

SILVANA GAIBA

**ANGIOTENSINA II EM CÉLULAS-TRONCO DO
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2012

SILVANA GAIBA

**ANGIOTENSINA II EM CÉLULAS-TRONCO DO
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

**Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências**

ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORIENTADORES: Profa. Dra. LUCIMAR PEREIRA DE FRANÇA

Prof. Dr. BERNARDO HOCHMAN

SÃO PAULO

2012

Gaiba, Silvana.
Angiotensina II em células-tronco do tecido adiposo humano. /
Silvana Gaiba -São Paulo, 2012.
xix, 125f

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista
de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica

Título em inglês: Angiotensin II in Human Adipose-derived Stem Cells.

1. Adipócitos 2. Angiotensina II 3. Células-Tronco Adultas 4. Células-Tronco 5. Tecido Adiposo 6. Obesidade

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA**

COORDENADOR:

Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Virgínia e Yuri, que souberam compreender os momentos de ausência durante esta fase de dedicação ao Curso, pelo amor, apoio constante e incentivo diário.

Aos meus pais Bruno Gaiba (in memorian) e Rosária Calado Gaiba (in memorian) e a todos meus irmãos e irmãs: Jorge, Bruno, Ana, Rosely, José (in memorian), Sandra, Solange e Sirlene. Que sempre demonstraram seu amor fraternal em todos os momentos da minha vida, consolidando em meu coração o sentido verdadeiro da palavra família.

À Lucimar Pereira de França amiga fiel, sincera, irmã carinhosa concedida por Deus. Sua firmeza, incentivo, dedicação, segurança e comprometimento, serviram-me de estímulo constante e certamente, servirão de exemplo por muito tempo. Hoje sou uma pessoa muito melhor do que quando iniciei essa jornada e sinto-me feliz por ter recebido com tanta dedicação e sabedoria os seus ensinamentos tanto científicos quanto pessoais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer a minha orientadora, **Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp) e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células, por abrir as portas desse laboratório para a realização deste trabalho, pela confiança, estímulo, competência, profissionalismo e com sua sábia orientação auxiliou-me na elaboração desta tese.

À **Profa. Dra. LUCIMAR PEREIRA DE FRANÇA**, PROFESSORA ADJUNTO do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz – BA (UESC), pela orientação e participação efetiva em todas as etapas deste trabalho.

Ao **Prof. BERNARDO HOCHMAN**, PROFESSOR AFILIADO da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, Professor Orientador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp pelo interesse demonstrado na realização desse trabalho, sugestões durante a correção da tese e pelos bons conselhos nos momentos tão indecisos da minha jornada.

À **Profa. Dra. HELENA BONCIANI NADER**, PROFESSORA TITULAR e Chefe do Departamento de Bioquímica da Unifesp pela

colaboração e oportunidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal e Citômetro de Fluxo.

À **CAROLINE VITO ROMERA** e à **ELIZABETH NAOMI KANASHIRO**, técnicas dos equipamentos multiusuários da Unifesp (Microscópio de Fluorescência Confocal e Citômetro de Fluxo) pelas sugestões e apoio técnico.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, **MARTA REJANE REIS SILVA, SANDRA DA SILVA** e **SILVANA APARECIDA COSTA DE ASSIS**, pelo apoio administrativo. Em especial pela amizade, carinho e compreensão adquiridas durante todos esses anos tornando minha estadia nessa universidade agradável, tranquila e feliz.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Células, **Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE** (DOUTOR EM CIÊNCIAS pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp – PPGCP/ Unifesp), **ANDREA FERNANDES DE OLIVEIRA** (MESTRE EM CIÊNCIAS pelo PPGCP/ Unifesp), **CELESTINO PRÓSPERO** (MESTRE EM CIÊNCIAS pelo PPGCP/ Unifesp), **GABRIELA SOARES SILVA BRITO** (MESTRE EM CIÊNCIAS pelo PPGCP/ Unifesp), **JORGE MANUEL** (MESTRE EM CIÊNCIAS pelo PPGCP/ Unifesp), **MICHELLE ZAMPIERI IPOLITO** (ENFERMEIRA ESPECIALISTA, aluna de doutorado do PPG/ Unifesp), **RAQUEL CUNSKIS CHIOCHETTE** (estagiária do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp), **Profa. VANINA MONIQUE TUCCI-VIEGAS** (DOUTORA EM CIÊNCIAS pelo PPGCP/ Unifesp), pela colaboração, sugestões nos protocolos experimentais, auxílio na formatação e correções desta tese. Agradeço principalmente pelo carinho e amizade demonstrados diariamente dentro e

fora do laboratório. Tenho prazer em ir ao Laboratório de Cultura de Células diariamente com certeza de encontrar pessoas alegres, amáveis, sinceras, solidárias que tornam o laboratório um ótimo lugar para se trabalhar.

A todos os professores da Universidade Federal de São Paulo, pelos constantes ensinamentos e pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, em especial àqueles que fazem o Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP.

Ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Plástica da Unifesp por conceder a bolsa de estudos da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

EPÍGRAFE

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas quando parte, nunca vai só nem nos deixa a sós. Leva um pouco de nós, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada.

(Khalil Gibran)

SUMÁRIO

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos.....	v
Epígrafe.....	viii
Sumário.....	ix
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xv
Resumo.....	xix
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	6
3. Literatura.....	8
4. Métodos.....	20
5. Resultados.....	38
6. Discussão.....	65
7. Conclusão.....	79
8. Referências.....	81
Abstract.....	92
Normas adotadas.....	94
Fontes consultadas.....	96
Apêndices	98

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. CTTAH (P2) corado com hematoxilina e eosina. (A) e (B) Microscópio de fluorescência (campo claro) com objetiva de 20x e em (C) e (D) (objetiva 40x). Células aderentes em semiconfluência com morfologia fusiforme, citoplasma extenso (semelhante a fibroblastos)..... 40
- Figura 2. CTTAH (P2) após diferenciação adipogênica. (A) Microscópio de fluorescência (objetiva 40x) demonstrando as gotículas lipídicas que foram coradas com Oil Red O (vermelho) e núcleo com DAPI (azul). (B) Mesma imagem utilizando o campo claro (objetiva 40x). A mudança para o meio de indução adipogênico originou células com várias inclusões lipídicas e núcleo periférico. 41
- Figura 3. CTTAH após diferenciação osteogênica em 21 dias. Os precipitados de cálcio foram corados com Alizarina vermelha (vermelho) e núcleo com DAPI (azul). (A) Microscópio de fluorescência (objetiva 20x) e (B) microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 20x)..... 42
- Figura 4. CTTAH cultivados após diferenciação condrogênica em 21 dias. As células foram coradas com azul de toluidina (azul). (A) Microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 20x) e (B) microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 40x)..... 43
- Figura 5. Imunofenotipagem representativa das CTTAH por citometria de fluxo (A) mostrando uma população negativa para a fluorescência avaliada (yellow fluorescence – YEL-HLog). Foram negativas também 45

	CD16 (B), CD34 (C) e CD45 (D).....	
Figura 6.	Imunofenotipagem das CTTAH por citometria de fluxo (A) mostrando uma população negativa para a fluorescência avaliada (yellow fluorescence – YEL-HLog). Foram positivas para CD73 (B), CD90 (C) e CD105 (D).....	46
Figura 7.	Média da porcentagens da imunofenotipagem da população de CTTAH cultivadas dos dez doadores avaliados. Todas as populações de células avaliadas estavam entre P2-P3. A expressão foi baixa (<5%) para os marcadores de células hematopoiéticas CD16, CD34 e CD45 e apresentaram alta expressão (>90%) para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105.....	47
Figura 8.	Média da porcentagem da população de CTTAH dos dez doadores avaliados. Foram marcados os receptores AT1 (1) e AT2 (2) da AII que foram avaliados 168 horas após estimulação com os diferentes meios de cultivo. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney (nível de significância: p<0,05). Os valores representam a média ± erro padrão (*: p<0,05. **: p<0,01. ***: p<0,001 indicam diferenças significantes em relação ao controle). Todos os grupos avaliados apresentaram a expressão dos receptores AT1 e AT2 da AII.	48
Figura 9.	Atividade Celular utilizando MTT ao longo do tempo. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney (nível de significância: p<0,05). Os valores representam a média ± erro padrão (*: p<0,05. **: p<0,01. ***: p<0,001 indicam diferenças significantes em relação ao controle). O aumento da atividade foi verificado principalmente nos grupos GII e GIV depois de 168 horas da estimulação com diferentes meios..	49
Figura 10.	Ciclo celular das CTTAH. (R2) representa a região correspondente a população de CTTAH onde podemos verificar o tamanho e complexidade dessas células (SSCxFSC). O histograma representativo (superior direito) mostra a análise da região das CTTAH marcadas	50

com 7AAD onde R3 corresponde a população em G0/G1, R4 corresponde a população das células em S e R5 corresponde a população de células em G2/M. (C) O histograma (inferior direito) representa a análise correspondente aos fragmentos de DNA. Avaliação do ciclo celular foi realizada no citometro de fluxo Guava (easyCyte HT) e analisadas no programa InCyte Software..

- Figura 11. Média da porcentagem da população de CTTAH nas diferentes fases do ciclo-celular avaliadas por citometria de fluxo. (1) fase G0/G1, (2) fase S/G2/M e (3) fragmentos de DNA dos diferentes grupos avaliados. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm erro padrão (*: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$ indicam diferenças significantes em relação ao controle).. 51
- Figura 12. Imunofluorescência das CTTAH (GC). Identificação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando-se o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 53
- Figura 13. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo II). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). 54
- Figura 14. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo III). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). 55
- Figura 15. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo IV). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). 56
- Figura 16. Imunofluorescência das CTTAH (GC). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 57
- Figura 17. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo II). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície 58

- celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ..
- Figura 18. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo III). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 59
- Figura 19. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo IV). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 60
- Figura 20. Microscopia de fluorescência das CTTAH (GC). (Superior esquerdo) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Superior direito) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Inferior) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). 61
- Figura 21. Microscopia de fluorescência das CTTAH Grupo II. (Superior esquerdo) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Superior direito) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Inferior) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 62
- Figura 22. Microscopia de fluorescência das CTTAH do Grupo III. (Superior esquerdo) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Superior direito) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Inferior) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 63
- Figura 23. Microscopia de fluorescência das CTTAH do Grupo IV. (Superior esquerdo) Citoesqueleto (vermelho) utilizando

Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Superior direito) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (Inferior) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).. ... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µM	Micromolar
µm	Micrometro
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
µm ²	Micrometro quadrado
µm ³	Micrometro cúbico
AGT	Angiotensinogênio
AI	Angiotensina I
AII	Angiotensina II
AP-1	Proteína-1 ativadora
ASCs	<i>Adipose-derived stem cells</i>
AT ₁	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina II tipo 2
BD	Becton-Dickinson
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior
cm ³	Centimetro cúbico
CO ₂	Dióxido de carbono

CTTAH	Células-tronco do tecido adiposo humano
DAPI	(4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMEM/F12	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco/Mistura de nutrients F-12 de Ham (1:1)
DMSO	Sufóxido de dimetila
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	<i>ethylenediamine-tetra acetic acid</i>
ELISA	<i>Enzime-linked immunosorbent assay</i>
ERK	ERK
<i>et al.</i>	E outros
FAS	Ácidos graxos sintase
FITC	Fluorocromo isotiocinato de fluoresceína
FL2	Intensidade de fluorescência 2
FSC	Dispersão frontal de luz - <i>Forward light scatter</i>
g	Força de gravidade
GPDH	glicerol-3-fosfato
h	Hora
HBSS	Solução salina balanceada de Hank
HE	Hematoxilina-eosina
HEPES	Ácido de (N-I-2-hidroxietil)piperazina-2-etanosulfônico
HSP	Hospital São Paulo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFG-1	Fator de crescimento <i>insulin-like</i>
IP	Iodeto de propídio
ISCT	ISCT

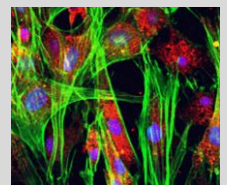
LPL	lipoproteína lipase
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
Mg	Magnésio
min	Minute
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MSCs	MSCs
MTT	<i>3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide</i>
nM	Nanomolar
n°	Número
O ₂	Oxigênio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBS	Solução tampão fosfato
PD123319	Antagonista do receptor AT2
PE	Ficoeritrina
PGs	Prostaglandinas
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
SFB	Soro fetal bovino
SRA	Sistema renina-angiotensina
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
SSC	<i>Dispersão lateral de luz –Side light scatter</i>
TAG	Triacilglicerol

TGF- β 1	Fator transformador de crescimento beta-1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UV	Ultra violeta
Valsartana	Antagonista do receptor AT1
α	Alfa
β	Beta

RESUMO

Introdução: Há um interesse científico crescente na plasticidade e potencial terapêutico das células-tronco do tecido adiposo humano (CTTAH), células multipotentes e abundantes no tecido adiposo que podem se diferenciar *in vitro* em múltiplas linhagens celulares, incluindo adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células neurais, endoteliais e cardiomiócitos. O objetivo deste estudo foi verificar o efeito da AII nas CTTAH. **Métodos:** Células precursoras humanas do tecido adiposo foram obtidas de tecido abdominal subcutâneo, separadas por gradiente de centrifugação por densidade, cultivadas, estimulados com diferentes meios de cultivo e então analisadas. **Resultados:** Os resultados de citometria de fluxo evidenciaram a expressão dos marcadores CD73, CD90 e CD105, contrastando com a falta de expressão dos marcadores CD16, CD34 e CD45. A diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica também foi induzida, confirmando seu potencial de células-tronco mesenquimais *in vitro*. As CTTAH foram capazes de se replicar em cultivo mantendo o fenótipo semelhante a fibroblastos *in vitro*. Quando estimuladas com os diferentes meios de cultivo verificamos que os meios contendo AII aumentaram a atividade celular e mitótica dessas células. **Conclusão:** Com a identificação da expressão dos receptores AT1 e AT2 e sob ação da AII exógena verificou-se o aumento da atividade celular e mitótica das CTTAH.

Introdução



1. INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo, sendo que os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, sem que isto seja nocivo para sua integridade funcional (AHIMA & FLIER, 2000). Além disso, nos últimos 15 anos foram dadas grande importância ao seu papel endócrino, em decorrência de estudos mostrando uma ampla gama de proteínas secretadas pelo tecido adiposo, denominadas adipocinas. Este fato consolida a ideia de que este tecido não é apenas um fornecedor e armazenador de energia, mas também um órgão dinâmico e endócrino (KERSHAW & FLIER, 2004; AILHAUD, 2006).

Estas adipocinas desempenham um papel importante na resposta imunitária, doenças vasculares e regulação do apetite. Em sua grande maioria, estão relacionadas direta ou indiretamente aos processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, diabetes tipo II e dislipidemias (GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998; AILHAUD, 2006).

Vários componentes do sistema renina angiotensina (SRA) foram descritos no tecido adiposo (MASSIERA *et. al.*, 2001). Estudos realizados nos últimos anos mostram que o SRA modula de forma importante o metabolismo e a função endócrina nesse tecido.

O sistema renina-angiotensina constitui uma cascata hormonal coordenada iniciada pela biossíntese da enzima renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais. A renina é então liberada por essas células através de exocitose, agindo enzimaticamente sobre o angiotensinogênio (AGT) hidrolisando-o em um decapeptídeo inativo, a angiotensina I (AI). Este peptídeo será catabolizado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em um octapeptídeo biologicamente ativo, a angiotensina II (AII).

Os níveis de RNAm de AGT são 60% maiores no tecido adiposo do que no fígado, que era considerado até então a principal fonte de AGT (HARP *et al.*, 1995, SAYE *et al.* 1993). A literatura tem demonstrado que a expressão de RNAm do AGT é regulado por ácidos graxos livres e que os glicocorticóides aumentam enquanto que a insulina diminui essa expressão (SAFANOVA *et al.*, 1997; AUBERT *et al.*, 1997: AUBERT *et al.*, 1998).

Sabe-se que a célula adiposa é uma das poucas células que dispõem não somente de todo o maquinário e ferramentas necessários para a síntese de angiotensina II (AII) como também aloja em sua membrana a subunidade AT1 de seu receptor, modulador de grande parte de suas respostas (CASSIS *et al.*, 1998). Os receptores da AII pertencem a superfamília de receptores acoplados a proteína G (*G protein-coupled receptors* - GPCRs), possuindo em sua estrutura sete hélices transmembranais (*seven-transmembrane* - 7TM) e na região N-terminal extracelular, sítios de glicosilação (OLIVEIRA *et al.*, 2007). A proteína G que se encontra acoplada ao receptor constitui uma via de transdução do sinal para o meio intracelular (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Os sítios de afinidade entre o receptor AT1 da AII têm cinética semelhante aos de outros órgãos alvos desse peptídeo e a presença desse

receptor no tecido adiposo é semelhante a do coração. Os adipócitos isolados do tecido adiposo humano demonstram apenas a presença de receptores AT1, sendo que muitas das ações da AII são antagonizadas por agentes que bloqueiam a atividade de receptores AT2 em células adiposas cultivadas (JONES *et al.*, 1997).

Devido às recentes descobertas de que o tecido adiposo expressa os vários componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) e processa toda a atividade enzimática desse sistema, inclusive vias alternativas, sugerem o possível papel do angiotensinogênio do tecido adiposo na obesidade associada à hipertensão (AILHAUD, 2006).

Sabe-se que a engenharia de tecido tem por objetivo integrar a contribuição tecnológica de diversas áreas de conhecimento científico que aparentemente não estão relacionadas, com o objetivo de gerar terapias inovadoras e revolucionárias para o reparo e enxertia de tecidos (LANGER & VACANTI, 1993; MOJALLAL & FOYATIER, 2004; AROSARENA, 2005).

Novas técnicas correlacionam pré-adipócitos autólogos, substratos de matriz extracelular, células progenitoras adultas e fatores de crescimento com atividades biológicas locais, os quais combinados resultariam em uma fabricação *in vitro* de enxertos autólogos de tecido adiposo e o subsequente uso clínico (GOMILLION & BURG, 2006).

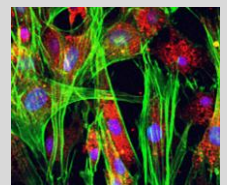
As células-tronco são células indiferenciadas e não especializadas, com capacidade única de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas por meio da autorreplicação, de forma que um pequeno número de células pode originar uma grande população de células semelhantes, e ainda exibem a potencialidade de se diferenciarem em células especializadas de um tecido específico (WEISSMAN, 2000, CAN

& KARAHUSEYINOGLU, 2007, RAMALHO-SANTOS & WILLENBRING, 2007, YAMANAKA & BLAU, 2010).

Toda vez que um órgão ou tecido sofre uma lesão, os sinais gerados induzem parte destes progenitores latentes para se desenvolverem em uma célula especializada, cumprindo um papel na manutenção, reparo e reconstituição de tecidos e órgãos de adultos, como o tecido adiposo, podendo ser divididas em dois grandes grupos, as células-tronco embrionárias e células-tronco adultas (WEISSMAN, 2000, CAN & KARAHUSEYINOGLU, 2007, RAMALHO-SANTOS & WILLENBRING, 2007, YAMANAKA & BLAU, 2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam o recrutamento das células-tronco de se submeterem a diferenciação adipogênica assim como os mecanismos intracelulares envolvidos na resposta da angiotensina II na formação dos adipócitos para a fisiologia do tecido adiposo.

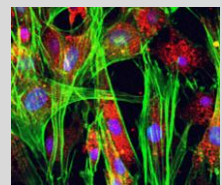
Objetivo



2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da angiotensina II em células-tronco do tecido adiposo humano.

Literatura



3. LITERATURA

PETTERSSON *et al.* (1985) isolaram células precursoras de adipócitos a partir de estroma vascular de omento e de tecido adiposo subcutâneo de humanos adultos obesos e não obesos. Depois, compararam a taxa de replicação destas células em cultura e o número de células com capacidade de expressar o fenótipo de adipócitos. Verificaram que não há diferença na taxa de replicação de células das amostras de doadores obesos e não obesos, nem quando comparados com células precursoras de outros locais diferentes. Também avaliaram o crescimento celular no meio de cultura, onde aproximadamente 6,5% da população celular original exibiram a morfologia de adipócitos. Assim estes resultados sugerem que as células encontradas no estroma vascular do tecido adiposo têm a habilidade para diferenciar-se em adipócitos sendo que o ambiente e fatores locais, muito mais do que os fatores genéticos, podem ser responsáveis pela hiperplasia em humanos obesos.

DESLEX *et al.* (1987) demonstraram que as células do estroma vascular do tecido adiposo humano adulto podem sofrer conversão gordurosa que consiste na síntese de gotículas de lipídio quando cultivadas em meio contendo insulina, transferrina e triiodotironina. Cerca de 20% das células mudaram sua morfologia para adipócitos e acumularam gotículas de

lipídio no período de 10 a 15 dias. As células se diferenciaram e formaram aglomerados observados por imunofluorescência pela identificação da lipoproteína lipase (situado na região de Golgi) e por meio da imunohistoquímica identificando-se o glicerol-3-fosfato (GPDH). O crescimento celular em meio de cultura apropriado, livre de soro, permitiu a diferenciação de adipócitos diplóides precursores por apresentarem fatores envolvidos na estimulação ou inibição do processo de diferenciação.

DESLEX, NEGREL, AILHAUD (1987) demonstraram que células do estroma vascular de ratos obesos de 4 semanas de idade quando cultivados em meio contendo insulina ou fator de crescimento insulina-like, IGF-I, triiodotironina e transferrina sofreram conversão em células gordurosas. Cerca de 90% das células acumularam gotículas de lipídio e isso foi proporcional à redução na suplementação do soro no meio de cultura. A conversão foi avaliada pelo desenvolvimento de lipoproteína lipase e atividade da GPDH, incorporação de glicose marcada com ^{14}C pelas células. Resultados semelhantes obtidos de diferentes regiões de rato com células do estroma vascular de tecido adiposo. Este resultado sugeriu que em meio apropriado livre de soro ocorre diferenciação celular de precursores de adipócitos diplóides e abre a possibilidade da caracterização de ativadores ou inibidores do processo de conversão adiposa.

HAUNER *et al.* (1989) cultivaram células do estroma vascular obtidas do tecido adiposo subcutâneo humano de adulto que foram cultivados em meio de cultura livre de soro na presença de 0,2 nM de triiodotironina, 0,5 μM de insulina. Após 18 dias mais de 25% das células

foram capazes de diferenciar-se. As células foram avaliadas por acúmulo de lipídios, expressão de lipoproteína lipase (LPL) e pela atividade da GPDH. A adição do cortisol resultou num potente processo de diferenciação do tecido adiposo com característica concentração-dependente. O cortisol pode ser substituído pela dexametasona ou pela aldosterona, mas não por hormônios esteróides sexuais. A proporção de células diferenciadas foi dependente da idade e do doador. Quando isoladas de adultos jovens, até 70% dessas células do estroma vascular expressaram o fenótipo de adipócito, quando comparada a 5-10% das células que foram isoladas dos pacientes mais velhos. Uma relação inversa foi observada entre a idade dos 27 doadores com peso normal e alta expressão de GPDH, após a manutenção das células por 18 dias (meio de cultura suplementado com insulina, triiodotironina e cortisol). Esses autores concluíram que o tecido adiposo humano adulto ainda contém células precursoras de adipócitos que são capazes de sofrer diferenciação *in vitro*.

DARIMONT *et al.*, (1994) analisaram a capacidade da AII para induzir os pré-adipocitos a diferenciação e, sua presença simultânea de células diferenciadas. Em co-cultura, tais experimentos mostram que o efeito da promoção de AII sobre a diferenciação de células pré-adipocitos foi fortemente reduzida pela aspirina, os anticorpos capazes de neutralizar PGI₂, e os antagonistas dos receptores AT₂ (PD123177), mas não pelo antagonista do receptor AT₁. Juntos, estes resultados demonstraram que a AII como sendo capaz por meio de ligação a um receptor do subtipo AT₂ presente nas células adiposas, controlar o efeito adipogênico de PGI₂ com sinalização parácrina.

POLIARD *et al.* (1995) mostraram que a linhagem celular C1 derivada de teratocarcinoma se comportava como uma célula progenitora de tripla potencialidade mesodermal podendo diferenciar-se em osteoblasto, condroblasto ou adipoblasto, sendo estritamente dependente da organização espacial das células e da natureza da indução. Na ausência de contato entre as células antes da adição de indutores, as células C1 mantinham um fenótipo de indiferenciação estável. Quando em contato, antes da indução de diferenciação, apresentam genes característicos de osteoblasto, condroblasto e adipoblasto. A presença de fatores específicos, como β -glicerofosfato, ascorbato e dexametasona nas células induziram essa diferenciação nesses três tipos celulares validando essa capacidade nos clones C1 como um modelo *in vitro* para estudo desses fatores moleculares que podem ter uma ação sinérgica pela ação conjunta de fatores de estimulação como a dexametasona e insulina que foram capazes de converter as C1 em adipócitos funcionais.

JONES, STANDRIDGE, MOUSTAID (1997) caracterizaram o receptor AT_1 em adipócitos da linhagem 3T3-L1 e testaram a hipótese que a AII tem ação direta no metabolismo de adipócitos usando ambos os modelos, 3T3-L1 e adipócitos humanos. Mostraram que a AII tem efeitos semelhantes em células adiposas de humanos e na linhagem 3T3-L1 mantidas em cultura primária. Finalmente, demonstraram que a AII aumenta a taxa de transcrição do FAS e do gene *ob* em 3T3-L1 e células adiposas de humanos. Estes resultados indicaram que AII pode estar envolvida no controle da adiposidade pela regulação da síntese de lipídio e do armazenamento em adipócitos.

JONES *et al.* (1997) Os autores investigaram os níveis de mRNA do AGT em tecidos adiposos de ratos Zucker, obesos, ratos Avy e humanos e trataram os adipócitos 3T3-L1 com insulina, glicose e um agonista beta-adrenérgico. Demonstraram que o mRNA do AGT diminuiu aproximadamente 50 e 80%, respectivamente, em tecidos adiposos de obesos versus magros (ratos Zucker e camundongos Avy). Concluindo que o mRNA do AGT é 'regulado para cima' pela insulina e 'regulado para baixo' pela estimulação de beta-adrenérgico em adipócitos.

MALLOW *et al.*, (2000) demonstraram a monitoração da produção de AT1 e AT2 durante a diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1 de camundongos por imunodeteção com anticorpos. Receptores AT1 pode ser detectado durante o período de diferenciação. Demonstrou que a expressão de AT2 em pré-adipócitos foi alta, porém, foi perdida durante o curso da diferenciação, o que sugere que a expressão de receptores AT2 é inversamente correlacionada com a diferenciação em adipócitos.

GREGOIRE (2001) relatou que o tecido adiposo branco possui um papel central na regulação do equilíbrio energético e atua como um órgão secretório/endócrino que participa de numerosos processos fisiológicos e patológicos. Desequilíbrio do tecido adiposo branco pode causar obesidade ou lipoatrofia, doenças cardiovasculares e diabetes. Alterações no tecido adiposo branco resultam em mudanças nos números ou tamanhos de adipócitos. As mudanças do número de adipócitos são alcançadas por uma interação complexa entre proliferação e diferenciação de pré-adipócitos. Diferenciação de adipócitos ou a adipogênese, é um processo altamente controlado que foi estudado extensivamente durante os últimos 25 anos.

JANKE *et al.* (2002) examinaram o papel de AII para a diferenciação de pré-adipócitos humanos em cultura primária. Os pré-adipócitos isolados do tecido adiposo humano foram estimulados para diferenciação. A influência do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) em diferenciação de adipócitos foi investigada adicionando angiotensinogênio (AGT), AII ou antagonistas do receptor de AII no meio para diferenciação. Verificaram também a influência de adipócitos em adipogênese por meio de experiências em co-cultura. A expressão dos genes do SRAA, AGT, enzima conversora de angiotensina (ECA) e receptor AT_1 aumentaram durante a adipogênese. A estimulação do receptor AT_1 através da AII reduziu conversão da gordura, considerando que o bloqueio deste receptor notadamente aumentou a adipogênese. Os adipócitos podem inibir a diferenciação de pré-adipócito na co-cultura, e este efeito foi abolido pelo bloqueio do receptor AT_1 . Este achado leva para um papel funcional do SRAA na diferenciação do tecido adiposo humano, porque a secreção de AGT e geração de AII são características da adipogênese. Os autores postularam um mecanismo parácrino de retroalimentação negativo que inibe o recrutamento adicional de pré-adipócitos em adipócitos maduros.

KIM *et al.* (2002) mostraram que a AII aumenta a síntese de ácido graxos e e triglicerídeos armazenados. Os triglicerídeos armazenados estão correlacionados com a concentração de leptina circulante. Propuseram que a AII pudesse aumentar a diferenciação de adipócitos e a produção de prostaglandinas (PGs). O propósito deste estudo foi determinar se AII aumenta a secreção de leptina por um mecanismo PG-dependente. Doses fisiológicas de AII aumentaram secreção de leptina significativamente na

linhagem 3T3-L1 e em adipócitos humanos. Concluíram que embora a AII estimule a secreção de leptina e PGs em adipócitos, a regulação dessa secreção de leptina, pela AII em adipócitos não é determinada por um mecanismo PGs-dependente.

SCHLING (2002) aborda a questão através do monitoramento dos níveis de RNAm, assim como a produção de proteína dos receptores da AT1 e AT2 durante a diferenciação dos pré-adipócitos humanos em cultura e em adipócitos maduros. Níveis de RNAm dos dois tipos de receptores são inversamente correlacionados durante a conversão do tecido adiposo. O receptor AT1 foi reduzido em até 12 dias após a indução de diferenciação, enquanto AT2 foi elevada, correlacionando bem com o aumento da atividade da desidrogenase específica glicerol-3-fosfato das células, mas o receptor AT1 não varia durante o período de diferenciação.

HARTE *et al.* (2003) utilizaram os adipócitos isolados do subcutâneo que foram tratados com insulina (doses variando de 1–1000 nM) por 48 h. Desenvolveram um anticorpo anti-AGT e validaram por imunohistoquímica. As doses crescentes de insulina elevaram a expressão da proteína de AGT de uma maneira dose-dependente e concluíram que essas doses crescentes estimularam a produção de AGT. A análise dessa proteína sugeriu, nesse trabalho, que a hiperinsulinemia deve ser um fator importante para a relação hipertensão e obesidade.

O'CONNOR *et al.* (2003) estimularam a fração do estroma vascular do tecido adiposo humano para adipogênese *in vitro* numa matriz de

substrato extracelular diferente de tecido adiposo coletado de pacientes do sexo feminino de 25 a 45 anos de idade submetidos a uma cirurgia eletiva. Depois de 24 dias, menos de 5% de células estroma-vasculares tinha sido convertida em adipócitos com substrato de fibronectina, 13% a 28% com colágeno I e $59\% \pm 7\%$ com Matrigel. O volume de lipídio ultrapassou $4,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{célula}$ para o Matrigel com 30% abaixo para os outros substratos. A proliferação das células era evidente para o Matrigel e para a fibronectina, as células apresentaram um espalhamento maior com uma área projetada que excede $3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{célula}$. Estes resultados são pertinentes ao desígnio de um implante gorduroso, enquanto promovem sua viabilidade na composição de um substituto.

CASSIS *et al.* (2004) buscaram determinar se a produção local de AII influenciava a liberação de leptina de adipócitos e concentrações de leptina circulantes. Os adipócitos de ratos tratados por três dias com captopril, demonstraram redução de AII, liberação de leptina e diminuição das concentrações de leptina circulante. Adipócitos incubados com AII resultaram em um aumento da expressão do RNAm da leptina e liberação da mesma. Determinaram o efeito elevado da AII sistêmico e leptina em ratos com injeções de AII ou solução salina por 1, 2, ou 7 dias tendo reduzido a concentração de leptina circulante com a duração da exposição de AII. Indicaram que a produção local de AII aumenta leptina liberada pelos adipócitos; porém, com elevações em AII sistêmica, ativada pelos efeitos da AII local produzida.

MATSUSHITA *et al.* (2006) avaliaram a expressão de RAS endógeno em células tronco mesenquimais humanas do tecido adiposo

durante sua diferenciação em adipócitos e estudaram os efeitos do AT1, AT2, antagonista do AT1 (Valsartana) e antagonista do AT2 (PD123319). Foi demonstrado que a diferenciação foi associada a um aumento na expressão dos receptores da renina celular e AII e uma diminuição concomitante no angiotensinogênio e na expressão de enzima conversora de angiotensina. O efeito foi associado a um aumento na produção endógena intracelular da AII. Incubação com AII (exógena) inibiu a adipogênese. O tratamento combinado de exógenos AII e Valsartana inibiram a adipogênese, enquanto o tratamento combinado de AII e PD123319 aboliram completamente a inibição da adipogênese, sugerindo um papel importante para AT2. A combinação de Valsartana e PD123319 não teve nenhum efeito. Os dados demonstram um papel importante da expressão do RAS local e na regulação da diferenciação das células tronco do tecido adiposo.

ASAMIZU *et al.* (2009) demonstraram que o mecanismo de AII-induzido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) induzido pela proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) produzida por pré-adipócitos de linhagem 3T3-L1. A MCP-1 e a expressão do RNAm da proteína MCP-1 dos pré-adipócitos foram aumentados significativamente pela estimulação com TNF-alfa. Os autores não encontraram aumento significativo na concentração de MCP-1 pela AII mas ocorreu aumento da expressão de TNF-alfa induzido pela expressão do RNAm da MCP-1 de maneira dose-dependente. A AII aumentou a proteína-1 ativadora (AP-1) (c-fos) induzida por TNF-alfa sugerindo que a AII pode servir como um estímulo adicional na produção de TNF-alfa induzindo produção de MCP-1

através das vias ERK e p38MAPK provavelmente devido à ativação do AP-1.

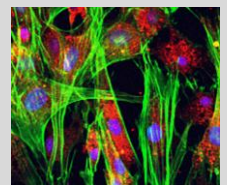
FUENTES *et al.* (2010) buscaram esclarecer os mecanismos intracelulares envolvidos na resposta anti-adipogênicas de células de pré-adipocitos omental em angiotensina II. Foram avaliados em células estimuladas a diferenciação adipogênica *in vitro*, pela avaliação de desidrogenase glicerol-3-fosfato de atividade e expressão de marcadores precoces de adipogênese. A exposição a angiotensina II durante o período de diferenciação de 10 dias resultou numa resposta adipogênica reduzida. Um efeito anti-adipogênico semelhante foi observado quando este hormônio estava presente durante as primeiras 48 h de indução de diferenciação. Após a exposição da angiotensina II, foi determinado, um aumento de ERK fosforilada que era mais proeminente 8-20 h após a indução da adipogênese. A inibição química da fosforilação ERK impediu a redução da angiotensina II dependente na adipogênese. Estes resultados confirmaram a participação da via proteína quinase / ERK e do efeito anti-adipogênico em pré-adipócitos em humanos tratadas com angiotensina.

LIU *et al.* (2011) verificaram o efeito da Ang-(1-7) sobre o estresse oxidativo e captação de glicose em adipócitos utilizando cultura de adipócitos do epidídimo de camundongos para estudar o efeito da a angiotensina-(1-7) sobre a captação de glicose. Também utilizaram Ang-(1-7) exógena em células de linhagem 3T3-L1 após diferenciação e super expressaram a ECA para induzir a Ang (1-7) para esclarecer seus efeitos sobre a ROS. Verificaram os efeitos da ROS por citometria de fluxo e por PCR em tempo real. Concluíram que a Ang-(1-7) pode ser um protetor

contra o estresse oxidativo e melhorar o metabolismo da glicose nos adipócitos.

THAN, TEE, CHEN (2012) investigaram os efeitos da AII sobre a secreção da apelina e sobre a expressão do receptor da apelina em células de linhagem 3T3-L1 e elucidaram as vias de sinalização mediadas pelos receptores AT1 e AT2 da AII. Demonstraram que o receptor AT1 estimula a secreção da apelina enquanto o AT2 inibi essa secreção. Além disso, demonstraram que a expressão do receptor da apelina também é regulada pelos receptores AT1 e AT2 da AII.

Métodos



4. MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Unifesp, tendo sido aprovado. CEP 0858/08 (Apêndice 1).

Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão estabelecidos a seguir, após assinatura de termo de consentimento (Apêndice 2).

4.1.1. Caracterização da Amostra

As amostras de células foram obtidas de 10 pacientes submetidos a cirurgias eletivas de abdominoplastias realizadas no Hospital São Paulo (HSP) pela Disciplina de Cirurgia Plástica. Os pacientes foram do gênero feminino com idade entre 18 a 50 anos e tipo de pele II ou maior segundo a classificação de Fitzpatrick.

4.2 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSE HUMANO (CTTAH)

Para a obtenção da cultura primária de células-tronco do tecido adiposo humano duas amostras de 10 cm³ de pele de peça cutânea adiposa infra-umbilical que seriam desprezadas nessas cirurgias foram imediatamente transportadas em frasco de cultura estéril de 100 ml (Schott Duran, Wertheim am Main, Baden-Württemberg, Alemanha) contendo 50 ml de solução salina balanceada Hank's (HBSS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), com 100 U/ml de penicilina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), e levados para ambiente estéril no Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica.

No ambiente estéril, cabine de fluxo laminar (Class IIA B3 - ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), os fragmentos foram lavados em seis béqueres (Laborglas, São Paulo, São Paulo, Brasil) com 20 ml de solução HBSS com auxílio de pinças estéreis e os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri de 100 mm (Corning, Corning, New York, EUA) de diâmetro sendo o tecido adiposo cortado em fragmentos de aproximadamente 0,5 mm com auxílio de uma tesoura de Íris.

Os fragmentos resultantes foram transferidos para um frasco de vidro de 100 ml estéril e acrescentado 1 mg/ml de colagenase tipo II (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em HBSS na proporção 4 volumes de

colagenase tipo II para 1 volume do tecido obtido, submetidos à agitação em incubadora (TE-420 - Tecnal, Piracicaba, São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 37° C. A solução obtida foi filtrada em malha de nylon de 250 µm. O filtrado obtido foi colocado em tubos cônicos (Corning, Corning, New York, EUA) estéreis de 50 ml e centrifugado (Centrífuga Excelsa II – Fanem, São Paulo, São Paulo, Brasil) por 10 minutos a 300 g em temperatura ambiente.

O precipitado foi transferido para um tubo cônico de 50 ml (Corning, Corning, New York, EUA) e lavado com uma solução de 20 ml de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)/Mistura de Nutrientes F-12 (HAM) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina (denominado a partir desse momento como DMEM/F12 completo), a solução contida no tubo foi centrifugada novamente por 10 minutos a 300 g em temperatura ambiente.

Para a separação das CTTAH utilizou-se o ficoll-hypaque como gradiente de centrifugação e a solução contendo o precipitado foi ressuspensa em 3 ml de solução tampão fosfato (PBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e adicionada em iguais volumes (3 ml) de soluções de diferentes densidades (Histopaque® -1077 e 1119) sendo após centrifugada a 300 g por 30 min. Este procedimento agrupa as células de dimensões e pesos semelhantes em anéis facilmente diferenciáveis, sendo retirado o anel intermediário com o uso de uma pipeta de 5 ml descartável (Corning, Corning, New York, EUA). As células presentes nesse anel foram ressuspensas em um tubo cônico de 15 ml contendo 10 ml de DMEM/F12 completo sendo novamente centrifugado a 300 g por 10 min

em temperatura ambiente. Foi descartado o sobrenadante e o precipitado de células foi ressuspensão em 4 ml de meio DMEM/F12 completo.

A solução de 4 ml de meio DMEM/F12 completo com as células ressuspensas foi distribuída em quatro garrafas de cultura de 75 cm² (Corning, Corning, New York, EUA) contendo 10 ml de DMEM/F12 completo e mantidas em incubadora (Revco Elite II - ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) úmida a 37° C e 5% de CO₂. No ambiente estéril após 24 horas do isolamento, com as CTTAH aderidas na garrafa de cultura, o meio foi removido por sucção utilizando uma pipeta estéril tipo Pasteur ponta capilar fina, havendo depois a lavagem da garrafa por três vezes com 10 ml de PBS contendo 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina à 37° C e adicionados 10 ml de DMEM/F-12 completo. Para a manutenção das células foi renovado o meio de cultura a cada 48 horas.

4.3 SUBCULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO

Quando as células aderidas à garrafa ou placa de cultura atingiram aproximadamente 80% de confluência, foi realizada a passagem através da digestão enzimática (tripsinização). Esse procedimento tem por objetivo desprender as células da garrafa ou placa e transferi-las para outro recipiente e/ou utilizá-las em procedimentos posteriores (células utilizadas da segunda a sexta passagem). Para a tripsinização a garrafa ou placa de

cultura teve seu meio de cultura retirado por sucção sendo após lavada utilizando uma solução de PBS suplementado com 0,5M de *ethylenediamine-tetra acetic acid* (EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e em seguida a solução foi retirada por sucção e acrescentada uma solução de 0,25% de tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 0,02% de EDTA por 2 minutos em igual proporção de volume da tripsina, essa variava dependendo do tamanho da garrafa ou placa de cultura utilizada. A tripsina foi neutralizada utilizando meio DMEM/F12 completo. A suspensão de células foi centrifugada a 300g por 10 min, o sobrenadante foi retirado por sucção e as células foram ressuspensas em meio DMEM/F12 completo e mantido em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ até atingirem novamente 80% de confluência.

As CTTAH foram distribuídos de acordo com os meios de cultura: a) DMEM/F12 completo b) DMEM/F12 completo suplementado com AII 10⁻⁷M (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) c) meio adipogênico (DMEM/F12 completo, 10 µM insulina, 1 µM de dexametasona), d) meio adipogênico suplementado com AII 10⁻⁷M.

QUADRO 1 – Grupos experimentais.

NOME DOS GRUPOS	MEIOS UTILIZADOS
Grupo I/Controle (GC)	DMEM/F12 completo
Grupo II	DMEM/F12 completo com AII 10^{-7} M
Grupo III	Meio Adipogênico
Grupo IV	Meio Adipogênico com AII 10^{-7} M

4.4 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO

Para o grupo controle as células foram cultivadas em duas placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausem, Suíça) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences, Hartfield, Pennsylvania, EUA). Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS. A seguir: as células foram incubadas por 10 min em PBS contendo 0,1 M de glicina sendo posteriormente lavadas duas vezes apenas em PBS por 2 min.

Posteriormente, as células foram incubadas com o corante hematoxilina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a temperatura

ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada cinco vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com o corante eosina em PBS por 2 min e as células foram novamente lavadas três vezes com água corrente para retirar o excesso do corante. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, Melville, New York, EUA). O referido equipamento foi adquirido no subprojeto “Avaliação funcional e morfológica de células em regeneração tecidual ecto e mesodérmica”, coordenado pela Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira (Edital Capes nº 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional).

4.4.1 Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em duas placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausem, Suíça) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 µM insulina e 1 µM de dexametasona (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por 15 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences, Hartfield,

Pennsylvania, EUA). Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 min.

Posteriormente, as células foram incubadas com o 0,5% de corante Oil Red O (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a temperatura ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada cinco vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1µg/ml do corante (4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride (DAPI) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) em PBS (0,1% de BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e 0,2 % de saponina (Calbiochem, Darmstadt, Hessen, Alemanha) por 2 min e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, Melville, New York, EUA).

4.4.2 Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em duas placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 50µM de ácido ascórbico (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) ®), 0,1µM de

dexametasona e 10^{-2} M de β glicerofosfato (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, New Jersey, EUA) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO_2 e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 min.

Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de 40 mM de alizarina vermelha sódica (pH 4.1) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com $1\mu\text{g}/\text{ml}$ do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 min e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, Melville, New York, EUA)

4.4.3 Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em duas placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Schaffhausen, Suíça) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 μ M insulina, 0,1 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico e 10ng/ml TGF- β 1 (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, EUA) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora formalina 0,4% em PBS paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 min.

Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução 0,1% de azul de Toluidina (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, Melville, New York, EUA).

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CELULAR

Para determinação da atividade celular das CTTAH foi utilizada uma solução de 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) (Amresco, Solon, Ohio, EUA). Foram semeadas 1×10^3 células em cada poço de placa de cultura (96 poços) com 90 μL de meio DMEM/F12 completo e mantido em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas e depois distribuídos nos respectivos grupos avaliados.

Após 24, 48 e 168 horas na placa de 96 poços foram adicionados 10 μL de solução de MTT a 10 mg/mL [10x] em DMEM/F-12 sem SFB e mantidos em incubadora por 4 horas a 37°C . O meio de cultura foi removido e substituído por 100 μL de solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e após 10 min, as leituras de absorbância foram realizadas em equipamento de Elisa SpectraMax M2^o E (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) em um comprimento de onda de 570nm. O referido equipamento foi adquirido no subprojeto “Avaliação espectrofotométrica, fluorimétrica e luminométrica para pesquisa em regeneração tecidual ecto e mesodérmica e estresse oxidativo”, coordenado pela Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira (Edital Capes nº 11/2009 - Pró-Equipamentos Institucional).

4.6 CITOMETRIA DE FLUXO

4.6.1 Imunofenotipagem das CTTAH

Após o isolamento das CTTAH as células da segunda passagem foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300 g por 4 min, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1 mL de PBS. Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi repetida duas vezes. Após a segunda lavagem as células foram ressuspensas em 600 μ L de PBS e divididas em 6 tubos de citometria de 5 mL. Foi acrescentado em cada tubo apenas um dos seguintes anticorpos (CD16 - PE-CY7, CD34 - APC, CD45 - FITC, CD73 - PE, CD90 - APC e CD105 - PE) conforme descrito no Quadro 2.

Os tubos contendo as células e os anticorpos foram incubados durante 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. A seguir foram acrescentados 300 μ L de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte HT (Millipore, Belford, Massachusetts, EUA) e analisadas no programa InCyte Software.

QUADRO 2 – Anticorpos conjugados a fluoróforos para citometria de fluxo.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	VOLUME (µL)	CANAL DE FLUORESCÊNCIA	MARCA
HU CD16 - 3G8	pronto para uso	5	PE-CY7	Becton, Dickinson
HU CD34 - 581	pronto para uso	20	APC	Becton, Dickinson
HU CD45 - HI30	pronto para uso	20	FITC	Becton, Dickinson
HU CD73 - AD2	pronto para uso	20	PE	Becton, Dickinson
HU CD90 - 5E10	pronto para uso	10	APC	Becton, Dickinson
HU CD105 - 266	pronto para uso	10	PE	Becton, Dickinson

4.6.2 Identificação dos receptores AT1 e AT2 da AII das CTTAH

Após o estímulo com os diferentes meios de cultivo as CTTAH cultivadas foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300 g por 4 min, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 1 mL de PBS. Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi repetida duas vezes. Após a segunda lavagem as células foram ressuspensas em 600 µL de PBS e divididas em 2 tubos de citometria de 5 mL. Foi acrescentado em cada tubo apenas um dos seguintes anticorpos (Anti-receptor AT₁ da AII - PE e Anti-receptor AT₂ - APC) conforme descrito no Quadro 2.

Os tubos contendo as células e os anticorpos foram incubados durante 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. A seguir foram acrescentados 300 µL de PBS e as amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo citômetro de fluxo Guava easyCyte HT e analisadas no programa InCyte Software.

QUADRO 3 – Anticorpos conjugados a fluoróforos para identificação dos receptores AT1 e AT2 da AII.

ANTICORPO	DILUIÇÃO	VOLUME (µL)	CANAL DE FLUORESCÊNCIA	MARCA
Anti-Receptores AT ₁ da AII AAR-011-AO	1:250 em PBS	100 (1x10 ⁶ células)	PE	Alomone Labs
Anti-Receptores AT ₂ da AII (A2295-07T3)	pronto para uso	10 (1x10 ⁶ células)	APC	US Biological

4.6.3 Determinação das fases do ciclo celular por citometria de fluxo

A fração de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela quantificação de DNA pelo IP, que é um agente que se intercala de maneira estequiométrica, isto é, proporcional ao número de bases do DNA seguindo as disposições espaciais de acordo com a forma molecular da dupla hélice do ácido nucléico. Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica revista por NICOLETTI *et al.* (1991). As células de cada grupo experimental foram tripsinizadas e ressuspensas paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a células fixadas foram lavadas duas vezes com 1ml de PBS a 4°C e ressuspensas em 0,1 M de glicina por 10 min. As células foram lavadas 2 vezes com 1ml de PBS e após a segunda lavagem as

células foram ressuspensas em 500 µl de PBS (0,1% BSA e 0,3% saponina) a 4° C. Para eliminar duplas hélices de RNA na amostra, foi adicionada RNase em uma concentração de 0,5 mg/ml, e a amostra foi incubada a 4° C por 50 minutos. Então, foi adicionado 5 µg/ml de IP por 15 min em temperatura ambiente. A amostra foi protegida da luz e analisada no citômetro de fluxo (10.000 eventos por amostra).

A análise da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, G₀/G₁, S e G₂/M foi realizada utilizando-se o programa InCyte Software.

4.7 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para os ensaios de detecções citoquímicas e/ou imunocitoquímicas, 1x10⁴ células foram semeadas sobre lamínulas circulares de 12 mm de diâmetro em placas de 24 poços contendo meio DMEM/F12 completo e, mantida em incubadora úmida à 37° C e 5% de CO₂. Após sete dias o meio foi removido por sucção e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml da solução fixadora formalina 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células foram lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 min. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução corante e/ou anticorpo a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante e/ou anticorpo foi removida cuidadosamente com auxílio de uma

pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água destilada para retirar o excesso de corante e/ou anticorpo. A seguir, as células foram incubadas com 1 µg/ml do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 min e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS.

As lamínulas contendo as células foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, Melville, New York, EUA).

QUADRO 4 – Fluoróforos e anticorpos para microscopia de fluorescência.

ANTICORPO OU CORANTE	DILUIÇÃO	EMISSÃO (nm)	APLICAÇÃO
Alexa Fluor	1:100 em PBS	570	Citoesqueleto
Alizarina Vermelha	40 nM	599	Precipitado de Cálcio
Anexina V	5 µl/ml	520	Fosfatidilserina
Anti-receptores AT ₁ da AII	1:250 em PBS	576	Receptores AT ₁ da AII
Anti-receptores AT ₂ da AII	1:500 em PBS	576	Receptores AT ₂ da AII
DAPI	1:100 em PBS	454	Ácido nucléico
IP	5 µl/ml	599	Ácido nucléico
Oil Red O	0,5%	599	Gotículas Lipídicas

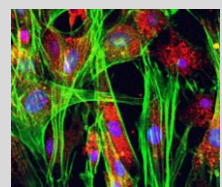
4.8 ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram comparados entre si e submetidos a análise estatística.

Os parâmetros de análise foram representados como valores médios ou como porcentagem de aumento relativo ao controle. Os valores foram expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística dos resultados foi determinada usando-se o teste de Anova seguido pelo teste de Mann-Whitney. Em todos os testes se fixou em 5% ($p < 0,05$) o nível de rejeição de nulidade, assinalando-se com um asterisco os valores significantes.

A análise do histograma em citometria de fluxo foi realizada quantificando a porcentagem das regiões G0/G1, S e G2/M utilizando-se o programa InCyte Software.

Resultados



5. RESULTADOS

5.1 ENSAIO DE DIFERENCIAÇÃO

Para os ensaios de diferenciação as células-tronco do tecido adiposo humano (CTTAH) cultivadas da segunda passagem (P2), que estavam aderidas nas duas placas de seis poços, foram divididas nos quatro grupos experimentais em triplicata. Esse procedimento foi realizado para as amostras de todos os doadores participantes e as imagens representativas correspondentes a cada ensaio estão demonstradas nas figuras 1, 2, 3 e 4 respectivamente.

5.1.1 Células-tronco do tecido adiposo humano (grupo controle).

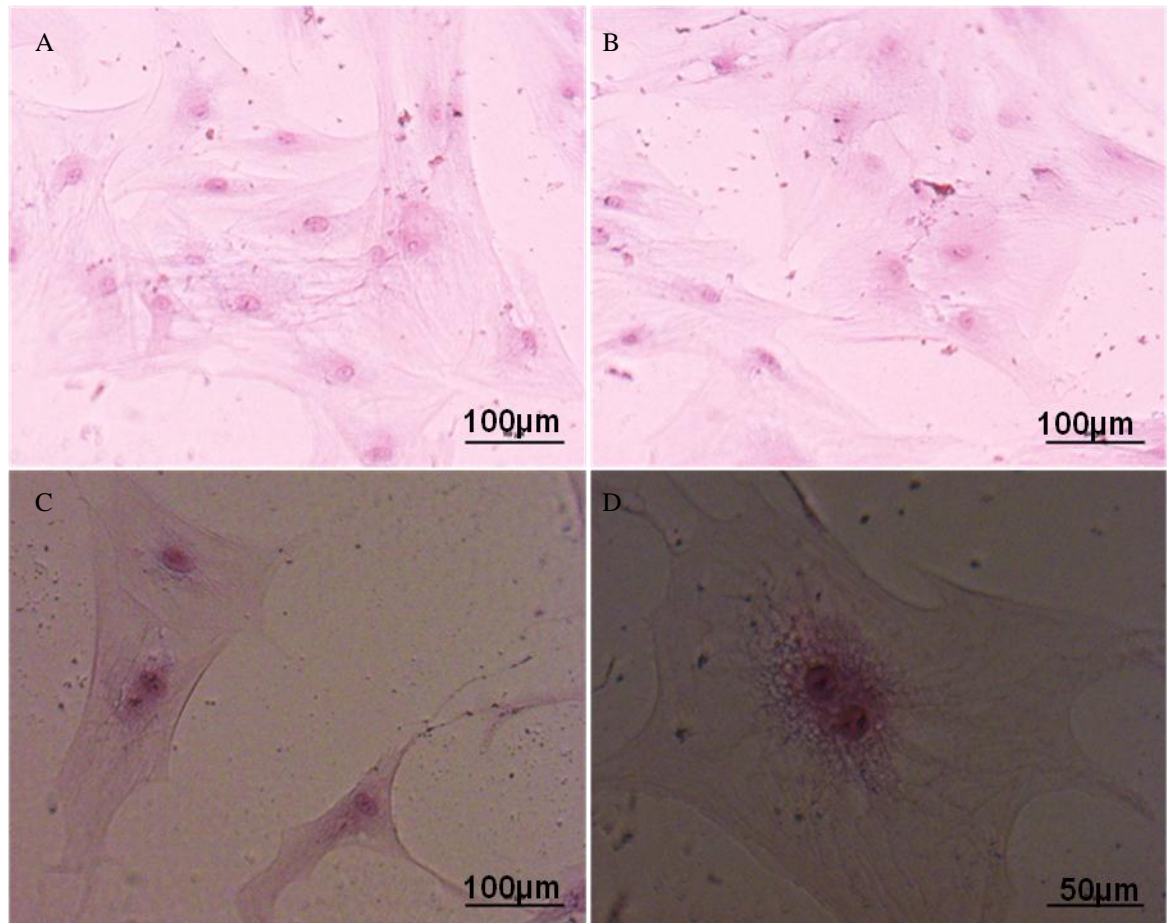


Figura 1. CTTAH (P2) corado com hematoxilina e eosina. (A) e (B) Microscópio de fluorescência (campo claro) com objetiva de 20x e em (C) e (D) (objetiva 40x). Células aderentes em semiconfluência com morfologia fusiforme, citoplasma extenso (semelhante a fibroblastos).

5.1.2 Células-tronco do tecido adiposo humano (diferenciação adipogênica)

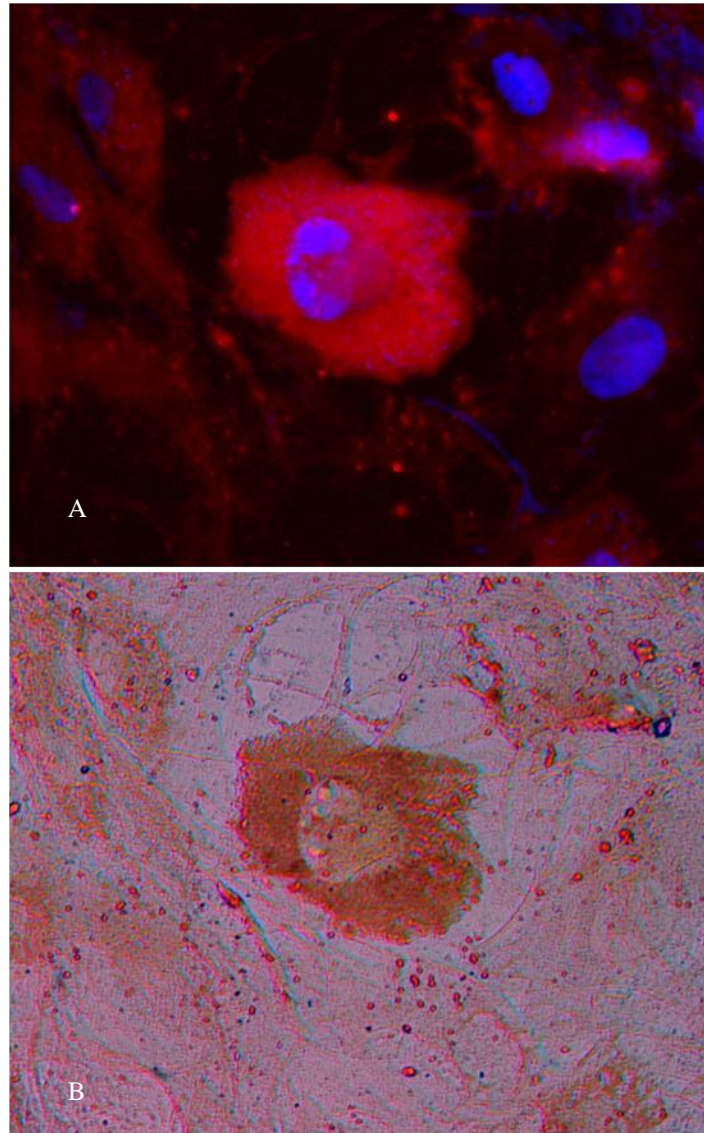


Figura 2. CTTAH (P2) após diferenciação adipogênica. (A) Microscópio de fluorescência (objetiva 40x) demonstrando as gotículas lipídicas que foram coradas com Oil Red O (vermelho) e núcleo com DAPI (azul). (B) Mesma imagem utilizando o campo claro (objetiva 40x). A mudança para o meio de indução adipogênico originou células com várias inclusões lipídicas e núcleo periférico.

5.1.3 Células-tronco do tecido adiposo humano (diferenciação osteogênica)

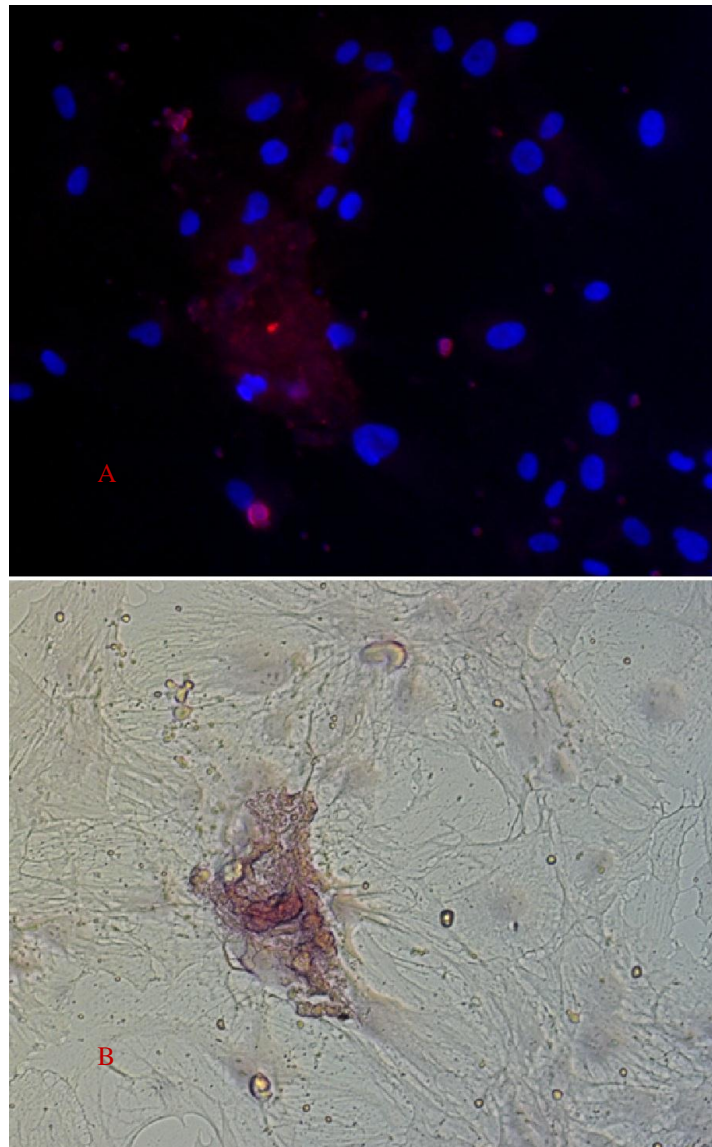


Figura 3. CTAH após diferenciação osteogênica em 21 dias. Os precipitados de cálcio foram corados com Alizarina vermelha (vermelho) e núcleo com DAPI (azul). (A) Microscópio de fluorescência (objetiva 20x) e (B) microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 20x).

5.1.4 Células-tronco do tecido adiposo humano (diferenciação condrogênica)

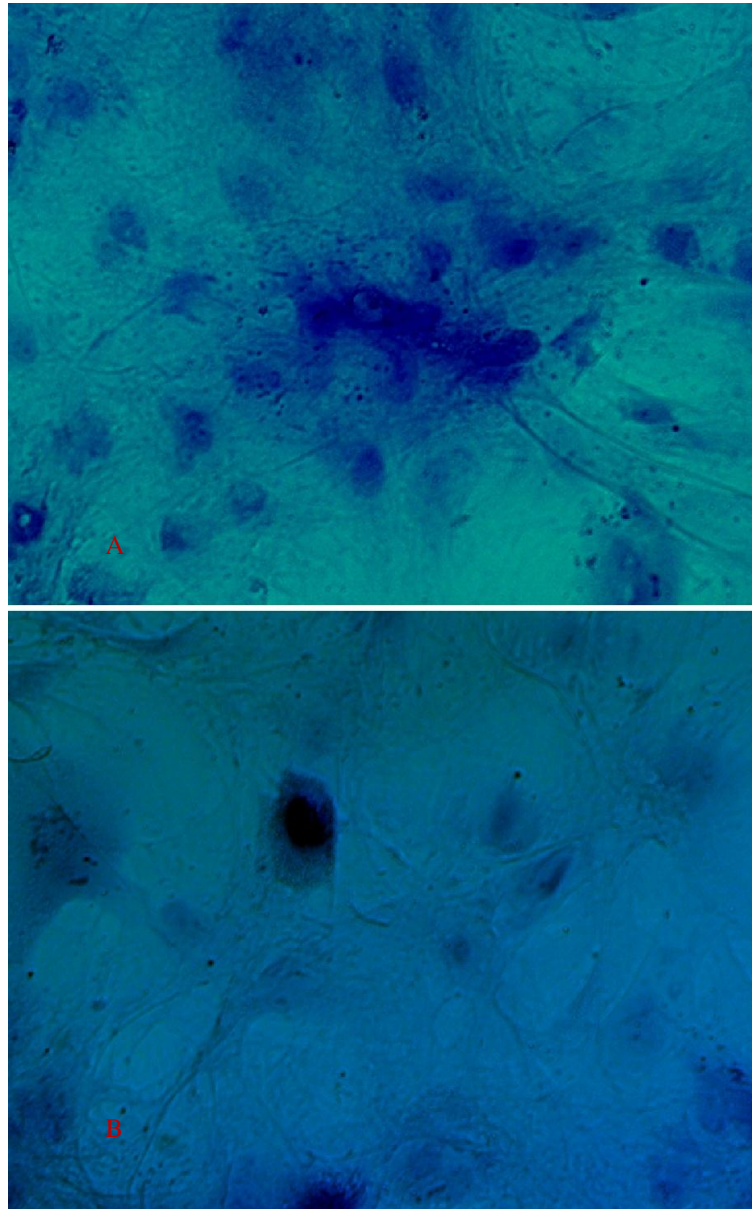


Figura 4. CTTAH cultivados após diferenciação condrogênica em 21 dias. As células foram coradas com azul de toluidina (azul). (A) Microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 20x) e (B) microscópio de fluorescência - campo claro (objetiva 40x).

5.2 CITOMETRIA DE FLUXO

5.2.1 Imunofenotipagem das células-tronco do tecido adiposo humano.

Foi isolado uma população homogênea de CTTAH e essas células foram caracterizadas por imunofenotipagem utilizando citometria de fluxo. Os resultados demonstraram que as células possuem características imunofenotípicas específicas de células-tronco mesenquimais. A expressão foi baixa (<5%) para os marcadores CD16, CD34 e CD45 e apresentaram alta expressão (>90%) para os antígenos característicos de células-tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105. Esse procedimento foi realizado para as amostras de todos os doadores participantes e os resultados da imunofenotipagem das CTTAH foram apresentados nas imagens representativas (figuras 5 e 6) e as porcentagens das células que expressaram cada um dos antígenos avaliados estão na figura 7.

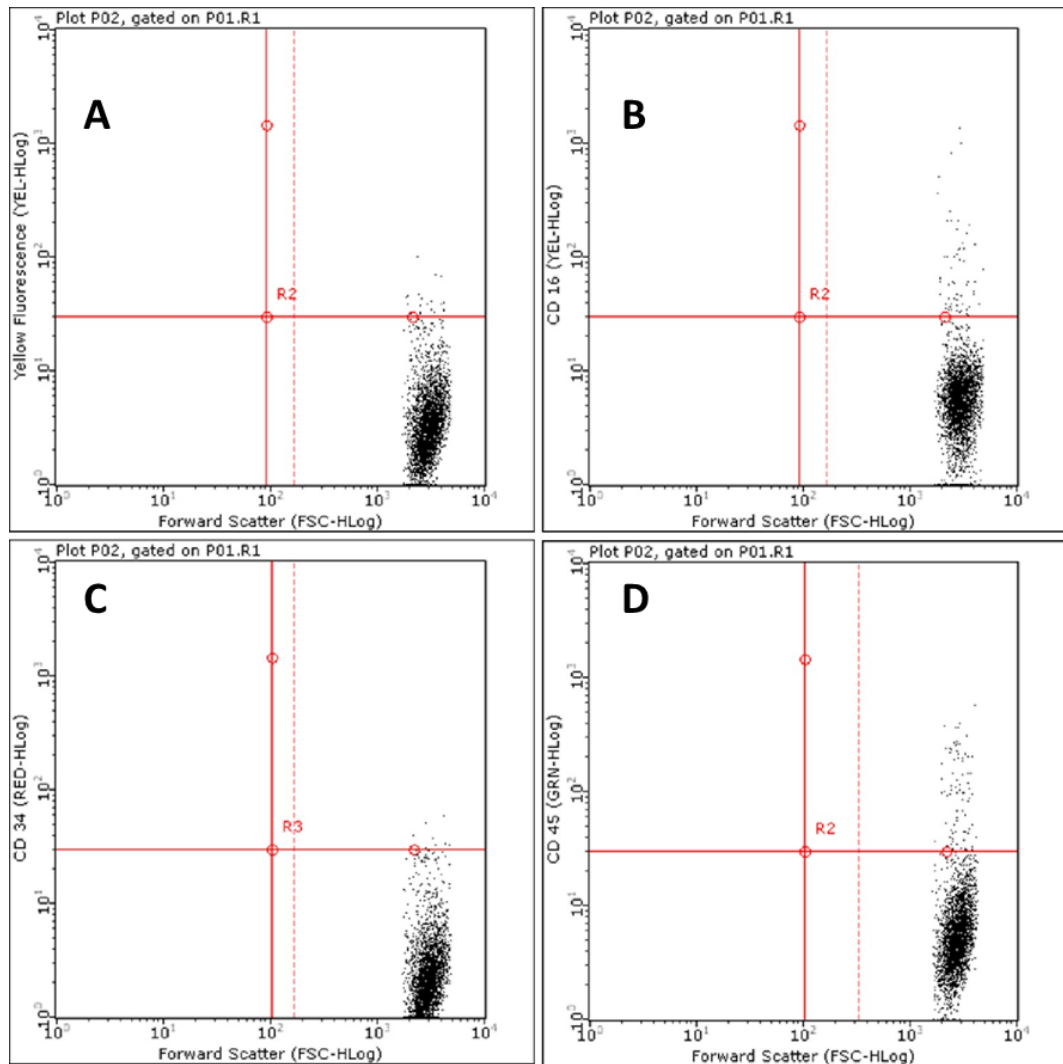


Figura 5. Imunofenotipagem representativa das CTTAH por citometria de fluxo (A) mostrando uma população negativa para a fluorescência avaliada (yellow fluorescence – YEL-HLog). Foram negativas também CD16 (B), CD34 (C) e CD45 (D).

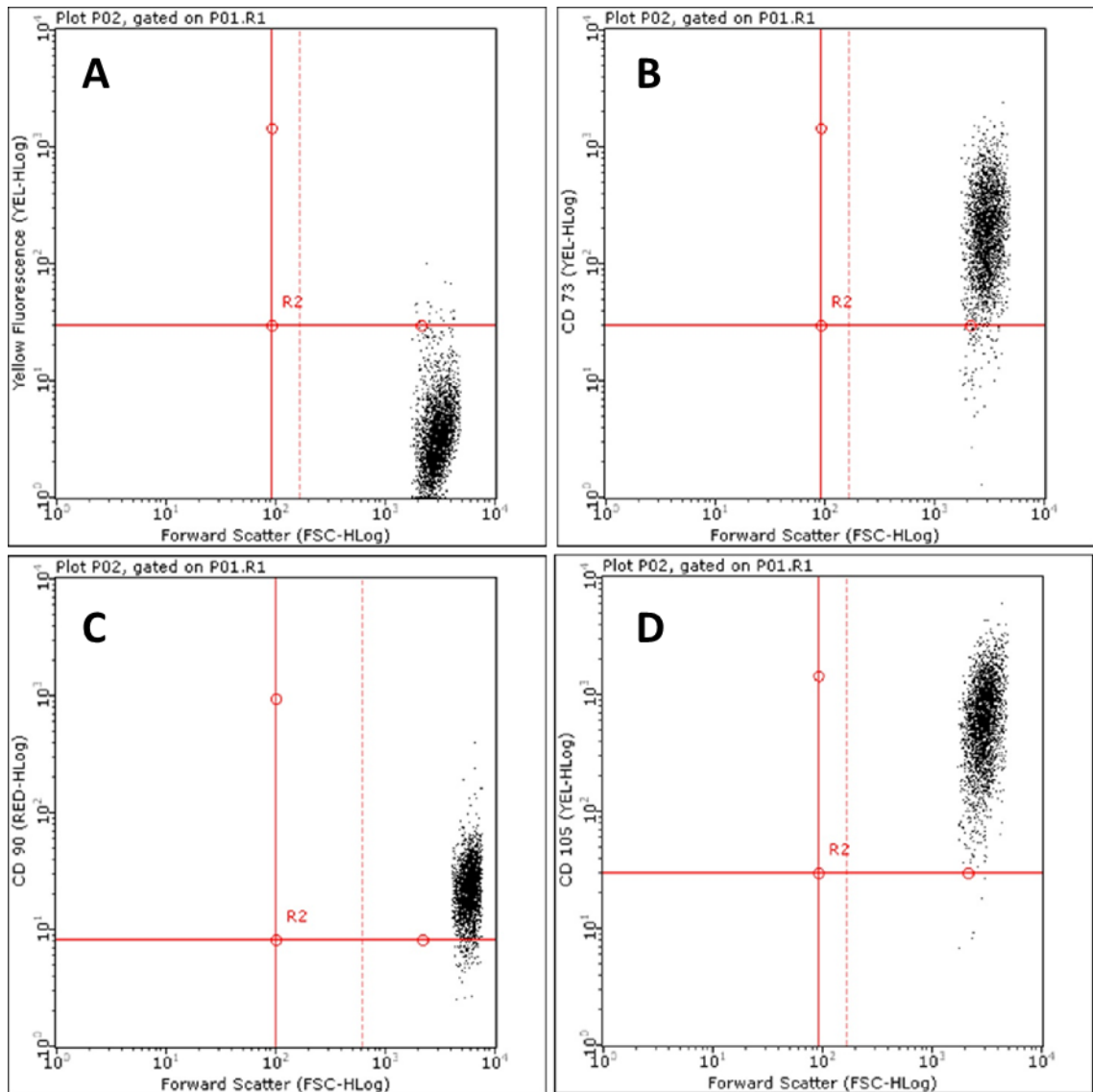


Figura 6. Imunofenotipagem das CTTAH por citometria de fluxo (A) mostrando uma população negativa para a fluorescência avaliada (yellow fluorescence – YEL-HLog). Foram positivas para CD73 (B), CD90 (C) e CD105 (D).

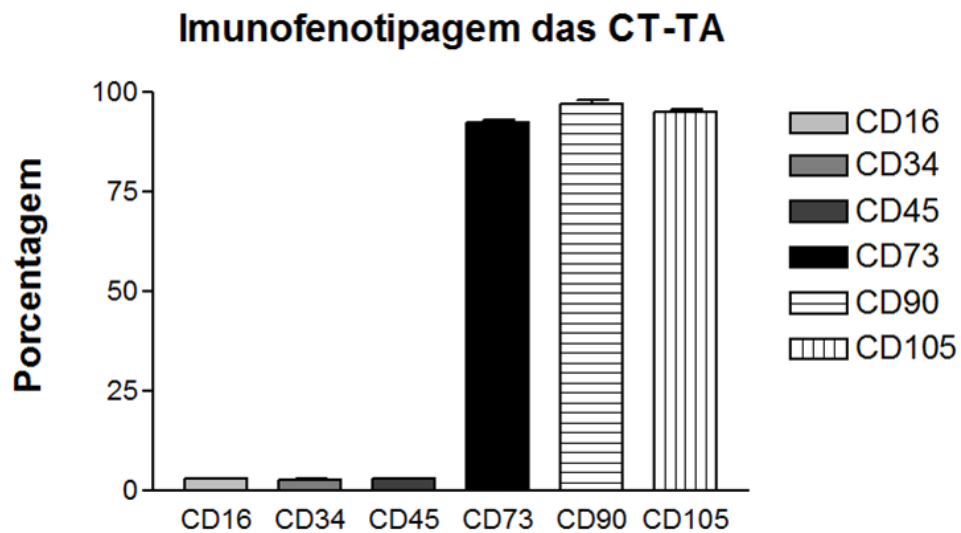


Figura 7. Média da porcentagens da imunofenotipagem da população de CTTAH cultivadas dos dez doadores avaliados. Todas as populações de células avaliadas estavam entre P2-P3. A expressão foi baixa (<5%) para os marcadores de células hematopoiéticas CD16, CD34 e CD45 e apresentaram alta expressão (>90%) para os marcadores de células-tronco mesenquimais CD73, CD90 e CD105.

5.2.3 IDENTIFICAÇÃO DOS RECEPTOR AT1 E AT2 DA AII POR CITOMETRIA.

As CTTAH distribuídos nos diferentes grupos foram analisados quanto à expressão dos receptores AT1 e AT2 da AII utilizando citometria de fluxo conforme demonstrado na figura 8.

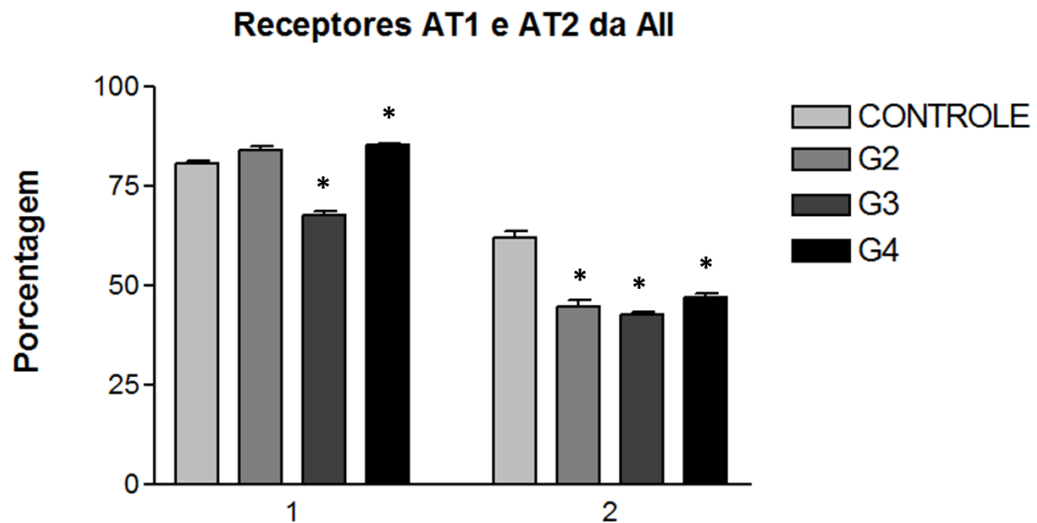


Figura 8. Média da porcentagem da população de CTTAH dos dez doadores avaliados. Foram marcados os receptores AT1 (1) e AT2 (2) da AII que foram avaliados 168 horas após estimulação com os diferentes meios de cultivo. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão (*: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle). Todos os grupos avaliados apresentaram a expressão dos receptores AT1 e AT2 da AII.

5.2.4 ATIVIDADE CELULAR DAS CTTAH UTILIZANDO MTT POR ELISA.

Atividade celular das CTTAH utilizando MTT ao longo do tempo mostrando que essa atividade diminuiu nos grupos GII e GIII 24 horas após o estímulo com os diferentes meios, não houve diferença entre os grupos quando avaliados 48 horas depois do estímulo, sendo que 168 horas depois esse aumento da atividade foi verificado principalmente nos grupos GII e GIV (figura 9).

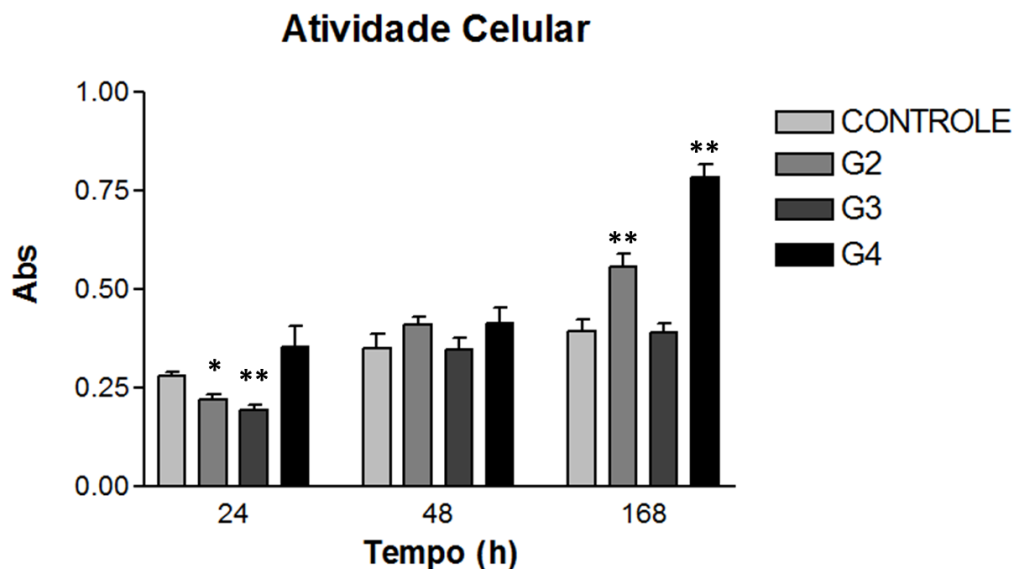


Figura 9. Atividade Celular utilizando MTT ao longo do tempo. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney (nível de significância: $p < 0,05$). Os valores representam a média \pm erro padrão (*: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$ indicam diferenças estatisticamente significantes em relação ao controle). O aumento da atividade foi verificado principalmente nos grupos GII e GIV depois de 168 horas da estimulação com diferentes meios.

5.2.5 CICLO CELULAR DAS CTTAH ESTIMULADAS COM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.

A distribuição do ciclo celular foi medida quantitativamente pela análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo conforme demonstrado na figura 10.

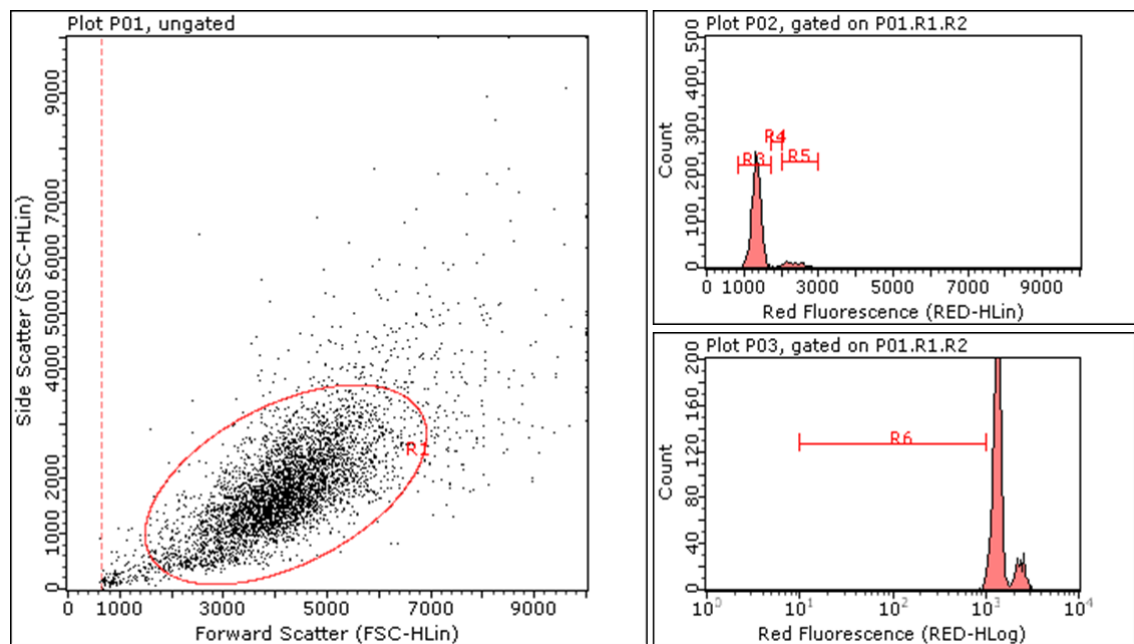


Figura 10. Ciclo celular das CTTAH. (R2) representa a região correspondente a população de CTTAH onde podemos verificar o tamanho e complexidade dessas células (SSCxFSC). O histograma representativo (superior direito) mostra a análise da região das CTTAH marcadas com 7AAD onde R3 corresponde a população em G0/G1, R4 corresponde a população das células em S e R5 corresponde a população de células em G2/M. (C) O histograma (inferior direito) representa a análise correspondente aos fragmentos de DNA. Avaliação do ciclo celular foi realizada no citômetro de fluxo Guava (easyCyte HT) e analisadas no programa InCyte Software.

A análise das CTTAH nos grupos apresentados foram avaliados utilizando a citometria de fluxo que mostrou uma população homogênea quanto ao tamanho e a granulosidade. O ciclo celular desses grupos foi expresso em média percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular: fragmentos de DNA, G0/G1, S e G2/M (figura 11). A distribuição quanto ao ciclo celular das CTTAH mostrou uma maior proporção de células na fase G0/G1 (quiescentes) sendo que nos grupos GIII e GIV houve um aumento na fase S/G2/M (fase proliferativa). Todos os grupos apresentaram baixa proporção de fragmentos de DNA.

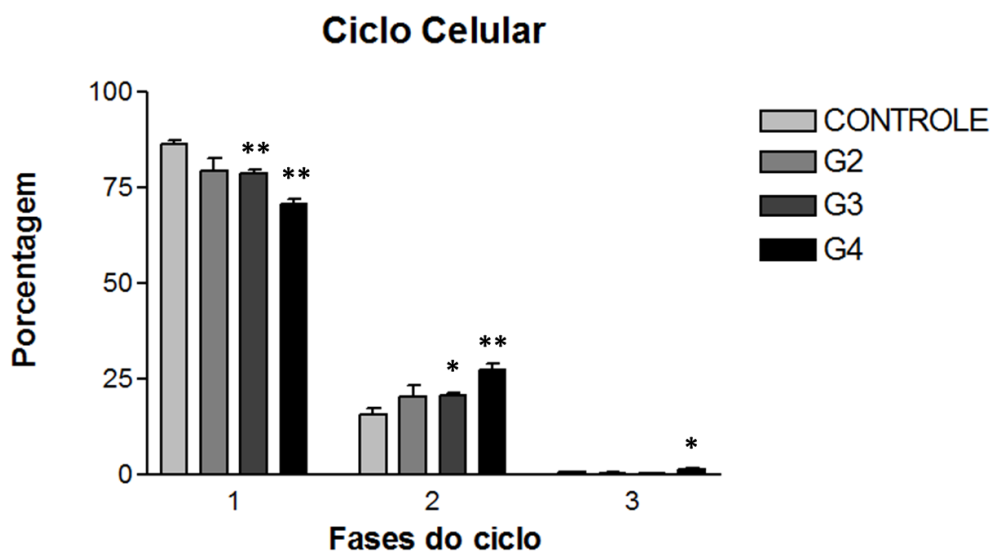


Figura 11. Média da porcentagem da população de CTTAH nas diferentes fases do ciclo-celular avaliadas por citometria de fluxo. (1) fase G0/G1, (2) fase S/G2/M e (3) fragmentos de DNA dos diferentes grupos avaliados. Dados analisados utilizando-se one-way Anova, seguido de Mann-Whitney. Os valores representam a média \pm erro padrão (*: $p < 0,05$. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$ indicam diferenças significantes em relação ao controle).

5.5 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.

A análise morfológica das CTTAH nos diferentes grupos avaliados foram avaliadas por microscopia de fluorescência. As figuras 12-15 mostram a presença dos receptores AT1 da AII nos grupos avaliados assim como é demonstrado a presença dos receptores AT2 da AII nas figuras 16-19. O citoesqueleto, a presença das gotículas de lipídios e morte celular dessas células nos grupos avaliados foram verificados nas figuras 20-23.

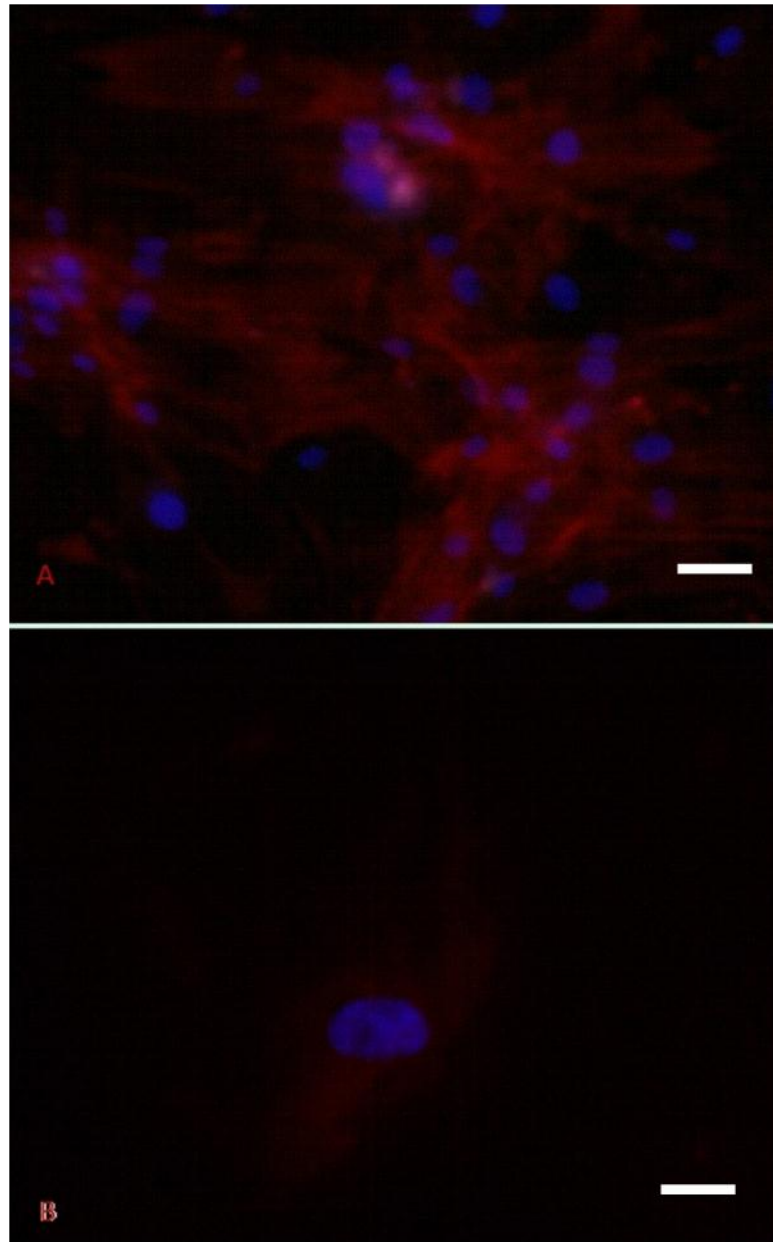


Figura 12. Imunofluorescência das CTTAH (GC). Identificação do receptor AT_1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando-se o anticorpo anti- AT_1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

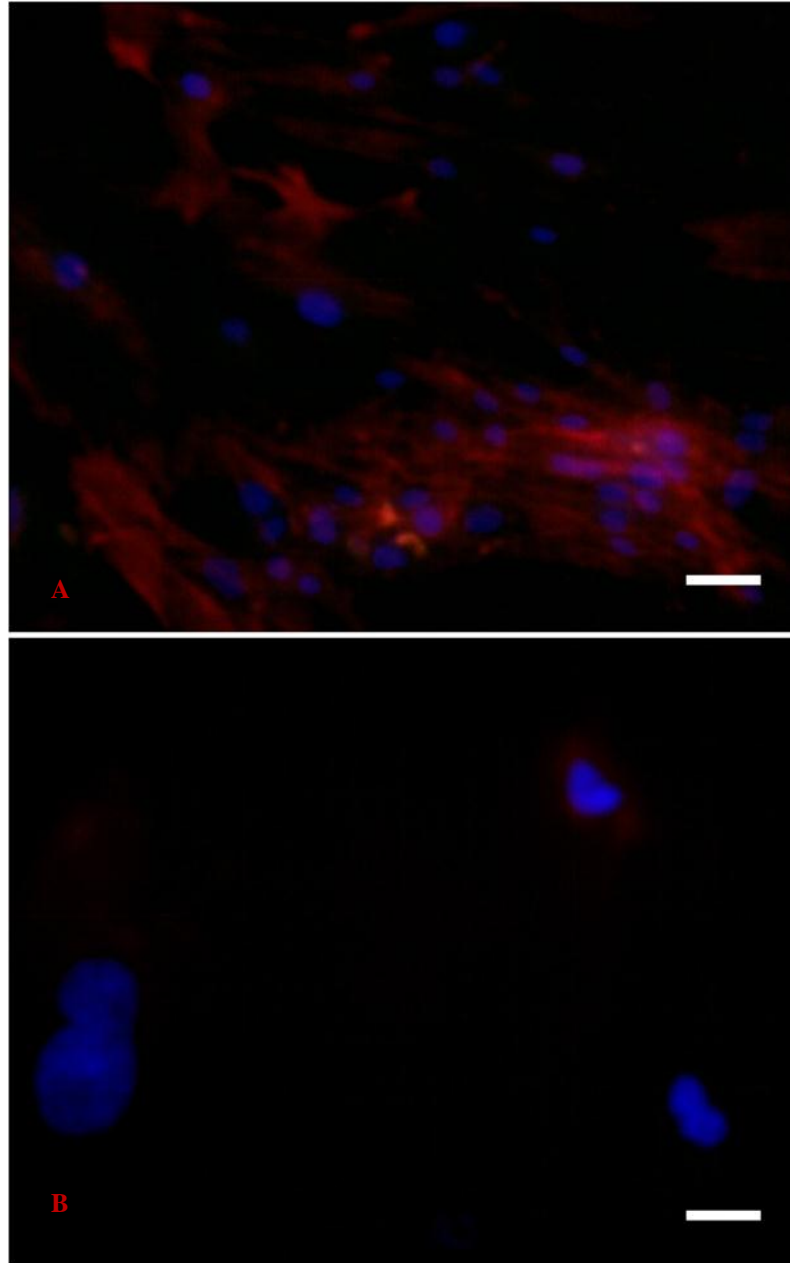


Figura 13. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo II). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

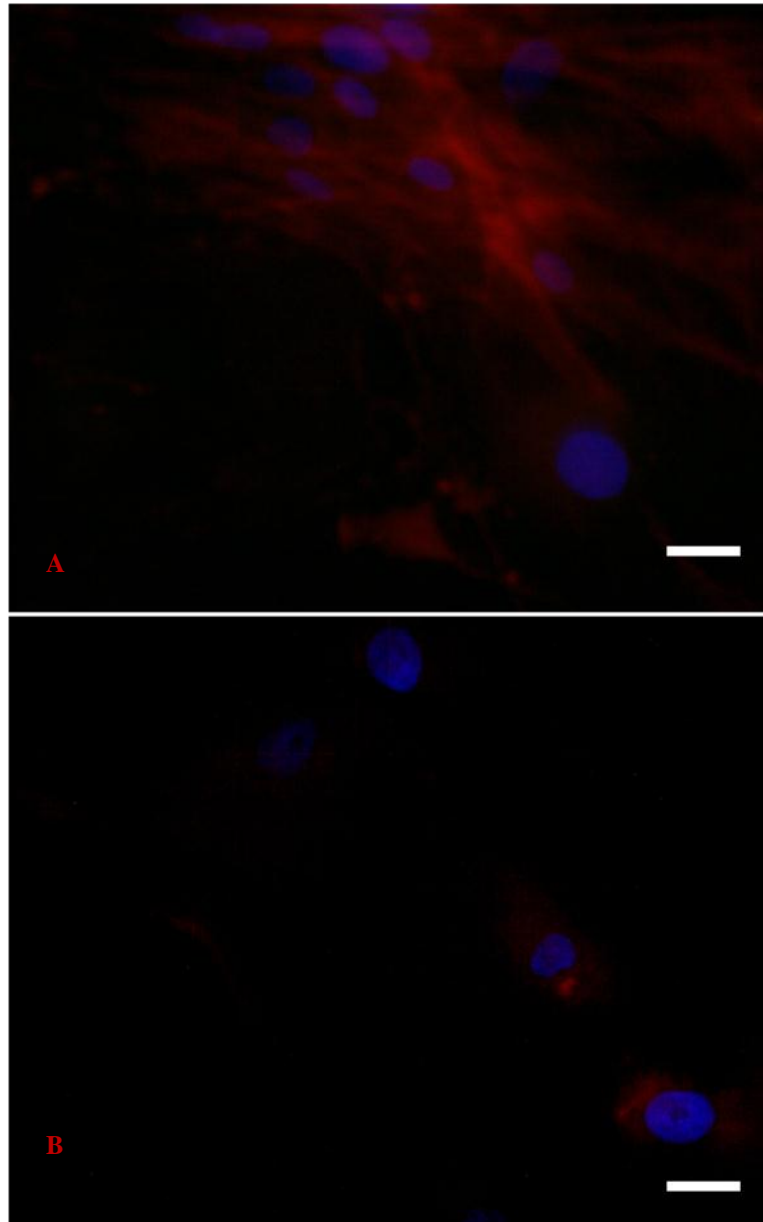


Figura 14. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo III). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

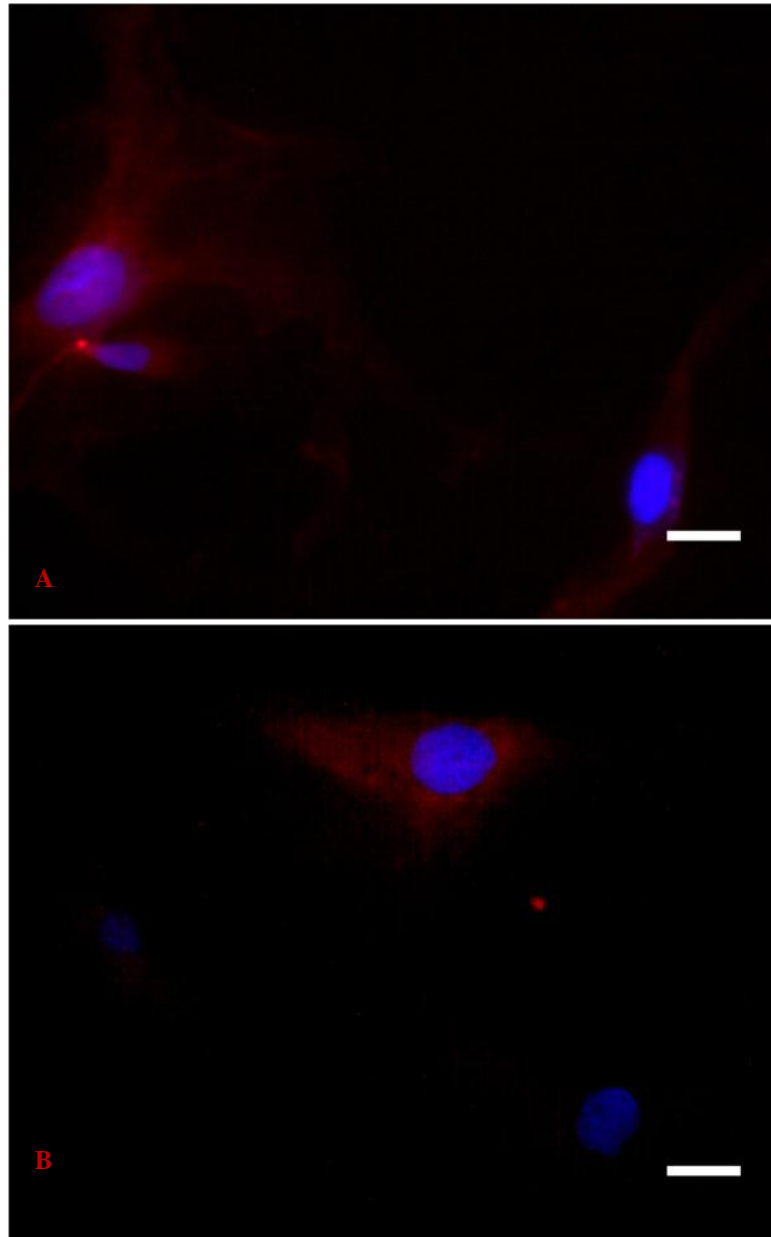


Figura 15. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo IV). Marcação do receptor AT1 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT1 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

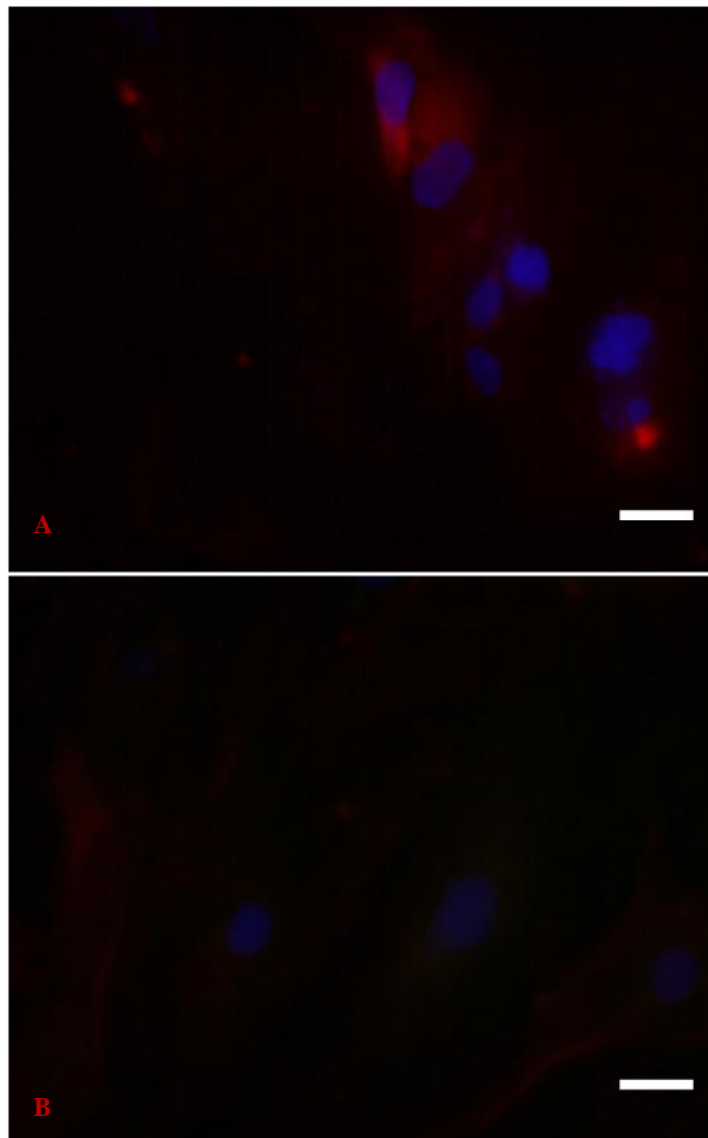


Figura 16. Imunofluorescência das CTTAH (GC). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

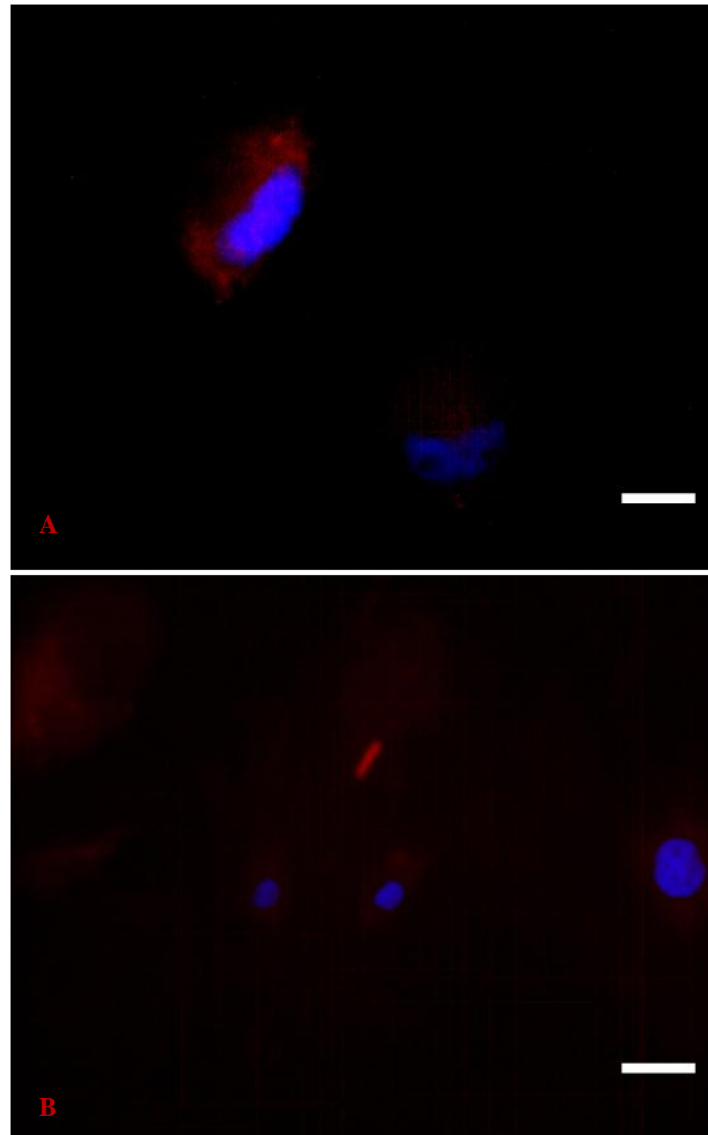


Figura 17. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo II). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

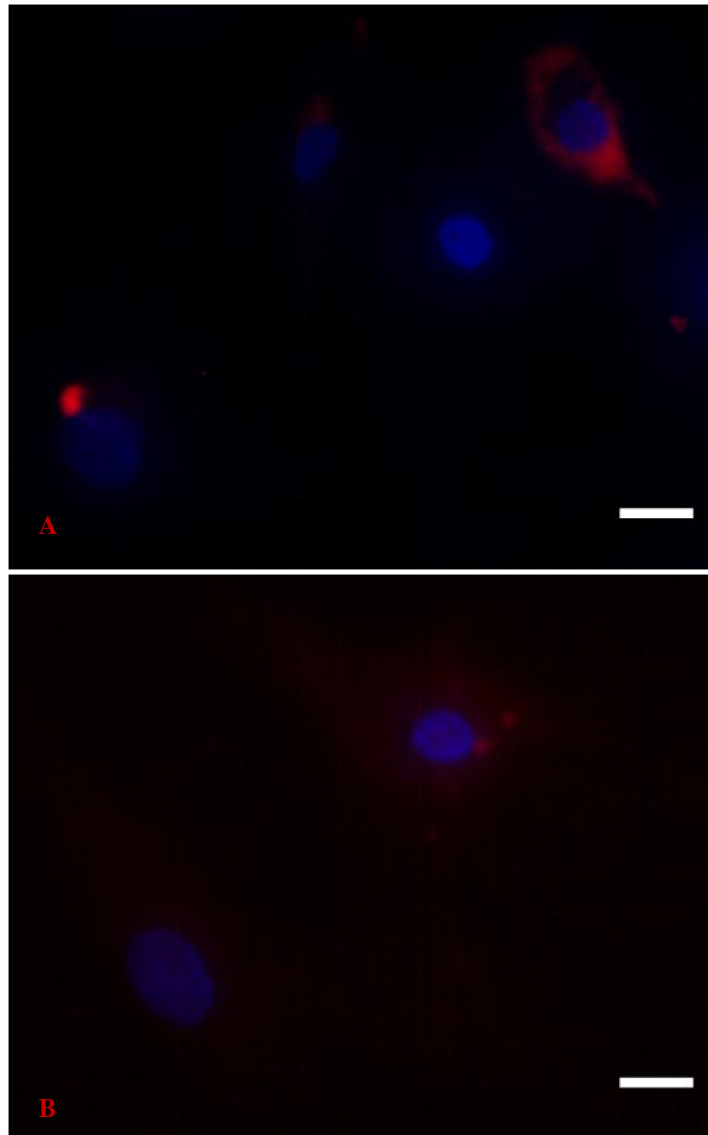


Figura 18. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo III). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

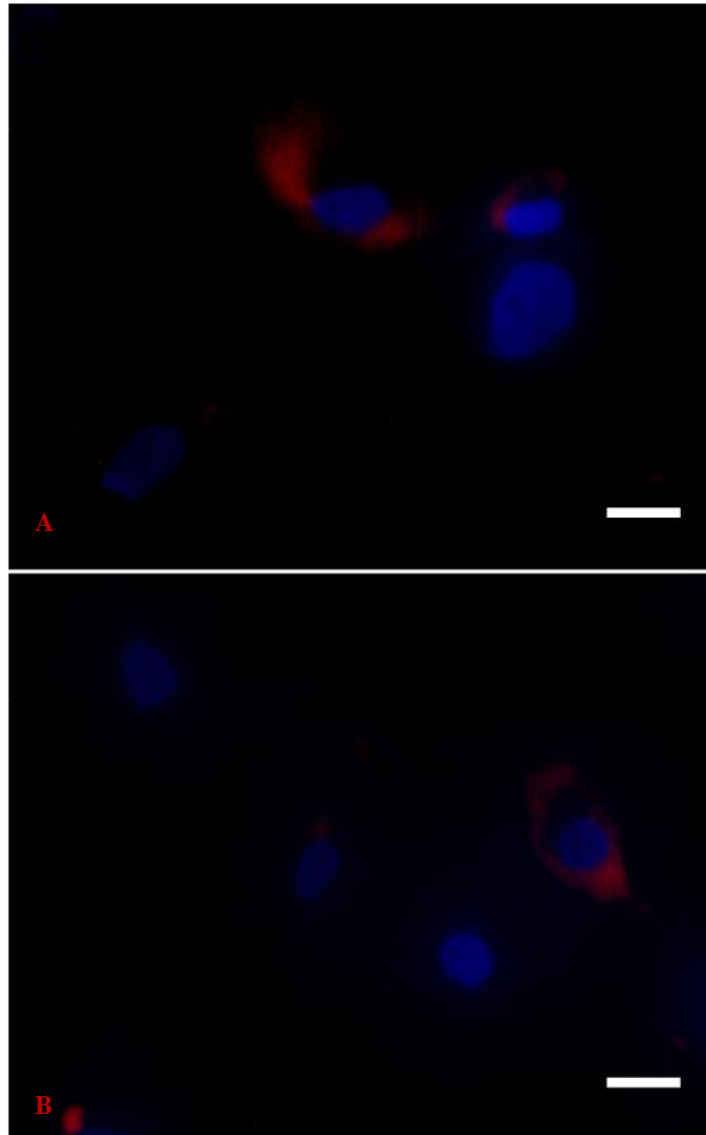


Figura 19. Imunofluorescência das CTTAH (Grupo IV). Marcação do receptor AT2 da angiotensina II presente na superfície celular utilizando o anticorpo anti-AT2 (vermelho) e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

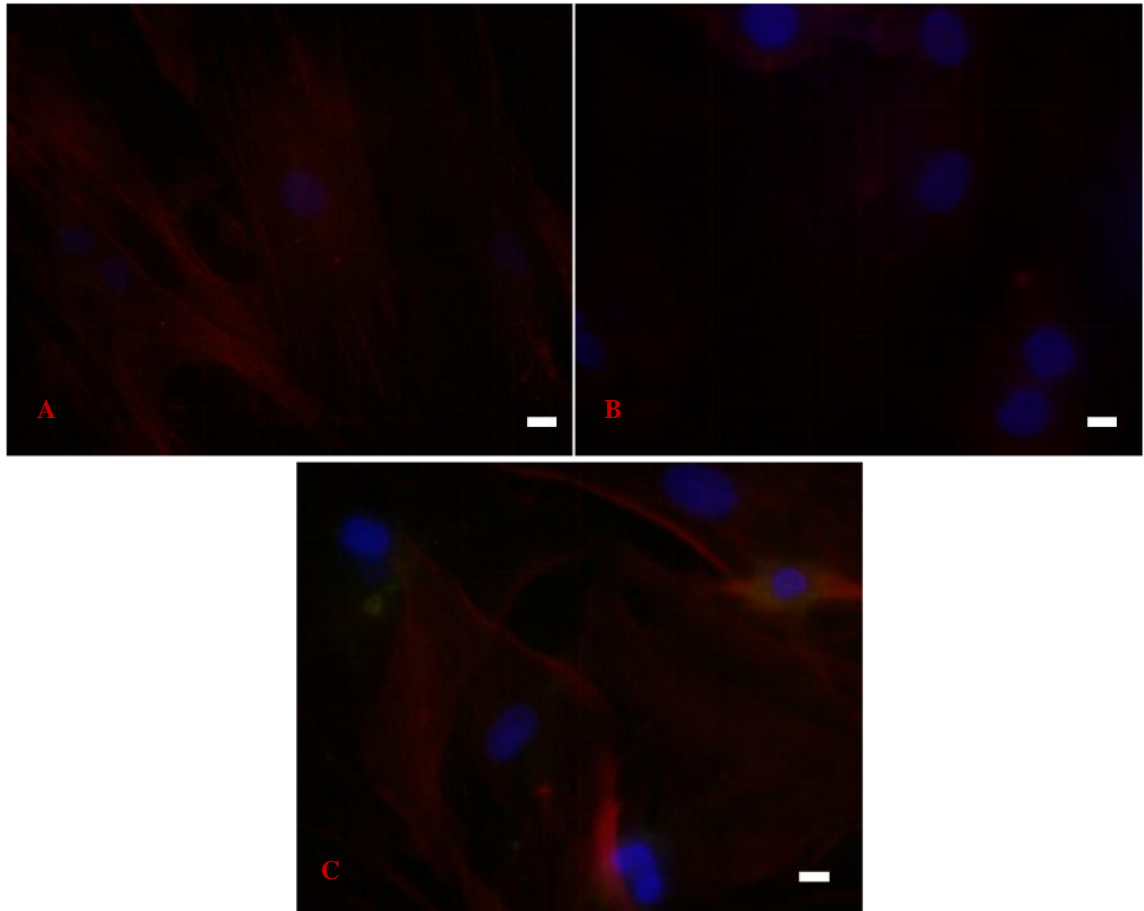


Figura 20. Microscopia de fluorescência das CTTAH (GC). (A) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (B) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (C) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

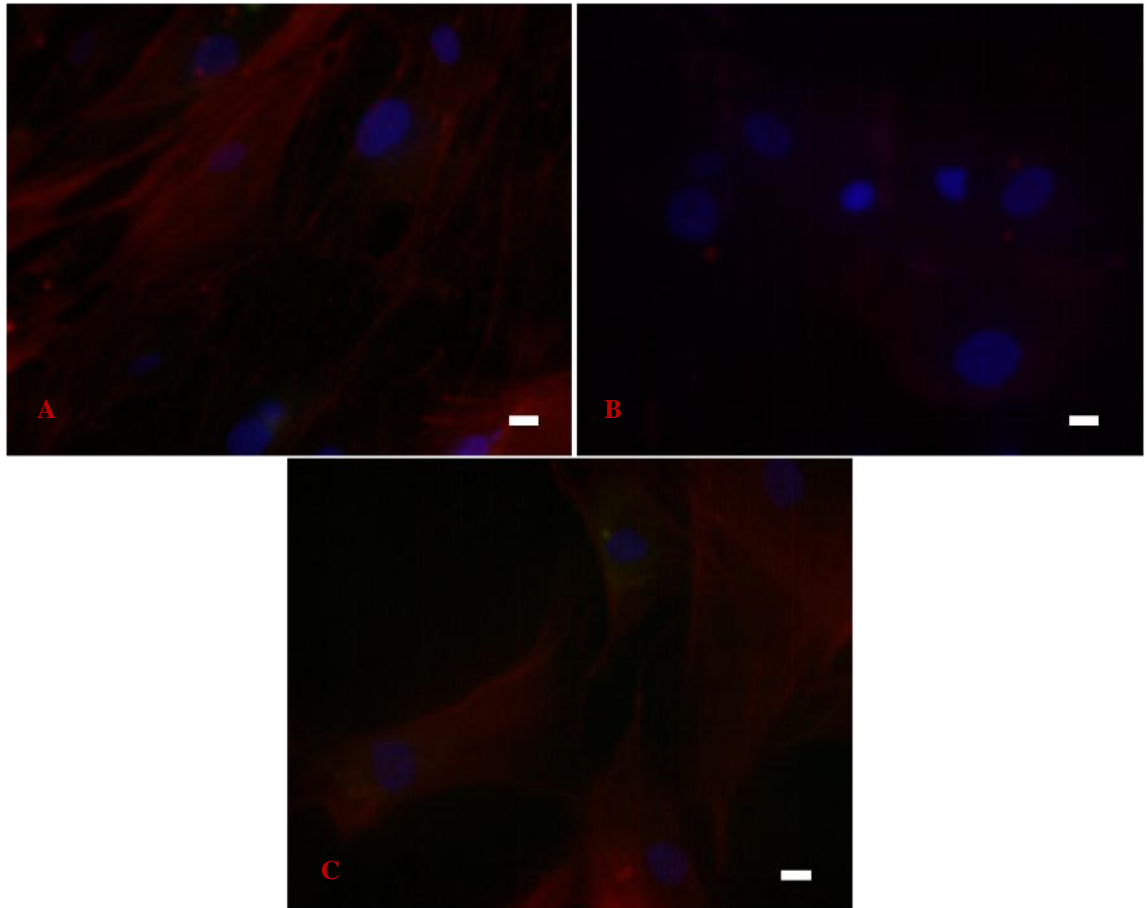


Figura 21. Microscopia de fluorescência das CTTAH Grupo II. (A) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (B) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (C) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

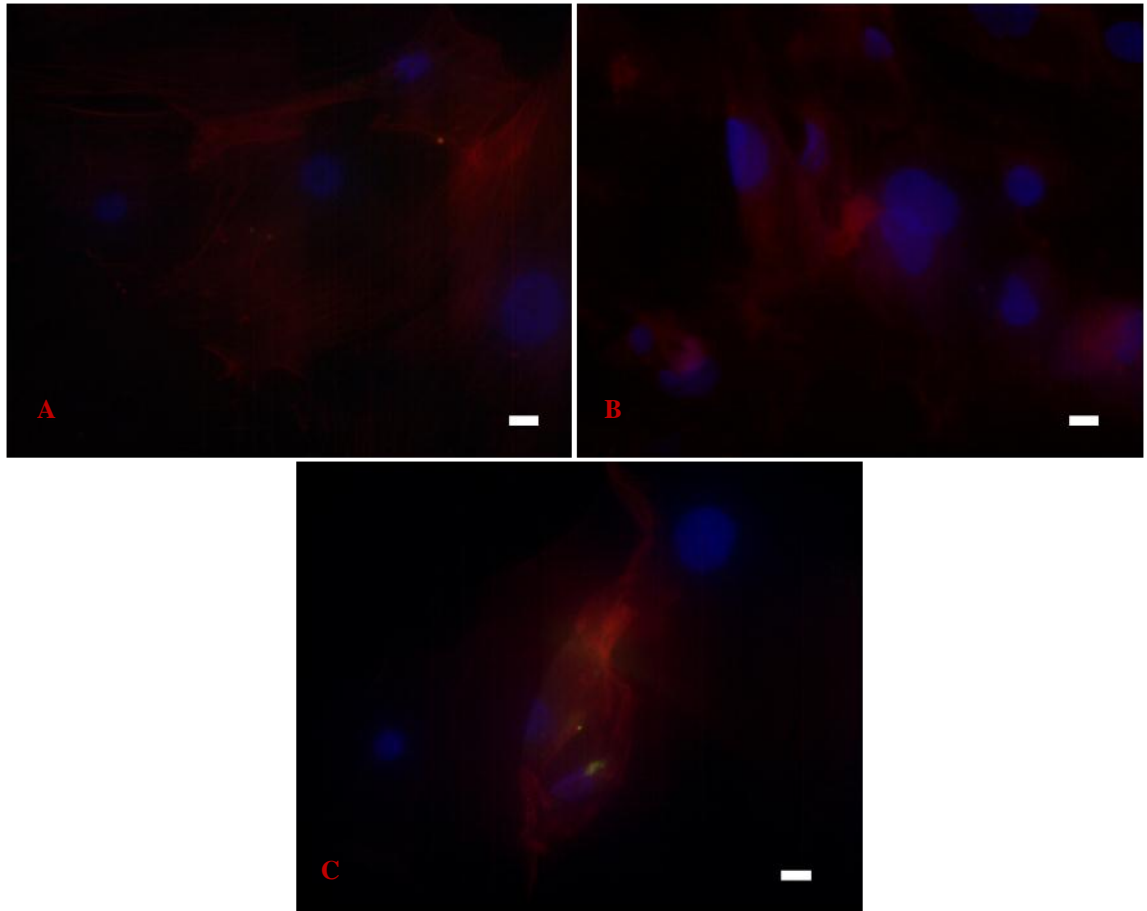


Figura 22. Microscopia de fluorescência das CTTAH do Grupo III. (A) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (B) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (C) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

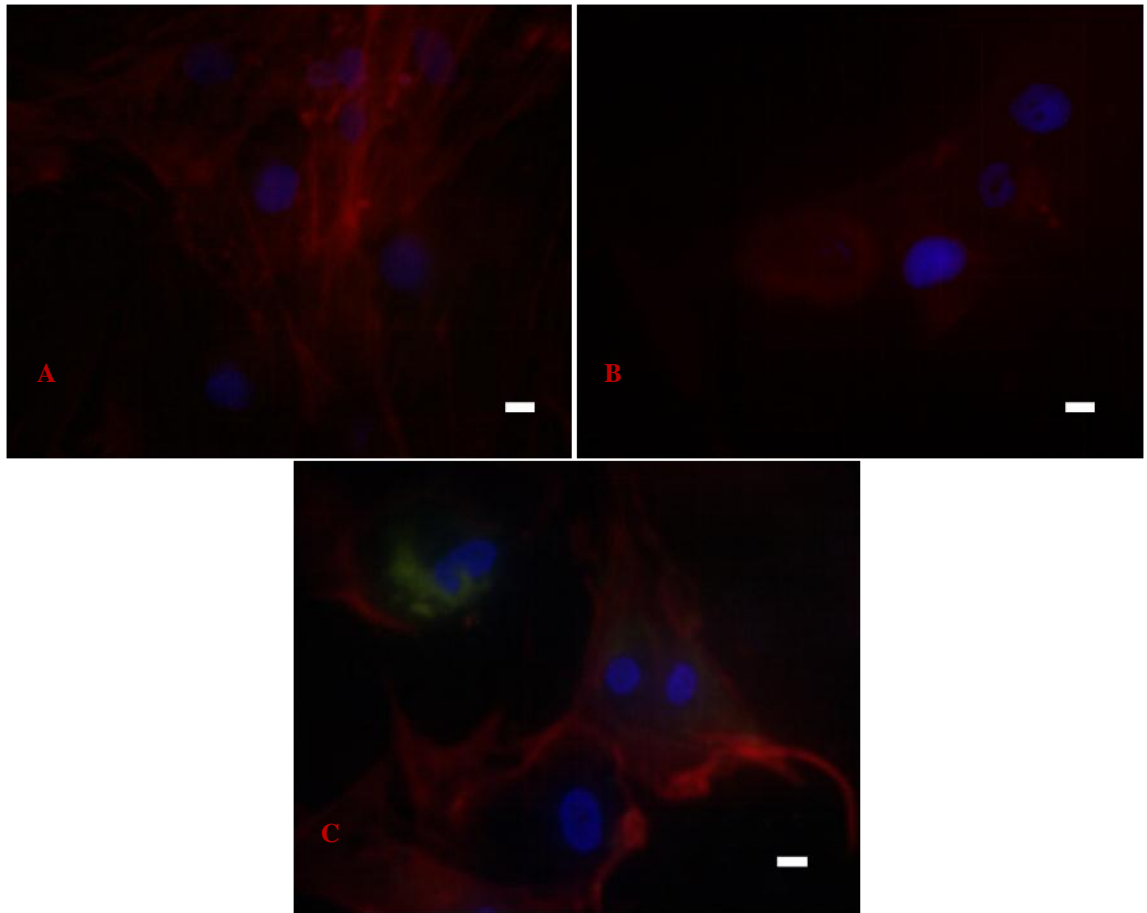
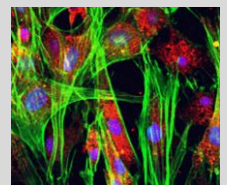


Figura 23. Microscopia de fluorescência das CTTAH do Grupo IV. (A) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546 e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (B) Gotículas de gordura (vermelho) marcado com o corante Oil Red O e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul). (C) Citoesqueleto (vermelho) utilizando Alexa flúor 546, fosfatidilserina marcada com Anexina V e núcleo da célula marcado com o corante DAPI (azul).

Discussão



6. DISCUSSÃO

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) o peso dos brasileiros vem aumentando nos últimos anos. Isso ocorre em todas as regiões do país, em todas as faixas etárias e em todas as faixas de renda. O sobrepeso atinge mais de 30% das crianças entre cinco e nove anos de idade, cerca de 20% da população entre 10 e 19 anos e nada menos que 48% das mulheres e 50,1% dos homens acima de 20 anos (IBGE, 2010).

No Brasil mais de 60% das mulheres adultas que utilizam unidades de pronto atendimento do Sistema Único de Saúde apresentam algum grau de sobrepeso ou obesidade e que 44% apresentam obesidade central (da Rosa *et al.*, 2011). Estima-se que cerca de 38 milhões da população acima de 20 anos estão acima do peso e mais de 10 milhões são considerados obesos (IBGE, 2010).

A obesidade é o estado mais grave do excesso de peso e é caracterizada como a expansão da massa de tecido adiposo no corpo como resultado do desequilíbrio entre ingestão e gasto energético (MEDINA-GÓMEZ & VIDAL-PUIG, 2009). É bem reconhecido que a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública e uma das doenças crônicas não-transmissíveis que, epidemiologicamente, mais crescem em todo o mundo (LINO, MUNIZ, SIQUEIRA, 2011). A obesidade está associado à

ocorrência de hipertensão, hiperlipidemia, diabetes tipo 2 e doença cardiovascular (FERRAREZI *et al.*, 2007; GRAY & VIDAL-PUIG, 2007; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2007; MATHEW *et al.*, 2007; LINO, MUNIZ, SIQUEIRA, 2011)

A hipertensão é uma complicação freqüente da obesidade e um importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Estudos epidemiológicos mostram uma correlação positiva significativa entre pressão sanguínea e teores circulantes de angiotensinogênio (ANG) (MASSIERA, 2001; MAENHAUT & VAN DE VOORDE, 2011).

Embora a produção de angiotensinogênio ocorra principalmente no fígado, o tecido adiposo é considerado uma importante fonte extra-hepática, contribuindo, possivelmente, para a elevação dos teores circulantes em indivíduos obesos (BRÜCHER *et al.*, 2007; MAENHAUT & VAN DE VOORDE, 2011).

O tecido adiposo é capaz de secretar ANG e renina e sintetizar os receptores AT1 e AT2 da Angiotensina II (AII) e enzima conversora de angiotensina (ECA), proteínas que participam da diferenciação das CTTAH e da lipogênese, indicando o seu envolvimento com o processo de acúmulo de gordura corporal. (AUBERT, 1997; SAFANOVA, 1997; AUBERT, 1998; CASSIS, 1998; SAYE, 1990; CASSIS *et al.*, 2008).

Pré-adipócitos humanos são células precursoras do tecido adiposo, podem se diferenciar em adipócitos maduros *in vitro* e *in vivo*, e são comumente utilizados como modelo de cultura para estudar a proliferação e diferenciação de adipócitos (GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998; BRADLEY *et al.*, 2001). Embora progressos significativos já tenham sido feitos na dissecação dos eventos moleculares e celulares que ocorrem durante a

transição das células precursoras assim como as células-tronco para adipócitos não é completamente compreendido (HU et al, 2009).

Já foi demonstrado que as células precursoras isoladas do tecido adiposo subcutâneo apresentavam as características de ASCs (*adipose-derived stem cells*), termo adotado pelo *Internacional Fat Applied Technology Society* para identificar a população celular plástico-aderente e multipotente (BUNNELL *et al.*, 2008).

Neste estudo utilizamos o termo células-tronco do tecido adiposo humano (CTTAH) para designar essa população de células estudadas. Essas células apresentaram a capacidade de aderência ao plástico em cultura e também o potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico e condrogênico (figuras 1-4). Essas duas características estão de acordo com os estudos de BJORNTORP *et al.*, 1985; DESLEX *et al.*, 1987; DESLEX, NEGREL, AIHAUD, 1987, GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998, ZUK *et al.*, 2001 e com os critérios estabelecidos pelo *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) que definem células-tronco mesenquimais adultas (LUBIS *et al.*, 2011).

Para obtenção de células indiferenciadas do tecido adiposo, o produto da fragmentação desse tecido foi submetido à digestão enzimática e posterior centrifugação permitindo a separação de uma fração sobrenadante (contendo adipócitos) e de um precipitado (contendo CTTAH de acordo com a metodologia descrita em métodos, que está de acordo com o trabalho de BUNNELL *et al.*, 2008. Nesse trabalho foram obtidos 10×10^6 células a partir da digestão enzimática seguida de centrifugação de 100 ml de tecido adiposo subcutâneo de cada doador. Essas células apresentaram, em cultivo, morfologia semelhante a do fibroblasto, característica de célula mesenquimal (figura 1).

Rodbell relatou em 1964 a separação de células da fração estroma vascular dos adipócitos maduros, utilizando um método enzimático. A observação inicial de que a fração do estroma vascular do tecido adiposo contém células semelhantes a fibroblastos e que eram os possíveis precursores de adipócitos, foi descrito por POZNANSKI, WAHEED, VAN (1973). Em 2001, ZUK *et al.* publicaram um trabalho demonstrando que células indiferenciadas provenientes do produto de lipoaspirado podiam ser cultivadas e possuíam capacidade de se diferenciar na linhagem condrogênica, osteogênica, adipogênica e miogênica, identificando o tecido adiposo como um reservatório de células-tronco mesenquimais.

Para comprovar a capacidade de diferenciação foi utilizada a técnica de citoquímica que demonstrou o aspecto morfológico dessas células (figura 1). Essas células apresentaram características semelhantes a fibroblastos com a presença de inúmeras gotículas lipídicas citoplasmáticas nas CTTAH diferenciadas para adipócitos e corados com *Oil Red O* (diferenciação adipogênica) (figura 2). O potencial de diferenciação osteogênico foi evidenciado pela formação de precipitados de cálcio corados com Alizarina vermelha (figura 3) e o potencial de diferenciação condrogênico foi evidenciado pela coloração com Azul de Toluidina (figura 4) (BUNNELL *et al.*, 2008).

Outra característica que foi determinada pelo ISCT é a expressão de marcadores de superfície celular. Existe um consenso que células-tronco mesenquimais (MSCs) possuem baixa expressão dos marcadores hematopoéticos CD16 (receptor expresso em células natural killer, macrófagos e neutrófilos), CD34 (marcador de células-tronco hematopoética primitiva) e CD45 (marcador de células hematopoéticas) entre outros. Entretanto, possuem uma expressão alta para CD44 (molécula

de adesão expressa em linfócitos B e T), CD73, CD90 (molécula da matriz extracelular) e CD105 (molécula de adesão) entre outros (CAWTHORN, SCHELLER, MACDOUGALD, 2012).

Para a caracterização das CTTAH utilizou-se a citometria de fluxo para verificar-se a expressão dos marcadores de superfície celular. As células cultivadas entre as passagens P2 e P3 dos diferentes doadores foram avaliadas antes de serem estimuladas com os diferentes meios de cultivo.

Todas as amostras entre P2 e P3 apresentaram a expressão dos marcadores de superfície celular, sendo o percentual de 97,3% (+) para o CD73, 95,1% (+) para o CD90 e 92,4% (+) para o CD105, o que está de acordo com os critérios do ISCT ($\geq 90\%$). Ainda de acordo com os critérios do ISCT, as células cultivadas apresentaram ausência da expressão que foi de 3,0% (-) para o CD16, 2,9% (-) para o CD34 e 3,0% (-) para o CD45 nas amostras celulares estudadas ($\leq 5\%$) e isso ocorreu com todas as amostras das células de todos doadores (figuras 5-6). Esses dados também estão de acordo com vários autores (BJORNTORP *et al.*, 1985, DESLEX, NEGREL, AIHAUD, 1987, GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998, ZUK *et al.* 2001, CAWTHORN, SCHELLER, MACDOUGALD, 2012) que verificaram semelhante expressão de marcadores de superfície celular como os obtidos neste trabalho (figuras 5-7).

A citometria de fluxo surge, então, como uma importante ferramenta alternativa para o estudo dos eventos celulares envolvidos na resposta imunológica com aplicações clínicas subseqüentes (SHAPIRO, 2004), porque uma das características deste instrumento é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, permitindo investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população em estudo, inclusive de avaliação funcional.

Essa versatilidade metodológica deriva da múltipla e independente quantidade de análises das características físicas e químicas das células (BERNAS *et al.*, 2006), pois no citômetro elas são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz geralmente proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e de densidade óptica de cada célula (SHAPIRO, 2004), as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular que pode ser verificada em preparados corados.

Nesse contexto, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado ao tamanho celular (forward light scatter - FSC), enquanto aqueles que captam o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do laser (side light scatter - SSC) estão relacionados com a complexidade celular interna, em particular sua granularidade (SHAPIRO, 2004, ROBINSON, 1993, BERNAS *et al.*, 2006). Após análise simultânea desses parâmetros, gráficos de coordenadas x e y são, então, gerados (SHAPIRO, 2004).

Nesse estudo, foi verificada a presença dos receptores AT1 e AT2 da AII nas CTTAH, 168 horas após o estímulo com os diferentes meios de cultura, utilizando-se a citometria de fluxo. A administração exógena da AII nas células permitiu verificar se esse estímulo alterava a presença dos receptores AT1 e AT2 quando comparados com o grupo controle.

Sabe-se que os receptores de angiotensina são classificados em dois subtipos, AT1 e AT2 (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Cada subtipo foi clonado, e a sua sequência estabelecida, apresentando uma homologia de apenas 32% nas sequências dos dois receptores (OLIVEIRA *et al.*, 2007). As principais funções biológicas da angiotensina II (regulação cardiovascular) são

mediadas através do receptor AT1 e em geral, a estimulação do receptor AT2 parece opor-se às ações fisiológicas da angiotensina II.

O tecido adiposo expande-se rapidamente após o nascimento. A capacidade de surgirem novos adipócitos persiste em indivíduos adultos e está evidenciado na obesidade. Essa possibilidade foi confirmada em outras pesquisas, onde obtiveram adipócitos maduros pela diferenciação *in vitro* de células adiposas precursoras, isoladas de tecido adiposo de rato e humano (BJORNTORP *et al.*, 1985; DESLEX *et al.*, 1987; DESLEX, NEGREL, AIHAUD, 1987).

Sob condições de cultivo de células, o meio físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica, pressão de CO₂ e O₂) pode ser controlado precisamente e as condições fisiológicas podem ser mantidas relativamente constantes. A única restrição é dada pela necessidade de suplementação do meio de cultura com soro ou outros constituintes por serem pouco definidos (FRESHNEY;1995). No presente estudo, as CTTAH foram expandidos *in vitro* na presença de meio nutritivo (DMEM/F12) suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina e estreptomicina (Grupo controle). O cultivo dessas células permitiu mimetizar as condições fisiológicas e foi obtido viabilidade celular, manutenção da sua morfologia e proliferação celular. Essas células foram induzidas a diferenciação celular adipogênica, osteogênica e condrogênica (figuras 1-4).

Está bem estabelecido que adipócitos não apenas desempenham um importante papel na homeostase energética, mas também secretam hormônios e fatores adipogênicos que estão envolvidos na regulação do apetite, resposta imune, sensibilidade à insulina, e crescimento vascular e esquelético (GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998, FRUHBECK *et al.*, 2001; GREGOIRE, 2001). A deposição excessiva de gordura corporal também

resulta em obesidade, que é um problema de saúde prevalente em países industrializados, e intimamente relacionados à ocorrência de hipertensão, hiperlipidemia, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares (FERRAREZI *et al.*, 2007; MATHEW *et al.*, 2007; GREGOR & HOTAMISLIGIL, 2007).

Os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) como o angiotensinogênio (AGT) e as angiotensinas I (AI) e II (AII) estão elevadas durante a adipogênese. A angiotensina I promove crescimento e diferenciação em adipócitos por induzir diretamente a lipogênese e indiretamente a estimulação da síntese de prostaglandinas (ENGELI *et al.*, 2003). Os adipócitos maduros produzem AII que pode inibir um maior recrutamento de pré-adipócitos. Os componentes derivados do SRA como a AII no tecido adiposo podem atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina e são importantes na patogênese da obesidade, da resistência à insulina e da hipertensão. A significância funcional da produção de componentes do SRA pelos adipócitos é uma área de intensa investigação e pode ser uma ligação entre a obesidade e as doenças cardiovasculares, incluindo hipertensão (CASSIS *et al.*, 2008).

Nesse estudo, foi caracterizada a presença dos receptores AT1 e AT2 da AII nas CTTAH estimulados com os diferentes meios de cultura, utilizando-se a imunofluorescência sob microscopia de fluorescência. A administração exógena desse hormônio nas células permitiu mimetizar as condições fisiológicas onde a AII, sendo sintetizada no tecido adiposo promove de maneira autócrina o estímulo dos seus receptores cuja resposta leva à proliferação celular, a diferenciação celular, a adipogênese entre outras respostas autócrinas e/ou parácrinas. A presença do receptor AT1 foi demonstrada em todos os grupos estudados (figuras 12-15), assim como, a

presença do receptor AT2 (figuras 16-19). Isso demonstra a participação desses receptores durante o processo de proliferação e/ou diferenciação celular.

Como os adipócitos secretam todos os componentes do SRA, essa célula pode servir como fonte dos componentes desse sistema para a circulação sistêmica, para todos os tecidos adjacentes, incluindo vasos sanguíneos ou localmente para controlar o crescimento e diferenciação de adipócitos e a expressão de adipocinas. Um SRA do adipócito quando desregulado pode contribuir com a elevação da pressão arterial pela modulação (local e circulante) dos componentes do SRA ou exercendo efeitos locais nos adipócitos e/ou macrófagos infiltrantes (CASSIS *et al.*, 2008).

Há muitas metodologias empregadas para quantificar a proliferação celular *in vitro*. Existem aquelas por incorporação de nucleotídeos radioativos ao DNA celular durante a replicação sendo a resposta proliferativa determinada pelos níveis de radiomarcador (por exemplo: timidina tritiada). Outras como o MTT que ocorre a redução de sais tetrazólio e outros derivados, por ação de redutases (GERLIER & THOMASSET, 1986, FERRARI, FORNASIERO, ISETTA, 1990). Essas ferramentas experimentais são alternativas, porém ambas não permitem estudos subseqüentes com as células, uma vez que comprometem sua viabilidade. No entanto, o método MTT detecta todas as células metabolicamente ativas incluindo as células na fase G0 e, assim pode-se inferir o número total de células viáveis, independentemente da proporção de células em proliferação (PETERSEN *et al.*, 2008).

Nesse estudo as CTTAH foram estimulados com diferentes meios de cultivo (Grupos I, II, III e IV) e foram submetidas ao ensaio por MTT onde

se verificou em 24 h, 48 h e 168 h a atividade celular em todos os grupos. Quando verificamos a viabilidade celular por esse método foi constatado que houve aumento da atividade celular após 168 horas. Os grupos GII e GIII apresentaram inibição da atividade celular nas primeiras 24 horas avaliadas, entretanto, todos os grupos apresentaram atividade celular semelhante em 48 horas. O aumento da atividade celular pode ser condizente com o metabolismo celular e a produção de adipocinas por essas células estando aumentada principalmente pela AII (grupos II e IV) que atuando em seus receptores AT1 e AT2 podem promover tanto a proliferação quanto a diferenciação celular.

Nesse trabalho o ciclo celular das CTTAH estimulados por 168 horas com diferentes meios de cultivo (Grupos I, II, III e IV) foram avaliados por citometria de fluxo (figura 11). Ao se avaliar o perfil proliferativo das CTTAH verificou-se que essa população celular estava principalmente no estágio inicial do ciclo celular (G0/G1). Supostamente o estímulo com os diferentes meios de cultivo nos grupos avaliados acarretou tanto redução na proliferação das células uma vez que as células apresentaram uma porcentagem menor em S/G2/M. Entretanto houve um aumento significativo de células na fase S/G2/M nos grupos III e IV.

Estudos indicam que em condições fisiológicas as células-tronco entram no ciclo celular muito raramente, mantendo-se principalmente em G0. Essas células mais primitivas apresentam ciclo celular mais prolongado quando comparadas com seus progenitores mais comprometidos. Esse aumento da cinética de proliferação pode estar relacionado ao meio de cultivo que continha fatores de diferenciação adipogênico (insulina e dexametasona) influenciando possivelmente no comprometimento dessas células com a diferenciação celular.

Existe um consenso que as CTTAH possuem fenótipo semelhante ao de fibroblastos e proliferam exponencialmente durante a fase de crescimento até atingir a confluência de 100% na placa de cultura. Quando temos limitação de espaço ocorre a parada da proliferação devido a inibição por contato célula-célula. Esta inibição entre as células sinaliza para que ocorra uma parada no ciclo celular em G1/S. Essa parada do ciclo é o primeiro passo para os pré-adipócitos em cultivo se comprometerem com a diferenciação terminal em adipócitos (AILHAUD *et al* 1989; GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998).

Embora as CTTAH estejam comprometidos a retirarem-se do ciclo, eles restauram a capacidade de crescimento logo após a conversão em adipócito. Apenas parar o crescimento leva à conversão de adipócitos, onde a confluência e contato célula-célula não são pré-requisitos para que ocorra o processo. Esta opinião é corroborada por PAIRAULT & GREEN (1979) que demonstraram que a multiplicação celular não é essencial para a conversão em adipócitos, mas é uma forma de seleção clonal, que aumenta a proporção de células adiposas em relação às células indiferenciadas.

A presença dos receptores AT1 e AT2 foram identificados por citometria de fluxo e posteriormente por microscopia de fluorescência. Todos os grupos avaliados apresentaram a presença dos receptores AT1 e AT2 sendo que os grupos GIII e GIV foram significantes quando comparados ao controle. No grupo GIII verificou-se uma diminuição na expressão do receptor AT1 sendo que no grupo GIV ocorreu o aumento da expressão do receptor AT1 em relação ao grupo controle.

Todos os grupos foram avaliados 168 horas após o estímulo com os diferentes meios de cultivo. Em relação ao receptor AT2 a citometria de

fluxo mostrou a expressão desse receptor que foi significativa nos grupos II, III e IV (fig 8), assim como visualizados por microscopia de fluorescência.

Todos os grupos avaliados apresentaram a presença dos dois receptores (AT1 e AT2 da AII) por microscopia de fluorescência e quando observado a morfologia celular das CTTAH foram constatadas as seguintes estruturas : Citoesqueleto (por Alexa Fluor 546) ; núcleo (por DAPI) e gotículas de gordura (por Oil Red).

A apoptose de todos os grupos foi verificada por marcação de anexina V, onde obtivemos poucas imagens, semelhante a demonstrada por citometria de fluxo quando verificado o ciclo celular dessas células após o estímulo com os diferentes meios de cultivo (fragmentos de DNA menos de 2%).

PERSPECTIVAS

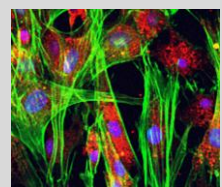
Averiguar mais detalhadamente o ciclo celular utilizando a citometria de fluxo e estudando as proteínas que regulam a transcrição entre as fases G1 e S, pode elucidar melhor o papel da AII tanto na proliferação quanto na diferenciação dessas células.

Por outro lado, o desenvolvimento de agonistas específicos de receptores que possam inibir e/ou estimularem as vias de sinalização das adipocinas pode ser uma promissora maneira de atenuar os efeitos da progressão de doenças relacionadas à obesidade.

Estudar o efeito de fitoterápicos (drogas anti-obesidade) no processo de proliferação e diferenciação nessas células, visando à possível utilização terapêutica desse composto no tratamento da obesidade e outras doenças metabólicas.

O presente estudo abre perspectivas no sentido de se continuar estudando as influências da angiotensina II sobre as CTTAH. Sendo assim, vale à pena investigar mais a fundo os mecanismos pelos quais essa adipocina atua não somente com essas células, mas também em co-culturas com fibroblastos e/ou queratinócitos.

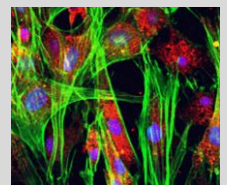
Conclusão



7. CONCLUSÃO

Com a identificação da expressão dos receptores AT₁ e AT₂ e sob ação da AII exógena verificou-se o aumento da atividade celular e mitótica das CTTAH.

Referências



8. REFERÊNCIAS

Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000 Oct;11(8):327-32.

Ailhaud G, Dani C, Amri EZ, Djian P, Vannier C, Doglio A, Forest C, Gaillard D, Négrel R, Grimaldi P. Coupling growth arrest and adipocyte differentiation. *Environ Health Perspect.* 1989 Mar;80:17-23.

Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol.* 2006 Aug;329(8):570-7; discussion 653-5. Epub 2006 May 3.

Arosarena O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Aug;13(4):233-41.

Asamizu S, Urakaze M, Kobashi C, Ishiki M, Norel Din AK, Fujisaka S, Kanatani Y, Bukahari A, Senda S, Suzuki H, Yamazaki Y, Iwata M, Usui I, Yamazaki K, Ogawa H, Kobayashi M, Tobe K. Angiotensin II enhances the increase in monocyte chemoattractant protein-1 production induced by tumor necrosis factor- α from 3T3-L1 preadipocytes. *J Endocrinol.* 2009 Aug;202(2):199-205.

-
- Aubert J, Darimont C, Safonova I, Ailhaud G, Negrel R. Regulation by glucocorticoids of angiotensinogen gene expression and secretion in adipose cells. *Biochem J*. 1997 Dec 1;328 (Pt 2):701-6.
- Aubert J, Safonova I, Negrel R, Ailhaud G. Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Sep 8;250(1):77-82.
- Beahm EK, Walton RL, Patrick CW Jr. Progress in adipose tissue construct development. *Clin Plast Surg*. 2003 Oct;30(4):547-58, viii.
- Bernas T, Grégori G, Asem EK, Robinson JP. Integrating cytomics and proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan;5(1):2-13.
- Bjorntorp P, Paust IM, Miller WH Jr, Karlsson M, Swpniewska G, Dahlgren K. Dietary and species influence on potential of plasma to stimulate differentiation and lipid accumulation in cultured adipocyte precursors. *J Lipid Res*. 1985; 26(12): 1444-54
- Bradley RL, Cleveland KA, Cheatham B. The adipocyte as a secretory organ: mechanisms of vesicle transport and secretory pathways. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:329-58.
- Brücher R, Cifuentes M, Acuña MJ, Albala C, Rojas CV. Larger anti-adipogenic effect of angiotensin II on omental preadipose cells of obese humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2007 Jul;15(7):1643-6.
- Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun;45(2):115-20

-
- Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2886-95.
- Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology*. 2004; 145(1): 169-74.
- Cassis LA, Helton M, English V, Burke G. Angiotensin II regulates oxygen consumption. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Feb;282(2):R445-53.
- Cassis LA, Marshall DE, Fettinger MJ, Rosenbluth B, Lodder RA. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):E867-76.
- Cassis LA, Police SB, Yiannikouris F, Thatcher SE. Local adipose tissue renin-angiotensin system. *Curr Hypertens Rep*. 2008 Apr;10(2):93-8.
- Cawthorn WP, Scheller EI, MacDougald AO. Adipose tissue stem cells meet preadipocytes commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 2012 Feb;53(2):227-46
- da Rosa MI, da Silva Fde M, Girolodi SB, Antunes GN, Wendland EM. The prevalence and factors associated with obesity in women attended at First Aid Units of the Unified Health System in southern Brazil. *Cien Saude Colet*. 2011 May;16(5):2559-66.
- Darimont C, Vassaux G, Ailhaud G, Negrel R. Differentiation of preadipose cells: paracrine role of prostacyclin upon stimulation of adipose cells by angiotensin-II. *Endocrinology*. 1994 Nov;135(5):2030-6.

-
- Deslex S, Negrel R, Ailhaud G. Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res.* 1987 Jan; 168(1): 15-30.
- Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes.* 1987; 11(1): 19-27.
- Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension.* 2000 Jun;35(6):1270-7.
- Ferrarezi DA, Cheurfa N, Reis AF, Fumeron F, Velho G. Adiponectin gene and cardiovascular risk in type 2 diabetic patients: a review of evidences. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007 Mar;51(2):153-9.
- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods.* 1990 Aug 7;131(2):165-72.
- Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Jun;280(6):E827-47.
- Fuentes P, Acuña MJ, Cifuentes M, Rojas CV. The anti-adipogenic effect of angiotensin II on human preadipose cells involves ERK1,2 activation and PPAR γ phosphorylation. *J Endocrinol.* 2010 Jul;206(1):75-83. Epub 2010 May 7.

-
- Gerlier D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*. 1986 Nov 20;94(1-2):57-63.
- Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006 Dec;27(36):6052-63. Epub 2006 Sep 14.
- Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2007 Jun;65(6 Pt 2):S7-12.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998; 78(3): 783-809.
- Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine Cell. *Exp Biol Med*. 2001; 226(11): 997-1002.
- Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*. 2007 Sep;48(9):1905-14. Epub 2007 May 9.
- Harte AL, McTernan, PG, McTernan CL, Crocker J, Starcynski J, Barnett AH, Matyka K, Kumar S. Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes Metab*. 2003; 5;:462-7.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer F. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. 1989; 84: 1663-70.
- Hu R, Mu-Lan He, Hao Hu, Bing-Xiang Yuan, Wei-Jin Zang, Chu-Pak Lau, Hung-Fat Tse, Gui-Rong Li Characterization of Calcium Signaling Pathways in Human Preadipocytes. *J Cell Physiol*. 2009;220:765–770

Huss FR, Kratz G. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival in vitro when tissue engineering principles are applied. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2002; 35(3): 166-71.

IBGE 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*. 2002; 51: 1699-1707.

Jones BH, Standridge MK, Moustaid N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology*. 1997 Apr;138(4):1512-9.

Jones BH, Standridge MK, Taylor JW, Moustaid N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. *Am J Physiol*. 1997 Jul;273(1 Pt 2):R236-42.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89: 2548-56.

Kim S, Whelan J, Claycombe K, Reath DB, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. *J Nutr*. 2002 Jun;132(6):1135-40.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.

Lino MZ, Muniz PT, Siqueira KS. Prevalence of overweight and associated factors in adults: a population survey in Rio Branco, Acre State, Brazil, 2007-2008. *Cad Saude Publica*. 2011 Apr;27(4):797-810.

-
- Liu C, Lv XH, Li HX, Cao X, Zhang F, Wang L, Yu M, Yang JK. Angiotensin-(1-7) suppresses oxidative stress and improves glucose uptake via Mas receptor in adipocytes. *Acta Diabetol.* 2011 Nov 1.
- Lubis AM, Sandhow L, Lubis VK, Noor A, Gumay F, Merlina M, Yang W, Kusnadi Y, Lorensia V, Sandra F, Susanto NH. Isolation and cultivation of mesenchymal stem cells from iliac crest bone marrow for further cartilage defect management. *Acta Med Indones.* 2011 Jul;43(3):178-84.
- Maenhaut N, Van de Voorde J. Regulation of vascular tone by adipocytes. *BMC Med.* 2011 Mar 16;9:25.
- Mallow H, Trindl A, Löffler G. Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Horm Metab Res.* 2000 Nov-Dec;32(11-12):500-3.
- Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci.* 2007 Jul;334(1):23-30. Review.
- Matsushita K, Wu Y, Okamoto Y, Pratt RE, Dzau VJ. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes. *Hypertension.* 2006 Dec;48(6):1095-102. Epub 2006 Oct 23.
- Medina-Gómez G, Vidal-Puig A. Adipose tissue as a therapeutic target in obesity. *Endocrinol Nutr.* 2009 Oct; 56(8):404-11.

-
- Mojallal A, Foyatier JL. Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery. *Ann Chir Plast Esthet.* 2004 Oct;49(5):419-25.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1991 Jun 3;139(2):271-9.
- O'Connor KC, Song H, Rosenzweig N, Jansen DA. Extracellular matrix substrata after adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett.* 2003; 25: 1967-72.
- Oliveira L, Costa-Neto CM, Nakaie CR, Schreier S, Shimuta SI, Paiva ACM. The Angiotensin II AT1 Receptor Structure-Activity Correlations in the Light of Rhodopsin Structure. *Physiol Rev.* 2007; 87: 565–92.
- Pairault J, Green H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Oct;76(10):5138-42.
- Petersen A, Carlsson T, Karlsson JO, Jonhede S, Zetterberg M. Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture. *Mol Vis.* 2008 Jul 21;14:1344-52.
- Pettersson P, Van R, Karlsson M, Bjorntorp P. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism.* 1985 Sep; 34(9): 808-12.
- Poliard A, Nifuji A, Lamblin D, Plee E, Forest C, Kellermann O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell

towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biol.* 1995 Sep; 130(6): 1461-72.

Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest.* 1973 Nov;29(5):570-6.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell.* 2007 Jun 7;1(1):35-8.

Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964 Feb;239:375-80.

Safonova I, Aubert J, Negrel R, Ailhaud G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. *Biochem J.* 1997 Feb 15;322 (Pt 1):235-9.

Saye J, Lynch KR, Peach MJ. Changes in angiotensinogen messenger RNA in differentiating 3T3-F442A adipocytes. *Hypertension.* 1990 Jun;15(6 Pt 2):867-71.

Saye JA, Ragsdale NV, Carey RM, Peach MJ. Localization of angiotensin peptide-forming enzymes of 3T3-F442A adipocytes. *Am J Physiol.* 1993 Jun;264(6 Pt 1):C1570-6.

Schling P. Expression of angiotensin II receptors type 1 and type 2 in human preadipose cells during differentiation. *Horm Metab Res.* 2002 Nov-Dec;34(11-12):709-15.

Shapiro HM. The evolution of cytometers. *Cytometry A.* 2004 Mar;58(1):13-20.

Than A, Tee WT, Chen P. Apelin secretion and expression of apelin receptors in 3T3-L1 adipocytes are differentially regulated by angiotensin type 1 and type 2 receptors. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Jan 11.

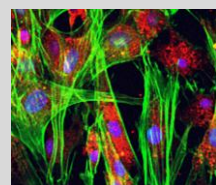
Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68. Review. No abstract available.

Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010 Jun 10;465(7299):704-12.

Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*. 2008 Sep;34(9):1178-85.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

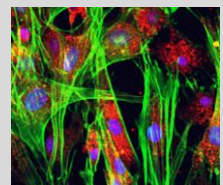
Abstract



ABSTRACT

Introduction: There is a crescent scientific interest about the plasticity and therapeutic potential of adipose-derived stem cells (ASCs), multipotent and abundant cells in adipose tissue, which are able to differentiate in multiple cellular lineages in vitro, including adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, neural cells, endothelial and cardiomyocytes. **Objective:** The aim of this study was verify the effect of AII on ASCs. **Methods:** Human adipose tissue precursor cells were obtained of subcutaneous abdominal tissue, separated by density centrifugation gradient, cultivated and stimulated with different culture media and, then analysed. **Results:** The results of flow citometry showed the expression of CD73, CD90 and CD105 markers, constrasting with the lack of expression of CD16, CD34 and CD45 markers. The adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation were also induced, confirming its mesenchymal stem cell potential in vitro. The human ASCs were able to replicate in culture, keeping phenotype similar to fibroblasts in vitro. When stimulated with different culture media, we verified that the media containing AII increased the cellular and mitotic activity of these cells. **Conclusion:** With the identification of the expression of the AT1 e AT2 receptors and under AII exogenous action, it was verified the increase of cellular activity and mitotic of human ASCs.

Normas adotadas

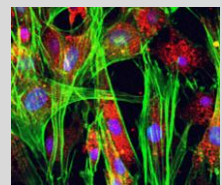


NORMAS ADOTADAS

Descritores em Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br>)

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses - guia prático. 1. ed. São Paulo: LMP; 2008.

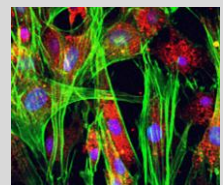
Fontes consultadas



FONTES CONSULTADAS

- Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procopio J. Entendendo as gorduras. Os ácidos graxos. 1. ed. São Paulo: Manole; 2002.
- Freshney RI. Animal cell culture: a practical approach. 1 ed. Oxford: IRL Press; 1996.
- Freshney RI. Cultured of Animal Cell: a manual of basic technique. 3 ed. New York: Wily-Liss; 1995
- Jones GE. Human Cell Culture Protocols. Totowa. New Jersey: Humana Press; 1996.
- Peres CM, Curi R. Como cultivar células. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005

Apêndices



São Paulo, 20 de junho de 2008.
CEP 0858/08

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) SILVANA GAIBA DE FRANÇA

Co-Investigadores: Lydiá Masako Ferreira (orientadora); Lucimar Pereira de França; Soraya S Smalli

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref. Projeto de pesquisa intitulado: “**Pré-adipócitos humano cultivados e estimulados com angiotensina II**”.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo de cultura de células.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco..

OBJETIVOS: Induzir diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros sob o estímulo devido e com hormônio angiotensina II; avaliar as células em estudo quanto aos níveis intracelulares de cálcio sob as condições de estímulo com angiotensina II; verificar nas células em processo de diferenciação as fases de ciclo celular por ação da angiotensina II e verificar o grau de apoptose em condições de não diferenciação e após estímulo com AII..

RESUMO: O cultivo de células será realizado de acordo com Hauner et al. Para caracterização morfológica será realizado a coloração com oil red O, gotículas de lipídios e as células cultivadas serão caracterizadas por imunocitoquímica utilizando-se anticorpos para AT1 da AII conjugados com um marcador fluorescente e analisados por microscopia confocal. Determinação das fases do ciclo celular, tamanho e complexidade das populações das células cultivadas será realizado através da citometria de fluxo. Para as medidas de cálcio intracelular será realizada a análise por microscopia de fluorescência da alta resolução. Os níveis intracelulares de cálcio, ou outros parâmetros de análise serão representados como valores médios ou como porcentagem de aumento relativo ao controle. Os valores serão expressos como média=erro padrão. A análise estatística dos resultados será determinada usando-se o teste de ANOVA seguido pelo de Newman-Kauls para múltiplas comparações..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: São necessários estudos in vitro e in vivo para entender a inter-relação dos mecanismos fisiológicos e os fisiopatológicos pelos quais o crescimento deste importante órgão é regulado.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos que serão realizados.

TCLE: Apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto..

CRONOGRAMA: 36 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **15/6/2009 e 15/6/2010.**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,



Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0858/08

Apêndice 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Título do projeto: “Pré-adipócitos humanos cultivados e estimulados com angiotensina II”.
2. Informações sobre o objetivo: Essa pesquisa na qual você participará como voluntário tem como objetivo estimular os pré-adipócitos humanos com angiotensina II e analisar os eventos da sinalização celular para futuramente usarmos estas informações em diversas restaurações estéticas e de defeitos congênitos.
3. Descrição dos procedimentos: Após sua cirurgia eletiva, quando normalmente os tecidos redundantes retirados durante o procedimento serão desprezados, como gordura e pele, serão enviados para o Laboratório de Cultura de Células da Pele onde faremos as células crescerem dentro de recipientes apropriados.
4. Relação dos procedimentos: A gordura e pele que são desprezadas em cirurgias eletivas como mamoplastia, abdominoplastia e lipoaspiração, serão encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Células da Pele.
5. Descrição dos desconfortos e riscos esperados: Nenhum transtorno será causado, pois o material utilizado seria desprezado, nenhum procedimento a mais será acrescentado à sua cirurgia.
6. Benefício para o paciente: Não há benefício direto ao participante.
7. Procedimentos alternativos: Não existem procedimentos alternativos, pois não serão realizados procedimentos aos já necessários ao procedimento eletivo.
8. Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a aluna Silvana Gaiba de França que pode ser encontrada no seguinte endereço: Rua Napoleão de Barros, 715, 4^o andar, Telefone: (11) 5576.4118. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa

(CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571.1062, FAX 5539.7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br.

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 – Eu, como pesquisadora, comprometo-me a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Pré-adipócitos humanos cultivados e estimulados com angiotensina II”.

Eu discuti com a aluna Silvana Gaiba de França sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

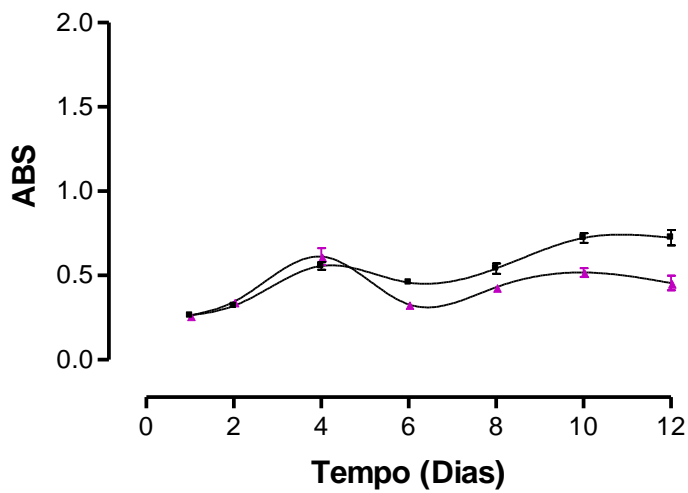
Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

Apêndice 3

Curva de atividade celular - MTT

Atividade celular de pré-adipócitos humano cultivados em meio DMEM/F12 completo e meio

- G1: Controle - Meio DMEM/F12 completo (padrão)
- ▲ G2: Meio adipogênico (1 μ M/ml dexametazon + 10 μ L/ml Insulina)



adipogênico. A atividade celular foi avaliada a cada 48 horas depois de semeadas as células em placas de cultura de 96 poços durante 12 dias. Nesse experimento os grupos 1 e 2 continham 1000 e 20000 células em cada coluna da placa de 96 poços.

A curva de Crescimento ou atividade identifica melhor o fenômeno do que a utilização de curvas de barras. A partir do sexto dia a atividade celular/crescimento celular são diferenciados.

Apêndice 4

Curva de densidade celular - MTT

Absorbância a 570 nm segundo o número de células semeado, em placa de 96 poços, para curva de densidade por MTT

GRUPOS EXPERIMENTAIS	Nº CÉLULAS	MÉDIA DAS ABSORBÂNCIAS
1	100	0,1162
2	200	0,1468
3	300	0,1752
4	400	0,1867
5	500	0,1867
6	1000	0,2402
7	2000	0,3689
8	3000	0,4836
9	4000	0,4699
10	5000	0,5314
11	6000	0,5771
12	7000	0,7062



Atividade celular de pré-adipócitos humano cultivados em meio DMEM/F12 completo. A atividade celular foi avaliada 24 horas depois de semeadas as células em placas de cultura de 96 poços. Nesse experimento os grupos de 1 a 12 continham respectivamente 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 e 7000 células em cada coluna da placa de 96 poços. Foi verificada a relação entre o número de células dos grupos experimentais e a absorbância constatando que o aumento do número de células era proporcional ao aumento da absorbância.