamente envolvidos no processo de diferenciação para linhagem hepatocítica demonstrou que: a albumina apresentou aumento de expressão crescente durante todo o processo de diferenciação, corroborando os resultados de Taléns-Visconti et al (2006) no processo aplicado para MSCs-TA diferenciadas à hepatócitos. A alfa fetoproteína (AFP) aumentou no início do processo de

diferenciação diminuindo no final do processo, resultado normal por se tratar de um marcador da fase inicial de diferenciação hepatocítica. A glutamina sintetase (GS) apresentou uma elevação na expressão durante o processo de diferenciação nos hepatócitos derivados das duas fontes. A tirosina amino transferase (TAT), que está relacionada com hepatócitos maduros (aparece apenas no final do processo de diferenciação) apresentou baixa expressão no início do processo, aumentando a expressão de forma importante no final da cultura nos hepatócitos derivados das duas fontes. Esses resultados corroboram estudos que relatam a importância de analisar a expressão de genes que desempenham um papel fundamental na diferenciação dos hepatócitos e dessas células maduras, como albumina, alfa feto proteína, glutamina sintetase e tirosina amino transferase (Seo et al, 2005; Kang et al, 2005). Neste trabalho o processo de diferenciação para linhagem hepatocítica todas as MSCs (MO, SCU e TA) foram capazes de se diferenciar em hepatócitos, de acordo com os resultados já obtidos por Lee et al (2004), Taléns-Visconti et al (2006), Taléns- Visconti et al (2007).

De modo geral, diferentes mecanismos contribuem para os efeitos terapêuticos exercidos pelas MSCs, que podem se diferenciar em células hepáticas funcionais e também produzem uma série de fatores de crescimento e citocinas que podem suprimir a resposta inflamatória, reduzir a apoptose de hepatócitos, regredindo a lesão hepática e proporcionando uma melhora da função. A análise funcional das células diferenciadas, semelhantes à hepatócitos foi realizada através de detecção de depósito de glicogênio, da absorção de isocianina verde e regeneração tecidual após transplante em animais submetidos a lesão hepática induzida por tetracloreto de carbono.

Em nosso estudo, os resultados de funcionalidade das células submetidas ao protocolo de diferenciação foram precoces, ou seja, as células das três fontes começaram a apresentar atividade semelhante à hepatócito já no 9º dia de diferenciação, atingindo a totalidade das células no 25º dia, estando de acordo com o resultado obtido por Schwartz et al publicados em 2002, que hepatócitos maduros e funcionais depositam glicogênio, sendo esta uma das principais funções do fígado. Esses resultados de início da atividade das funções de um hepatócito não foram descritos por Taléns-Visconti et al em 2006, no entanto, os resultados foram semelhantes aos apresentados por Seo et al em 2005, que descreve que as células do seu estudo apresentaram funcionalidade a partir do sétimo dia de diferenciação, e Bi et al (2013) relata um aumento significativo da quantidade de células diferenciadas em hepatócitos funcionais a partir do nono dia.

Quando comparamos nossos resultados com os de Lee et al (2004) verificamos que no estudo de Lee, as células mesenquimais de medula óssea e sangue de cordão umbilical quando diferenciadas para linhagem hepatocítica, começavam a estocar glicogênio na 4ª semana de cultura e 50% das células da placa estocaram na 6ª semana, de forma mais tardia que os nossos.

As células também foram capazes de absorver o corante indocianina verde, que um reagente é absorvido e eliminado exclusivamente pelos hepatócitos maduros, a partir do 9º dia de diferenciação hepatocítica, corroborando os resultados descritos por Bi et al (2013) e Yamada et al (2002).

No intuito de melhor avaliar a funcionalidade dos hepatócitos obtidos através de MSCs provenientes de medula óssea (MO-MSCs) e de tecido adiposo (TA-MSCs), camundongos SCID/Balb-c submetidos a indução de injúria hepática utilizando-se como agente hepatotóxico o tetracloreto de carbono (CCl₄), agente químico altamente tóxico que induz lesão hepática aguda já utilizado na literatura nos trabalhos de Sato et al, 2013 e Lee et al, 2012A foram transplantados com estas células e com as MO-MSCs e TA-MSCs indiferenciadas quarenta e oito horas após a indução da hepatite fulminante. Em nosso trabalho, os cortes histológicos feitos a partir das amostras de fígado após 48 horas da injeção de CCl₄ quando corados com Hematoxilina & Eosina evidenciaram necrose zonal em 50% dos campos lidos.

O transplante foi realizado apenas com MSCs derivadas de tecido adiposo e medula óssea, devido à maior dificuldade de expansão das MSCs-SCU já descrita na literatura por Kang et al (2005) e Scheers et al (2013).

Nesse estudo, utilizamos para o transplante, células semelhantes à hepatócitos derivadas das duas fontes, assim MSCs indiferenciadas, e tanto as células diferenciadas à hepatócitos quanto as indiferenciadas de ambas as fontes foram capazes de regenerar o fígado lesionado. Esses resultados corroboram os que foram encontrados por Seo et al (2005) e Banas et al (2009).

Apesar de todas regenerarem a injúria hepática em diferentes graus, as MSCs indiferenciadas foram mais efetivas nesse processo. As células mesenquimais indiferenciadas apresentam maior habilidade migratória ao local de injúria com relação às células diferenciadas, o que melhoraria o enxerto dessas células na região lesionada.

Além disso, a infusão de MSCs aumenta a capacidade intrínseca dos hepatócitos em se proliferar por estimular a produção de citocinas proliferativas. A sua ação imunomodulatória também contribuiria na regeneração do tecido lesado por regular citocinas anti-inflamatórias. Esses dados corroboram os resultados encontrados por Li et al (2013) e por Seo et al (2005).

As análises anatomopatológicas realizadas nas amostras coletadas dos fígados dos camundongos sacrificados para os marcadores humanos albumina e CK19, um marcador epitelial biliar encontrado em colangiócitos, corroboram os resultados encontrados por Li et al (2013) que resume que esses marcadores podem ser potencialmente utilizados para identificar e isolar células progenitoras hepáticas humanas, estando os dados obtidos pelos métodos de coloração de acordo com os resultados encontrados através de métodos de expressão gênica. Seo et al (2005) descreve que não obteve resultados positivos para albumina após 3 dias do transplante, somente ao 10º dia, porém nossos resultados foram positivos já ao 7º dia após o transplante.

Diante desses resultados, o presente estudo enaltece as vantagens da utilização de células tronco mesenquimais em terapia celular e a sua efetividade na regeneração de lesão hepática aguda. Apesar da sua capacidade de diferenciação em hepatócitos funcionais, as células tronco mesenquimais indiferenciadas talvez sejam uma melhor opção, para regeneração hepática quando comparadas às células tronco mesenquimais diferenciadas, além do fato que as células indiferenciadas proporcionam a imunomodulação, o que não acontece com hepatócitos maduros.

6. Conclusão

As células mesenquimais obtidas de TA, SCU e MO foram capazes de se diferenciar em hepatócitos, sendo que a expressão gênica e a análise funcional indicaram que essas células não apresentaram capacidade tumorigênica.

Neste trabalho, tecido adiposo e medula óssea se mostraram fontes mais efetivas para utilização em terapia celular, pois as células mesenquimais de sangue de cordão umbilical humano levaram mais tempo para diferenciar-se em hepatócitos funcionais e expandir.

Os experimentos animais demonstraram que tanto as células mesenquimais indiferenciadas quanto às MSCs diferenciadas em hepatócitos foram capazes de regenerar a lesão hepática. Embora todas tenham se diferenciado em hepatócitos funcionais, sendo uma promessa para regeneração do fígado e medicina regenerativa, quando estas células foram transfundidas em animais submetidos à hepatite fulminante, as células mesenquimais indiferenciadas das duas fontes utilizadas foram mais efetivas que as que as células “hepatócitos like” obtidas das MSCs-TA e MSCs-MO.

Talvez MSCs indiferenciadas sejam mais efetivas na regeneração de lesões hepáticas graves, o que proporcionará mais rapidamente a utilização destas células em terapia celular.

7. Referências Bibliográficas

1. Puglisi MA, Tesori V, Lattanzi W. Therapeutic implications of mesenchymal stem in liver injury. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 2011:860578.
2. Mito M, Ebata H, Kusan M. Studies on ectopic liver utilizing hepatocyte transplantation into the rat spleen. *Transplant Proc.* 1979; 11: 585.
3. Overturf K, Al-Dhalimy M, Ou CN. Serial transplantation reveals the stem cell like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol.* 1999; 155: 2135-2143.
4. Shafritz DA. Rat liver stem cells: Prospects for the future. *Hepatology.* 2000; 32:1399-1400.
5. Spangrude GL, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988; 241: 58-62.
6. Kinoshita R. Studies on the cancerogenic chemical substances. *Trans Soc Pathol Jpn.* 1937; 27: 665-727.
7. Faber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by thionine, 2-acetylaminofluorene, and 3-methylaminobenzene. *Cancer Res.* 1956; 16: 142-148.
8. Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res.* 1991; 51: 2611-2620.
9. Arkadopoulos N, Lilja H, Suh KS. Intrasplenic transplantation of allogeneic hepatocyte prolongs survival in anhepatic rats. *Hepatology.* 1998; 28: 1365-70.
10. Onodera K, Kasai S, Kato K. Long term effect of intrasplenic hepatocyte transplantation in congenital ascorbic acid biosynthetic enzyme-deficient rats. *Cell Transpl* 1995; 4:S41.
11. Sell S, Salman J. Light- and electron microscopy autoradiographic analysis of proliferating cells during the early stages of chemical hepatocarcinogenesis in the rat induced by feeding NO_2 fluorenylacetylamide in a choline-deficient diet. *Am.J Pathol* 1984; 114: 287-300.
12. Baumann U; Crosby H; Ramani P. Expression of Stem Cell Factor Receptor c-kit in Normal and Diseased Pediatric Liver: Identification of a Human Hepatic Progenitor Cell? *Hepatology.* 1999; 30: 112-117.

13. Matsusaka S; Toyosaka A; Nakasho K. The role of cells in rat hepatocyte transplantation. *Transplantation* 2000, 70, 441-446.
14. Roskams T; De Vos R; Van Eyken P. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments. *J Hepatol* 1998, 29: 455-463.
15. Strain AJ, Crosby HA. Hepatic stem cells. *Gut* 2000, 46, 743-745.
16. Dianat N, Steichen C, Vallier L. Human pluripotent stem cells for modeling human liver diseases and cell therapy. *Current Gene Therapy*, 2013; 13: 120-132.
17. Huebert RC, Rakela J. Cellular therapy for liver disease. *Mayo Clin Proc.* 2014; 89(3):414-424.
18. Guillot P, Cui W, Fisk NM. Stem Cell differentiation and expansion for clinical applications and tissue engineering. *J cell Mol Med*, 2007; 11: 935-944.
19. Oertel M, Shafritz DA. Stem cells transplantation and liver repopulation, *BBA*, 2008; 1782: 61-74.
20. Chui DH, Loyer BV. Foetal erythropoiesis in steel mutant mice. II. Haemopoietic stem cells in foetal livers during development. *Br J Haematol.* 1975; 29: 553-65.
21. Grossi CE; Velardi A; Cooper MD. Postnatal liver hematopoiesis in mice: generation of pre-B cells, granulocytes in discrete colonies. *J Immunol* 1985, 135, 2303-2311.
22. Suzuki A; Zheng YM; Kondo R. Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 2000; 32: 1230-1239.
23. Blakolmer K; Jaskiewicz K; Dunsford HA. Hematopoietic Stem Cell Markers Are Expressed by Ductal Plate and Bile Duct in Developing Human Liver. *Hepatology.* 1995; 21:1510-1516.
24. Lemmer ER; Shephard EG; Blakolmer K. Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM5.2 pancytokeratin markers. *J Hepatol* 1998, 29: 450-454.
25. Omori N; Omori M; Everts RP. Partial cloning in rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in adult rat. *Hepatology.* 1997; 26: 720-727.
26. Petersen BE; Goff JP; Joel S. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *J Hepatol.* 1998; 27:433-463.

27. Alison MR; Poulson R; Jeffery R. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000, 406; 257.
28. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999, 284, 1168-1170.
29. Theise ND; Badve S; Saxena R. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000, 31, 235-240.
30. Kollet O; Shvitiel S; Chen Y. HGF, SDF-1 and MM-9 are involved in stress-induced. *J Clinical Invest* human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clinical Invest* 2003;112: 160-169.
31. Alvarez-Dolado M; Pardal R; Garcia-Verdugo JM. Fusion of bone-marrow-derived cell with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003; 425: 968-973.
32. Wang X, Willenbring, Akkari. Cell fusion is the principal source of bone marrow-derived hepatocytes. *Nature*. 2003; 422:897-901.
33. Willenbring H, Bailey AS, Foster M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nature Medicine*. 2004; 10: 744-748.
34. De Silvestro G, Vicatioto M, Donadel C. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*. 2004; 51: 805-810.
35. Huiling X, Inagaki M, Arikura J. Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in albuminemic rat livers. *J Surg Res*. 2004; 122: 75-82.
36. Quintana-Bustamante O, Alvarez-Barrientos A, Kofman AV. Hematopoietic mobilization in mice increases the presence of bone marrow-derived hepatocytes via in vivo cell fusion. *Hepatology*. 2006; 43:108-116.
37. Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure : a preliminary study: *Transplant Proc*, 2008;40: 1140-1144.
38. Lemoli RM, Catani L, Talarico S. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic endothelial stem cells after orthopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells* 2006, 24: 2817-2825.

39. Yannaki E, Athanasiou E, Xagorari, G-CSF-primed hematopoietic stem cells or G-CSF per se accelerate recovery and improve survival after liver injury, predominantly by promoting endogenous repair programs. *Exp Hematol.* 2005; 33: 108-19.
40. Spahr L, Lambert JF, Rubia-Brandt L. Granulocyte-Colony Stimulating Factor induces proliferation of hepatic progenitors in alcoholic steatohepatitis: A randomized trial. *Hepatology*, 2008, 48:221-229.
41. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24: 70-77.
42. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284.
43. Liu F, Pan X, Chen G. Hematopoietic stem cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor partly contributes to liver graft regeneration after partial orthopic liver transplantation. *Liver Transplantation* 2006, 12:1129-1137.
44. Kakinuma S; Asahina K; Okamura K; Teramoto K; Tateno C; Yoshizato K; Tanaka Y; Yasumizu T; Sakamoto N; Watanabe M; Teraoka H. Human umbilical cord blood cells transplanted into chronically damaged liver exhibit similar characteristics to functional hepatocytes. *Transplantation Proceedings* 2007; 39:240-243.
45. Taléns-Visconti R; Bonora A; Jover R; Mirabet V; Carbonell F; Castell JV; Gómez-Lechón MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12(36): 5834-9327.
46. Taléns-Visconti R; Bonora A; Jover R; Mirabet V; Carbonell F; Castell JV; Gómez-Lechón MJ. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicology in Vitro* 2007; 21: 324-329.
47. Newsome PN; Johannessen I; Boyle S. human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocyte in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterol* 2003, 124: 1891-1990.
48. Chiu RC. Bone marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev.* 2003; 8: 247-251.

49. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver and bone marrow). *Blood*, 2007;110: 3438-3446.
50. Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2008; 17(5):909-16.
51. Chang CF, Hsu KH, Chiou SH. Fibronectin and pellet suspension culture promote differentiation of human mesenchymal stem cells into insulin producing cells. *J Biomed Mater Res A*. 2007.
52. Weir C, Morel-Kopp MC, Gil A. Mesenchymal stem cells: Isolation, characterization and in vivo fluorescent dye tracking. *Heart Lung Circ*. 2008; 17(5):395-403.
53. Yamamoto Y, Banas A, Murata S. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathway in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS journal* 2008; 275:1260-1273.
54. Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells*, 2007; 25: 639-645.
55. Locatelli F, Maccario R, Frasson F. Mesenchymal stromal cells from indifferent spectators to principal actors. Are we going to witness a revolution in the scenario of allograft and immune-mediated disorders? *Haematologica*, 2007; 92: 872-877.
56. Chamberlain G, Fox J, Aston B. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells* 2007; 25: 2739-2749.
57. Esrefoglu M. Role of stem cells in repair of liver injury: Experimental and clinical benefit of transferred stem cells on liver failure. *World J Gastroenterol* 2013; 19(40): 6757-6773.
58. Prasajak P, Leeanansaksiri W. Developing a new two step protocol to generate functional hepatocytes from Wharton's jelly- derived mesenchymal stem cells under hypoxia condition. *Stem Cells International* 2013; 2013: 762196.
59. Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation* 2010; 79: 65-73.

60. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328: 258-64.
61. Gimble JM, Guilak F, Nutall ME. In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus Med Hemother* 2008; 35:228–238.
62. Hu L, Hu J, Zhao J. Side-by-side comparison of the biological characteristics of human umbilical cord and adipose tissue- derived mesenchymal stem cells. *BioMed Research International* 2013; 2013: 438243.
63. Fidler J. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2012; 8(8):1141-2.
64. Rubio D, Garcia- Castro J, Martín M. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65:3035-3039.
65. Wong RSY. Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011: 459510.
66. Robart AR, Collins K. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease- linked subunit variants. *J Biol Chem.* 2010; 285(7):4375-86.
67. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-1284.
68. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood- derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005;11(47):7461-7465.
69. Bi Y, He Y, Huang JY, Xu L, Tang N, He TC, Feng T. Induced maturation of hepatic progenitor cells in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2013; 46:559-566.
70. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells.* 2002; 20:146-154.

71. Sato A, Nakashima H, Nakashima M. Involvement of the TNF and FasL produced by CD11b Kupffer cells/Macrophages in CCl4- induced acute hepatic injury. PLoS ONE 9(3): e92515.
72. Scheers I, Lombard C, Paganelli M. Human umbilical cord matrix stem cells maintain multilineage differentiation abilities and do not transform during long-term culture. PLoS ONE 8(8): e71374.
73. Li Q, Zhou X, Shi Y, Li J, Zheng L, Cui L, Zhang J, et al. In Vivo Tracking and Comparison of the Therapeutic Effects of MSCs and HSCs for Liver Injury. Plos One. 2013; 8(4): e62363.
74. Li J, Xin J, Zhang L, Wu J, Jiang L, Zhou Q, et al. Human Hepatic Progenitor Cells Express Hematopoietic Cell Markers CD45 and CD109. International Journal of Medical Sciences. 2014; 11(1):65-79.

8. Anexos

- TERMO DE CONSENTIMENTO -

Tecido Adiposo

Eu, _____,
registro hospitalar: _____, RG: _____,
autorizo a doação de 20 ml de tecido adiposo, coletados durante a cirurgia de lipoaspiração a que serei submetida em ____/____/____. Este material será utilizado para pesquisa a serem realizadas na UNICAMP. Informo que fui devidamente esclarecido (a) sobre todas as possíveis intercorrências que possam decorrer deste procedimento, já descritas no termo de consentimento livre esclarecido de autorização para cirurgia. Fui informado(a) que se não quiser autorizar esta doação, não haverá nenhum prejuízo ao meu atendimento nestes hospitais (Complexo Hospitalar HC, CAISM, Hemocentro da UNICAMP). Informaram-me de que o material coletado será utilizado na pesquisa “ *Avaliação da capacidade de células mesenquimais obtidas de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo humanos na diferenciação para hepatócitos*”. O projeto consiste na extração de células do material coletado de tecido adiposo (lipoaspiração) e de mononucleares de sangue de cordão umbilical humanos e diferenciar estas células para linhagem mesenquimal. Estas mesenquimais obtidas das duas fontes serão diferenciadas em hepatócitos, células do fígado e estudar a capacidade destas células em regenerar fígado de camundongos que serão submetidos a hepatite fulminante. Portanto, não há riscos ou perigo algum decorrente da pesquisa do material doado para mim, assegurando a minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. *Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas e minhas dúvidas esclarecidas. A opção de doação foi tomada de modo consciente, livre e voluntário.*

Doador: _____

Campinas, ____/____/____

Telefone para contato:
Pesquisador (Hemocentro): (19) 35218734
Comitê de Ética da Unicamp: (19) 3521-8942



BRASILCORD
MINISTÉRIO DA SAÚDE

Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP
Hemocentro Campinas – Unicamp



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

etiqueta com nº da bolsa

Eu,

Registro Hospitalar: Data de nascimento:/...../.....,

Portadora dos documentos de Identidade (RG): e CPF:

Residente à

Bairro: Cidade Estado

Concordo em colaborar com o Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP. Para isso, autorizo a coleta após o nascimento de meu (minha) filho (a), do sangue do cordão umbilical e ou da placenta. Fui orientada que a coleta do sangue ocorre após o nascimento do bebê e poderá ser feita de duas formas: Durante o período de dequitação placentária, quando o bebê já foi entregue ao pediatra ou profissional habilitado para os primeiros cuidados e o médico está aguardando a saída da placenta do organismo materno, a veia do cordão umbilical, que é uma continuação da placenta, será puncionada, ou após a dequitação placentária, quando a placenta estiver fora do organismo da mãe. Portanto, como você pode perceber, a coleta não irá interferir com o trabalho de parto de seu bebê e nem com a saúde dele. Este material seria jogado fora, como ocorre normalmente, mas será guardado em nitrogênio líquido, sendo usado para criar um Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical que pode ajudar pessoas com alguns tipos de doenças do sangue.

Estou ciente que mesmo tendo concordado com a doação, o sangue de cordão só será coletado se no parto eu não apresentar alteração clínica ou obstétrica que impeça a coleta, se o trabalho de parto se desenvolver normalmente sem risco para mim e ou para meu (minha) filho (a) e ocorrer em horário de coleta.

Sei também que tanto o sangue do cordão como a placenta, será examinado para ver se não apresentam infecção ou outra doença, sendo depois congelados. O sangue de cordão somente será utilizado se aparecer uma pessoa que apresente uma doença que possa se beneficiar desse sangue armazenado e que seja compatível. Atualmente, este material é utilizado para reconstituir tecido hematopoiético (transplante de células tronco), podendo ser no futuro, utilizado em terapia celular em doenças hematológicas como talassemia, anemia falciforme dentre outras.

Fui informada que se o sangue do cordão for congelado, a equipe de enfermagem do BSCUP fará contato telefônico a partir de 60 dias após o parto, para saber se foi realizado o teste do pezinho (PKU) e se está tudo bem comigo e com o bebê.

Estou ciente que se a quantidade de sangue de cordão coletado for menor que 50ml ou apresentar baixa celularidade, este não será armazenado para o banco por não ser viável para transplante e nem para terapia celular. Entretanto, poderá ser utilizado em pesquisas relacionadas a células tronco em andamento na instituição, que tenham sido aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FCM/Unicamp. As pesquisas que atualmente utilizam sangue de cordão são: “Células beta pancreáticas diferenciadas de células mesenquimais de tecido adiposo e sangue de cordão umbilical, na presença de conoflina e betacelulina: Maior produção de insulina? Alternativa terapêutica para o Diabetes Mellitus?”; “Avaliação da capacidade das células neuronais originárias de células mesenquimais provenientes de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos na regeneração do nervo óptico de coelhos”; “Avaliação da capacidade de diferenciação de células tronco mesenquimais, obtidas de tecido adiposo e de sangue de cordão umbilical humanos, na diferenciação para células de ducto biliar”; “Avaliação da capacidade de células mesenquimais



**Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – BSCUP
Hemocentro Campinas – Unicamp**



obtidas de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo humanos na diferenciação para hepatócitos”, “Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo na hematopoese normal utilizando células CD34+ de cordão umbilical”. As amostras armazenadas para pesquisa serão desprezadas após o término destas.

Tenho ciência que serão coletados aproximadamente 48ml do meu sangue após o parto, para realização de sorologia para as seguintes doenças: sífilis, SIDA, hepatite B e C, HTLV 1 e 2, doença de Chagas, citomegalovírus, toxoplasmose e tipagem HLA. Estes exames são necessários para melhor identificar o meu sangue. Caso alguma doença seja encontrada, serei comunicada pela equipe do Hemocentro Campinas e receberei encaminhamento para tratamento médico dentro do complexo hospitalar HC, CAISM, Hospital Estadual de Sumaré e Hemocentro Campinas.

Será respeitado o sigilo e confidencialidade dos resultados dos exames que irei fazer, não sendo revelada minha identidade a não ser para a equipe médica responsável pelo atendimento. Esse respeito ao sigilo será mantido no caso da utilização do sangue do cordão para transplante, em caso de publicação dos resultados sobre o banco de sangue de cordão ou se for utilizado para pesquisa.

Autorizo a consulta do meu prontuário médico e do meu (minha) filho (a) pela equipe médica do BSCUP e do Serviço de Transplante solicitante, se houver necessidade da obtenção do histórico e ou dados clínicos no momento do transplante onde a bolsa coletada for utilizada. O BSCUP fica autorizado a transferir a unidade coletada, assim como todos os dados a ela relacionados para os Centros de Registro e/ou Serviços de Transplante solicitantes.

Autorizo também, o descarte da bolsa se o período de validade vencer ou se algum exame detectar algo que impeça sua utilização.

Estou ciente que minha doação é livre e voluntária, podendo desistir da doação a qualquer momento, inclusive na hora do parto, não havendo qualquer prejuízo para o meu atendimento nos hospitais da UNICAMP, se eu não quiser participar. Não receberei nenhuma remuneração, compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da unidade de SCUP.

Uma vez realizada a doação, estou ciente que se porventura alguém de minha família necessitar deste material, ele já poderá ter sido utilizado para outra pessoa.

Quaisquer dúvidas poderão ser esclarecidas pelos telefones ou endereços abaixo.

<p>MATERNIDADE DE CAMPINAS: 3208-8038/3308-8181</p> <p>HOSPITAL ESTADUAL DE SUMARÉ: 3883-8800 ramal 1145</p> <p>Ambulatório de Pré-natal do CAISM: 3521-8535</p>	<p>Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – Hemocentro - Unicamp Rua Vital Brasil, 251 – Cidade Universitária “Zeferino Vaz” – Campinas – SP Fone: (19) 3521-7003</p> <p>Comitê de Ética em Pesquisa – FCM - Unicamp Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Cidade Universitária “Zeferino Vaz” - Campinas - SP Fone: (19) 3521-8936</p> <p>Comissão de Ética do CAISM: 3521-7810</p>
--	---

Assinatura da doadora:

Aplicador Termo de Consentimento:

Testemunhas: 1. 2. Responsável pelo serviço:

Campinas,/...../.....

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário da UNICAMP

Eu,
data de nascimento: / /, Portadora dos documentos de
Identidade (RG): e CPF: ;
Registro Hospitalar (HC):, residente à.....,
.....
Bairro:
Cidade Estado

Concordo em colaborar com o Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário do Hemocentro da UNICAMP. Para isso autorizo a coleta, após o nascimento de meu (minha) filho (a), do sangue do cordão umbilical e ou da placenta. Fui orientada que a coleta do sangue ocorre após o nascimento do bebê e poderá ser feito de duas formas. Durante o período chamado de dequitação placentária, quando o bebê já foi para o berçário e o médico está aguardando a saída da placenta do organismo materno, a veia do cordão umbilical que é uma continuação da placenta e se encontra do lado de fora do corpo da mãe, será puncionada, ou após a dequitação, quando a placenta estiver fora do organismo da mãe. Portanto, como você pode perceber, a coleta não irá interferir nem com o trabalho de parto de seu bebê nem com a saúde dele.. Este material seria jogado fora, como ocorre normalmente, mas será guardado em nitrogênio líquido, sendo usado para criar um Banco Público de Sangue de Cordão Umbilical que pode ajudar pessoas com alguns tipos de doenças do sangue.

Estou ciente que mesmo tendo concordado com a doação, o sangue de cordão só será coletado se o parto ocorrer em período de coleta, se eu não apresentar alteração clínica ou obstétrica no dia do parto que impeça a coleta e que o trabalho de parto se desenvolva normalmente sem risco para mim e ou para meu (minha) filho (a).

Tenho ciência que serão coletados 23 ml de sangue, após o parto para realização de sorologia para as seguintes doenças: sífilis, SIDA, hepatite (B e C), HTLV (1 e 2), doença de Chagas, citomegalovírus, toxoplasmose e tipagem HLA. Estes exames são necessários para melhor identificar o meu sangue.

Tanto o sangue do cordão como o da placenta, serão examinados para ver se não apresentam infecção ou outra doença, sendo depois congelados. O sangue de cordão somente será utilizado se aparecer uma pessoa que apresente uma doença que possa se beneficiar daquele sangue armazenado e que seja compatível. Atualmente este material é utilizado para reconstituir tecido hematopoiético (transplante de células progenitoras), podendo ser, no futuro, utilizado em terapia gênica nas doenças hematológicas como talassemia, anemia falciforme dentre outras.

Estou ciente que se a quantidade de sangue de cordão coletado for menor que 70 ml este não será armazenado para o banco de sangue de cordão, podendo ser utilizado em pesquisas relacionadas

a células tronco, em andamento na instituição, que tenham sido aprovados pelo Comitê de Ética. As amostras armazenadas para pesquisa serão desprezadas após o término destas.

Se a coleta for maior ou igual à 70 ml, deverei retornar à UBS (Unidade Básica de Saúde), ao PSF (Programa de Saúde da Família) ou a equipe do BSCUP entrará em contato em aproximadamente 60 dias (2 meses) após o parto, para fazer nova coleta de 23 ml do meu sangue, repetindo os exames anteriores (sorologia e tipagem do sistema HLA).

Serei informada dos resultados dos exames realizados tanto com o meu sangue quanto com o do meu (minha) filho (a), caso eu procure esta informação. Caso alguma doença seja encontrada, serei comunicada pela equipe do BSCUP e receberei encaminhamento para tratamento médico dentro do complexo hospitalar HC, CAISM, Hospital Estadual de Sumaré e Hemocentro da UNICAMP.

Será respeitado o sigilo e confidencialidade dos resultados dos exames que irei fazer, não sendo revelada minha identidade a não ser para a equipe médica responsável pelo atendimento. Esse respeito ao sigilo será mantido no caso da utilização do sangue do cordão para transplante, em caso de publicação dos resultados sobre o banco de sangue de cordão ou se for utilizado para pesquisa.

Autorizo a consulta do meu prontuário médico e do meu (minha) filho (a) pela equipe médica do BSCUP e do Serviço de Transplante solicitante, se houver necessidade da obtenção do histórico e ou dados clínicos no momento do transplante onde a bolsa coletada for utilizada. O BSCUP fica autorizado a transferir a unidade coletada, assim como todos os dados a ela relacionados para os Centros de Registro e/ou Serviços de Transplante solicitantes. Autorizo também, o descarte da bolsa se o período de validade vencer ou se algum exame detectar algo que impeça sua utilização.

Estou ciente que minha doação é livre e voluntária, podendo desistir da doação a qualquer momento, inclusive na hora do parto, não havendo qualquer prejuízo para o meu atendimento nos hospitais da UNICAMP, se eu não quiser participar. Não receberei nenhuma remuneração compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da unidade de SCUP.

Uma vez realizada a doação, estou ciente que se porventura alguém de minha família necessitar deste material, ele já poderá ter sido utilizado para outra pessoa.

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida nos seguintes ramais telefônicos abaixo.

Assinatura da doadora:

Aplicador do Termo de Consentimento:
.....

Responsável pelo serviço:

Testemunhas: 1.....

2.....

Campinas,...../...../.....

Banco de Sangue de Cordão – Unicamp: 3521-7003

Ambulatório de Pré-natal do CAISM: 3521-8535

Comissão de ética do CAISM: 35217910