

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Thaís Maria da Mata Martins

**COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO TECIDO
ADIPOSO DA PÁLPEBRA HUMANA E FIBROBLASTOS**

**Belo Horizonte
2013**

Thaís Maria da Mata Martins

**COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSEO
DA PÁLPEBRA HUMANA E FIBROBLASTOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes

Coorientador: Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes

**Belo Horizonte
2013**



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

THAÍS MARIA DA MATA MARTINS

244/2013/17
entrada
2º/2011
07679552690

Às **quatorze horas** do dia **02 de julho de 2013**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSE DA PÁLPEBRA HUMANA E FIBROBLASTOS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Alfredo de Miranda Góes**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Alfredo de Miranda Góes	UFMG/ICB	APROVADA
Dr. Dawidson Assis Gomes	UFMG	APROVADA
Dra. Adriana Bozzi de Melo	CPQRR	APROVADA
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 02 de julho de 2013.**

Dr. Alfredo de Miranda Góes (Orientador) [Assinatura]
Dr. Dawidson Assis Gomes (Co-Orientador) [Assinatura]
Dr^a. Adriana Bozzi de Melo [Assinatura]
Dr^a. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda [Assinatura]

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

[Assinatura]
Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR ICB/UFMG

*Aos meus amados pais,
exemplos de amor e ética;
à minha querida irmã,
presença e apoio constante em
todos os momentos da minha vida
e ao Thadeu, por todo carinho!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, ao Professor Alfredo, por ter me concedido a oportunidade de participar desse maravilhoso grupo de pesquisa e pelo grande exemplo de sabedoria, humanidade e serenidade.

Ao meu coorientador, Professor Dawidson, pelas idéias brilhantes e pela disponibilidade e entusiasmo constante em ajudar.

Ao chefe da Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, João Agostini Netto, pelo fornecimento dos produtos da blefaroplastia. Aos funcionários e doadores da Santa Casa e da Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, em especial à Nilda e à Dr. Ana Paula, pela colaboração na coleta dos tecidos. À Ana Cristina Pinheiro, pelo contato inicial.

Agradeço a todos os meus familiares, de uma forma muito especial aos meus pais e irmãos, à Tia Dalva e à Dindinha, pela confiança, incentivo, carinho e orações. À Juliene, que com seu exemplo, me deu força e coragem para continuar seguindo. Aos meus sobrinhos, Marco Túlio e Télió Júnior, que, mesmo de forma tão efêmera, me mostram o que realmente tem valor na vida.

Aos membros da grande família LICM, obrigada por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável, por todo apoio e amizade! Obrigada por doarem amor e sangue a essa pesquisa! É um presente conviver com todos vocês!

Especialmente, à Alessandra, Alexandra, Cíntia e Ju pelo carinho, incentivo e todos os ensinamentos. À Ana, pela imensa ajuda, por compartilhar das minhas expectativas e vibrar junto a cada resultado!

À Betinha, por adoçar nossas vidas e cuidar tão bem de todos e do laboratório.

À Maira, por toda ajuda nas análises estatísticas.

Ao Thadeu, por toda ajuda durante a execução desse projeto e por me fazer tão bem!
À família do Thadeu, por me acolher com tanto carinho, especialmente à Mirtes.

Ao Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, especialmente à Cris, Igor e Íria,
pela simpatia e disponibilidade, por toda ajuda nas inclusões e fotodocumentação.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular, pelos ensinamentos e apoio à minha formação científica.

A todos os amigos, antigos e recentes, aos amigos do Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular, obrigada pela torcida!

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro.

E, por fim, agradeço a Deus, o maior de todos os mestres, por colocar em meu
caminho pessoas tão especiais como vocês sem as quais esse trabalho não existiria!

*“Tudo, aliás, é a ponta de um mistério,
inclusive os fatos. Ou a ausência deles.*

Duvida?”

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

As bolsas de gordura da pálpebra humana são uma fonte potencial de isolamento de células-tronco para uso na medicina regenerativa. Para futura aplicação clínica dessas células é fundamental estabelecer condições de cultivo livres de componentes animais assim como definir claramente a população de células-tronco diferenciando-a de outros tipos celulares, como os fibroblastos. As células-tronco mesenquimais (MSCs) compartilham semelhanças *in vitro* com os fibroblastos e não há marcadores específicos que permitam a clara distinção entre estes dois tipos celulares. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é comparar fenotípica e funcionalmente as células-tronco isoladas das bolsas de gordura da pálpebra (OFSCs) e os fibroblastos residentes na pele da pálpebra cultivados em meio de cultura suplementado com plasma (PH) ou soro alogênico humano (SH) em substituição ao soro fetal bovino (SFB). Os resultados demonstraram que houve maior cinética de proliferação celular na presença do meio de cultura suplementado com SH indicando a viabilidade do uso desse suplemento para cultivo em larga escala de células para fins terapêuticos. As OFSCs cultivadas nesse meio apresentaram as características imunofenotípicas de MSCs, foram capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e apresentaram altos níveis de atividade da fosfatase alcalina. Em contraste, os fibroblastos não exibiram propriedades de multipotência *in vitro* e apresentaram baixos níveis de expressão e atividade de fosfatase alcalina. Os resultados obtidos possibilitaram distinguir com sucesso as populações de OFSCs e fibroblastos viabilizando futuros estudos de avaliação dos fibroblastos da pálpebra como substituto dos fibroblastos do limbo em trabalhos visando a reconstrução da superfície ocular e permitirão também estudos de avaliação das pálpebras como um nicho de células-tronco para o globo ocular.

Palavras-chave: pálpebra, células-tronco, fibroblastos, soro humano, plasma humano

Abstract

Human orbital fat tissues are a potential source to isolate stem cells for the development of regenerative medicine therapies. For future clinical application of these cells is critical to establish animal components free culture conditions as well as clearly define the stem cells population differentiating it from other cell types, such as fibroblasts. The mesenchymal stem cells (MSCs) share *in vitro* similarities with fibroblasts and there are no specific markers allowing a clear distinction between these two cell types. Therefore, the aim of this study is to compare phenotypic and functionally orbital fat-derived stem cells (OFSCs) and fibroblasts resident in the eyelid skin grown in culture medium supplemented with allogeneic human serum (HS) or plasma (HP) replacing fetal bovine serum (FBS). The results showed that there was a greater cell proliferation kinetics in the presence of culture medium supplemented with HS indicating the feasibility of use of this supplement for clinical application to optimize the *ex vivo* expansion of cells before transplants. The OFSCs grown in this medium showed the immunophenotypic characteristics of MSCs and were able to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. In contrast, the fibroblasts did not have multilineage differentiation potential and showed low levels of alkaline phosphatase expression and activity. The results enabled us to successfully distinguish OFSCs and fibroblasts populations and enabling future studies to evaluate the eyelid fibroblasts as a substitute for limbal fibroblasts works for ocular surface reconstruction and also allow evaluation studies of the eyelids as a stem cells niche to the eyeball.

Keywords: eyelid, stem cells, fibroblasts, human serum, human plasma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gráficos de tamanho <i>versus</i> granulidade.....	40
Figura 2	Curva padrão para concentração de colágeno bovino tipo I.....	42
Figura 3	Estrutura histológica das bolsas de gordura da pálpebra.....	49
Figura 4	Aspectos morfológicos das células extraídas das bolsas de gordura da pálpebra.....	49
Figura 5	Aspectos morfológicos das OFSCs, durante a determinação da taxa de duplicação acumulada em meio de cultura suplementado com SFB, SH ou PH.....	50
Figura 6	Duplicação acumulada das OFSCs.....	51
Figura 7	Curva de crescimento das OFSCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, SH ou PH.	52
Figura 8	Visualização dos cristais de formazan produzidos no ensaio de MTT pelas OFSCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB, SH ou PH.....	53
Figura 9	Representação gráfica da metabolização do MTT pelas OFSCs.....	54
Figura 10	Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs cultivadas na presença de meio suplementado com SFB, SH ou PH.....	55
Figura 11	Cortes histológicos da pele da pálpebra.....	56
Figura 12	Aspectos morfológicos dos fibroblastos extraídos da pele da pálpebra humana.....	56
Figura 13	Duplicação acumulada das populações de OFSCs e fibroblastos.....	57
Figura 14	Curva de crescimento das OFSCs e fibroblastos.....	58
Figura 15	Fotomicrografias das OFSCs (A) e fibroblastos (B) durante o ensaio de BCIP/NBT.....	58
Figura 16	Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs e fibroblastos.....	59
Figura 17	Análise imunofenotípica das OFSCs por meio de citometria de fluxo....	60
Figura 18	Análise imunofenotípica dos fibroblastos por meio de citometria de fluxo.....	61
Figura 19	Representação gráfica da quantificação do percentual de células positivas para cada marcador avaliado.....	62
Figura 20	Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelas OFSCs durante a indução da diferenciação osteogênica.....	63
Figura 21	Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelos fibroblastos durante a indução da diferenciação osteogênica.....	63
Figura 22	Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs durante a indução da diferenciação osteogênica.....	64
Figura 23	Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de fobroblastos durante a indução da diferenciação osteogênica.....	65
Figura 24	Fotomicrografias das OFSCs coradas pelo método de <i>von Kossa</i>	66
Figura 25	Fotomicrografias dos fibroblastos corados pelo método de <i>von Kossa</i>	66
Figura 26	Fotomicrografias das OFSCs coradas com <i>Alizarin Red S</i>	67
Figura 27	Fotomicrografias dos fibroblastos corados com <i>Alizarin Red S</i>	67

Figura 28	Detecção da expressão de fosfatase alcalina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias.....	68
Figura 29	Detecção da expressão de osteopontina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias.....	68
Figura 30	Detecção da expressão de colágeno tipo I, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias.....	69
Figura 31	Indução da diferenciação adipogênica das OFSCs.....	70
Figura 32	Indução da diferenciação adipogênica dos fibroblastos.....	70
Figura 33	Detecção da expressão de PPARG2, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias.....	71
Figura 34	Detecção da expressão de GLUT 4, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias.	71
Figura 35	Detecção da expressão de leptina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias.	72
Figura 36	<i>Pellets</i> formados pelas OFSCs (à esquerda) e fibroblastos (à direita) após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica.....	72
Figura 37	<i>Pellets</i> formados pelas OFSCs após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica.....	73
Figura 38	<i>Pellets</i> formados pelos fibroblastos após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica.....	73
Figura 39	Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelas OFSCs durante a indução da diferenciação condrogênica.	74
Figura 40	Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelos fibroblastos durante a indução da diferenciação condrogênica.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos primários utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	39
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados para PCR.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

AgNO₃ - Nitrato de prata

BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina

BSA - Albumina do Soro Bovino

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CaCl₂ – Cloreto de cálcio

cDNA - Ácido Desoxirribonucléico Complementar

cm - Centímetro

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EDTA - Ácido Tetracético Etilenodiamidina

FA – Fosfatase alcalina

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH - Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase

GLUT 4 - Transportador de glicose GLUT 4

hASC - Células-tronco derivadas do tecido adiposo humano

HCl - Ácido clorídrico

HLA - Antígeno leucocitário humano

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

Kg - Quilograma

Log - Logaritmo

LSCs - *limbal stem cells*

M - Molar

mg - Micrograma

mL - Mililitro

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MSCs - Células-tronco mesenquimais

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

N1 - Número de células plaqueadas

N2 - Número de células ao alcançarem confluência.

NaOH - Hidróxido de sódio

NBT - Nitroblue tetrazólio clorídrico

ng - nanograma

nm - nanômetro

nM - Nanomolar

°C - graus Celsius

OFSCs - células-tronco isoladas das bolsas de gordura da pálpebra - *Orbital fat-derived stem cells*

P - Passagem

PBS - Tampão fosfato de sódio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PE - Ficoeritrina

PH - Plasma alogênico humano

PPARG2 - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos

R1 - População de células - citometria de fluxo

RNA - Ácido Ribonucléico

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SFB - Soro fetal bovino

SH - Soro alogênico humano

T1 - Horário de plaqueamento das células

T2 - Horário de contagem das células

TGF- β - Fator de crescimento transformador beta

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

μ g - Micrograma

μ l - Microlitro

μ m - Micrômetro

μ M - Micromolar

SUMÁRIO

	RESUMO.....	6
	ABSTRACT.....	7
	LISTA DE FIGURAS.....	8
	LISTA DE TABELAS.....	11
	LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	12
1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1.	Medicina regenerativa e células-tronco.....	17
1.1.1.	Células-tronco mesenquimais.....	18
1.1.2.	Células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra e medicina regenerativa ocular.....	21
1.1.3	Células-tronco e reconstrução da superfície ocular.....	22
1.1.4	Diferenças entre células-tronco mesenquimais e fibroblastos.....	24
1.1.5	Pálpebras como fonte de fibroblastos e MSCs para estudo comparativo..	25
1.1.6	Eliminação de elementos xenobióticos em culturas celulares.....	27
2.	JUSTIFICATIVA.....	29
3.	OBJETIVOS.....	30
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2.	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1.	Histologia da pele e das bolsas de gordura da pálpebra.....	31
4.2.	Meios de cultura celular.....	31
4.2.1.	Meios de cultura basal.....	32
4.2.1.1.	Obtenção do <i>pool</i> de soro alogênico humano.....	32
4.2.1.2.	Obtenção do plasma alogênico humano.....	32
4.2.2.	Meios de diferenciação.....	33
4.2.2.1.	Meio osteogênico.....	33
4.2.2.2.	Meio adipogênico.....	33
4.2.2.3.	Meio condrogênico.....	33
4.3.	Isolamento e cultivo das OFSCs.....	33
4.4.	Isolamento e cultivo dos fibroblastos.....	34
4.5.	Cinética de proliferação.....	35
4.5.1.	Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população.....	35
4.5.2.	Curva de crescimento.....	36
4.6.	Viabilidade celular.....	37
4.7.	Atividade da fosfatase alcalina.....	38
4.8.	Caracterização do imunofenótipo.....	38
4.8.1.	Marcação celular com anticorpos primário e secundário.....	39
4.8.2.	Leitura no citômetro de fluxo.....	40
4.9.	Indução da diferenciação osteogênica.....	40
4.9.1.	Avaliação da síntese de colágeno total.....	41
4.9.2.	Avaliação da atividade da fosfatase alcalina.....	42
4.9.3.	Avaliação da mineralização.....	42
4.9.4.	Avaliação da deposição de cálcio.....	43
4.9.5.	Análise da expressão gênica de FA, osteopontina e colágeno tipo I.....	43
4.9.5.1.	Extração de RNA total.....	43
4.9.5.2.	Síntese da primeira fita de cDNA.....	44

4.9.5.3.	Reação em cadeia da polimerase.....	44
4.10.	Indução da diferenciação adipogênica.....	45
4.10.1.	Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos.....	45
4.10.2.	Análise da expressão gênica de leptina, GLUT 4 e PPARG2.....	46
4.11.	Indução da diferenciação condrogênica.....	47
4.11.1.	Avaliação da deposição de proteoglicanos.....	48
4.11.2.	Avaliação da síntese de colágeno total.....	48
4.12.	Análise Estatística.....	48
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Isolamento e cultivo das OFSCs.....	49
5.2.	Cinética de proliferação das OFSCs nos meios suplementados com SH, PH ou SFB.....	50
5.2.1.	Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população.....	50
5.2.2.	Curva de Crescimento.....	51
5.3.	Viabilidade celular.....	53
5.3.1.	Avaliação da capacidade de metabolização do MTT.....	53
5.4.	Atividade da fosfatase alcalina.....	54
5.5.	Isolamento e cultivo dos fibroblastos.....	55
5.6.	Cinética de proliferação dos fibroblastos e OFSCs.....	57
5.6.1.	Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população de fibroblastos e OFSCs.....	57
5.6.2.	Curva de Crescimento dos fibroblastos e OFSCs.....	57
5.7.	Atividade da fosfatase alcalina nos fibroblastos e OFSCs.....	58
5.8.	Caracterização do imunofenótipo das OFSCs e fibroblastos.....	59
5.9.	Indução da diferenciação osteogênica.....	62
5.9.1.	Avaliação da síntese de colágeno total.....	62
5.9.2.	Avaliação da atividade da fosfatase alcalina.....	64
5.9.3.	Avaliação da mineralização.....	65
5.9.4.	Avaliação da deposição de cálcio.....	66
5.9.5.	Análise da expressão gênica de FA, osteopontina e colágeno tipo I.....	67
5.10.	Indução da diferenciação adipogênica.....	69
5.10.1.	Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos.....	69
5.10.2.	Análise da expressão gênica de leptina, GLUT 4 e PPARG2.....	71
5.11.	Indução da diferenciação condrogênica.....	72
5.11.1.	Avaliação da deposição de proteoglicanos.....	72
5.11.2.	Avaliação da síntese de colágeno total.....	73
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONCLUSÕES.....	84
8.	PERSPECTIVAS.....	85
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
	ANEXOS.....	101

1. INTRODUÇÃO

1.1. Medicina regenerativa e células-tronco

A medicina regenerativa é um campo interdisciplinar e emergente de pesquisas e aplicações clínicas focado na substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos com o intuito de restaurar ou estabelecer uma função comprometida por diferentes causas como defeitos congênitos, traumas e envelhecimento (Greenwood, 2006). As medidas terapêuticas empregadas incluem, além dos transplantes tradicionais, a terapia celular, o uso de moléculas solúveis, a terapia gênica, a engenharia de tecidos, a terapia celular avançada com reprogramação celular e o transplante de células-tronco (Mason 2008; Schmitt et al., 2012).

Os novos conhecimentos adquiridos sobre as células-tronco e suas possibilidades terapêuticas levaram a um notável desenvolvimento no campo da medicina regenerativa nos últimos anos, de tal forma que, essas células podem ser consideradas, atualmente, o pilar central da medicina regenerativa (Ramírez, 2009).

Por definição, as células-tronco são células indiferenciadas que possuem grande capacidade de proliferação e autorrenovação, além de possuírem a capacidade de responder a estímulos externos e se diferenciarem em linhagens celulares especializadas (Mountford, 2008; Gepstein, 2002). Essas células encontram-se presentes em uma variedade de tecidos e podem ser classificadas, segundo seu potencial de diferenciação, em três grandes grupos: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Wagers & Weissman, 2004).

O zigoto e as células do blastômero são considerados células-tronco totipotentes já que são capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários assim como os anexos embrionários (Fischbach & Fischbach, 2004).

As células-tronco embrionárias, extraídas da massa interna do blastocisto, são pluripotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários. O estabelecimento das primeiras linhagens de células-tronco embrionárias humanas, em 1998, gerou enorme expectativa para seu uso terapêutico (Thomson et al., 1998; Gearhart, 1998). Entretanto, o uso dessas é limitado devido ao envolvimento em questões éticas, religiosas e políticas referentes à utilização de embriões derivados da fertilização *in vitro* para sua obtenção (Schwindt et al., 2005). No Brasil, a Lei de Biossegurança número 11.105/05 regulamenta o uso de embriões humanos (Pereira, 2008).

Outro problema referente ao uso das células-tronco embrionárias é a sua capacidade de formar teratomas quando introduzidas em animais imunodeficientes (Mountford, 2008).

Uma forma de contornar os problemas referentes ao uso de células-tronco embrionárias pode ser a utilização de células-tronco de pluripotência induzida. Células diferenciadas podem ser induzidas ao estado de pluripotência semelhante ao das células-tronco embrionárias por meio da indução da expressão dos fatores de transcrição Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Apesar do seu enorme potencial no campo da medicina regenerativa, muitos aspectos moleculares, funcionais e referentes à indução, cultivo e manutenção dessas células ainda são desconhecidos (Volarevic et al., 2011). Além disso, assim como as células-tronco embrionárias, as células-tronco de pluripotência induzida possuem alto potencial de formação de teratomas se injetadas em um estado indiferenciado (Schmitt et al., 2012).

Dessa forma, uma fonte mais segura de células autólogas para utilização na medicina regenerativa são as células-tronco adultas. Estas são consideradas multipotentes, pois são capazes de originar células de diversos tecidos, mas não de todos os folhetos embrionários (Schwindt et al., 2005). Essas células exibem propriedades de plasticidade e, sob condições especiais, elas podem se transdiferenciar originando, assim, tipos celulares de origem embriológica diferente da sua própria gênese (Ringe et al., 2002; De Kretser, 2007). As células-tronco adultas melhor estudadas e caracterizadas são as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Hipp & Atala, 2008).

As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as células dos sistemas hematopoiético e imunológico e são utilizadas em transplantes para regeneração do sistema hematopoiético desde 1956 (Hipp & Atala, 2008).

1.1.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais foram primeiramente descritas por Friedenstein e colaboradores, em 1968, como uma população de células aderentes extraídas da medula óssea com grande capacidade proliferativa e foram denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas. Durante as décadas de 70 e 80, estudos demonstraram que essas células possuem a capacidade de diferenciação em linhagens celulares de origem mesodérmica como osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Friedenstein et al., 1972; Hematti, 2012). Em 1991,

Caplan popularizou o termo células-tronco mesenquimais (MSCs - *mesenchymal stem cells*). Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs o uso do termo células estromais mesenquimais multipotentes, mantendo o acrônimo MSC (Horwitz, 2005). Atualmente, é comum a utilização dos dois termos pela comunidade científica.

Estudos demonstram que as MSCs não se diferenciam apenas em tipos celulares da linhagem mesodérmica, elas também podem se diferenciar em linhagens celulares de origem ectodérmica e endodérmica (Kopen, 1999; Sato 2005; Li & Ikehara, 2013). Além da ampla capacidade de diferenciação, as MSCs apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, sendo capazes de modular a função de células do sistema imune inato e adaptativo, podendo induzir tolerância imune (Nauta & Fibbe, 2007; Williams & Hare, 2011). Tem sido demonstrado também, que as MSCs apresentam fenótipo hipoinmunogênico, devido à baixa expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (Le Blanc & Ringdén, 2005). Assim, trabalhos sugerem que as MSCs possam ser transplantadas de forma autóloga (o paciente é seu próprio doador), alogênica (entre membros da mesma espécie) e em xenoenxertos (entre membros de espécies diferentes) (Vieira, 2008; Law & Chaudhuri, 2013).

Acredita-se que as MSCs se localizem por todo o organismo associadas à parede dos vasos sanguíneos e que contribuam para a manutenção da homeostasia tecidual e do sistema imune e que, diante de uma lesão, elas exerçam um papel de proteção dos tecidos injuriados contra repostas imunes exacerbadas, promovendo reposição celular e regeneração tecidual (da Silva Meirelles et al., 2008; Crisan et al., 2008; Schmitt et al., 2012).

Atualmente, células com características semelhantes às MSCs da medula óssea foram isoladas de diversos tecidos como tecido adiposo (Zuk et al., 2001), pulmões (Sabatini et al., 2005), líquido amniótico (De Coppi et al., 2007), membrana sinovial (De Bari, 2001), sangue menstrual (Musina, 2008), polpa dental (Gronthos, 2000), sangue periférico (Kuznetsov 2001) e cordão umbilical (Secco et al., 2008).

Devido ao grande número de estudos descrevendo a presença de MSCs em diferentes tecidos e à variedade de métodos de isolamento, expansão e caracterização utilizados, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs os seguintes critérios mínimos para a definição de MSCs humanas (Dominici et al., 2006):

1. aderência à superfície plástica quando mantidas em condições de cultivo padronizadas;

2. no mínimo, 95% da população celular deve expressar os antígenos de superfície CD73, CD90, CD105 e não devem expressar os antígenos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α e HLA-DR (no máximo, 2% da população positiva);

3. multipotência *in vitro*, ou seja, capacidade de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando estimuladas.

Apesar das MSCs da medula óssea serem candidatas atraentes para uso na medicina regenerativa, a sua utilização clínica apresenta alguns problemas que incluem dor, morbidade e baixo número de células após a coleta (Zuk et al., 2002; Wang et al., 2011). Além disso, o número, a frequência e a capacidade de diferenciação das MSCs da medula óssea decrescem com o aumento da idade (Stenderup, 2003).

Dessa forma, o tecido adiposo apresenta algumas vantagens em relação à medula óssea. O tecido adiposo é um subproduto descartável de cirurgias plásticas obtido em maiores quantidades e por métodos menos invasivos. Além disso, as células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo (hASCs – *human adipose stem cells*) apresentam frequência e taxa de proliferação maior e podem ser cultivadas por maior tempo sem senescer (Kern et al., 2006; Nakagami et al., 2006; Taha & Hedayati, 2010). Segundo Fraser (2006), o número de células-tronco em 1g de tecido adiposo é cerca de 500 vezes maior do que em 1g de medula óssea. Assim, o tecido adiposo pode ser considerado a fonte mais abundante e acessível de células-tronco adultas para uso na medicina regenerativa (Strem et al., 2005; Mizuno, 2009; Zhu et al., 2012).

As hASCs foram primeiramente isoladas por Zuk e colaboradores, em 2001, a partir da fração estromal do tecido adiposo obtido de lipoaspiração. Essas células foram capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos e apresentaram características semelhantes às MSCs da medula óssea. Recentemente, foi demonstrado o potencial de diferenciação dessas células em células endoteliais (Planat-Benard et al., 2004), cardiomiócitos (Strem et al., 2005), células pancreáticas (Timper et al., 2006), neurônios (Anghileri et al., 2008) e hepatócitos (Aurich et al., 2009).

Inúmeros estudos têm identificado a presença de fontes abundantes de hASCs em diferentes depósitos anatômicos de tecido adiposo, como no tecido adiposo subcutâneo do abdômen, do quadril e da região da tíbia, no tecido adiposo do omento e do mesentério e, no tecido adiposo infrapatelar (Dragoo et al., 2003; Tchkonja et al., 2006; Mochizuki et al., 2006; Fraser et al., 2007; Maiorana et al., 2009; Rada et al., 2009; Guilak et al., 2010). Trabalhos

recentes identificaram a presença de células-tronco nas bolsas de gordura da pálpebra (OFSCs - *orbital fat-derived stem cells*).

1.1.2. Células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra e medicina regenerativa ocular

Korn et al. (2009) desenvolveram o primeiro estudo de identificação de células-tronco das bolsas de gordura da pálpebra humana capazes de se diferenciarem em adipócitos, células musculares lisas e em linhagens neuronais e gliais. Ho et al. (2011) evidenciaram que além do potencial de diferenciação em tipos celulares de origem mesodérmica, as OFSCs também possuem o potencial de se diferenciar em células epiteliais da córnea.

As bolsas de gordura da pálpebra são uma fonte potencial de isolamento de MSCs para uso na medicina regenerativa ocular, tendo em vista que, o tecido conjuntivo orbital compartilha a mesma origem embriológica com muitas estruturas oculares. Durante o desenvolvimento embrionário, muitos dos tecidos oculares e orbitais são derivados do neuroectoderma e, em particular, da crista neural (Ho et al., 2011). A maioria das células mesenquimais da região ocular originam-se das células da crista neural, sendo que os tecidos conjuntivos orbitais e oculares são, em sua maioria, derivados dessa estrutura (Johnston et al., 1979; Billon et al., 2007). O mesoderma participa de uma forma bem menos significativa para a formação dos tecidos oculares, sendo que apenas as fibras dos músculos extraoculares e a linhagem endotelial dos vasos sanguíneos são derivadas desse folheto embrionário (Korn et al., 2009; Ho et al., 2011). Assim, o tecido adiposo orbital é derivado da crista neural e não do mesoderma como a maioria do tecido adiposo do corpo (Johnston, 1979; Billon et al., 2008). Devido a essas características embriológicas, acredita-se que as bolsas de gordura da pálpebra possuam uma população de MSCs com características únicas (Korn et al., 2009).

Além de ser uma nova fonte em potencial para uso na medicina regenerativa ocular, as OFSCs podem facilitar o entendimento de doenças oftálmicas, já que algumas doenças podem estar diretamente envolvidas com essas células, como a orbitopatia tireoideana. Sabe-se que em uma parcela de pacientes com essa doença há uma expansão seletiva do compartimento de gordura orbital (Korn et al., 2007). Assim, o estudo *in vitro* das OFSCs de pacientes com orbitopatia tireoideana pode fornecer dados valiosos sobre essa doença e esclarecer se a via de diferenciação adipogênica das OFSCs está favorecida nessa doença.

Korn et al. (2009) apontam que as possibilidades de uso terapêutico das OFSCs são amplas e elas podem ser aplicadas clinicamente a uma série de doenças incluindo doenças da retina, glaucoma, doenças neuro-oftalmológicas e doenças da superfície ocular.

1.1.3. Células-tronco e reconstrução da superfície ocular

O epitélio da córnea é fundamental para a visão e manutenção da transparência da córnea. As células-tronco responsáveis pela renovação constante e reparação desse epitélio estão localizadas na camada basal do epitélio límbico (Shortt et al., 2007; Gu et al., 2009). O limbo esclero-corneano é a região de transição entre a córnea e a conjuntiva bulbar e atua como uma importante barreira entre o epitélio corneano e o epitélio conjuntival impedindo a neovascularização e a invasão da superfície corneana pelo epitélio conjuntival mantendo assim a transparência e integridade da córnea (Dua & Azuara-Blanco, 2000; Baylis et al., 2011).

A deficiência parcial ou total de células-tronco do limbo (LSCs - *limbal stem cells*) pode ocorrer devido a uma variedade de causas como queimaduras químicas ou térmicas, Síndrome de Stevens-Johnson, penfigóide ocular cicatricial, tumores, infecções, dentre outras (Casaroli-Marano et al., 2013; Covre et al., 2013). Estas afecções que acometem a região límbica podem desencadear alterações significativas na córnea como a ocorrência de defeitos epiteliais persistentes, conjuntivalização (invasão da superfície corneana pelo epitélio conjuntival), opacificação, neovascularização, inflamação crônica e cicatrização estromal, levando à fotofobia, dor, diminuição da acuidade visual, podendo conduzir à cegueira (Ricardo, 2010; Zhu et al., 2013). Estima-se que a deficiência de LSCs afeta milhões de pessoas ao redor do mundo sendo um dos grandes fatores responsáveis pelas doenças da córnea que representam a segunda causa mais comum de cegueira depois da catarata (Kolli et al., 2010; Sharma et al., 2011).

Os transplantes autólogos ou alógenos de células epiteliais do limbo e da mucosa oral expandidas *ex vivo* são opções de tratamento para a deficiência de LSC (Pellegrini et al., 1997; Blazejewska et al., 2009; Sharma et al., 2011). A maioria dos estudos envolvendo cultura em suspensão dessas células utiliza camada nutriente de fibroblastos de camundongo 3T3 mitoticamente inativados com mitomicina C ou irradiados a fim de aumentar o crescimento, a sobrevivência e manter as características das células-tronco epiteliais durante o

processo de cultivo (Cristovam et al., 2008; Lu et al., 2012). Estes fibroblastos, além de sintetizarem fibronectina, pequenas quantidades de colágeno tipo IV e laminina, secretam também fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular ao meio de cultura (Green, 1978; Alitalo et al., 1982).

Apesar do desenvolvimento de estratégias terapêuticas como o transplante de células epiteliais do limbo e da mucosa oral ainda não há terapias seguras para as formas mais severas de deficiência de LSC, especialmente quando esta é bilateral (Nakamura & Kinoshita, 2003; Nishida et al., 2004; Gu et al., 2009). Assim, é importante pesquisar fontes alternativas de células-tronco autólogas para a reparação e reconstrução da superfície ocular deficiente de LSC (Blazejewska et al., 2009). Nos últimos anos, pesquisas estão sendo conduzidas utilizando células-tronco epiteliais da conjuntiva (Tanioka et al., 2006), células-tronco da epiderme (Gao et al., 2007), células-tronco embrionárias (Homma et al., 2004; Ahmad et al., 2007), células-tronco epiteliais do folículo piloso (Blazejewska et al., 2009), células epiteliais da membrana amniótica (Parmar et al., 2006), células-tronco da polpa de dente de leite (Gomes et al., 2010) e células-tronco mesenquimais da medula óssea (Gu et al., 2009).

A fim de direcionar a diferenciação das células-tronco em células epiteliais da córnea vários trabalhos buscam replicar, *in vitro*, os fatores presentes no nicho das LSCs (Ahmad et al., 2007; Li et al., 2007; Blazejewska et al., 2009). Atualmente, é bem estabelecido que o nicho desempenha importante papel na manutenção das propriedades das células-tronco (Li & Neaves, 2006). Dessa forma, a manutenção das características de indiferenciação e proliferação das LSCs são controladas por fatores presentes no seu nicho, incluindo colágeno IV, laminina, fibronectina e fibroblastos do limbo (Li et al., 2007; Ordonez & Girolamo, 2012). Estes fibroblastos constituem o principal componente do estroma celular do limbo e produzem várias citocinas e fatores de crescimento que promovem a cicatrização de feridas do epitélio da córnea pelas LSCs (Li & Tseng, 1996). Por essa razão, os fibroblastos do limbo são utilizados para condicionar o meio de cultura que é utilizado, posteriormente, para induzir a diferenciação de células-tronco em células epiteliais da córnea (Ahmad et al., 2007; Blazejewska et al., 2009; Notara et al., 2010; Amirjamshidi et al., 2011).

Apesar dos fibroblastos da derme não estarem presentes no nicho das LSCs *in vivo*, é possível que eles produzam fatores idênticos àqueles sintetizados pelos fibroblastos do limbo (Fukuda et al., 2003). Acredita-se que os fibroblastos de vários nichos de células-tronco

possuam características em comum, como a produção de citocinas comuns, as quais são vitais para manter as propriedades das células-tronco adultas (Sharma et al., 2011).

Nesse contexto, o nosso grupo de pesquisa hipotetiza que as OFSCs podem se comprometer com a linhagem de células epiteliais da córnea quando cultivadas na presença do meio de cultura condicionado por fibroblastos obtidos da pele da pálpebra em substituição ao meio condicionado por fibroblastos do limbo.

Para testar a hipótese acima é essencial fazer um estudo prévio de caracterização das duas populações celulares, OFSCs e fibroblastos, tendo em vista a grande controvérsia existente na literatura a respeito das diferenças entre MSCs e fibroblastos.

1.1.4. Diferenças entre células-tronco mesenquimais e fibroblastos

Os fibroblastos são células mesenquimais identificadas por sua morfologia, habilidade de aderência à superfície plástica, ausência de marcadores das linhagens epiteliais, vasculares e leucocitárias, sendo responsáveis pela síntese e remodelação da matriz extracelular. Eles desempenham importante papel durante o desenvolvimento, manutenção e reparação tecidual (Flavell et al., 2008).

Apesar da ampla quantidade de estudos envolvendo essas células, ainda não há marcadores específicos que permitam a clara distinção entre MSCs e fibroblastos de tal forma que as diferenças entre estes dois tipos celulares ainda não são completamente conhecidas (Hematti, 2012). Embora amplamente reconhecidas como uma entidade celular única, as MSCs compartilham semelhanças *in vitro* com fibroblastos no que diz respeito ao tamanho celular, morfologia, imunofenótipo, capacidade proliferativa e propriedade imunomodulatória (Sabatini et al., 2005; Lysy et al., 2007; Haniffa et al., 2007).

Em contraste com as MSCs, os fibroblastos são considerados células terminalmente diferenciadas que não possuem a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares (Bae et al., 2009; Cappellesso-Fleury et al., 2010; Pereira et al., 2010). Tradicionalmente, a capacidade de diferenciação tem sido o critério utilizado para distinguir fibroblastos e MSCs (Alt et al., 2011). Assim, os fibroblastos são, comumente, utilizados como controle negativo para a avaliação da capacidade de diferenciação das MSCs em diversos estudos (Wagner et al., 2005; Brendel et al., 2005; Alt et al., 2011). No entanto, esse critério de distinção entre MSCs e fibroblastos perdeu, recentemente, a sua clareza, devido aos resultados contraditórios

obtidos por pesquisas relacionadas à capacidade de diferenciação dos fibroblastos (Bae, 2009). Vários estudos demonstram que, assim como as OFSCs, os fibroblastos são capazes de se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e condrócitos (Chen et al., 2007; Covas et al., 2008; Lorenz et al., 2008; Blasi et al., 2011; Brohem et al. 2013).

Até mesmo os estudos dos padrões de expressão gênica têm produzido resultados contraditórios em relação à distinção entre MSCs e fibroblastos. Enquanto alguns estudos mostram diferenças no padrão de expressão gênica, outros estudos mostram que os dois tipos celulares compartilham um padrão de expressão gênica global (Covas et al., 2008; Bae et al., 2009; Alt et al., 2011; Jaager et al., 2012).

A maioria dos estudos de comparação entre MSCs e fibroblastos foram desenvolvidos utilizando células disponíveis comercialmente, de fundo genético desconhecido e que, dificilmente, foram isoladas a partir do mesmo doador (Jaager et al., 2011). A comparação entre células isoladas de diferentes doadores pode introduzir variações individuais para a comparação de diferentes tipos celulares e levar a variações nos padrões de expressão gênica e funções celulares que não podem ser diretamente associadas a identidades celulares distintas (Jaager et al., 2012).

Como os fibroblastos são amplamente distribuídos por todo o corpo, eles são suscetíveis de permanecer como um contaminante indesejável em culturas primárias, se propagando em conjunto com as MSCs durante o cultivo *in vitro*, o que representa um risco para o uso clínico dessas células (Bae et al., 2009). Em 2008, Pereira e colaboradores demonstraram que o transplante de MSCs contaminadas com fibroblastos reverteu a eficácia terapêutica do transplante de MSCs e causou efeitos nocivos, exacerbando a neurodegeneração e os déficits motores em modelo pré-clínico de doença de Parkinson.

Todos estes dados colocados acima sublinham a importância de se definir claramente e distinguir esses dois tipos celulares *in vitro*. Entender as diferenças entre MSCs e fibroblastos é importante para a compreensão da biologia dessas células e para futura utilização segura destas no campo da medicina regenerativa (Cappellesso-Fleury et al., 2010).

1.1.5. Pálpebras como fonte de fibroblastos e MSCs para estudo comparativo

As pálpebras fornecem proteção mecânica ao globo ocular, produzem o componente gorduroso da lágrima, ajudam a impedir a sua evaporação e auxiliam na lubrificação da

superfície ocular espalhando homogeneamente a lágrima sobre essa superfície. Elas ainda agem na limpeza dos detritos e metabólitos corneconjuntivais varrendo a lágrima para as vias lacrimais excretoras (Neto, 2011).

Cada pálpebra apresenta quatro folhetos anatômicos, sendo, de fora para dentro: pele, músculo orbicular, tarso e conjuntiva (Neto, 2011).

A pele palpebral difere da maioria das outras partes do corpo por ser fina, frouxa e elástica, sendo o tecido adiposo subcutâneo praticamente inexistente nessa estrutura (Vaughan & Asbury, 2011).

O músculo orbicular do olho é fino, elíptico e circunda o adito da órbita sendo responsável pelo fechamento das pálpebras (Dantas, 2011).

O tarso é a principal estrutura de sustentação das pálpebras e é constituído por tecido conjuntivo fibroso denso e uma pequena quantidade de tecido elástico. O tarso está ligado ao perióstio do rebordo orbitário pelo septo orbitário, que é formado por uma fásia delgada. Posterior ao septo, encontram-se pequenas acumulações de tecido adiposo rodeadas por uma fina membrana com o formato de bolsas de gordura (Moura et al., 1997; Vaughan & Asbury, 2011). Na pálpebra superior são duas: a nasal (menor e de cor mais clara) e a central (de cor amarelada). Vários autores relatam a presença de uma terceira bolsa de gordura adicional na pálpebra superior em, aproximadamente, 21% da população (Persichetti et al., 2004).

Posteriormente, as pálpebras são delineadas por uma camada de membrana mucosa, a conjuntiva palpebral, que está aderida firmemente ao tarso.

O envelhecimento das estruturas palpebrais causa alterações anatômicas e funcionais que podem provocar déficit de acuidade visual; diminuição do campo visual, causado por obstrução mecânica; alteração da cosmética das pálpebras; cefaléia frontal e excessiva fadiga à leitura, pelo uso crônico da musculatura frontal para vencer a obstrução visual (De Angelis & Carter, 2002; Schellini et al., 2005). A fim de reverter esse quadro, muitos indivíduos recorrem à blefaroplastia, que é a cirurgia plástica de reconstrução palpebral (Ishizuka, 2012).

Atualmente, é crescente o número de indivíduos que recorrem à blefaroplastia, na qual são removidos, na maioria das vezes, a pele e as bolsas de gordura palpebral. Esses tecidos, que são geralmente desprezados, constituem uma promissora fonte de fibroblastos e MSCs para estudo comparativo, tendo em vista as características anatômicas da pálpebra. A pele da pálpebra, como colocado acima, possui escassez de tecido adiposo subcutâneo. Assim, o isolamento de fibroblastos da pele da pálpebra pode se dar de forma segura, sem riscos de

contaminação com MSCs derivadas do tecido adiposo subcutâneo. Já as MSCs podem ser isoladas de forma segura das bolsas de gordura, sem risco de contaminação por fibroblastos dérmicos, tendo em vista a separação anatômica existente entre os compartimentos de gordura e a pele palpebral.

1.1.6. Eliminação de elementos xenobióticos em culturas celulares

Outra potencial aplicação dos fibroblastos obtidos da pele da pálpebra humana consiste no uso como substituto dos fibroblastos de camundongo 3T3 que são atualmente utilizados como camada nutriente das células epiteliais límbicas e da mucosa oral nos sistemas de co-cultura visando reconstrução da córnea. Sharma et al. (2011) apontam que fibroblastos da derme podem produzir fatores semelhantes aos produzidos pelos fibroblastos 3T3 em cultura. O uso de células xenogênicas (de origem animal) nesse sistema de co-cultivo tem sido um dos principais obstáculos para a aplicação clínica dessa técnica devido aos riscos de transmissão de patógenos e de indução da resposta imunológica inerentes ao uso de derivados de origem animal (Martin et al., 2005).

A ausência de elementos xenobióticos em culturas celulares é preconizada pelos protocolos de Boas Práticas de Manipulação como uma das formas seguras para utilização terapêutica das células-tronco (Lindroos et al., 2011). Assim, há a necessidade de pesquisas por camadas nutrientes de origem humana, sendo que Sharma et al. (2011) mostraram que camadas nutrientes de fibroblastos da derme humana foram capazes de manter o crescimento e as características das células-tronco epiteliais do limbo e da mucosa oral.

Outra forma de minimizar o uso de produtos de origem animal no cultivo de células importantes para terapia celular humana consiste em substituir o soro fetal bovino (SFB) comumente utilizado como suplemento dos meios de cultura celular por suplementos de origem humana. O SFB é uma fonte indesejável de proteínas xenogênicas que podem ser internalizadas ou aderir à superfície das células-tronco provocando reações imunológicas (Spees et al., 2004; Martin et al., 2005; Heiskanen et al., 2007). Esse soro pode conter também endotoxinas e ser uma fonte de micro-organismos patogênicos, como vírus, bactérias e príons (Manello & Tonti, 2007). Além disso, o SFB apresenta variações nas concentrações de nutrientes de um lote para o outro, sua composição não é completamente conhecida e seu

uso representa um problema ético devido à morte de milhões de fetos para sua obtenção (Brunner et al., 2010; Isaac et al., 2011).

Dessa forma, diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de substituir o SFB por suplementos livres de componentes animais como o soro humano alogênico ou autólogo (Lin et al., 2005; Pérez-Ilzarbe et al., 2009; Paula et al., 2012), o plasma humano autólogo (Lin et al., 2005), soro humano AB alogênico ou autólogo (Shahdadfar et al., 2005; Kocaoemer et al., 2007; Bieback et al., 2009; Lindroos et al., 2010), plasma rico em plaquetas – trombina ativada (Kocaoemer et al., 2007; Bieback et al., 2009; Cho et al., 2011), plasma autólogo derivado da medula óssea (Schecroun & Delloye, 2004; Sun et al., 2008), lisado plaquetário humano (Bernardo et al., 2007; Bieback et al., 2009; Pérez-Ilzarbe et al., 2009) e meios de cultura quimicamente definidos, livres de soro (van der Valk et al., 2010; Hudson et al., 2011; Gottipamula et al., 2013). Entretanto, os dois estudos presentes na literatura, até o momento, que buscaram caracterizar as OFSCs utilizaram meios de cultura contendo SFB (Korn et al., 2009; Ho et al., 2011). Assim, é importante fazer um estudo dessas células em meio de cultura livre de componentes animais.

2. JUSTIFICATIVA

Para futura utilização segura das OFSCs no campo da medicina regenerativa é fundamental estabelecer condições de cultivo livres de componentes animais assim como definir claramente a população de células-tronco diferenciando-a de outros tipos celulares, como os fibroblastos. Este é o primeiro trabalho que avalia a cinética de proliferação e as características fenotípicas e funcionais das OFSCs em meio de cultura contendo suplementos humanos em substituição ao SFB.

Devido às características anatômicas e embriológicas das pálpebras, elas constituem uma interessante fonte de fibroblastos e células-tronco mesenquimais para estudo comparativo sendo que essas células também apresentam enorme potencial para uso na medicina regenerativa ocular. Neste contexto, este é um trabalho pioneiro que visa comparar fenotípica e funcionalmente as OFSCs com os fibroblastos isolados da pele da pálpebra. A caracterização e distinção destas duas populações celulares possibilitarão futuros estudos de avaliação dos fibroblastos da pálpebra como substituto dos fibroblastos do limbo em trabalhos visando a reconstrução da superfície ocular e permitirão também estudos de avaliação das pálpebras como um nicho de células-tronco para o globo ocular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar fenotípica e funcionalmente células-tronco humanas isoladas das bolsas de gordura e fibroblastos residentes na pele da pálpebra cultivados em meio de cultura livre de componentes animais.

3.2. Objetivos Específicos

- Estudar as condições de isolamento e cultivo das OFSCs.

- Avaliar a capacidade de expansão das OFSCs em meio de cultura suplementado com plasma ou soro alogênico humano em comparação ao SFB.

- Estudar as condições de isolamento e cultivo de fibroblastos da pele da pálpebra.

- Comparar a cinética de proliferação das OFSCs e fibroblastos.

- Caracterizar fenotipicamente as OFSCs e fibroblastos.

- Avaliar a capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica das OFSCs e fibroblastos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Histologia da pele e das bolsas de gordura da pálpebra

A pele e as bolsas de gordura da pálpebra superior foram obtidas de pacientes submetidos à blefaroplastia na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Logo após a remoção cirúrgica, as amostras foram colocadas em tubos cônicos de polietileno de 50 mL (Sarstedt) contendo 20 mL do fixador Bouin (solução aquosa saturada de ácido pícrico/formol 37%/ácido acético) e encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. As amostras foram fixadas por 24 horas.

Após a fixação, a pele e as bolsas de gordura da pálpebra foram incluídas em parafina. Para tanto, as amostras passaram por uma fase de desidratação, com imersão em séries crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 95% e absoluto I, II e III) por um período de 30 minutos em cada banho. Após a fase de desidratação, foi realizada a diafanização por meio da imersão das amostras em três banhos de xilol por um período de 20 minutos em cada. Em seguida, foi realizada a fase de infiltração, com imersão das amostras em três banhos de parafina à 58°C por um período de 20 minutos em cada banho. A seguir, foi feita a inclusão em parafina. Cortes de 7 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina. Os cortes foram observados e fotografados ao microscópio de luz (Olympus BX-41/câmera digital colorida Q-Color3 da QImaging).

4.2. Meios de cultura celular

Inicialmente, foi realizado um estudo de comparação da capacidade de expansão das OFSCs em meios de cultura suplementado com plasma alogênico humano (PH) ou soro alogênico humano (SH) em relação ao meio de cultura suplementado com SFB. Após esse estudo, foi feita a escolha pelo suplemento humano que levou à maior proliferação celular (o PH ou SH) e este foi utilizado na produção do meio de cultura dos estudos posteriores de

caracterização fenotípica e diferenciação celular. O meio de cultura escolhido foi utilizado para o isolamento, expansão e todos os estudos envolvendo os fibroblastos.

4.2.1. Meios de cultura basal

Foi utilizado o meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Vetec); 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (PSA - Sigma-Aldrich); 60 mg/L de gentamicina (Schering-Plough). Foram utilizados três meios de cultura basal diferentes, sendo:

- (i) meio de cultura basal suplementado com 10% de SFB (Cripion);
- (ii) meio de cultura basal suplementado com 10% de SH;
- (iii) meio de cultura basal suplementado com 10% de PH;

O pH dos meios foi ajustado para 7,2 e, em seguida, os meios foram filtrados com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore).

4.2.1.1. Obtenção do *pool* de soro alogênico humano

O soro humano foi obtido de doadores voluntários, entre 20 e 37 anos, submetidos à técnica de coleta de sangue convencional com tubos para coleta de sangue a vácuo e sem anticoagulante (Vacuplast), de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Após a coagulação espontânea, o sangue total foi centrifugado a 2000 rpm, à temperatura ambiente, por 10 minutos, para a separação do soro. O soro de diferentes doadores foi removido dos tubos de coleta e misturados para produzir o SH. Posteriormente, o soro foi inativado à 56°C, por 30 minutos e congelado à -20°C.

4.2.1.2. Obtenção do plasma alogênico humano

Bolsas de plasma foram obtidas da Fundação Hemominas. O plasma obtido do sangue total com anticoagulante (CPDA-1 - ácido cítrico, citrato de sódio, fosfato de sódio e dextrose) foi transferido para tubos cônicos de polietileno de 50 mL onde foi adicionada solução de CaCl₂ 0,025 M. Os tubos foram colocados em banho-maria à 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, foi feita centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos e a rede de fibrina

formada foi retirada. O sobrenadante foi coletado, inativado à 56°C, por 30 minutos e congelado à -20°C.

4.2.2. Meios de diferenciação

4.2.2.1. Meio osteogênico

Ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SH foram adicionados os seguintes fatores indutores: 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Ecibra) e 0,1 mM dexametasona (Aché) (Zuk et al., 2001; Paula et al., 2013). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 μ m.

4.2.2.2. Meio adipogênico

Ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SH foram adicionados 0,1 mM de dexametasona, 200 unidades/mL de insulina (Eli Lilly), 200 μ M de indometacina (Sigma-Aldrich), 500 μ M de isobutil-metilxantina (Sigma-Aldrich) (Zuk et al., 2001). Para esterilização, o meio foi filtrado em membrana de difluoreto de polivinilideno 0,22 μ m.

4.2.2.3. Meio condrogênico

Para produção do meio condrogênico foram adicionados os seguintes fatores indutores ao meio de cultura basal suplementado com 1% de SH: 0,01 μ g/mL de TGF β -1(Sigma-Aldrich), 1 mM de dexametasona, 5 mg/ml de ácido ascórbico, 200 unidades/mL de insulina, 3,25 μ g/ml de transferrina (Wako), 1 mM de piruvato (Sigma-Aldrich), 125 μ g/ml de BSA (PAA) (Zuk et al., 2001). Para esterilização, essa solução foi filtrada em membrana de difluoreto de polivinilideno 0,22 μ m.

4.3. Isolamento e cultivo das OFSCs

O tecido adiposo foi obtido das bolsas de gordura da pálpebra superior removidas durante blefaroplastia de cinco pacientes saudáveis, com idade entre 52 e 65 anos, internados na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Logo após a remoção da gordura, esta

foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura basal sem soro. O tecido foi então encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado ICB - UFMG.

Em capela de fluxo laminar, o tecido foi lavado em tampão fosfato salina 0,15M, pH 7,2 (PBS). A gordura foi picotada e tratada com solução de colagenase tipo I 0,10% (Life Technologies) em PBS 0,15 M, por 1 hora, em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, para digestão da matriz extracelular. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo a gordura era agitado vigorosamente. Decorrido o período de 1 hora, a digestão foi interrompida pela adição de meio de cultura basal. A seguir, o tubo foi centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo a fração celular foi ressuspenso em meio de cultura basal e transferido para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt) que foram mantidas em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após um dia de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 1400 rpm à 20 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado suspenso em 5 mL do meio de cultura basal e acondicionados em novas garrafas de cultura celular T-25.

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2, para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (9 mL) e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular. As células foram expandidas, dessa maneira, até a 4^a passagem para serem utilizadas nos experimentos e por mais passagens para acompanhar as culturas ao longo das mesmas.

4.4. Isolamento e cultivo dos fibroblastos

Os fibroblastos foram obtidos da pele da pálpebra superior de cinco pacientes saudáveis, com idade entre 52 e 65 anos, submetidos à blefaroplastia realizada na Clínica de Olhos da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte ou na Sociedade Oftalmológica de Minas Gerais, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da

UFMG (CAAE: 02887512.6.0000.5149). Logo após a remoção da pele, esta foi transferida para tubos de polietileno de 50 mL contendo 20 mL de meio de cultura DMEM sem soro. A pele foi então encaminhada ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no ICB – UFMG.

Em capela de fluxo laminar, a pele foi lavada em PBS 0,15M, pH 7,2 e transferida para placa de cultura celular de 10 centímetros (Sarstedt) onde foi cortada em pedaços de, aproximadamente, 1 mm². Os pedaços de pele foram transferidos para tubo contendo solução de colagenase tipo I 0,10% em PBS 0,15 M e incubados por 3 horas, em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Durante esse período, a cada 15 minutos, o tubo contendo a pele foi agitado vigorosamente. Decorrido o período de 3 horas, a digestão foi interrompida pela adição de meio de cultura basal suplementado com 10% SH. A seguir, o tubo foi centrifugado a 1400 rpm por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o precipitado foi ressuspensão em meio de cultura basal e transferido para garrafas de cultura celular T-25 e mantidas em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após dois dias de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 1400 rpm à 20°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado foi suspenso em 5 mL do respectivo meio de cultura basal e acondicionados em novas garrafas de cultura celular T-25.

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e, em seguida, foi adicionado novo meio de cultura basal. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% EDTA, por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (9 mL) e a suspensão formada foi dividida em duas novas garrafas de cultura celular T-75. As células foram expandidas, dessa maneira, até à 4ª passagem para serem utilizadas nos experimentos e por mais passagens para acompanhar as culturas ao longo das mesmas.

4.5. Cinética de proliferação celular

4.5.1. Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população

As OFSCs foram expandidas além da 4ª passagem nos três diferentes meios de cultura basal (suplementado com 10% de SFB ou 10% de PH ou 10% de SH). Os fibroblastos também foram expandidos além da 4ª passagem no meio de cultura suplementado com SH. Ao alcançarem a confluência, em cada passagem, as células foram contadas e a taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada. As culturas celulares foram descontinuadas a partir do momento em que as células demoraram mais de 15 dias para confluir.

Para este ensaio, as células foram acompanhadas desde seu isolamento, sendo que em cada passagem, foram plaqueadas 1×10^5 células/garrafa de cultura celular T25 e incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ até alcançarem a confluência. As culturas confluentes foram contadas: para isso, foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e removidas das garrafas de cultura celular T25 utilizando solução de tripsina 0,05% EDTA por 5 minutos. As células foram centrifugadas a 1400 rpm por 10 minutos e suspendidas em 1 mL de meio de cultura basal para contagem do número de células por meio de um hemocitômetro (HBG).

A taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$x = [\log_{10}N2 - \log_{10}N1] \div \log_{10}2$$

na qual,

x: taxa de duplicação da população;

N2: número de células contadas ao alcançarem confluência;

N1: número de células plaqueadas.

Para calcular a taxa de duplicação acumulada da população, a taxa de duplicação da população determinada em cada passagem foi adicionada a da passagem anterior (Kocaoemer *et al.*, 2007).

Paralelamente, o tempo de duplicação das células cultivadas nos diferentes meios de cultura foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$y = (T2 - T1) \times \log_{10}2 \div \log_{10}(N2 \div N1)$$

na qual,

y: tempo de duplicação;

T2: horário de contagem das células;

T1: horário de plaqueamento das células;

N2: número de células contadas ao alcançarem confluência;

N1: número de células plaqueadas.

4.5.2. Curva de crescimento

As curvas de crescimento das OFSCs cultivadas nos três diferentes meios de cultura basal (suplementado com 10% de SFB ou 10% de PH ou 10% de SH) e dos fibroblastos cultivados no meio suplementando com SH foram determinadas pela contagem do número de células em tempo definidos. No tempo zero, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T25 e incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ pelos seguintes intervalos de tempo: 3, 5, 7, 9 e 11 dias. Ao final de cada intervalo, as células foram contadas, de acordo com o procedimento descrito acima.

4.6. Viabilidade celular

A viabilidade das OFSCs foram mensuradas pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), baseado em um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de MTT, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água (Mosmann, 1983). Os cristais de formazan foram solubilizados e a densidade ótica determinada pelo espectrofotômetro a 595 nm.

As OFSCs, cultivadas nos três diferentes meios de cultura basal (suplementado com SFB, SH ou PH), na quarta passagem, foram semeados em placas de 24 poços (TPP) na densidade de 5×10^2 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. As células foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 1, 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado e 210 µL/poço do respectivo meio de cultura basal foram adicionados. Em seguida, foram acrescentados 170 µL/poço de solução de MTT (5 mg/mL) (Invitrogen) e a placa foi incubada em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas. As células foram observadas ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) para visualização dos cristais de formazan e

fotodocumentação (Olympus Evolt E-300). Os cristais formados foram solubilizados por meio da adição de 210 µL/poço de uma solução de SDS 10%-HCl (ácido clorídrico 0,01 M - 10% de sulfato de sódio dodecil em água) seguido de incubação em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Após esse período, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços fundo reto (Nunc), em triplicata, e a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade.

4.7. Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina (FA) foi avaliada por meio do ensaio de BCIP-NBT (Invitrogen). Este ensaio é baseado na reação cromogênica decorrente da clivagem de um grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) pela FA produzida pelas células. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valério et al., 2004).

As OFSCs, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, SH ou PH e os fibroblastos cultivados no meio suplementado com SH, na quarta passagem, foram semeados em placas de 24 poços na densidade de 5×10^2 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. Em seguida, foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 1, 7, 14, 21 e 28 dias.

Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi descartado, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e incubadas com 200 µL/poço da solução de BCIP-NBT (preparada de acordo com as instruções do fabricante) à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas.

Após o período de incubação, os precipitados de cor púrpura formados foram visualizados em microscópio de luz. Em seguida, foram adicionados 210 µL/poço de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados. As placas foram incubadas em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Após este período, um volume de 100 µL de cada poço foi transferido, em triplicata, para uma placa de 96 poços e a densidade ótica foi medida em espectrofotômetro a 595 nm. Durante o experimento, todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade.

Foi feita, em paralelo ao ensaio de BCIP/NBT, a contagem do número de células. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização.

4.8. Caracterização do imunofenótipo

As OFSCs e fibroblastos foram caracterizados por citometria de fluxo pela análise da expressão das moléculas de superfície celular CD105, CD73, CD90, CD166 e CD9 que são marcadores comuns de MSCs. Para verificar a existência de contaminações na cultura com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34, CD45, CD14 e CD19 que são marcadores expressos em células-tronco hematopoiéticas. As células também foram caracterizadas em relação à expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I e II: HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente (Lindroos et al., 2010; Dominici et al., 2006; Mitchel et al. 2006; Halfon et al., 2011).

4.8.1. Marcação celular com anticorpos primário e secundário

As células, na quarta passagem, foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/poço em placa de 96 poços (fundo em U) e incubadas com 0,4 µg de anticorpos primários (Tabela 1) à 4°C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 anti-IgG de camundongo feito em cabras (Invitrogen), na diluição de 1:500 à 4 °C por 30 minutos. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas em formaldeído a 4% (Cromaline). Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada.

4.8.2. Leitura no citômetro de fluxo

A obtenção dos dados foi realizada por meio do citômetro de fluxo Guava easyCyte 6-2L (Millipore). Foram adquiridos 5000 eventos, em triplicata, e os dados obtidos foram

analisados no programa FlowJo. Primeiramente, a população de células de cada cultura a ser avaliada foi delimitada a partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação (Figura 1). Posteriormente, um gráfico de histograma foi criado para determinar a região do controle negativo de fluorescência referente às células incubadas apenas com o anticorpo secundário. Definidos estes parâmetros, foram realizadas as análises das células marcadas, com anticorpos primários e secundários.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
CD105	Monoclonal	Camundongo	FITC	BD Biosciences	1:20
CD73	Monoclonal	Camundongo	PE	BD Biosciences	1:10
CD90	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:41
CD166	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:62
CD9	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:62
CD34	Monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1:20
CD45	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:62
CD14	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:62
CD19	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:62
HLA-ABC	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10
HLA-DR	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10

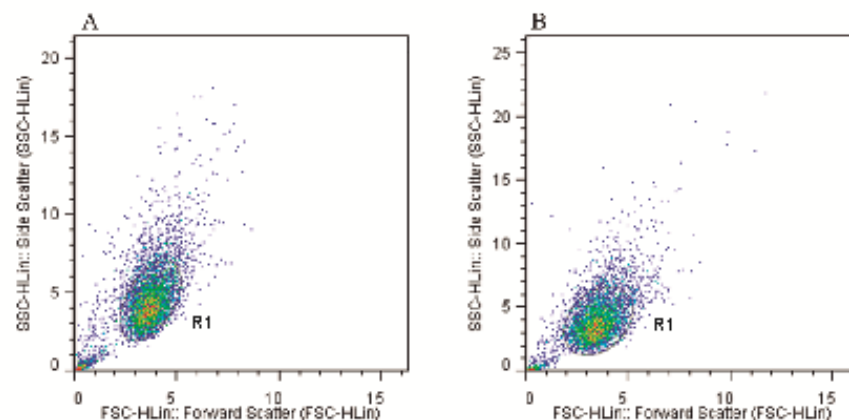


Figura 1. Gráficos de tamanho *versus* granulosidade. R1 é a população escolhida para análise dos marcadores nas culturas de OFSCs (A) e fibroblastos (B).

4.9. Indução da diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação osteogênica, os fibroblastos e as OFSCs, na quarta passagem, foram semeados na densidade de 5×10^2 células/poço em placas de 6 ou 24 poços contendo 2 ou 1 mL de meio osteogênico. As placas foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 1, 7, 14 e 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas no meio de cultura basal, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados após o término de cada período de incubação e estão descritos a seguir. Todas as culturas e experimentos envolvendo o meio de diferenciação osteogênico foram realizados em condições de mínima luminosidade.

4.9.1. Avaliação da síntese de colágeno total

O ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999) foi realizado a fim de avaliar a síntese de colágeno pelas células após 1, 7, 14 e 21 dias de indução da diferenciação osteogênica.

Para tanto, as OFSCs e os fibroblastos, na quarta passagem, foram plaqueados na concentração de 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. Após cada período de incubação, o meio de cultura foi desprezado, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas com 1ml de Bouin por 1h, à 37°C, sob agitação. Após a fixação, as células foram lavadas em água destilada por 15 minutos para posterior coloração pelo reagente *Sirius Red* (1 mg/mL em solução saturada de ácido pícrico) à 37°C sob agitação por 30 minutos. O excesso do corante foi removido e os poços foram lavados com HCl 0,01 N. Posteriormente, o corante foi solubilizado com 300 µL de NaOH 0,5 M, por 30 minutos sob agitação. Após este período, 100 µL da solução foram transferidos para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade ótica foi mensurada no espectrofotômetro a 540 nm.

Uma curva padrão de concentração de colágeno foi produzida a partir de dosagens estabelecidas de colágeno bovino comercial tipo I. O colágeno em pó foi dissolvido em solução de ácido acético 0,1 N, em diferentes concentrações e transferido para placas de 24 poços, que secaram à 37°C. Em seguida, o colágeno distribuído sobre a superfície dos poços da placa foi submetido ao mesmo procedimento de dosagem de colágeno descrito acima. Os

resultados de densidade ótica obtidos foram utilizados para produção da curva padrão de concentração de colágeno (Figura 2). Utilizando esta curva, a concentração de colágeno sintetizada pelas células ao final de cada tempo de cultura foi inferida a partir da densidade ótica obtida a 540 nm.

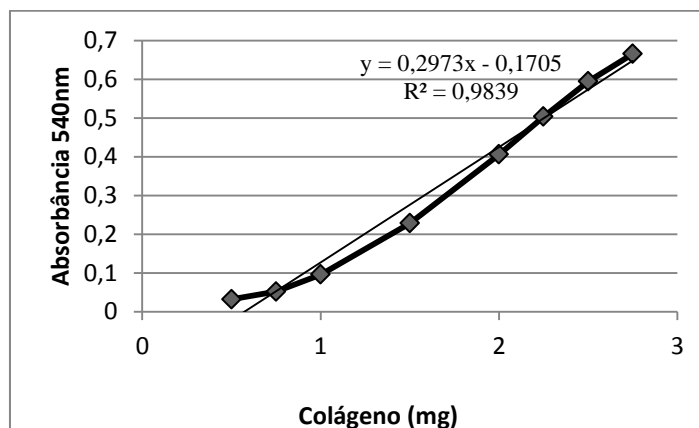


Figura 2. Curva padrão para concentração de colágeno bovino tipo I. A equação da reta fornece a concentração de colágeno em mg de acordo com a densidade ótica obtida em 540 nm.

4.9.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

Para avaliar a atividade da FA durante a indução da diferenciação osteogênica, foi realizado o ensaio de BCIP/NBT após 1, 7, 14 e 21 dias conforme descrito no item 4.7.

4.9.3. Avaliação da mineralização

Para avaliar a mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica foi realizada a coloração pelo método de *Von Kossa*.

Ao término do período de 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas. Após a fixação, as células foram lavadas abundantemente com água destilada. Foi adicionado 1 mL/poço de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO_3) (Vetec) em água e as células foram expostas a luz ultravioleta, por 1 hora. A solução de AgNO_3 foi removida e as células foram lavadas com água destilada para posterior adição de solução de 5% de tiosulfato de sódio (Cinética Química Ltda) em água, por 5 minutos. Foi realizada, novamente, lavagem abundante com água destilada e as células foram coradas com eosina por 40 segundos. Foi feita a observação ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e fotodocumentação (Olympus Evolt E-300) para demonstração da presença de mineralização indicada pela coloração negra ou marrom.

4.9.4. Avaliação da deposição de cálcio

A fim de avaliar a deposição de cálcio durante indução da diferenciação osteogênica, foi feita a coloração com *Alizarin Red S*, que cora a matriz extracelular rica em cálcio em vermelho.

Para tanto, após 21 dias de cultivo, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas com álcool etílico 70% por 1 hora a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e, posteriormente, com água Mili-Q. Foi adicionado 1 mL do corante *Alizarin Red S* a 2% e as células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o excesso de corante foi retirado e as células foram lavadas abundantemente com água Mili-Q. Após, foi feita lavagem com PBS 0,15 M, pH 7,2 por 15 minutos seguida de lavagem rápida com água Mili-Q e secagem à temperatura ambiente. As células foram observadas ao microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e fotografadas (Olympus Evolt E-300).

4.9.5. Análise da expressão gênica de fosfatase alcalina, osteopontina e colágeno tipo I

Após 21 dia de indução da diferenciação osteogênica, foi realizada a extração do RNA, a síntese da primeira fita de cDNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR) a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes FA, osteopontina e colágeno tipo I.

4.9.5.1. Extração de RNA total

O RNA total foi isolado das células utilizando-se 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) por poço da placa de 6 poços. Após incubação com o Trizol, por 5 minutos, à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) à solução formada. Após agitação vigorosa, a solução foi centrifugada a 12000 x g, por 15 minutos, a 4°C. A fase superior aquosa foi transferida para novo tubo de 1,5 mL (Axygen), onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi removido e o RNA precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Sigma-Aldrich). Após centrifugação a 7500 g, por 5 minutos, à 4°C e remoção do sobrenadante, o RNA foi solubilizado em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a

260/280nm em Nanodrop e a qualidade do RNA foi testada em gel de agarose 1%. (Sigma-Aldrich). As amostras foram estocadas a -80°C até o momento de uso.

As amostras de RNA foram tratadas com DNase (RQ1 DNase Promega) à 37°C por 30 minutos em tampão apropriado. A seguir, foi feita a extração do RNA com fenol-clorofórmio (Sigma-Aldrich) e a precipitação com etanol.

4.9.5.2. Síntese da primeira fita de cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA total, utilizando-se o RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. 1µg de cada amostra de RNA total foi incubado com 0,5 µg de oligo(dT)₁₈ à 65°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras, 5X *reaction buffer*, 20 unidades RibolockTM RNase inhibitor, 2 µL de dNTP mix (10mM) e 200 unidades da enzima RevertAidTM H Minus M-MuLV RT e as amostras foram incubadas por 60 minutos à 42°C . A reação foi interrompida pelo aquecimento à 70°C por 10 minutos. A primeira fita de cDNA obtida foi utilizada nas reações de PCR descritas a seguir.

4.9.5.3. Reação em cadeia da polimerase

A primeira fita de cDNA sintetizada foi utilizada na reação em cadeia da polimerase (PCR) objetivando a amplificação específica de fragmento dos genes FA, osteopontina e colágeno tipo I. Como controle positivo da reação também foi amplificado o segmento gênico que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), enzima expressa constitutivamente pelas células. Para reações de 10 µL de volume final, foram utilizados: 1X Green Go Taq Reaction Buffer, 0,2mM de cada dNTP, 2mM MgCl₂, 5pM dos iniciadores (*primers*) específicos, 0,25 u de Go Taq DNA polimerase (Promega) e a quantidade de cDNA correspondente a 20 ng da quantidade de RNA inicial. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.) programado para um aquecimento inicial de 95°C por 2 minutos seguidos de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento específica para cada par de *primer*, 72°C por 45 segundo. Para uma extensão completa dos produtos amplificados, adicionou-se um passo final de 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados

foram fracionados em gel de agarose 1%, corados com brometo de etídio (10 µg/mL) analisados em transluminador de luz ultravioleta e as imagens foram capturadas.

4.10. Indução da diferenciação adipogênica

No intuito de promover a diferenciação adipogênica, as OFSCs e os fibroblastos, na 4ª passagem, foram semeados na densidade de 5×10^3 células/poço em placas de 6 poços contendo 2 mL do meio adipogênico. As placas foram incubadas à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 21 dias. Como controle, as células também foram cultivadas no meio de cultura basal, na ausência dos fatores indutores, nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados ao término do período de indução e estão descritos a seguir.

4.10.1. Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos

A coloração com Oil Red O foi realizada a fim de confirmar a diferenciação adipogênica por meio da coloração de lipídeos presentes no interior das células. Para tanto, após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica, o meio de cultura foi removido dos poços e estes foram lavados com 2 mL de PBS 0,15M, pH 7,2. Após lavagem, as células foram fixadas com formalina 10% (Cromaline) por um período de 30 a 60 minutos, à temperatura ambiente. Foi preparada uma solução de uso do Oil Red O (Thermo Scientific) composta por 3 partes da solução estoque (300 mg de Oil Red O em 100 mL de isopropanol 99%) para 2 partes de água destilada. Após o preparo, essa solução de uso foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada em papel filtro. Após o período de fixação, a formalina foi removida dos poços e estes foram lavados com 2 mL de água destilada. Foram adicionados 2 mL de isopropanol 60% (Vetec) por poço e a placa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. O isopropanol foi retirado e foram adicionados 2 mL da solução de uso do corante por poço. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o Oil Red O foi removido e os poços foram lavados com água destilada. Após lavagem, foram adicionados 2 mL de hematoxilina por poço, seguido de incubação por 1 minuto à temperatura ambiente. A hematoxilina foi removida e os poços foram lavados com água destilada. A seguir, foram adicionados 2 mL de água destilada e foi

feita a observação em microscópio de luz (OLYMPUS IX70) e a fotodocumentação (Olympus Evolt E-300). Os lipídeos foram corados em vermelho e os núcleos em azul.

4.10.2. Análise da expressão gênica de leptina, transportador de glicose GLUT 4 e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos

Após 21 dia de indução da diferenciação adipogênica, foi realizada a extração do RNA, a síntese do cDNA e a PCR a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes leptina, transportador de glicose GLUT 4 (GLUT 4) e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos (PPARG2) conforme descrito no item 3.12.4. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - *Primers* utilizados para PCR

Gene alvo*	Seqüência (5'-3')	Tamanho do fragmento (bp)	Temperatura de anelamento (°C)
FA	F: TGGTGGGAAGGAGGCAGAATTGAC R: CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	581	56
Col I	F: TGACGAGACCAAGAAGCTG R: CCATCCAAACCACTGAAACC	599	62
OSP	F: GCCGAGGTGATAGTGTGGTT R: TGCTTGTGGCTGTGGGTTTC	253	51
GLUT 4	F: TCTTCGAGACAGCAGGGGTA R: AGATGGCCACAATGGAGACG	228	60
Lep	F: GAACCCTGTGCGGATTCTTG R: TGAAGTCCAAACCGGTGACT	177	60
PPARG2	F: CTCCTATTGACCCAGAAAGCGA R: GCAGGCTCCACTTTGATTGC	310	60
GAPDH	F: ACATCGCTCAGACACCATG R: TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG	143	60

*FA – fosfatase alcalina; Col I - colágeno tipo I; OSP – osteopontina; GLUT 4 - transportador de glicose GLUT 4; Lep – leptina; PPARG2 - Receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomos; GAPDH - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; bp – pares de base.

4.11. Indução da diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica, as OFSCs e fibroblastos, na 4^a passagem, foram cultivados em um sistema de *pellet* de células. Para tanto, 5×10^5 células foram centrifugadas a 800 g por 5 minutos em tubos de polietileno de 15 mL (Sarstedt) contendo 1 mL do meio de cultura basal. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1 mL do meio condrogênico sobre o *pellet* de células formado. Os tubos de polietileno de 15 mL contendo os *pellets* de células foram incubados em estufa à 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 21 dias. O meio de cultura foi renovado uma vez por semana. Os ensaios para comprovar a diferenciação foram realizados ao término do período de indução e estão descritos a seguir.

4.11.1. Avaliação da deposição de proteoglicanos

A fim de visualizar a deposição de proteoglicanos durante a indução da diferenciação condrogênica, foi feita a coloração com *Alcian Blue*, o qual cora proteoglicanos da matriz extracelular em azul.

Ao término do período de 21 dias, os *pellets* de células foram lavados com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixados com formaldeído 10% por 1 hora. Após a fixação, os *pellets* foram incluídos em parafina conforme descrito no item 4.1. Cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e corados por hematoxilina e eosina e foi realizada também a coloração com *Alcian Blue* 8GX, 1%, pH 2,5 (Sigma-Aldrich). Para tanto, as lâminas foram desparafinizadas em estufa à 60°C por 15 minutos, seguido por banho em xilol por 14 minutos. Após desparafinização, as lâminas passaram por uma série gradual de etanol (absoluto I e II, 95%, 70%) por um período de 4 minutos em cada banho. Após lavagem em água corrente, por 1 minuto, as lâminas foram incubadas com o corante *Alcian Blue* 1% por 30 minutos. Após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos. Os núcleos foram contracorados com hematoxilina por 40 segundos. Após lavagem em água corrente por 1 minuto e desidratação em séries crescentes de etanol, foi feita a montagem das lâminas. As secções dos *pellets* foram observados ao microscópio de luz e fotografados (Olympus BX-41/acoplado a câmera Q-Color3 digital da QImaging).

4.11.2. Avaliação da síntese de colágeno total

O ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (Tullberg-Reinert & Jundt, 1999) foi realizado a fim de avaliar a síntese de colágeno total pelas células durante a indução da diferenciação condrogênica. A concentração de colágeno sintetizada pelas células ao final do tempo de indução foi inferida conforme descrito no item 4.9.1.

4.12. Análise Estatística

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com tratamentos em fatorial. Os resultados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade (programa Sisvar) e posteriormente submetidos à análise de variância (ANOVA). As variáveis paramétricas e aquelas normalizadas após transformação logarítmica ou quadrática foram analisadas por teste t ou SNK, dependendo da comparação realizada. Nível de significância adotado foi 5% ($p < 0,05$) e o programa estatístico utilizado foi o R. Os resultados apresentados representam a média \pm o desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e cultivo das OFSCs

A fim de permitir a visualização da estrutura histológica do tecido adiposo do qual as OFSCs foram obtidas, as bolsas de gordura da pálpebra, removidas durante a blefaroplastia, foram incluídas em parafina e os cortes histológicos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (Figura 3).

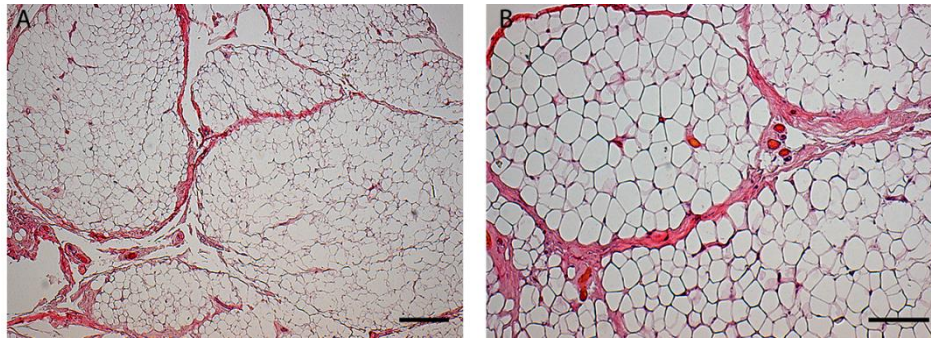


Figura 3. Estrutura histológica das bolsas de gordura da pálpebra. Coloração hematoxilina e eosina. Barra = 300 μm (A). Barra = 150 μm (B).

Após o processamento enzimático do tecido adiposo presente nas bolsas de gordura palpebral, conforme descrito no item 4.3, foi obtida uma população heterogênea de células, contendo células aderentes à superfície plástica, de morfologia fibroblastóide e células não aderentes, de formato arredondado. Por meio das trocas sucessivas do meio de cultura e expansão celular, as células não aderentes, foram removidas ao longo do cultivo. Dessa forma, a partir da terceira passagem, obteve-se uma população homogênea de células aderentes de formato fibroblastóide, com potencial de autorrenovação e formação de colônias (Figura 4).

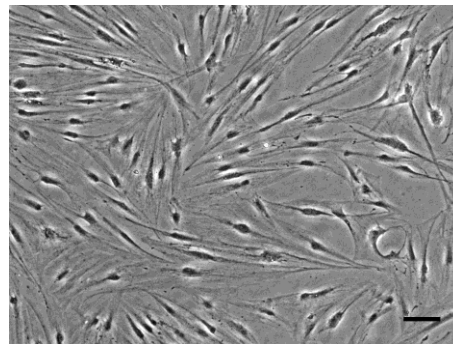


Figura 4. Aspectos morfológicos das células extraídas das bolsas de gordura da pálpebra humana, na terceira passagem. Barra = 100 μm .

5.2. Cinética de proliferação das OFSCs nos meios suplementados com SH, PH ou SFB

5.2.1. Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população

Para este ensaio, as OFSCs foram acompanhadas desde seu isolamento e expandidas nos três diferentes meios de cultura basal (suplementado com 10% de SFB ou 10% de PH ou 10% de SH). As culturas confluentes foram contadas, a taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada e adicionada a da passagem anterior para cálculo da taxa de duplicação acumulada da população. Determinou-se também o tempo de duplicação da população (item 4.5.1).

Por meio da observação microscópica das OFSCs cultivadas nos três diferentes meios de cultura, foi possível observar que na presença dos meios de cultura contendo suplementos humanos (SH ou PH) as células apresentaram um tamanho menor e maior densidade quando comparadas às células cultivadas em meio suplementado com SFB (Figura 5). Quando comparados apenas os meios contendo suplementos humanos, observou-se maior densidade celular na presença do meio suplementado com SH em todas as passagens.

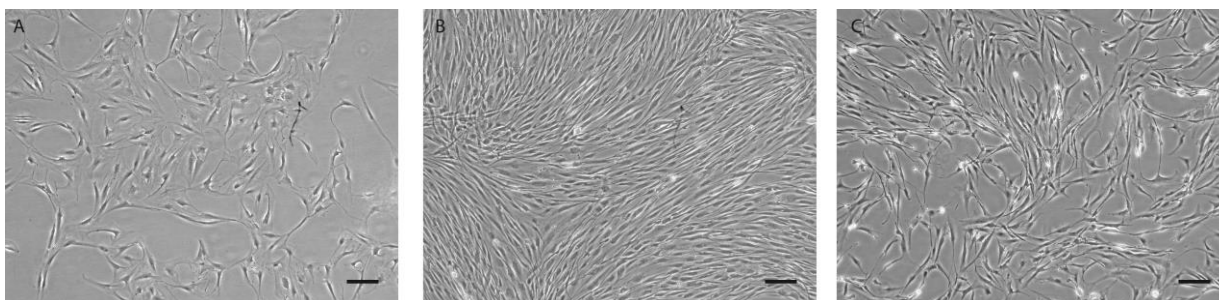


Figura 5. Aspectos morfológicos das OFSCs, na segunda passagem, durante a determinação da taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população em meio de cultura suplementado com SFB (A), SH (B) ou PH (C). Foi plaqueado o mesmo número inicial de células. Barras = 150 μ m.

Observou-se uma expansão acumulada maior na população de OFSCs cultivadas no meio de cultura suplementado com SH em comparação com as células cultivadas nos meios suplementados com PH ou SFB ($p < 0,05$). Quando comparados apenas esses dois últimos meios, verificou-se que houve expansão acumulada maior na população celular cultivada em meio suplementado com PH comparado ao meio suplementado com SFB ($p < 0,05$) (Figura 6).

Foi possível acompanhar as culturas em meio suplementado com SH até a 12^a passagem, enquanto as culturas em meio suplementado com SFB ou PH foram acompanhadas

até a 10^a passagem e 8^a passagem, respectivamente, uma vez que a partir dessas passagens as células levaram mais de 15 dias para confluir e, assim, as culturas foram descontinuadas.

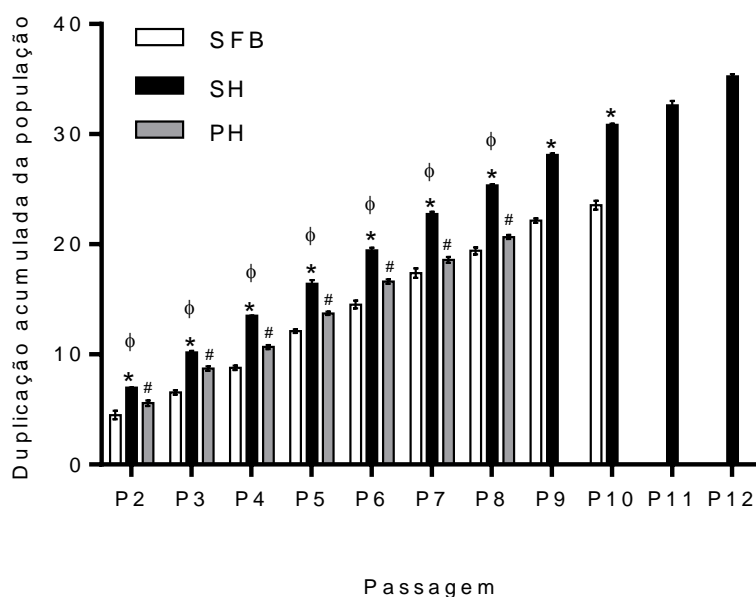


Figura 6. Duplicação acumulada das OFSCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, SH ou PH. Em cada passagem, foram plaqueadas 1×10^5 células. As culturas confluentes foram contadas, a taxa de duplicação da população em cada passagem foi determinada e adicionada a da passagem anterior para cálculo da taxa de duplicação acumulada da população. $n=3$. * meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$); ϕ meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com PH ($p < 0,05$); # meio suplementado com PH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$).

O tempo de duplicação médio das OFSCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH foi estimado em 32 horas, das células cultivadas em meio suplementado com PH foi 70 horas, já em meio contendo SFB o tempo de duplicação médio foi estimado em 89 horas.

5.2.2. Curva de Crescimento

As curvas de crescimento das OFSCs cultivadas nos três diferentes meios de cultura basal foram obtidas utilizando o mesmo número inicial de células que foram contadas aos 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo (item 4.5.2).

Observou-se, nos tempos de 5, 7, 9 e 11 dias, maior proliferação celular no meio de cultura suplementado com SH em comparação aos meios suplementados com PH ou SFB

($p < 0,05$). Quando analisados apenas esses dois últimos meios, observou-se maior proliferação celular no meio suplementado com PH nos tempos de 5, 7, 9 e 11 dias ($p < 0,05$) (Figura 7).

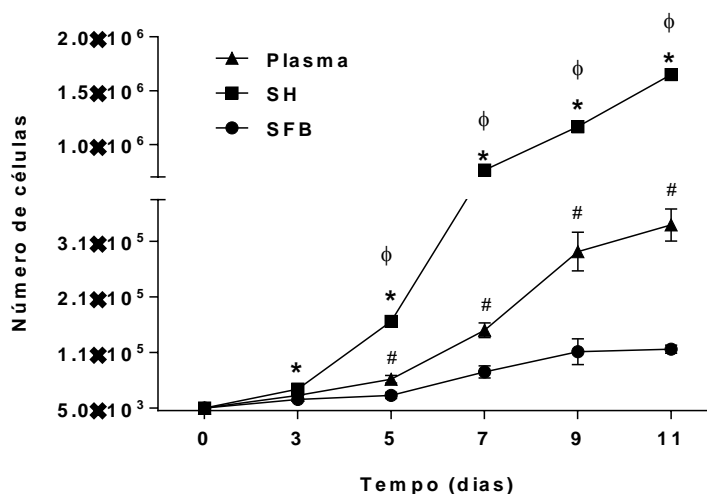


Figura 7. Curva de crescimento das OFSCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB, SH ou PH. No tempo zero, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T25. Após 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo foi feita a contagem do número de células. $n=3$. * meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$); ϕ meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com PH ($p < 0,05$); # meio suplementado com PH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$).

A cinética de proliferação das populações, demonstrada pelas curvas de crescimento, mostrou um crescimento inicial acelerado das células cultivadas em meio suplementado com SH a partir do 3º dia de cultivo. Enquanto as células cultivadas em meio contendo PH apresentaram um crescimento acelerado a partir do 5º dia de cultivo, o que não foi observado nas OFSCs cultivadas em SFB em nenhum dos tempos de cultivo pesquisados. Também foi possível observar que as células cultivadas em SFB tenderam a estagnar a proliferação a partir do 9º dia de cultivo, o que não ocorreu com as células cultivadas nos meios contendo SH ou PH, que continuaram a proliferar em todos os tempos de cultivo analisados.

Esses resultados, aliados aos resultados da taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação, indicam maior taxa proliferativa das OFSCs em meio de cultura suplementado com SH em comparação aos meios suplementados com PH ou SFB. Esses resultados demonstram também que a cinética de proliferação é maior nas células cultivadas em meio suplementado com PH em comparação ao SFB.

5.3. Viabilidade celular

5.3.1. Avaliação da capacidade de metabolização do MTT

A viabilidade das OFSCs cultivadas nos três diferentes meios de cultura basal foram mensuradas pelo ensaio de MTT em tempos de cultivo definidos conforme descrito no item 4.6.

Os cristais de formazan formados foram analisados em microscópio de luz e fotografados. Verificou-se que os cristais de formazan produzidos pelas células cultivadas em meio suplementado com PH eram maiores e apresentavam coloração mais forte quando comparados com os cristais produzidos pelas células cultivadas em SH ou SFB. Foi possível observar também maior quantidade de cristais de formazan nas culturas contendo SH como suplemento (Figura 8).



Figura 8: Visualização dos cristais de formazan produzidos no ensaio de MTT pelas OFSCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB (A), SH (B) ou PH (C). Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 14 dias de cultivo, os cristais formados, durante o ensaio de MTT, foram fotografados. Barras = 50 μm .

No tempo de 7 dias, observou-se que a metabolização do MTT foi maior no meio de cultura suplementado com SH em comparação aos meios suplementados com PH ou SFB ($p < 0,05$). Nos tempos de 14 e 21 dias, a metabolização do MTT foi maior nas OFSCs cultivadas em meio suplementado com SH ou PH em comparação com as células mantidas em meio contendo SFB ($p < 0,05$). Sendo que, no tempo de 21 dias de cultivo, a metabolização do MTT foi maior no meio de cultura suplementado com PH em comparação ao meio suplementado com SH ($p < 0,05$) (Figura 9).

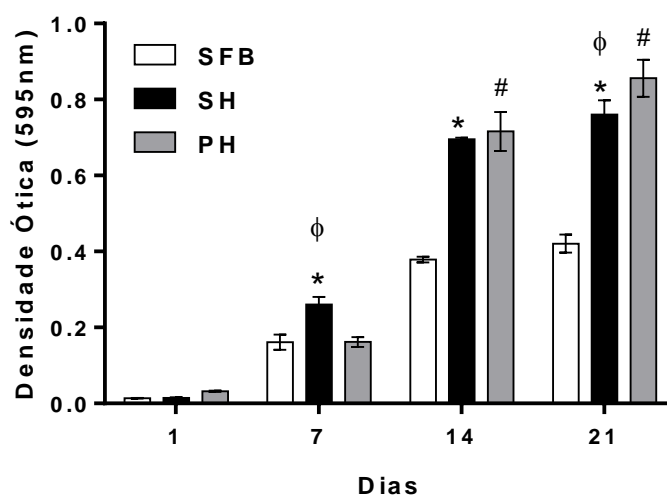


Figura 9. Representação gráfica da metabolização do MTT pelas OFSCs cultivadas em meios de cultura suplementado com SFB, SH ou PH. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de MTT, os cristais de formazan formados foram solubilizados e a densidade ótica mensurada. $n = 3$; * meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$); ϕ meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com PH ($p < 0,05$); # meio suplementado com PH *versus* meio suplementado com SFB ($p < 0,05$).

5.4. Atividade da fosfatase alcalina

Foi realizado o ensaio de BCIP/NBT com o intuito de avaliar a atividade da FA nos meios suplementados com SH, PH ou SFB. Neste ensaio, forma-se um precipitado púrpura quando a FA cliva o grupamento fosfato presente no BCIP produzindo um próton que reduz o NBT. Esse precipitado foi diluído e a densidade ótica mensurada. Em paralelo ao ensaio de BCIP/NBT, foi feita a contagem do número de células. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização.

Foi observado que a atividade da FA foi maior nas OFSCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH em comparação às células cultivadas nos meios suplementados com PH e SFB nos tempos de 7, 14 e 21 dias de cultivo ($p < 0,05$). Além disso, as células cultivadas em meio suplementado com PH apresentaram maior atividade da fosfatase alcalina em comparação com as OFSCs cultivadas no meio suplementado com SFB nos tempos de 7 e 21 dias de cultivo ($p < 0,05$) (Figura 10).

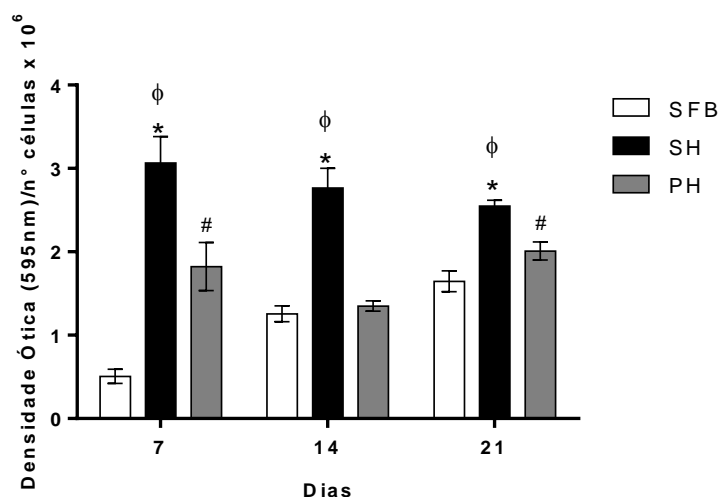


Figura 10. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs cultivadas na presença de meio suplementado com SFB, SH ou PH. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de BCIP/NBT. O precipitado púrpura formado foi solubilizado e a densidade ótica mensurada. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização. $n=3$; * meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com SFB ($p<0,05$); ϕ meio suplementado com SH *versus* meio suplementado com PH ($p<0,05$); # meio suplementado com PH *versus* meio suplementado com SFB ($p<0,05$).

5.5. Isolamento e cultivo dos fibroblastos

Amostras da pele da pálpebra foram incluídas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina a fim de permitir a análise histológica do tecido do qual foram extraídos os fibroblastos (Figura 11).

Nos cortes histológicos referentes a dois pacientes foi observada a presença de uma pequena quantidade de tecido adiposo subcutâneo que não era visível macroscopicamente (Figura 11-A). Nos cortes histológicos da pele dos outros três pacientes não foi observado tecido adiposo subcutâneo (Figura 11-B).

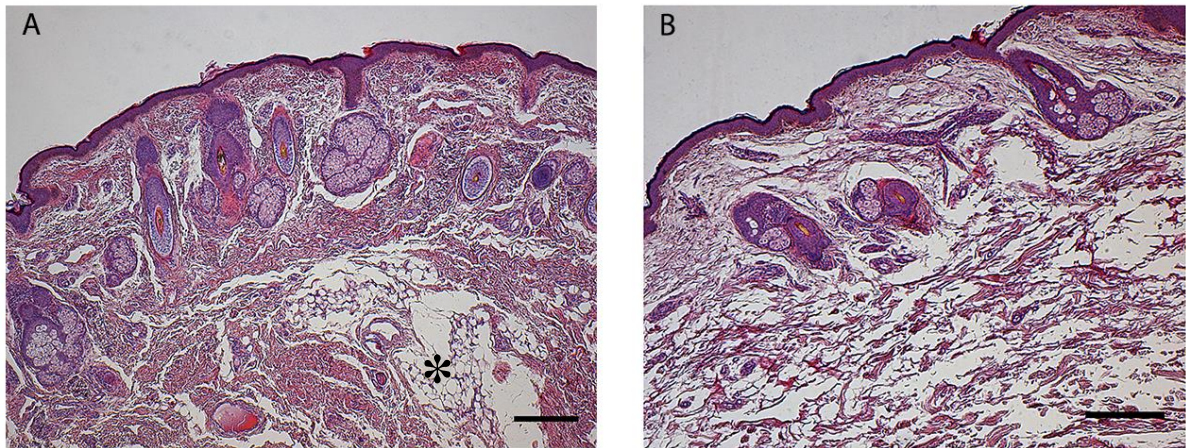


Figura 11. Cortes histológicos da pele da pálpebra corados com hematoxilina e eosina. Na fotomicrografia A, é possível observar a presença de uma pequena quantidade de tecido adiposo subcutâneo (*). Na fotomicrografia B, ausência de tecido adiposo subcutâneo. Barras = 300 μ m.

Os fibroblastos foram extraídos da pele da pálpebra conforme descrito no item 4.4. Os pedaços de tecido e a fração celular resultantes da digestão com collagenase foram colocados em cultivo em meio suplementado com SH. A escolha por este meio de cultura se baseou nos experimentos acima, que demonstraram maior cinética de proliferação celular na presença desse suplemento. Assim, o SH foi utilizado na suplementação do meio de cultura de todos os demais resultados apresentados neste trabalho.

Assim como na cultura primária das OFSCs, o processamento da pele palpebral resultou em uma população heterogênea de células, com células aderentes à superfície plástica, de morfologia fibroblástóide e células arredondadas não aderentes. Estas foram removidas, ao longo do cultivo, por meio da troca do meio de cultura e expansão celular. A partir da terceira passagem obteve-se uma população homogênea de células que compartilham com as OFSCs as seguintes características: aderência à superfície plástica, morfologia fibroblástóide, potencial de autorrenovação e formação de colônias (Figura 12).

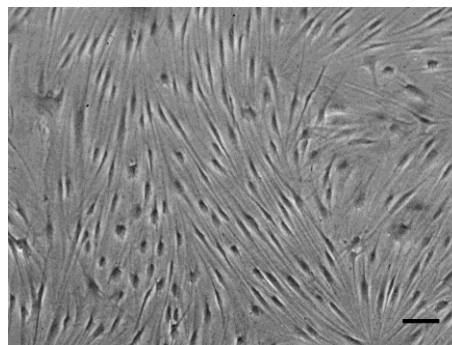


Figura 12. Aspectos morfológicos dos fibroblastos extraídos da pele da pálpebra humana, na terceira passagem. Barra = 100 μ m.

5.6. Cinética de proliferação dos fibroblastos e OFSCs

5.6.1. Taxa de duplicação acumulada e tempo de duplicação da população de fibroblastos e OFSCs

Para este ensaio, os fibroblastos e as OFSCs, do mesmo paciente, foram acompanhadas desde seu isolamento. As culturas confluentes foram contadas, a taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada e adicionada a da passagem anterior para cálculo da taxa de duplicação acumulada da população. Determinou-se também tempo de duplicação das populações (item 4.5.1).

A duplicação acumulada da população foi maior nas OFSCs em comparação aos fibroblastos apenas na passagem 3 ($p < 0,05$). Nas demais passagens, não houve diferenças em relação à taxa de duplicação acumulada entre as populações de OFSCs e fibroblastos (Figura 13).

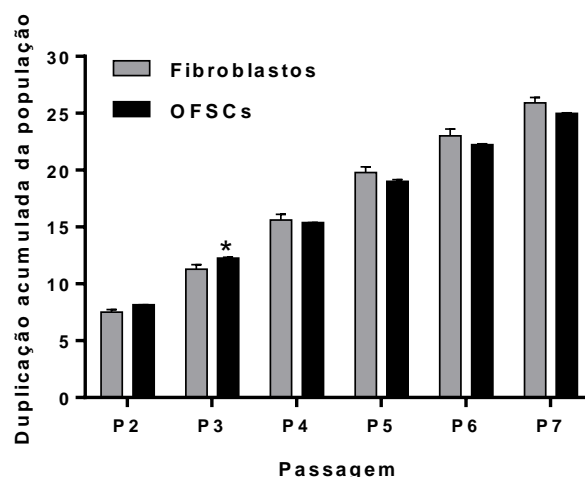


Figura 13. Duplicação acumulada das populações de OFSCs e fibroblastos. Em cada passagem, foram plaqueadas 1×10^5 células. As culturas confluentes foram contadas, a taxa de duplicação da população de cada passagem foi determinada e adicionada a da passagem anterior para cálculo da taxa de duplicação acumulada da população. $n=3$; * OFSCs *versus* fibroblastos ($p < 0,05$).

O tempo de duplicação médio dos fibroblastos foi estimado em 43 horas e das OFSCs 46 horas.

5.6.2. Curva de Crescimento dos fibroblastos e OFSCs

As curvas de crescimento dos fibroblastos e OFSCs foram obtidas por meio da contagem do número de células em tempo definidos (item 4.5.2).

A cinética de proliferação das duas populações celulares, demonstrada pelas curvas de crescimento, não mostraram diferenças entre a capacidade proliferativa das OFSCs e dos fibroblastos (Figura 14).

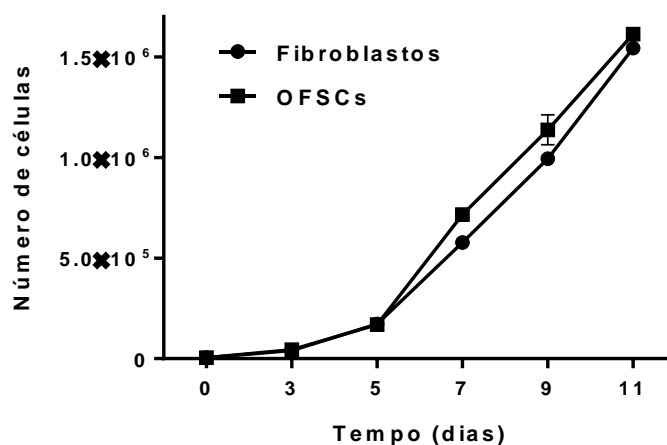


Figura 14. Curva de crescimento das OFSCs e fibroblastos. No tempo zero, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram plaqueadas em garrafas de cultura celular T25. Após 3, 5, 7, 9 e 11 dias de cultivo foi feita a contagem do número de células. $n=3$.

5.7. Atividade da fosfatase alcalina nos fibroblastos e OFSCs

Foi realizado o ensaio de BCIP/NBT com o intuito de avaliar a atividade da fosfatase alcalina nos fibroblastos e OFSCs (item 4.7).

O precipitado púrpura formado foi analisado em microscópio de luz e fotografado (Figura 15). Foi possível observar que a atividade da FA é praticamente inexistente nos fibroblastos em contraste com as OFSCs, que apresentaram elevados níveis de atividade dessa enzima ($p < 0,05$) (Figura 16).

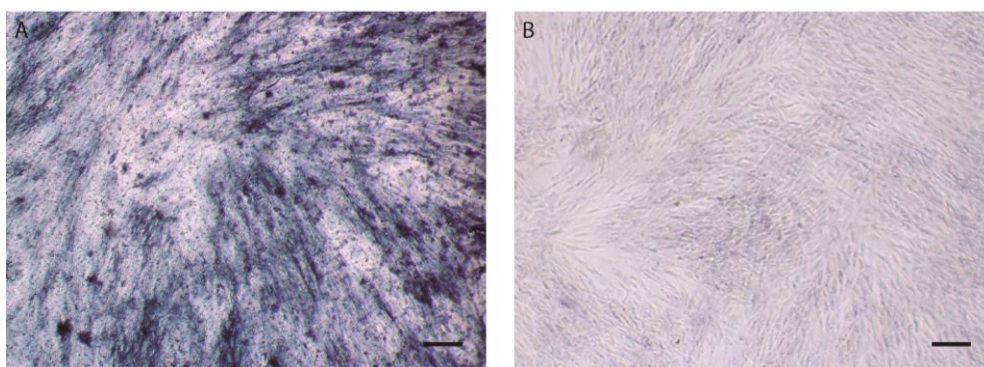


Figura 15. Fotomicrografias das OFSCs (A) e fibroblastos (B) durante o ensaio de BCIP/NBT. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços, após 7 dias de cultivo foi realizado o ensaio de BCIP/NBT. É possível observar em A, o precipitado púrpura produzido pelas OFSCs. Barras = 150 μm .

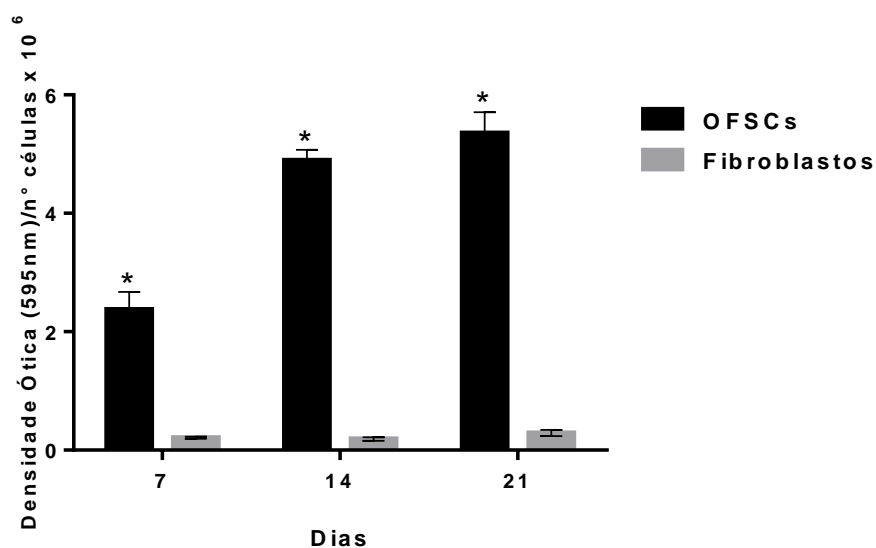


Figura 16. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs e fibroblastos. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de BCIP/NBT. O precipitado púrpura formado foi solubilizado e a densidade ótica mensurada. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização. $n = 3$; * OFSCs *versus* fibroblastos ($p < 0,05$).

5.8. Caracterização do imunofenótipo das OFSCs e fibroblastos

Na quarta passagem, foi feita a análise do imunofenótipo das populações de OFSCs e fibroblastos (item 4.8) e, a seguir, estão representados os histogramas das populações celulares. As populações de células analisadas foram determinadas a partir dos gráficos de tamanho *versus* granulidade obtido de células sem nenhum tipo de marcação (população R1 - Figura 1).

As análises dos histogramas (Figura 17) demonstraram que 100% das OFSCs expressaram os antígenos CD73, CD105, CD166 e HLA-ABC; 99,8% expressaram CD9 e; 98,5% expressaram CD90. Em relação aos fibroblastos (Figura 18), 100% deles expressaram CD73, CD90 e HLA-ABC; 99,6% expressaram CD166; 99,3% expressaram CD105 e 93% expressaram CD9. Já os marcadores de superfície CD34, CD19, CD14, CD45 e HLA-DR foram expressos em menos de 2% da população de OFSCs (Figura 17) e fibroblastos (Figura 18).

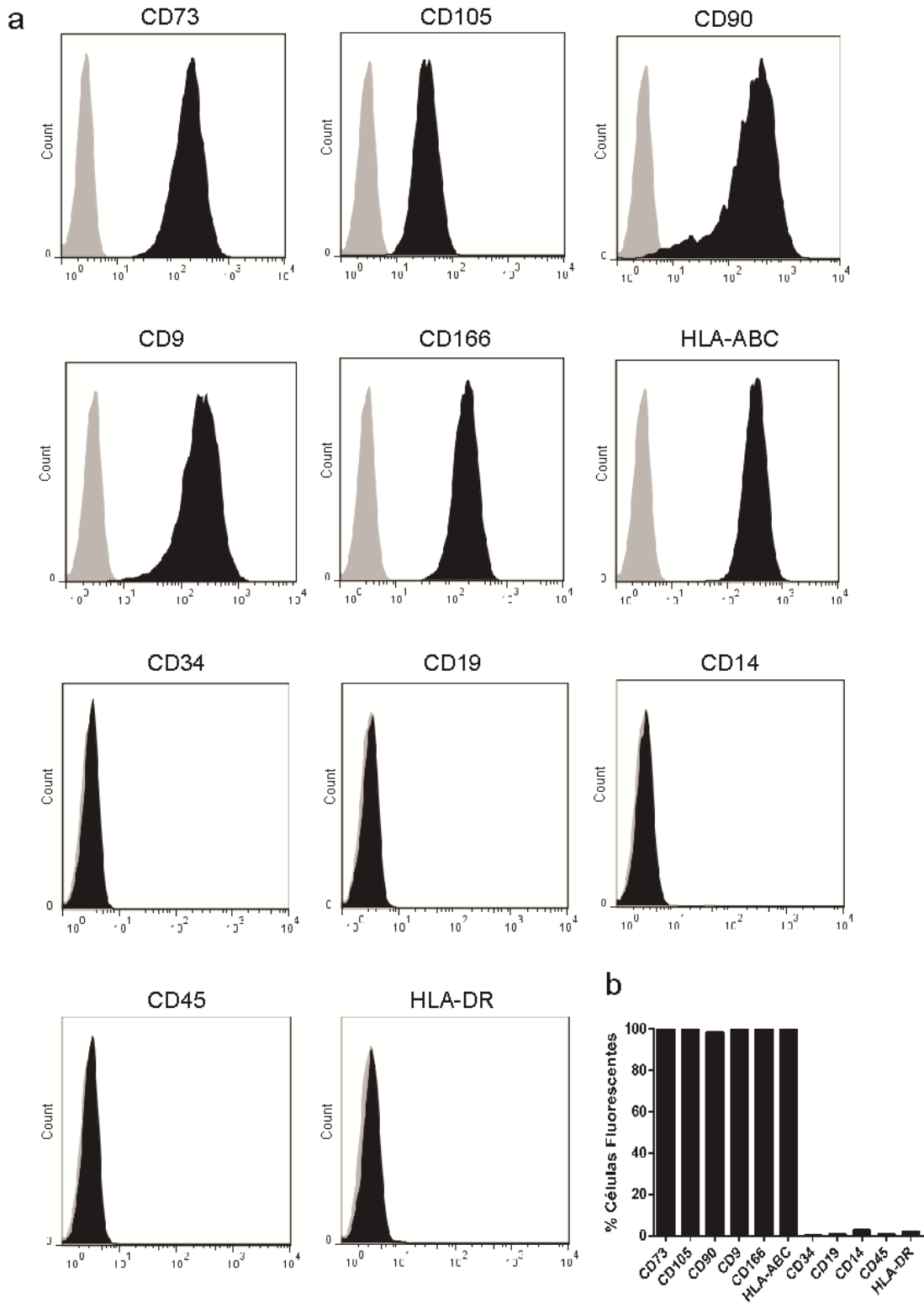


Figura 17. Análise imunofenotípica das OFSCs por meio de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva cinza é o controle negativo e a curva preta representa a população de células avaliadas para cada marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de maior marcação) (A). O gráfico de barras demonstra a quantificação do percentual de células positivas para cada marcador avaliado (B).

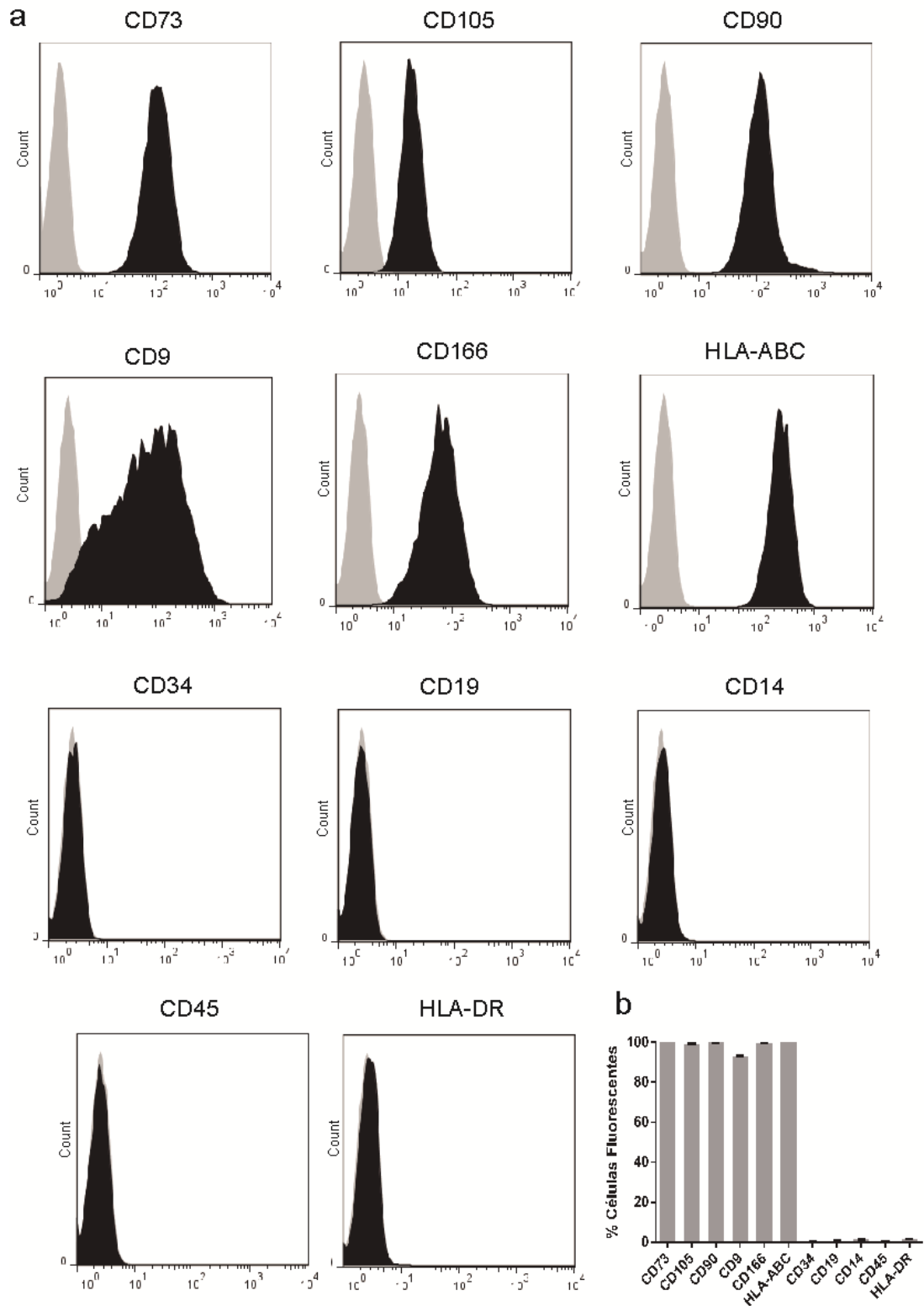


Figura 18. Análise imunofenotípica dos fibroblastos por meio de citometria de fluxo. Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva cinza é o controle negativo da fluorescência e a curva preta representa a população de células avaliadas para cada marcador específico (o deslocamento para direita indica a existência de maior marcação) (A). O gráfico de barras demonstra a quantificação do percentual de células positivas para cada marcador avaliado (B).

Na figura 19, é possível visualizar a representação gráfica do percentual de OFSCs e fibroblastos positivos para cada marcador. Houve diferença quanto à expressão de CD9 entre as duas populações analisadas, sendo que as OFSCs apresentaram maior percentual de expressão desse marcador de superfície em comparação aos fibroblastos ($p < 0,05$).

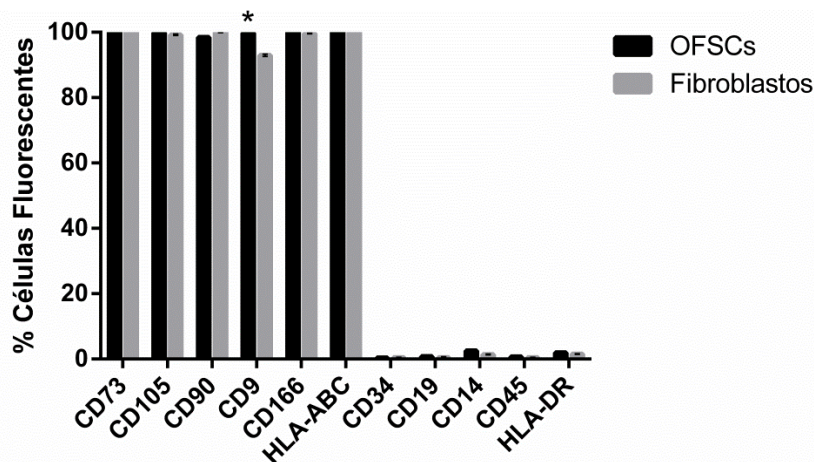


Figura 19. Representação gráfica da quantificação do percentual de células positivas para cada marcador avaliado. $n = 3$; * OFSCs *versus* fibroblastos ($p < 0,05$).

5.9. Indução da diferenciação osteogênica

As OFSCs e fibroblastos foram induzidos à diferenciação osteogênica por meio do cultivo em meio de cultura contendo fatores indutores por 21 dias (item 4.9). A fim de comprovar a diferenciação osteogênica, foram realizados os seguintes ensaios: avaliação da atividade da fosfatase alcalina (item 4.9.2), dosagem de colágeno total pela coloração de *Sirius Red* (item 4.9.1), avaliação da deposição de cálcio pela coloração com *Alizarin Red S* (item 4.9.4), detecção de mineralização pela coloração de *von Kossa* (item 4.9.3) e análise da expressão gênica de FA, osteopontina e colágeno tipo I (item 4.9.5). Os resultados de cada ensaio estão apresentados a seguir.

5.9.1. Avaliação da síntese de colágeno total

O ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* (item 4.9.1) foi realizado a fim de avaliar a síntese de colágeno pelas células após 1, 7, 14 e 21 dias de indução da diferenciação osteogênica.

Foi possível observar que houve maior produção de colágeno nas OFSCs cultivadas em meio osteogênico em comparação às OFSCs cultivadas no meio de cultura basal nos tempos de 7, 14 e 21 dias ($p < 0,05$) (Figura 20).

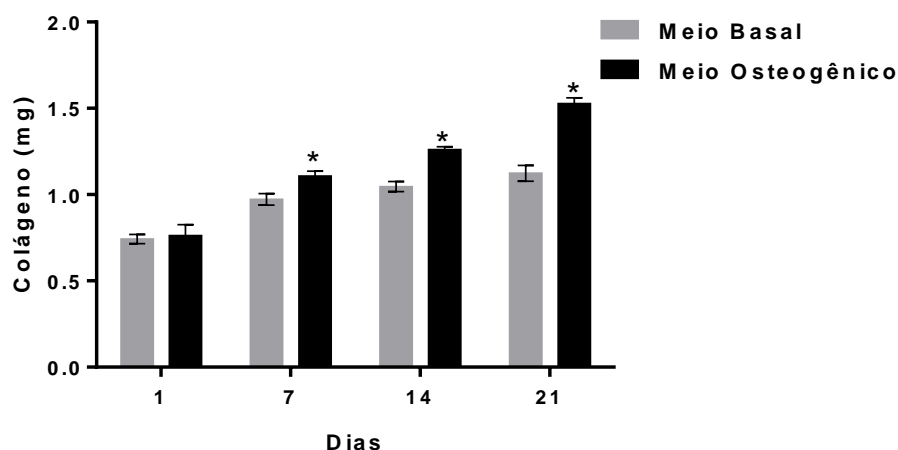


Figura 20. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelas OFSCs durante a indução da diferenciação osteogênica. As OFSCs, na quarta passagem, foram plaqueadas na concentração de 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* e a concentração de colágeno sintetizada ao final de cada tempo de cultura foi inferida. $n = 3$; * células cultivadas em meio osteogênico *versus* células cultivadas em meio basal ($p < 0,05$).

Em contraposição, não houve diferenças na síntese de colágeno total entre os fibroblastos cultivados no meio osteogênico em relação ao seu controle (Figura 21).

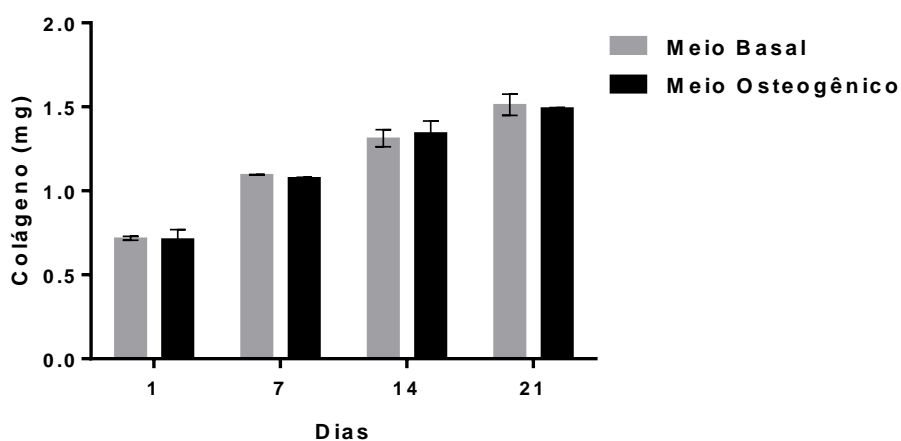


Figura 21. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelos fibroblastos durante a indução da diferenciação osteogênica. Os fibroblastos, na quarta passagem, foram plaqueadas na concentração de 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* e a concentração de colágeno sintetizada ao final de cada tempo de cultura foi inferida. $n = 3$.

5.9.2. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

A atividade da FA durante a diferenciação osteogênica foi avaliada até o 21º dia de indução, pelo ensaio de BCIP-NBT (item 4.9.2).

Foi possível observar que, no sétimo dia de indução da diferenciação, a atividade da FA foi maior nas OFSCs cultivadas no meio osteogênico em relação ao seu controle (células cultivadas no meio basal), sendo que o contrário ocorreu nos outros tempos de cultivo ($p < 0,05$) (Figura 22).

Verificou-se também que as OFSCs cultivadas no meio osteogênico apresentaram o nível mais elevado de atividade da FA no sétimo dia, sendo que o nível de atividade da enzima diminuiu nos tempos de 14 e 21 dias de indução da diferenciação osteogênica.

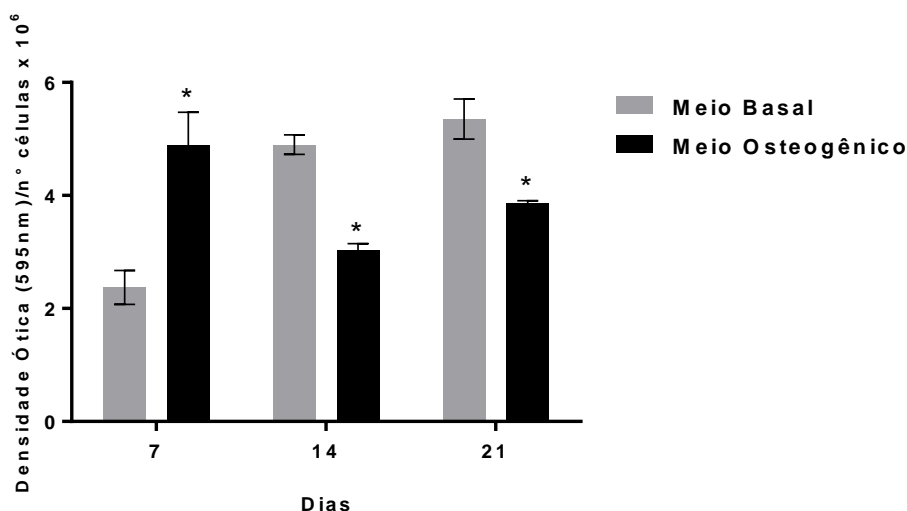


Figura 22. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de OFSCs durante a indução da diferenciação osteogênica. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de BCIP/NBT. O precipitado púrpura formado foi solubilizado e a densidade ótica mensurada. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização. $n = 3$; * células cultivadas em meio osteogênico *versus* células cultivadas em meio basal ($p < 0,05$).

Em relação aos fibroblastos, observou-se que ambos os grupos, induzidos ou não à diferenciação, apresentaram baixos níveis de atividade da FA (Figura 23). A atividade desta enzima foi maior no grupo de fibroblastos cultivados no meio osteogênico, quando comparado com seu controle, apenas no 21º dia de indução da diferenciação ($p < 0,05$).

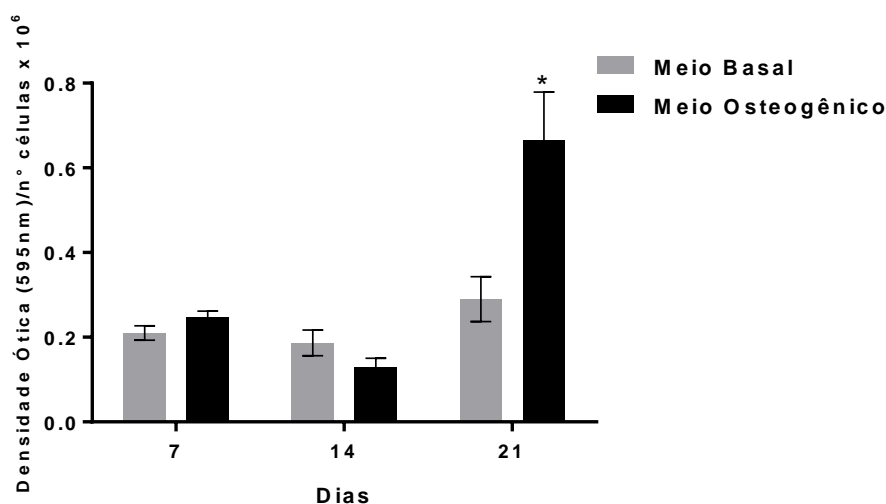


Figura 23. Representação gráfica da atividade da fosfatase alcalina nas culturas de fibroblastos durante a indução da diferenciação osteogênica. Foram semeadas 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio de BCIP/NBT. O precipitado púrpura formado foi solubilizado e a densidade ótica mensurada. O valor da densidade ótica foi dividido pelo número de células contado em cada tempo de cultivo como critério de normalização. $n = 3$; * células cultivadas em meio osteogênico *versus* células cultivadas em meio basal ($p < 0,05$).

5.9.3. Avaliação da mineralização

Para avaliar a presença de nódulos de mineralização, foi realizada a coloração pelo método de *von Kossa* (item 4.9.3) após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica.

A presença de nódulos de mineralização, representada por coloração negra ou marrom, foi observada apenas no grupo de OFSCs cultivadas em meio de cultura osteogênico (Figura 24-B). Já os fibroblastos cultivados no meio indutor osteogênico (Figura 25-B) não apresentaram mineralização da matriz extracelular assim como os grupos controles (Figuras 24-A e 25-A).

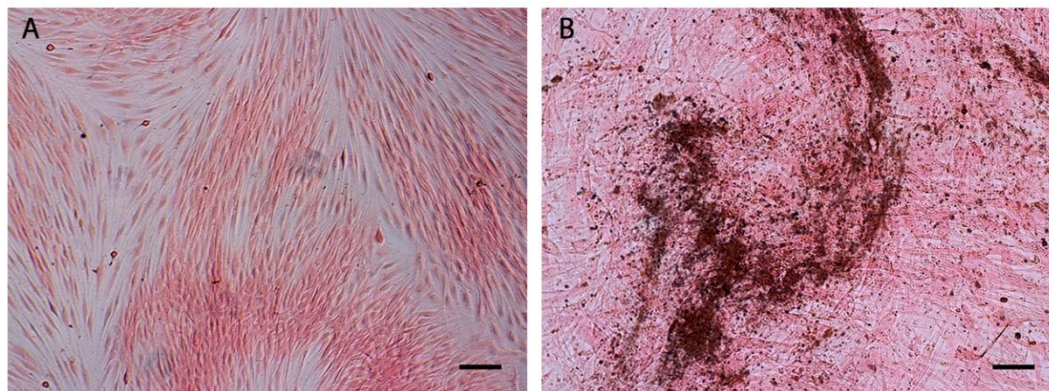


Figura 24. Fotomicrografias das OFSCs coradas pelo método de *von Kossa*. OFSCs cultivadas em meio de cultura basal (A) e em meio indutor osteogênico (B) por 21 dias. Barras = 150 µm.

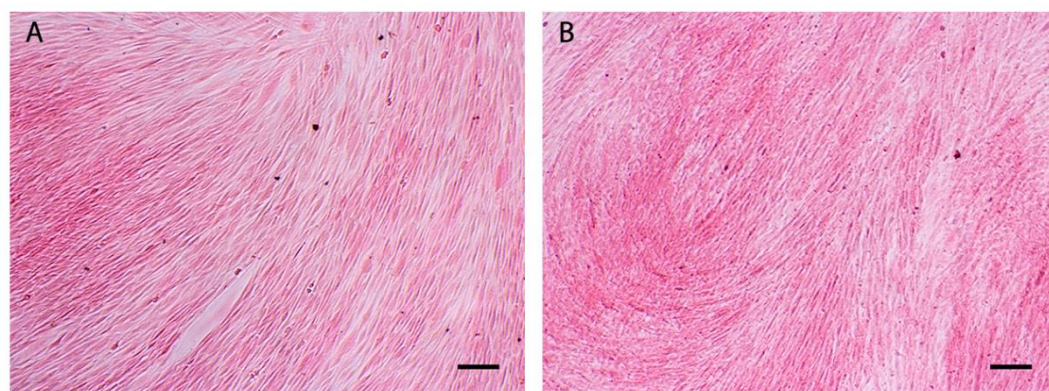


Figura 25. Fotomicrografias dos fibroblastos corados pelo método de *von Kossa*. Fibroblastos cultivados em meio de cultura basal (A) e em meio indutor osteogênico (B) por 21 dias. Barras = 150 µm.

5.9.4. Avaliação da deposição de cálcio

A avaliação da deposição de cálcio durante indução da diferenciação osteogênica foi feita por meio da coloração com *Alizarin Red S* (item 4.9.4).

Foi possível verificar que apenas as OFSCs cultivadas na presença do meio indutor osteogênico apresentaram matriz extracelular rica em cálcio, representada pela coloração vermelha, após 21 dias de indução da diferenciação (Figura 26-B). Os fibroblastos cultivados em meio osteogênico (Figura 27-B), assim como os grupos controles (Figuras 26-A e 27-A), não apresentaram matriz extracelular calcificada.

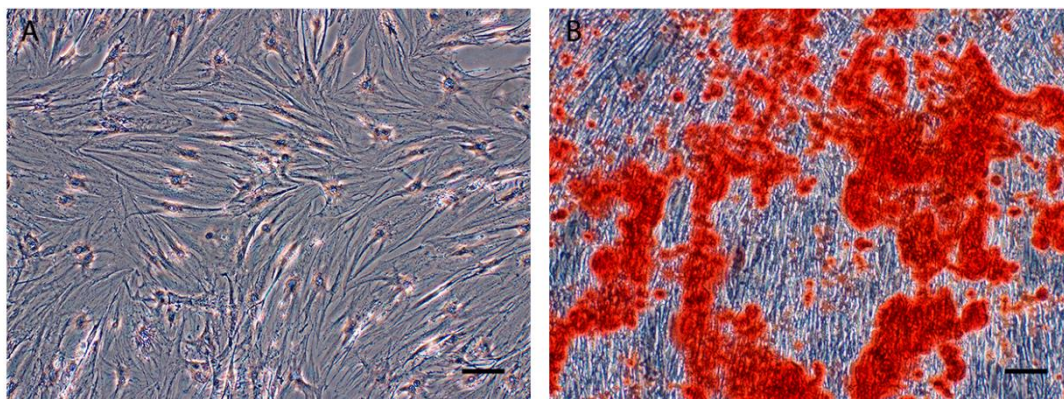


Figura 26. Fotomicrografias das OFSCs coradas com *Alizarin Red S*. OFSCs cultivados em meio de cultura basal (A) e em meio indutor osteogênico (B) por 21 dias. Barras = 150 µm.

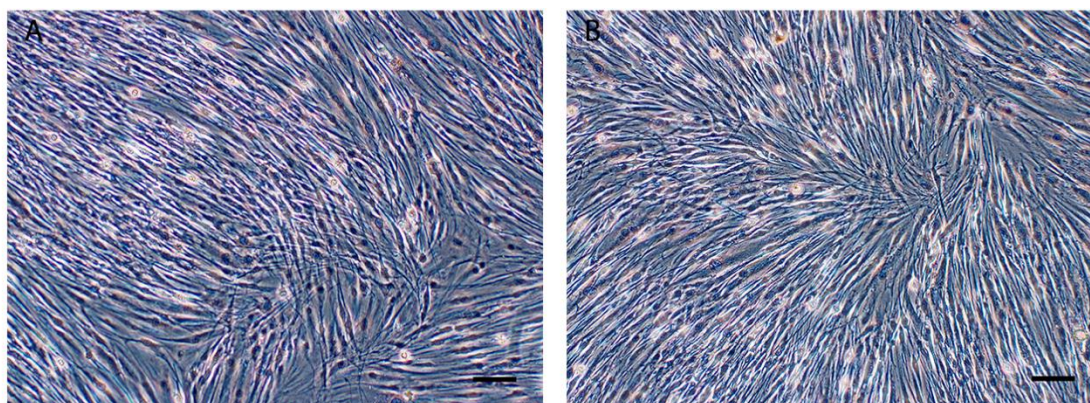


Figura 27. Fotomicrografias dos fibroblastos corados com *Alizarin Red S*. Fibroblastos cultivados em meio de cultura basal (A) e em meio indutor osteogênico (B) por 21 dias. Barras = 150 µm.

5.9.5. Análise da expressão gênica de FA, osteopontina e colágeno tipo I

Após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica, foi realizada a PCR a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes FA, osteopontina e colágeno tipo I. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH (item 4.9.5).

Bandas referentes à amplificação do segmento gênico de FA foram detectadas nas OFSCs cultivadas no meio de cultura basal e no meio indutor osteogênico, sendo que houve um aumento qualitativo na expressão de FA nas OFSCs cultivadas no meio osteogênico. Em contrapartida, não foram observadas bandas referentes à amplificação do segmento gênico de FA nos fibroblastos cultivados no meio basal. Foi possível visualizar uma leve banda referente à amplificação do segmento gênico de FA nos fibroblastos cultivados no meio osteogênico (Figura 28).

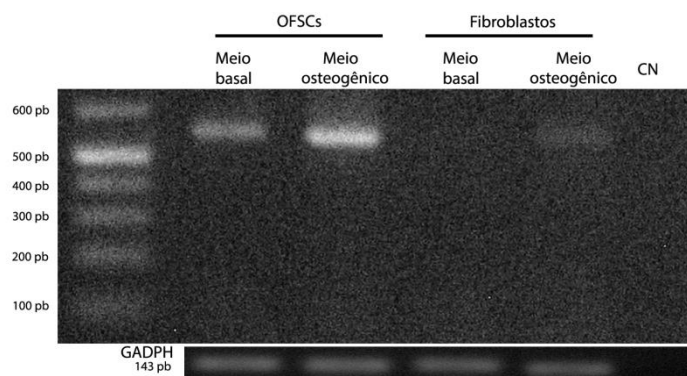


Figura 28. Detecção da expressão de fosfatase alcalina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

Foram detectadas bandas referentes à amplificação do segmento gênico da osteopontina apenas nas OFSCs cultivadas no meio osteogênico e nos fibroblastos cultivados no meio basal. Já as OFSCs cultivadas no meio de cultura basal e os fibroblastos cultivados no meio osteogênico não apresentaram bandas referentes à amplificação do segmento gênico da osteopontina (Figura 29).

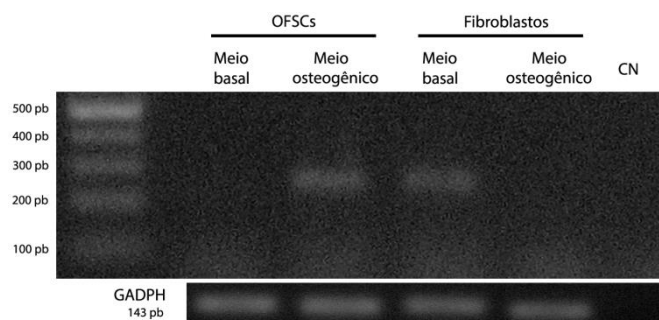


Figura 29. Detecção da expressão de osteopontina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

Em contraste, as OFSCs e fibroblastos cultivados nos dois meios de cultura (basal e osteogênico) apresentaram expressão gênica de colágeno tipo I (Figura 30).

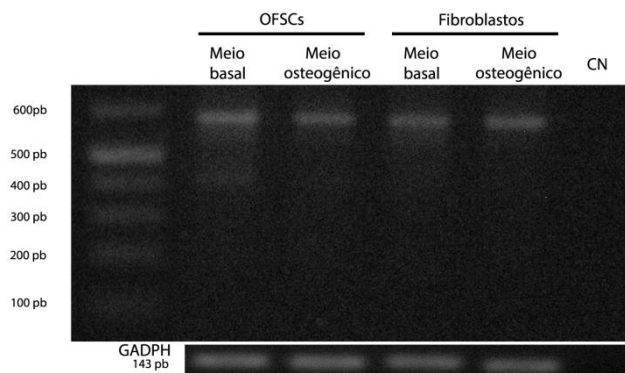


Figura 30. Detecção da expressão de colágeno tipo I, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio osteogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

5.10. Indução da diferenciação adipogênica

As OFSCs e fibroblastos foram induzidos à diferenciação adipogênica por meio do cultivo em meio de cultura contendo fatores indutores por 21 dias (item 4.10). A fim de comprovar a diferenciação adipogênica, foram realizados os seguintes ensaios: detecção do acúmulo intracelular de lipídeos e análise da expressão gênica de PPAR γ 2, GLUT 4 e leptina. Os resultados de cada ensaio estão apresentados a seguir.

5.10.1. Detecção do acúmulo intracelular de lipídeos

A fim de confirmar a diferenciação adipogênica por meio da coloração de lipídeos presentes no interior das células foi realizada a coloração com *Oil Red O* após 21 dias de indução da diferenciação (item 4.10.1).

Foi possível observar a presença de lipídeos intracelulares apenas nas OFSCs cultivadas no meio adipogênico (Figuras 31-B e 31-D). Em contraposição, os fibroblastos cultivados em meio adipogênico (Figura 32-B e 32-D), assim como os grupos controles (Figuras 31-A, 31-C, 32-A e 32-C), não apresentaram acúmulo intracelular de lipídeos.

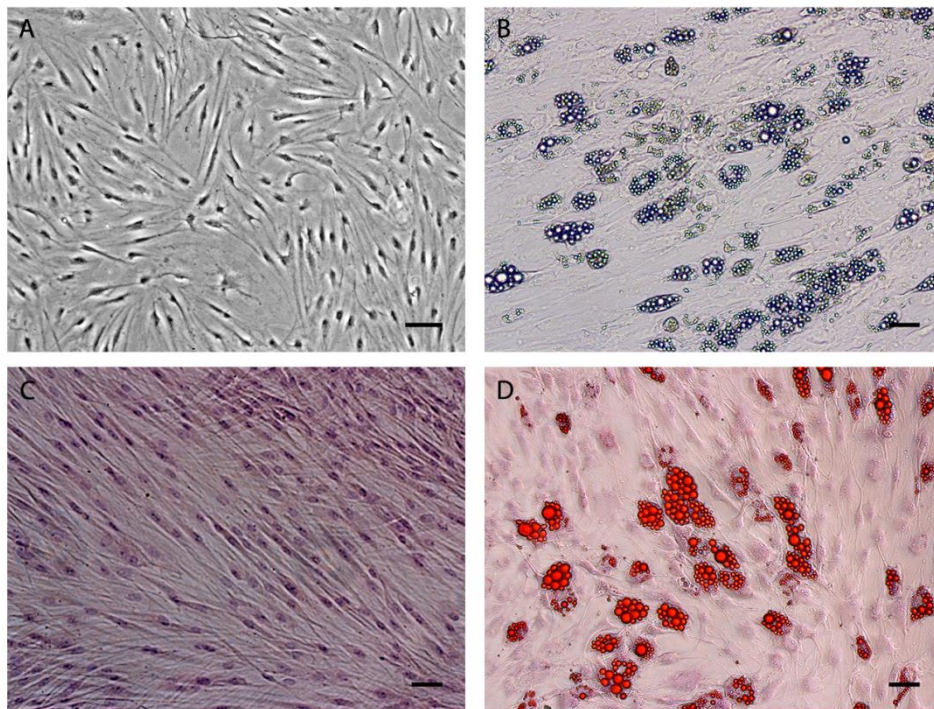


Figura 31. Indução da diferenciação adipogênica das OFSCs. Fotomicrografias das OFSCs do grupo controle, cultivadas em meio de cultura basal por 21 dias, antes (A) e após (C) a coloração com *Oil Red O*. Fotomicrografias das OFSCs cultivadas em meio indutor adipogênico, por 21 dias, antes (B) e após (D) a coloração com *Oil Red O*. Barras = 50 μm .

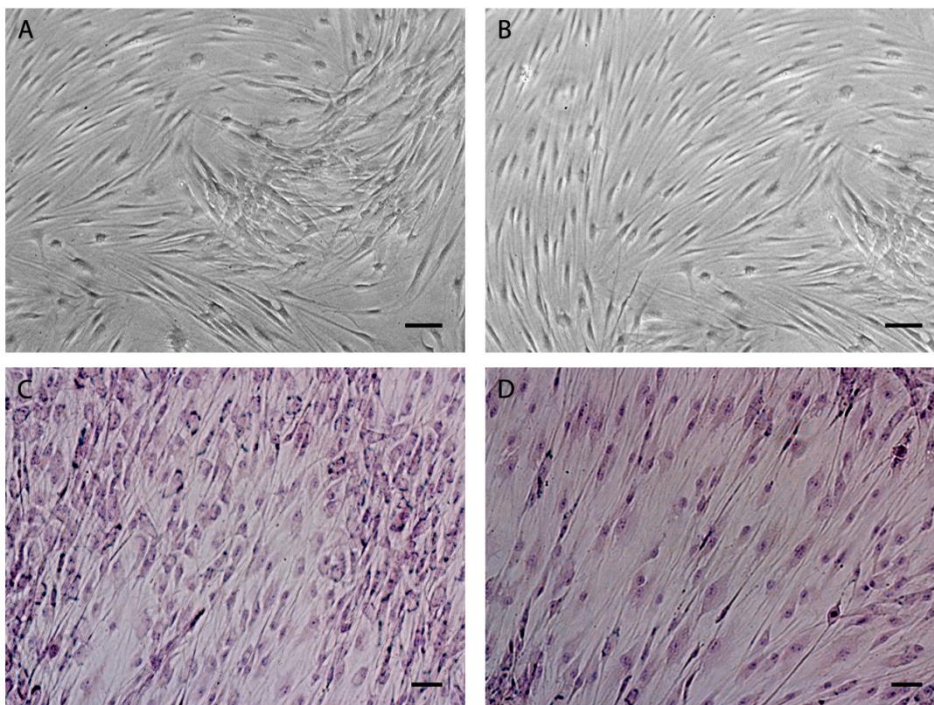


Figura 32. Indução da diferenciação adipogênica dos fibroblastos. Fotomicrografias dos fibroblastos do grupo controle, cultivadas em meio de cultura basal, por 21 dias, antes (A) e após (C) a coloração com *Oil Red O*. Fotomicrografias dos fibroblastos cultivados em meio indutor adipogênico, por 21 dias, antes (B) e após (D) a coloração com *Oil Red O*. Barras = 50 μm .

5.10.2. Análise da expressão gênica de leptina, GLUT 4 e PPARG2

Após 21 dias de indução da diferenciação adipogênica, foi realizada a PCR a fim de comprovar a diferenciação por meio da amplificação específica de fragmentos dos genes leptina, GLUT 4 e PPARG2. Como controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH (item 4.10.2).

Houve expressão gênica de PPARG2 (Figura 33) e GLUT 4 (Figura 34) apenas nas OFSCs cultivadas no meio indutor adipogênico. Em contraste, não foram detectadas bandas referentes à amplificação dos segmentos gênicos de PPARG2 e GLUT 4 nas OFSCs cultivadas no meio basal, assim como nos fibroblastos cultivados no meio basal e no meio adipogênico.

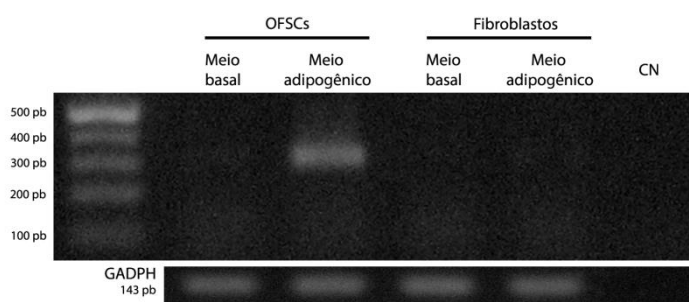


Figura 33. Detecção da expressão de PPARG2, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

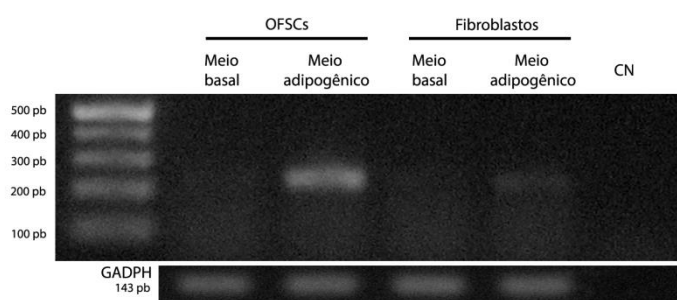


Figura 34. Detecção da expressão de GLUT 4, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

Observou-se que houve expressão gênica de leptina apenas nas OFSCs cultivadas no meio adipogênico já que não foi detectada banda referente à amplificação do segmento gênico de leptina nas OFSCs cultivadas no meio basal. Em contraposição, houve expressão gênica de leptina nos fibroblastos cultivados tanto no meio basal quanto no meio indutor adipogênico (Figura 35).

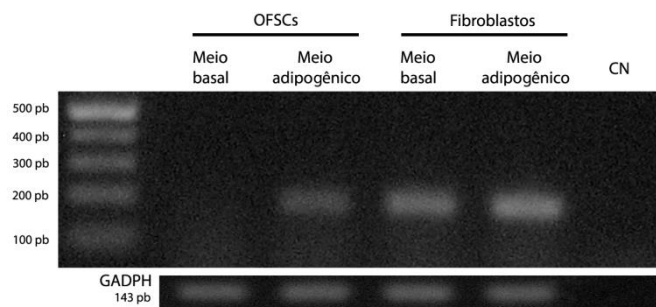


Figura 35. Detecção da expressão de leptina, por PCR, nas OFSCs e fibroblastos cultivados em meio de cultura basal e em meio adipogênico por 21 dias. CN: Controle negativo da reação. GAPDH é controle interno da reação.

5.11. Indução da diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica, as OFSCs e fibroblastos, na 4^a passagem, foram cultivados em um sistema de *pellet* de células, por 21 dias, na presença do meio indutor (item 4.11). Após esse período, observou-se que os *pellets* dos fibroblastos apresentaram tamanho menor em relação aos pellets das OFSCs (Figura 36). Os ensaios para comprovar a diferenciação condrogênica foram realizados ao término do período de indução e estão descritos a seguir.

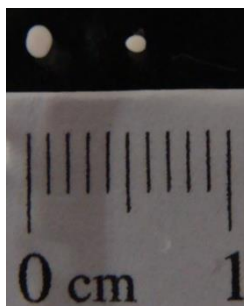


Figura 36. *Pellets* formados pelas OFSCs (à esquerda) e fibroblastos (à direita) após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica.

5.11.1 Avaliação da deposição de proteoglicanos

Após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica, os *pellets* foram incluídos em parafina e os cortes histológicos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina e também com *Alcian Blue*, a fim de visualizar a deposição de proteoglicanos.

Verificou-se que tanto os pellets formados pelas OFSCs (Figura 37) quanto os *pellets* formados pelos fibroblastos (Figura 38) apresentaram marcação positiva para a coloração de *Alcian Blue*, evidenciando a deposição de proteoglicanos na matriz extracelular.

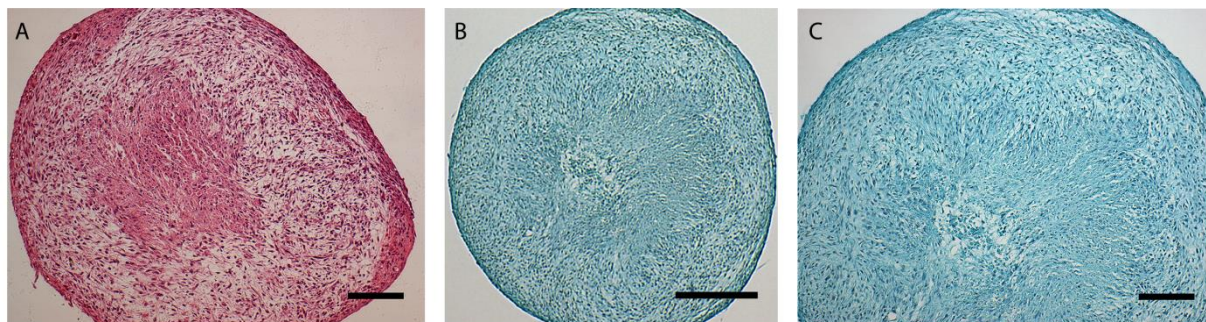


Figura 37. *Pellets* formados pelas OFSCs após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica. Coloração hematoxilina e eosina (A) e *Alcian Blue* (B e C). Barras = 150 μ m (A e C). Barra = 300 μ m (B).

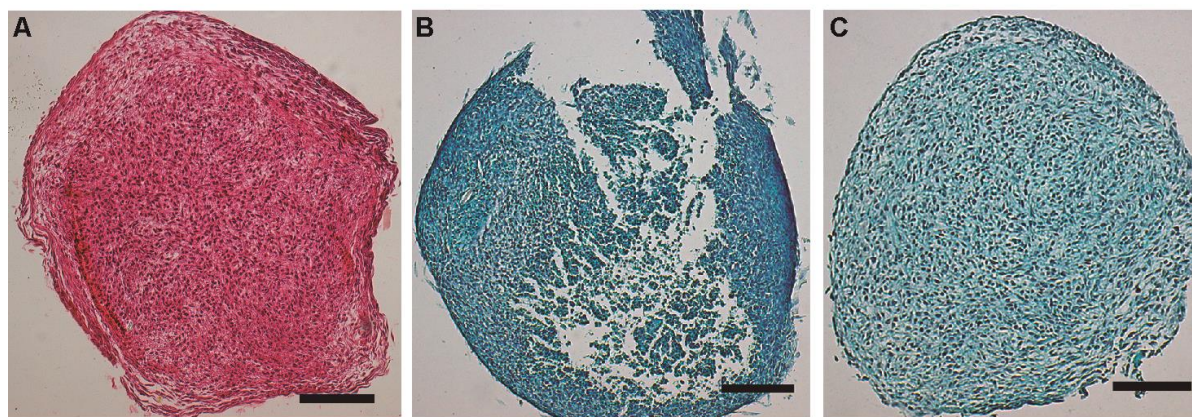


Figura 38. *Pellets* formados pelos fibroblastos após 21 dias de indução da diferenciação condrogênica. Coloração com hematoxilina e eosina (A) *Alcian Blue* (B e C). Barras = 150 μ m.

5.11.2. Avaliação da síntese de colágeno total

O ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* foi realizado a fim de avaliar a síntese de colágeno total pelas OFSCs e fibroblastos durante a indução da diferenciação condrogênica (item).

Foi observado aumento da síntese de colágeno total nas OFSCs induzidas à diferenciação condrogênica em comparação ao seu grupo controle nos tempos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$) (Figura 39).

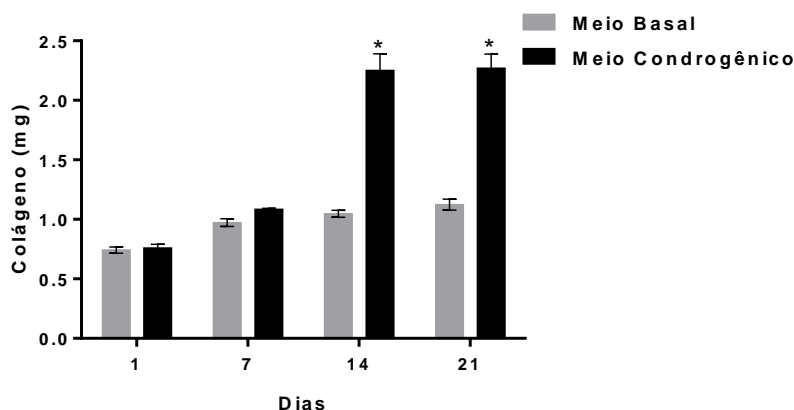


Figura 39. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelas OFSCs durante a indução da diferenciação condrogênica. As OFSCs, na quarta passagem, foram plaqueadas na concentração de 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* e a concentração de colágeno sintetizada ao final de cada tempo de cultura foi inferida. $n=3$; * células cultivadas em meio condrogênico *versus* células cultivadas em meio basal ($p < 0,05$).

Também foi observado aumento na síntese de colágeno total nos fibroblastos cultivados em meio indutor condrogênico em comparação ao seu controle nos tempos de 14 e 21 dias de indução da diferenciação ($p < 0,05$) (Figura 40).

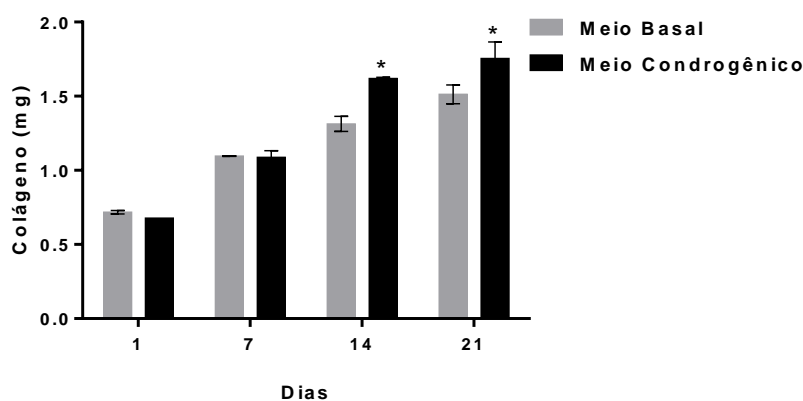


Figura 40. Representação gráfica da quantidade de colágeno sintetizada pelos fibroblastos durante a indução da diferenciação condrogênica. Os fibroblastos, na quarta passagem, foram plaqueadas na concentração de 5×10^2 células/poço em placas de 24 poços. Após 1, 7, 14 e 21 dias de cultivo foi realizado o ensaio colorimétrico baseado no *Sirius Red* e a concentração de colágeno sintetizada ao final de cada tempo de cultura foi inferida. $n=3$; * células cultivadas em meio condrogênico *versus* células cultivadas em meio basal ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

As bolsas de gordura da pálpebra representam uma fonte potencial de células-tronco para utilização na medicina regenerativa, com amplas possibilidades de uso terapêutico podendo ser aplicadas clinicamente a uma série de doenças oculares (Korn et al., 2009).

As OFSCs apresentam algumas vantagens para emprego no campo da medicina regenerativa, tendo em vista a facilidade de obtenção das bolsas de gordura da pálpebra. Estas são, geralmente, removidas e descartadas durante a blefaroplastia, que é um procedimento cirúrgico pouco invasivo, rápido e que requer o uso de anestesia local. Atualmente, é crescente o número de pessoas que recorrem a esse tipo de cirurgia plástica a fim de reverter os sinais de envelhecimento das estruturas palpebrais (Ishizuka, 2012). Além dessa facilidade de obtenção, as OFSCs podem ser uma fonte autóloga de células para uso na medicina regenerativa.

Após o processamento enzimático das bolsas de gordura palpebral obteve-se uma população de células aderentes à superfície plástica, de morfologia fibroblastóide, com potencial de autorrenovação e formação de colônias, corroborando com os dados de Korn et al. (2009) e Ho et al. (2011).

Foi proposta a utilização de meio de cultura contendo suplementos humanos em substituição ao soro fetal bovino (SFB) tendo em vista que a ausência de elementos xenobióticos em culturas celulares é preconizada pelos protocolos de Boas Práticas de Manipulação como uma das formas seguras para utilização terapêutica das células-tronco (Lindroos et al., 2011). Dessa forma, diversos estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de substituir o SFB por suplementos livres de componentes animais (Lin et al., 2005; Pérez-Illarbe et al., 2009; Cho et al., 2011; Paula et al., 2013; Gottipamula et al., 2013).

Todos os trabalhos existentes na literatura, até o momento, envolvendo as OFSCs utilizaram meio DMEM suplementado com 10% SFB ou meio MesenPro, que contém 2% de SFB (Korn et al., 2009; Ho et al., 2011; Chien et al., 2012; Lee et al., 2013; Ong et al., 2013). Gregory et al. (2006), demonstraram que ocorre acúmulo intracelular de antígenos bovinos pelas células-tronco mesenquimais (MSCs) mesmo quando estas são cultivadas em meio contendo baixas concentrações de SFB como 2%. A internalização ou aderência de proteínas xenogênicas à superfície celular pode provocar reações imunológicas severas quando transplantadas (Selvaggi et al., 1997). Além disso, o SFB pode conter endotoxinas e ser uma fonte de vírus, bactérias e príons (Mannello & Tonti, 2007).

No presente estudo, avaliou-se a capacidade de expansão das OFSCs em meio de cultura suplementado com *pool* de soro alogênico humano (SH) ou plasma alogênico humano (PH) em comparação ao meio contendo SFB. O plasma e o soro humano são boas alternativas para substituir o SFB devido à disponibilidade desses suplementos e à possibilidade de realização de testes para patógenos humanos antes da utilização no cultivo e transplante celular (Aldahmash et al., 2011). O emprego desses suplementos também justificam-se, uma vez que a expressão dos antígenos do sistema ABO e outros antígenos de superfície baseados em proteínas e carboidratos não são detectáveis em MSCs, permitindo a substituição do SFB por soro de qualquer grupo sanguíneo (Schäfer et al., 2011).

Foi observado que as OFSCs mantiveram o formato fibroblastóide, a capacidade de formar colônias e a aderência à superfície plástica na presença dos três meios de cultura analisados (SH, PH ou SFB). Entretanto, na presença dos meios de cultura contendo suplementos humanos, as células apresentaram um tamanho menor quando comparadas às células cultivadas em SFB. Outros trabalhos também demonstraram tamanho menor das células-tronco derivadas do tecido adiposo obtidas a partir do lipoaspirado (hASCs) cultivadas em meio suplementado com *pool* de soro alogênico humano, soro humano AB ou plasma rico em plaquetas – trombina ativadas quando comparadas com as hASCs mantidas em meio suplementado com SFB (Kocaoemer et al., 2007; Paula et al., 2013). Da mesma forma, Isaac et al. (2011), demonstraram que fibroblastos cultivados em meio contendo soro humano apresentavam tamanho menor quando comparados com fibroblastos cultivados em meio suplementado com SFB.

As culturas de OFSCs em meio de cultura suplementado com SH ou PH apresentaram-se mais densas que as culturas em meio contendo SFB em todas as passagens. Quando comparados apenas os meios contendo suplementos humanos, observou-se maior densidade celular na presença do meio suplementado com SH. O tempo de duplicação médio das células cultivadas em meio com SH, PH ou SFB foi estimado em 32, 70 e 89 horas respectivamente. Paula et al. (2013), também observaram maior densidade celular e menor tempo de duplicação das hASCs cultivadas em meio suplementado com *pool* de soro alogênico humano em comparação às células cultivadas em meio contendo SFB.

A expansão acumulada das OFSCs cultivadas em meio suplementado com SH foi maior do que em meio suplementado com PH, que por sua vez, foi maior do que em meio contendo SFB. Da mesma forma, a cinética de proliferação das populações, demonstrada

pelas curvas de crescimento, mostraram maior proliferação celular no meio suplementado com SH quando comparado ao meio contendo PH, que por sua vez, levou a maior proliferação celular do que o meio suplementado com SFB. Verificou-se então, no presente trabalho, uma cinética acelerada de proliferação das OFSCs, obtidas a partir de um pequeno volume de tecido adiposo, nos meios de cultura contendo suplementos humanos, principalmente o SH. Essa taxa de proliferação acelerada implica em tempo de cultura mais curto necessário para obter quantidade de células requerida para transplante, o que torna essas condições de cultivo de MSCs humanas ainda mais apropriadas para utilização clínica.

Os achados descritos acima são semelhantes aos de outros estudos, que demonstraram maior taxa de proliferação das hASCs e das MSCs derivadas da medula óssea, vilosidades coriônicas ou polpa dental em meios contendo suplementos humanos em comparação aos meios contendo SFB (Kocaoemer et al., 2007; Goedecke et al., 2011; Poloni et al., 2012 e Pisciotta et al., 2012). Entretanto, estudo de Lindroos et al. (2010), demonstrou que as hASCs apresentavam níveis compatíveis de proliferação em meios suplementados com 15% de soro humano ou 10% de SFB. Em outros estudos, não foram observadas diferenças na taxa proliferativa de MSCs imortalizadas ou derivadas da medula óssea e fibroblastos em meio suplementado com soro alogênico humano em comparação ao meio contendo SFB (Bieback et al., 2009; Pérez-Illarbe et al., 2009; Aldahmash et al., 2011; Isaac et al., 2011). Os achados do presente estudo contrariam também o trabalho de Lin et al. (2005), no qual não foram observadas diferenças na taxa de proliferação das MSCs derivadas da medula óssea quando cultivadas na presença de meio suplementado com plasma humano, soro humano ou SFB.

As OFSCs cultivadas em meio de cultura basal, contendo os três tipos de suplementos, foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan indicando a viabilidade dessas células nos três meios avaliados. Obteve-se maior quantidade de cristais de formazan e maior densidade ótica nas culturas contendo SH como suplemento em comparação ao SFB. Esse resultado provavelmente se deve ao maior número de células presentes nas culturas com SH, corroborando com a maior proliferação observada para as OFSCs neste meio em relação ao meio contendo SFB, uma vez que, o número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzidos.

Entretanto, verificou-se que, embora as culturas contendo PH apresentassem menor quantidade de células em comparação com as culturas contendo SH, não houve diferenças na densidade ótica entre essas culturas no tempo de 14 dias. Sendo que, no tempo de 21 dias de

cultivo, a metabolização do MTT foi maior no meio de cultura suplementado com PH em comparação ao meio suplementado com SH. Esse resultado provavelmente se deve ao fato de que os cristais de formazan produzidos pelas células cultivadas em meio suplementado com PH eram maiores e apresentavam coloração mais forte quando comparados com os cristais produzidos pelas células cultivadas em SH ou SFB. Esse achado indica maior atividade metabólica das OFSCs cultivadas em meio suplementado com PH, provavelmente devido ao cloreto de cálcio utilizado durante o processamento do plasma. No entanto, esse efeito do cálcio na ativação celular não foi avaliado.

A fosfatase alcalina é um dos marcadores de indiferenciação das células-tronco embrionárias e é descrita também para MSCs (Riekstina *et al.*, 2009). Os diferentes tipos de suplementos empregados nos meios de cultura basal parecem interferir na atividade da enzima. Os níveis da densidade ótica foram superiores nas culturas cultivadas em meio suplementado com SH ou PH comparadas com SFB. Sendo que a densidade ótica foi maior nas culturas contendo SH quando comparadas com o PH. Este resultado sugere que o SH pode ser o melhor suplemento para manter as MSCs em um estado indiferenciado. Iremos realizar marcação das células com a fosfatase alcalina para quantificar a porcentagem de células positivas ao longo de diversas passagens para comprovar este resultado.

Todos os experimentos discutidos acima demonstraram maior cinética de proliferação celular na presença do meio de cultura suplementado com SH em comparação ao meio contendo PH. Assim, foi feita a escolha pelo SH e este foi utilizado para suplementação do meio de cultura de todos os experimentos relacionados à caracterização fenotípica e funcional das OFSCs. Concomitante com o estudo de caracterização das OFSCs em meio suplementado com SH foi feito estudo comparativo destas células com os fibroblastos obtidos da pele da pálpebra.

As pálpebras são uma excelente fonte de MSCs e fibroblastos dérmicos para estudo comparativo, tendo em vista a separação anatômica existente entre os compartimentos de gordura e a pele palpebral. Essa separação elimina os riscos de contaminações das OFSCs com fibroblastos dérmicos e vice e versa.

Além disso, como a pele e as bolsas de gordura são, geralmente, removidas e desprezadas durante a blefaroplastia, torna-se possível o estudo comparativo de fibroblastos e MSCs do mesmo paciente. Isso evita a introdução de variações individuais para a comparação de diferentes tipos celulares, eliminando variações nos padrões de expressão gênica e funções

celulares que não podem ser diretamente associadas a identidades celulares distintas (Jaeger et al., 2012).

Os fibroblastos foram isolados da pele da pálpebra cujas análises histológicas revelaram a presença de pequenas quantidades de tecido adiposo subcutâneo em duas, das cinco amostras analisadas. Conforme indicado por alguns autores, a pele palpebral possui escassez ou ausência de tecido adiposo subcutâneo (Moura et al., 1997; Sullivan et al., 2011; Dantas, 2011). Assim, o isolamento de fibroblastos da pele da pálpebra pode se dar de forma mais segura, com menores riscos de contaminação com MSCs derivadas do tecido adiposo subcutâneo.

O processamento da pele da pálpebra resultou em uma população homogênea de células semelhantes às OFSCs nos seguintes aspectos: aderência à superfície plástica, morfologia fibroblastóide, potencial de autorrenovação e formação de colônias. Após o isolamento dos fibroblastos a capacidade de expansão destes foi comparada com a capacidade proliferativa das OFSCs. A taxa de duplicação acumulada das duas populações celulares foi semelhante, sendo o tempo de duplicação médio dos fibroblastos estimado em 43 horas e das OFSCs em 46 horas. Além disso, a curva de crescimento apresentou perfil semelhante.

Corroborando com os achados descritos acima, vários estudos demonstram que as MSCs compartilham semelhanças *in vitro* com os fibroblastos no que diz respeito ao tamanho celular, morfologia e capacidade proliferativa (Sabatini et al., 2005; Haniffa et al., 2007; Alt et al., 2011; Blasi et al., 2011). No entanto, Lysy et al. (2007), demonstraram que fibroblastos dérmicos, embora compartilhassem a mesma morfologia com as MSCs, apresentaram capacidade proliferativa maior com taxa de crescimento superior.

Após o estudo da cinética de proliferação dos fibroblastos e OFSCs, foi feita a avaliação da atividade da fosfatase alcalina (FA) e observou-se que a atividade dessa enzima é praticamente inexistente nos fibroblastos em contraste com as OFSCs, que apresentaram elevados níveis de atividade da enzima. Foi analisada também a expressão gênica da FA nos dois tipos celulares e verificou-se que, enquanto as OFSCs expressaram o gene da FA, não houve expressão deste gene nos fibroblastos. A FA é uma enzima presente em células indiferenciadas e por isso, é utilizada como um marcador de células-tronco. A baixa expressão gênica e atividade dessa enzima nos fibroblastos justificam-se uma vez que estes são considerados células terminalmente diferenciadas (Bae et al., 2009; Cappellesso-Fleury et al., 2010; Pereira et al., 2011). Huang et al. (2010), ao comparar uma linhagem de fibroblastos

imortalizados com MSCs da medula óssea demonstraram que não houve expressão dessa enzima nos fibroblastos imortalizados. Cappellesso-Fleury et al. (2010) demonstraram que a dosagem de FA foi praticamente nula em culturas de fibroblastos do prepúcio humano.

Foi estabelecida então uma caracterização fenotípica das OFSCs e fibroblastos com o intuito de identificar as populações celulares por meio da combinação da expressão de marcadores de superfície. Verificou-se que as OFSCs constituíram, *in vitro*, uma população homogênea já que 100% das células expressaram os antígenos CD73, CD105, CD166 e HLA-ABC; 99,8% expressaram CD9; 98,5% expressaram CD90 e menos de 2% expressaram os marcadores CD34, CD19, CD14, CD45 e HLA-DR. Fenotipicamente, as OFSCs estão de acordo com o perfil proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici et al., 2006).

A comparação do imunofenótipo das OFSCs e fibroblastos revelou diferença apenas na expressão de CD9. Os marcadores CD73, CD90 e HLA-ABC foram expressos por 100% dos fibroblastos, o CD166 foi expresso por 99,6% e o CD105 por 99,3%, enquanto 93% dos fibroblastos expressaram CD9. Já os marcadores de superfície CD34, CD19, CD14, CD45 e HLA-DR foram expressos em menos de 2% da população.

Discordando com os dados de imunofenotipagem do presente trabalho, um estudo demonstrou maior nível de expressão de CD9 em fibroblastos adquiridos comercialmente em comparação com MSCs (Halfon et al., 2011). Vários estudos mostram que fibroblastos e MSCs apresentam imunofenótipo similar (Lysy et al., 2007; Lorenz et al., 2008; Bae et al., 2009; Alt et al., 2011; Blasi et al., 2011).

Após a caracterização fenotípica, as OFSCs e fibroblastos foram caracterizados também quanto à capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica.

Em relação à diferenciação osteogênica, observou-se aumento da síntese de colágeno total nas OFSCs a partir do sétimo dia de indução da diferenciação, o que não foi observado nos fibroblastos. Embora a dosagem não tenha sido específica para o colágeno tipo I, sabe-se que este tipo de colágeno é um dos marcadores de osteoblastos mais rapidamente expressos em células comprometidas com esta linhagem, sendo sua deposição na matriz extracelular um evento relativamente inicial na via de diferenciação de osteoblastos (Aubin, 2001).

O aumento do nível de atividade da fosfatase alcalina também é considerado um marcador precoce da diferenciação osteogênica, enquanto uma posterior diminuição correlaciona-se com uma avançada mineralização da matriz e um fenótipo celular mais

maduro (Jaiswal et al., 1997). Os resultados obtidos com as OFSCs indicaram que no sétimo dia de cultivo, as células mantidas em meio osteogênico apresentaram nível mais elevado de atividade da FA, sendo que esse nível diminuiu nos tempos de 14 e 21 dias de indução da diferenciação.

Em relação aos fibroblastos, observou-se que ambos os grupos, induzidos ou não à diferenciação, apresentaram baixos níveis de atividade da FA. A atividade desta enzima foi maior no grupo de fibroblastos cultivados no meio osteogênico, quando comparado com seu controle, apenas no 21º dia de indução da diferenciação.

Foi também avaliada a presença de nódulos de mineralização durante a indução da diferenciação osteogênica. As colorações pelo *Alizarin Red S* e pelo método de *von Kossa* evidenciaram a presença de cálcio e fosfato, respectivamente, em áreas nodulares de matriz mineralizada nas OFSCs cultivadas em meio osteogênico, o que não foi observado nas culturas de fibroblastos induzidos à diferenciação.

A análise da expressão gênica de fosfatase alcalina e osteopontina comprovou que as OFSCs se comprometeram com a linhagem osteogênica, em contraste com os fibroblastos, que não se diferenciaram em osteoblastos.

Corroborando com o achado do teste de atividade da FA, não foi observada expressão gênica dessa enzima nos fibroblastos cultivados em meio basal, enquanto foi observada uma leve banda referente à amplificação do segmento gênico de FA nos fibroblastos mantidos em meio osteogênico por 21 dias. Da mesma forma, Bouffi et al. (2011), mostraram um ligeiro aumento na expressão de FA em fibroblastos dérmicos após 21 dias de indução da diferenciação osteogênica embora outros testes tenham comprovado que estes fibroblastos não se diferenciaram em osteoblastos.

As OFSCs e fibroblastos foram submetidos também à indução da diferenciação adipogênica. Foi observado acúmulo intracelular de lipídeos e expressão gênica de marcadores da linhagem adipogênica, como PPAR γ 2 e do transportador de glicose GLUT 4 apenas nas OFSCs cultivadas em meio adipogênico, o que não foi observado para os fibroblastos. Esses resultados revelaram a capacidade de diferenciação adipogênica das OFSCs e demonstraram que os fibroblastos não foram capazes de se diferenciar nessa linhagem celular.

Em relação à leptina, houve expressão gênica dessa proteína nas OFSCs cultivadas em meio adipogênico o que não foi observado nas OFSCs mantidas em meio basal. Em

contraposição, houve expressão gênica de leptina nos fibroblastos cultivados tanto no meio basal quanto no meio indutor adipogênico. Em 2001, Glasow et al. demonstraram, pela primeira vez, que fibroblastos dérmicos sintetizam e secretam leptina, a qual pode exercer importantes ações autócrinas e parácrinas.

Foi avaliada também a capacidade de diferenciação condrogênica das OFSCs e fibroblastos. Observou-se, que embora os *pellets* formados pelos fibroblastos apresentassem tamanho menor em relação aos *pellets* formados pelas OFSCs, ambos apresentaram marcação positiva para a coloração de *Alcian Blue*, evidenciando a deposição de proteoglicanos na matriz extracelular. A capacidade das células em formar um *pellet* condensado que aumenta o volume durante a indução da diferenciação é um dos indícios precoces de diferenciação condrogênica.

Foi observado também aumento da síntese de colágeno total nas OFSCs induzidas à diferenciação condrogênica em comparação ao seu grupo controle nos tempos de 14 e 21 dias de indução da diferenciação. Nos fibroblastos, também foi observado esse aumento na síntese de colágeno total durante indução da diferenciação, embora esse aumento não tenha sido tão pronunciado como nas OFSCs. Sabe-se que a matriz extracelular de tecido cartilaginoso é composta principalmente de colágeno assim, ocorre aumento na síntese de colágeno durante a indução da diferenciação condrogênica (Melrose et al., 2008; Raghunath et al., 2005).

Esses dados podem ser um indicativo de que as OFSCs e fibroblastos se comprometeram com a linhagem condrogênica, embora os fibroblastos demonstrem sinais de diferenciação menos pronunciados.

Assim como no presente estudo, Korn et al. (2009) demonstraram o potencial de diferenciação adipogênico das OFSCs e, Ho et al. (2011) demonstraram o potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico dessas células. No presente trabalho foi demonstrado que as OFSCs mantêm as suas características imunofenotípicas e a capacidade de diferenciação em meio de cultura suplementado com SH em substituição ao SFB, que foi o suplemento utilizado nos outros dois trabalhos de caracterização das OFSCs.

Os achados referentes à capacidade de diferenciação dos fibroblastos obtidos no presente trabalho são semelhantes aos de vários estudos, que demonstram que, em contraste com as MSCs, os fibroblastos não possuem o potencial de diferenciação multilinhagem (Wagner et al., 2005; Brendel et al., 2005; Suzdal'tseva et al., 2007; Bae et al., 2009; Cappellesso-Fleury et al., 2010; Pereira et al., 2010; Bouffi et al., 2011; Alt et al., 2011).

Entretanto, esses dados contrariam outros trabalhos que demonstram que, assim como as MSCs, os fibroblastos são capazes de se diferenciar em tipos celulares de origem mesodérmica (Chen et al., 2007; Lorenz et al., 2008; Blasi et al., 2011; Brohem et al. 2013). Outros trabalhos apontam ainda que, comparados às MSCs, os fibroblastos apresentam potencial de diferenciação mais restrito (Covas et al., 2008; Hong et al., 2013).

Essa grande contradição existente na literatura a respeito das diferenças entre MSCs e fibroblastos, podem estar relacionadas à diversidade de células comparadas, provenientes de doadores diferentes, com idades distintas ou mesmo obtidas comercialmente, isoladas e cultivadas em condições diversas (Huang et al., 2010).

Entender as diferenças entre MSCs e fibroblastos é importante para a compreensão da biologia dessas células e para futura utilização segura destas no campo da medicina regenerativa (Cappellesso-Fleury et al., 2010). Os resultados obtidos no presente estudo possibilitaram distinguir com sucesso as populações de OFSCs e fibroblastos da pele palpebral.

Resumidamente, as OFSCs possuem o imunofenótipo aceito para definição de MSCs e possuem potencial de diferenciação multilinhagem quando cultivadas em meios indutores suplementados com SH e, contrariamente às OFSCs, os fibroblastos da pele da pálpebra não exibem propriedades de multipotência *in vitro*, apresentam menores níveis de expressão de CD9 sendo a atividade da fosfatase alcalina quase inexistente neste tipo celular.

Outros estudos também correlacionaram a baixa expressão e atividade de fosfatase alcalina com a incapacidade de diferenciação multilinhagem dos fibroblastos (Wagner et al., 2005; Huang et al., 2010; Cappellesso-Fleury et al., 2010). Assim, aliados aos achados do presente estudo, pode-se sugerir essas características como critérios de diferenciação entre MSCs e fibroblastos.

Os achados do presente estudo ainda comprovaram que o meio de cultura suplementado com SH, além de não alterar as características fenotípicas e funcionais das OFSCs, levam à maior proliferação celular, indicando a viabilidade do uso desse suplemento para cultivo em larga escala de células para fins terapêuticos.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho comprovou a presença de células-tronco multipotentes nas bolsas de gordura da pálpebra humana com grande capacidade proliferativa em meio suplementado com soro humano. Essas células diferenciam-se dos fibroblastos da pele palpebral nos aspectos: expressão de CD9, atividade da fosfatase alcalina e multipotencialidade.

8. PERSPECTIVAS

- Avaliar se as OFSCs se comprometem com a linhagem de células epiteliais da córnea quando cultivadas na presença do meio de cultura condicionado por fibroblastos obtidos da pele da pálpebra em substituição ao meio condicionado por fibroblastos do limbo.

- Avaliar a migração das OFSCs para a córnea após implante na pálpebra em modelo de lesão da córnea em coelhos.

- Avaliar se as OFSCs promoverão a regeneração tecidual em modelo de lesões da córnea em coelhos.

- Promover o cultivo das OFSCs em membranas nanoestruturadas derivadas da quitosana com o intuito de regenerar lesões da córnea.

- Avaliar o processo de regeneração tecidual em modelo de lesões da córnea em coelhos após implantes de membranas nanoestruturadas de quitosana colonizadas com OFSCs.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, S.; STEWART, R.; YUNG, S. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. **Stem Cells**, v. 25, p. 1145-1155, 2007.

ALDAHMAH, A.; HAACK-SØRENSEN, M.; AL-NBAHEEN, M.; et al. Human serum is as efficient as fetal bovine serum in supporting proliferation and differentiation of human multipotent stromal (mesenchymal) stem cells in vitro and in vivo. **Stem Cell Reviews**, v. 7, 860-868, 2011.

ALITALO, K.; KUISMANEN, E.; MYLLYLÄ, R. et al. Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 94, n. 3, p. 497-505, 1982.

ALT, E.; YAN, Y.; GEHMERT, S. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biology of the Cell**, v. 103, p. 197-208, 2011.

AMIRJAMSHIDI, H.; MILANI, B. Y.; SAGHA, H. M. et al. Limbal fibroblast conditioned media: A non-invasive treatment for limbal stem cell deficiency. **Molecular Vision**, v. 17, p. 658-666, 2011.

ANG, L. P.; TANIOKA, H.; KAWASAKI, S. et al. Cultivated human conjunctival epithelial transplantation for total limbal stem cell deficiency. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 2, p. 758-764, 2010.

ANGHILERI, E.; MARCONI, S.; PIGNATELLI, A. et al. Neuronal differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 5, p. 909-916, 2008.

AUBIN, J. E. Regulation of osteoblast formation and function. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 2, p. 81-94, 2001.

AURICH, H.; SGODDA, M.; KALTWAßER, P. et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 570-581, 2009.

BAE, S.; AHN, J. H.; PARK, C. W.; et al. Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. **Cell and Tissue Research**, v. 335, p. 565-573, 2009.

BAYLIS, O.; FIGUEIREDO, F.; HENEIN, C. et al. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, p. 993-1002, 2011.

- BERNARDO, M. E.; AVANZINI, M. A.; PEROTTI, C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. **Journal of Cellular Physiology**, v. 211, p. 121-130, 2007.
- BIEBACK, K.; HECKER, A.; KOCAÖMER, A. et al. Bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. **Stem Cells**, v. 27, p. 2331-2341, 2009.
- BILLON, N.; IANNARELLI, P.; MONTEIRO, M. C.; et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2283-2292, 2007.
- BILLON, N.; MONTEIRO, M. C.; DANI, C. Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. **Biology of the Cell**, v. 100, p. 563-575, 2008.
- BLASI, A.; MARTINO, C.; BALDUCCI, Luigi.; et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. **Vascular Cell**, v.3, n.5, 2011.
- BLAZEJEWSKA, E. A.; SCHLOTZER-SCHREHARDT, U.; ZENKEL, M. et al. Corneal limbal microenvironment can induce transdifferentiation of hair follicle stem cells into corneal epithelial-like cells. **Stem Cells**, v. 27, p. 642-652, 2009.
- BOUFFI, C.; BONY, C.; JORGENSEN, C.; et al. Skin fibroblasts are potent suppressors of inflammation in experimental arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, p. 1671-1676, 2011.
- BROHEM, C. A.; CARVALHO, C. M.; RADOSKI, C. L.; et al. Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. **International Journal of Cosmetic Science**, 2013.
- BRUNNER, D.; FRANK, J.; APPL, H. et al. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. **Altex**, v. 27, p. 53-62, 2010.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CAPPELLESSO-FLEURY, S.; PUISSANT-LUBRANO B.; APOIL, P. A.; et al. Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Immunology**, v. 30, p. 607-619, 2010.
- CASAROLI-MARANO, R. P.; NIETO-NICOLAU, N.; MARTÍNEZ-CONESA. E. M. Progenitor cells for ocular surface regenerative therapy. **Ophthalmic Research**, v. 49, p. 115-121, 2013.
- CHEN, F. G.; ZHANG, W. J.; BI, D. Clonal analysis of nestin- vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. **Journal of Cell Science**, v. 120, p. 2875-2883, 2007.

CHIEN, M. H.; BIEN, M. Y.; KU, C. C. Systemic human orbital fat-derived stem/stromal cell transplantation ameliorates acute inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. **Critical Care Medicine**, V. 40, n.4, 2012.

CHO, H. S.; SONG, I. H.; PARK, S. et al. Individual variation in growth factor concentrations in platelet-rich PH and its influence on human mesenchymal stem cells. **Korean Journal of Laboratory Medicine**, v. 31, p. 212-218, 2011.

COVAS, D. T.; PANEPUCCHI, R. A.; FONTES, A. M.; et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**; v. 36, p.642–654, 2008.

COVRE, J. L.; LOUREIRO, R. R.; CRISTOVAM, P. C. et al. Comparação entre membrana amniótica com e sem epitélio como substrato para cultura de células epiteliais do limbo *ex vivo*. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 74, n. 2, p. 114-117, 2011.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L. et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell.**, v. 3, p. 301-313, 2008.

CRISTOVAM, P. C.; DA GLÓRIA, M. A.; MELO, G. B. et al. Importância do co-cultivo com fibroblastos de camundongo 3T3 para estabelecer cultura de suspensão de células epiteliais do limbo humano. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 71, n. 5, p. 689-94, 2008.

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

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 2008.

DANTAS, A. M. **Essencial em Oftamologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2011. p. 38-39.

DE COPPI, P.; BARTSCH, G. J.; SIDDIQUI, M M. et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 100-106, 2007.

DE KRETZER, D. Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology. **Journal of Law and Medicine**, v. 15, n. 2, p. 212-218, 2007.

DE ANGELIS, D. D.; CARTER, S.R.; SEIFF, S. R. Dermatochalasis: Review. **International Ophthalmology Clinics**, v. 42, n. 2, p.89-101, 2002.

DE BARI, C. DELL'ACCIO, F.; TYLZANOWSKI, P.; LUYTEN, F. P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis & Rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

DRAGOO, J. L.; SAMIMI, B.; ZHU, M. et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. **Journal of Bone Joint Surgery -British**, v. 85, p. 740-747, 2003.

DUA, H. S.; AZUARA-BLANCO, A. Limbal stem cells of the corneal epithelium. **Survey of Ophthalmology**, v. 44, n. 5, 2000.

FAUZA, D. Amniotic fluid and placental stem cells. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 877-91, 2004.

FISCHBACH, G. D.; FISCHBACH, R. L. Stem cells: science, policy, and ethics. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, p. 1364-1370, 2004.

FLAVELL, S.J.; HOU, T.Z.; LAX, S.; et al. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. **British of Journal Pharmacology**. v. 153 (Suppl. 1, S241–S246), 2008.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. Differences in stem and progenitor cell yield in different subcutaneous adipose tissue depots. **Cytotherapy**, v. 9, p. 459, 2007.

FRASER, J. K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 4, 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J.; LALYKINA, K. S. Thymus cells are inducible to osteogenesis. **European Journal Immunology**, v. 2, p. 602-603, 1972.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I. et al. Heterotopic of bone marrow: analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, p. 230-247, 1968.

FUKUDA, K.; FUJITSU, Y.; SEKI, K. et al. Differential expression of thymus- and activation regulated chemokine (CCL17) and macrophage-derived chemokine (CCL22) by human fibroblasts from cornea, skin, and lung. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 3, p. 520-526, 2003.

GAO, N.; WANG, Z.; HUANG, B. et al. Putative epidermal stem cell convert into corneal epithelium-like cell under corneal tissue in vitro. **Science China Series C Life Sciences**, v. 50, p. 101-110, 2007.

GEARHART, J. New potential for human embryonic stem cells. **Science**, v. 6, p. 1061-1062, 1998.

GEPSTEIN, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. **Circulation Research**, v. 91, n. 10, p.8 66-876, 2002.

- GLASOW, A.; ANDEREGG, U.; BERTHOLD, A. et al. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 9, p. 4472-4479, 2011.
- GOEDECKE, A., WOBUS, M., KRECH, M. et al. Differential effect of platelet-rich plasma and fetal calf serum on bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells expanded in vitro. **Journal of Tissue and Eng Regenerative Medicine**, v. 5, p. 648, 2011.
- GOMES, J. A.; GERALDES MONTEIRO, B.; MELO, G. B. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 3, p. 1408-1414, 2010.
- GOTTIPAMULA, S; MUTTIGI, M. S.; CHAANSA, S. et al. Large-scale expansion of pre-isolated bone marrow mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. **Journal of tissue Engineering and Regenerative Medicine**, 2013.
- GREEN, H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. **Cell**, v. 15, n. 3, p. 801-811, 1978.
- GREENWOOD, H. L.; THORSTEINSDÓTTIR, H.; PERRY, G. et al. Regenerative medicine: new opportunities for developing countries. *Int. J. Biotechnology*, v. 8,n.1/2, 2006.
- GREGORY, C. A.; REYES, E.; WHITNEY M. J.; et al. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. **Stem Cells**, v.24, p. 2232-2243, 2006.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. In: **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-13630, 2000.
- GU, S.; XING, C.; HAN, J. et al. Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo. **Molecular Vision**, v. 15, p. 99-107, 2009.
- GUILAK, F.; ESTES, B. T.; DIEKMAN, B. O. Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 468, n. 9, p. 2530-2540, 2010.
- HALFON, S.; ABRAMOV, N.; GRINBLAT, B. et al. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 1, 2011.
- HANIFFA, M. A.; WANG, X. N.; HOLTICK, U. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 1595-1604, 2007.

HEISKANEN, A.; SATOMAA, T.; TIITINEN, S. et al. N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. **Stem Cells**, v. 25, p. 197-202, 2007.

HEMATTI, P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? **Cytotherapy**, v. 14, p. 516–521, 2012.

HIPP, J.; ATALA, A. Sources of stem cells for regenerative medicine. **Stem Cell Review**, v. 4, n. 1, p. 3-11, 2008.

HO, J. H. C.; MA, W. H.; TSENG, T. C.; et al. Isolation and characterization of multi-potent stem cells from human orbital fat tissues. **Tissue Engineering**, v. 17, n. 1, p. 255-266, 2011.

HOMMA, R.; YOSHIKAWA, H.; TAKENO, M. et al. Induction of epithelial progenitors in vitro from mouse embryonic stem cells and application for reconstruction of damaged cornea in mice. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 12, 004.

HONG, S. J.; JIA, S. X.; XIE, P.; et al. Topically delivered adipose derived stem cells show an activated- fibroblast phenotype and enhance granulation tissue formation in skin wounds. **Plos One**, v. 8, n. 1, 2013.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393- 395, 2005.

HUANG, H. I.; CHEN, S. K.; LING, Q. D.; et al. Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. **Tissue Engineering**, v. 16, n. 5, 2010.

HUDSON, J. E.; MILLS, R. J.; FRITH, J. E. et al. Defined medium and substrate for expansion of human mesenchymal stromal cell progenitors that enriches for osteo- and chondrogenic precursors. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 1, 2011.

ISAAC, C.; DE MATTOS, C. N.; RÊGO, F. M. P. et al. Substituição de soro bovino fetal por soro humano como suplemento para cultura de fibroblastos humanos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 3, p. 379-384, 2011.

ISHIZUKA, C. K. Autoestima em pacientes submetidas a blefaroplastia. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 27, n. 1, p. 31-36, 2012.

JAAGER, K.; ISLAM, S.; ZAJAC, P. RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. **Plos One**, v.7, n. 6, 2012.

JAAGER, K.; NEUMAN, T. Human dermal fibroblasts exhibit delayed adipogenic differentiation compared with mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 8, 2011.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E.; CAPLAN, A. I. et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p. 295-312, 1997.

JOHNSTON, M. C.; NODEN, D. M.; HAZELTON, R. D. et al. Origins of avian ocular and periocular tissues. **Experimental Eye Research**, v. 29, p. 27-43, 1979.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem cells**, v. 24, p. 1294-1301, 2006.

KOCHAEEMER, A.; KERN, S.; KLÜTER, H. et al. Serum and thrombin-activated platelet-rich PH are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Stem Cells**, v. 25, p. 1270-1278, 2007.

KOLLI, S.; AHMAD, S.; LAKO, M. et al. Successful clinical implementation of corneal epithelial stem cell therapy for treatment of unilateral limbal stem cell deficiency. **Stem Cells**, v. 28, p. 297-610, 2010.

KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 96, p. 10711-10716, 1999.

KORN, B. S.; KIKKAWA, D. O.; HICOK, K. C. Identification and characterization of adult stem cells from human orbital adipose tissue. **Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 25, n. 1, p. 27-32, 2009.

KORN, B. S.; SEO, S.; LEVI, L. et al. Optic neuropathy associated with botulinum A toxin in thyroid-related orbitopathy. **Ophthalmic Plastic & Reconstructive Surgery**, v. 23, n. 2, p.109-114, 2007.

KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M. H.; GRONTHOS, S. Circulating skeletal stem cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 153, 2001.

LAW, S.; CHAUDHURI, S. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges: a review. **American Journal of Stem Cells**, v. 2, n. 1. p. 22-38, 2013.

LE BLANC, K; RINGDÉN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation biology of blood and marrow transplantation. **American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 11, p. 321-334, 2005.

LEE, J. Y.; LEE, K. H.; SHIN, H. M. Orbital volume augmentation after injection of human orbital adipose-derived stem cells in rabbits. 27th Asia Pacific Academy of Ophthalmology Congress, April, 2013 in Busan, Korea.

- LI, D. Q.; TSENG, S. C. Differential regulation of cytokine and receptor transcript expression in human corneal and limbal fibroblasts by epidermal growth factor, transforming growth factor- α , platelet-derived growth factor B, and interleukin-1 β . **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 37, p. 2068-2080, 1996.
- LI, L.; NEAVES, W. B. Normal stem cells and cancer stem cells: The niche matters. **Cancer Research**, v. 66, p. 4553-4557, 2006.
- LI, M., IKEHARA, S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 1-8, 2013.
- LI, W.; HAYASHIDA, Y.; CHEN, Y. T. et al. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. **Cell Research**, v. 17, n. 1, p. 26-36, 2007.
- LIN, H. T.; TARNG, Y. W.; CHEN, Y. C. et al. Using human PH supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and evaluation of its multiple-lineage potential. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 4504-4505, 2005.
- LINDROOS, B.; AHO, K.; KUOKKANEN, H. et al. Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. **Tissue Engineering: Part A**, v. 16, p. 2281-2294, 2010.
- LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews**, v. 7, p. 269-291, 2011.
- LIU, G.; ZHOU, H.; LI, Y. et al. Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cell. **Cryobiology**, v. 57, n. 1, p. 18-24, 2008.
- LORENZ, K.; SICKER, M.; SCHMELZER, E.; et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 925-932, 2008.
- LU, R.; BIAN, F.; LIN, J. et al. Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. **Plos One**, v. 7, n. 6, p. 1-6, 2012.
- LYSY, P. A.; SMETS, F.; SIBILLE, C.; et al. Human skin fibroblasts: from mesodermal to hepatocyte-like differentiation. **Hepatology**, v. 46, p.1574-1585, 2007.
- MAIORANA, A.; FIERABRACCI, A.; CIANFARANI, S. Isolation and characterization of omental adipose progenitor cells in children: a potential tool to unravel the pathogenesis of metabolic syndrome. **Hormone Research**, v. 72, p. 348-358, 2009.
- MANNELLO, F.; TONTI, G. A. Concise Review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched PH; Serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or Ad Hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem Cells**, v. 25, p. 1603-1609, 2007.

MARTIN, M. J.; MUOTRI, A.; GAGE, F. et al. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature Medicine**, v. 11, n. 2, p. 228-232, 2005.

MASON, C.; DUNNILL, P. A brief definition of regenerative medicine. **Regenerative Medicine**, v. 3, n.1, p.1-5, 2008.

MELROSE, J.; CHUANG, C.; WHITELOCK, J. Tissue engineering of cartilages using biomatrices. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 444-463, 2008.

MITCHELL, J. B.; MCINTOSH, K.; ZVONIC, S. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem Cells**, v. 24, p. 376-385, 2006.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and literature review. **Journal of Nippon Medical School**, v. 76, p. 56-66, 2009.

MOCHIZUKI, T.; MUNETA, T.; SAKAGUCHI, Y. et al. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. **Arthritis Rheumatism**, v. 54, p. 843, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOUNTFORD, J.C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. **Transfusion Medicine**, v. 18, p. 1-12, 2008.

MOURA, E. M.; IGLESIAS, L.; PORTELLINHA, W. M. et al. Blefaroplastias cosméticas: elevação dos supercílios. In: SOARES, E. J. C.; MOURA, E. M.; GONÇALVES, J. O. **Cirurgia Plástica Ocular**. 1 ed. São Paulo: Roca, 1997. p. 245-249.

MUSINA, R. A.; Belyavski A. V.; TARUSOVA O. V.; et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 145 n. 4, 2008.

NAKAGAMI, H.; MORISHITA, R.; MAEDA, K. et al. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. **Journal of Atherosclerosis Thrombosis**, v. 13, p. 77-81, 2006.

NAKAMURA, T.; INATOMI, T.; SOTOZONO, C. et al. Successful primary culture and autologous transplantation of corneal limbal epithelial cells from minimal biopsy for unilateral severe ocular surface disease. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v. 82, p. 468, 2004.

NAKAMURA, T.; KINOSHITA, S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. **Cornea**, v. 22 (suppl. 7), p. S75-S80, 2003.

- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, p. 3499-3506, 2007.
- NETO, G. H. Afecções das pálpebras. In: DANTAS, A. M. **Essencial em Oftamologia**. 1 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2011. p. 245-246.
- NISHIDA, K.; YAMATO, M.; HAYASHIDA, Y. et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1187-1196, 2004.
- NOTARA, M.; SHORTT, A. J.; GALATOWICZ, G. et al. IL6 and the human limbal stem cell niche: a mediator of epithelial–stromal interaction. **Stem Cell Research**, v. 5, p. 188-200, 2010.
- ONG, W. K.; CHEN, H. F.; TSAI, C. T. The activation of directional stem cell motility by green light-emitting diode Irradiation. **Biomaterials**, v. 34, p. 1911-1920, 2013.
- ORDONEZ, P.; DI GIROLAMO, N. Concise review: limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment. **Stem Cells**, v. 30, p. 100-107, 2012.
- PARMAR, D. N.; ALIZADEH, H.; AWWAD, S. T. et al. Ocular surface restoration using non-surgical transplantation of tissue-cultured human amniotic epithelial cells. **American Journal Ophthalmology**, v. 141, n. 2, p. 299-307, 2006.
- PAULA, A. C. C.; ZONARI, A. A. C.; MARTINS, T. M. M. et al. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. **Tissue Engineering: Part A**, v. 19, n. 1-2, p. 277-289, 2013.
- PELLEGRINI, G.; TRAVERSO, C. E.; FRANZI, A. T. et al. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. **The Lancet**, v. 349, p. 990-993, 1997.
- PEREIRA, L. V. A importância do uso de células-tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 7-14, 2008.
- PEREIRA, M. C. L.; SECCO, M.; SUZUKI, D. E.; et al. contamination of mesenchymal stem-cells with fibroblasts accelerates neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. **Stem Cell Reviews and Reports**, 2011.
- PÉREZ-ILZARBE, M.; DÍEZ-CAMPELO, M.; ARANDA, P. et al. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. **Transfusion**, v. 49, p. 1901-1910, 2009.
- PERSICHETTI, P.; LELLA, F. D.; DELFINO, S. Adipose compartments of the upper eyelid: anatomy applied to blepharoplasty. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 113, n. 1, 373-378, 2004.

- PISCIOTTA, A.; RICCIO, M.; CARNEVALE, G. Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells *in vitro* and *in vivo*. **Plos One**, v. 7, n.11, 2012.
- PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J. S.; COUSIN, B. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, n. 5, p. 656-663, 2004.
- POLONI, A.; MAURIZI, G.; SERRANI, F. Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 66-75, 2012.
- RADA, T.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v. 15, n. 2, p. 113-125, 2009.
- RAGHUNATH, J.; SALACINSKY, H. J.; SALES, K. M. et al. Advanced cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 503-509, 2005.
- RAMA, P.; MATUSKA, S.; PAGANONI, G. et al. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. **New England Journal of Medicine**, v. 363, p. 147-155, 2010.
- RAMÍREZ, P. H. Medicina regenerativa y células madre: mecanismos de acción de las células madre adultas. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Medicina Transfusional**, v. 25, n. 1, 2009.
- RICARDO, J. R. S.; GOMES, J. A. P. Uso de células-tronco cultivadas ex vivo na reconstrução da superfície ocular. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 73, n. 6, p. 541-547, 2010.
- RIEKSTINA, U.; ČAKSTINA, I.; PARFEJEVS, V. et al. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 5, n. 4, p. 378-386, 2010.
- RINGE, J.; KAPS, C.; BURMESTER, M. et al. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 8, p. 338-351, 2002.
- RIORDAN-EVA, P.; WHITCHER, J. P. **Oftalmologia Geral de Vaughan e Asbury**. 17 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 79.
- SABATINI, F.; PETECCHIA, L.; TAVIAN, M. et al. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory Investigation**, v. 85, n. 8, p. 962-971, 2005.

SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J. et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. **Blood**, v. 106, p. 756-763, 2005.

SCHÄFER, R.; SCHNAIDT, M.; KLAFSCHENKEL, et al. Expression of blood group genes by mesenchymal stem cells. **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 520-528, 2011.

SCHECROUN, N.; DELLOYE, C. In vitro growth and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells supported by autologous PH. **Bone**, v. 35, p. 517- 524, 2004.

SCHELLINI, S. A.; PRETI, R. C.; YAMAMOTO, R. K. et al. Dimensões palpebrais antes e após blefaroplastia superior – avaliação quantitativa. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 68, n. 1, p.85-88, 2005.

SCHMITT, A.; GRIENSVEN, M. V.; IMHOFF, A. B. et al. Application of stem cells in orthopedics. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar? perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SECCO, M.; ZUCCONI, E.; VIEIRA, N. M. et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! **Stem Cells**, v. 26, p. 146-150, 2008.

SELVAGGI, T.A.; WALKER, R.E.; FLEISHER, T.A. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus–infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. **Blood**, v. 89, p. 776, 1997.

SHAHDADFAR, A.; FRØNSDAL, K.; HAUG, T. et al. In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. **Stem Cells**, v. 23, p. 1357-1366, 2005.

SHARMA, S. M.; FUCHSLUGER, T.; AHMAD, S. et al. Comparative analysis of human-derived feeder layers with 3T3 fibroblasts for the ex vivo expansion of human limbal and oral epithelium. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 3, p. 606-705, 2012.

SHORTT, A. J.; SECKER, G. A.; NOTARA, M. D. et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: A review of techniques and clinical results. **Survey of Ophthalmology**, v. 52, p. 483-502, 2007.

SOARES, E. J. C.; MOURA, E. M.; GONÇALVES, J. O. **Cirurgia Plástica Ocular**. 1 ed. São Paulo: Roca, 1997. p. 8, 11.

SPEES, J. L.; GREGORY, C. A.; SINGH, H. et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. **Molecular Therapy**, v. 9, p. 447-456, 2004.

STENDERUP, K.; JUSTUESEN, J.; CLAUSEN, C. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, p. 919-926, 2003.

STREM, B. M.; HICOK, K. C.; ZHU, M. et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. **The Keio Journal of Medicine**, v. 54, n. 3, p. 132-141, 2005.

STREM, B. M.; ZHU, M.; ALFONSO, Z. et al. Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue derived cells in a murine model of acute myocardial injury. **Cytotherapy**, v. 7, n. 3, p. 282-291, 2005.

SULLIVAN, J. H.; SHETLAR, D. J.; WHITCHER, J. P. Pálpebras, aparelho lacrimal e lágrimas. In: RIORDAN-EVA, P.; WHITCHER, J. P. **Oftamologia Geral de Vaughan e Asbury**. 17 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 16-17.

SUN, X.; GAN, Y.; TANG, T. et al. In vitro proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in autologous PH derived from bone marrow. **Tissue Engineering: Part A**, v. 14, n. 3, 2008.

SUZDAL'TSEVA, Y. G.; BURUNOVA, V. V.; PETRAKOVA, N. V.; et al. Comparative analysis of cytophenotypes of cells of mesenchymal lineage isolated from human tissues. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 1, 2007.

SUZDAL'TSEVA, Y. G.; BURUNOVA, V. V.; VAKHRUSHEV, I. V.; et al. Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 1, 2007.

TAHA, M. F.; HEDAYATI, V. Isolation identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. **Tissue and Cell**, v. 42, p. 211-216, 2010.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676, 2006.

TANIOKA, H.; KAWASAKI, S.; YAMASAKI, K. et al. Establishment of a cultivated human conjunctival epithelium as an alternative tissue source for autologous corneal epithelial transplantation. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 9, 2006.

TCHKONIA, T.; GIORGADZE, N.; PIRTSKHALAVA, T. et al. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. **Diabetes**, v. 55, n. 9, p. 2571-2578, 2006.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145-1147, 1998.

TIMPER, K.; SEBOEK, D. et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, n. 4, p. 1135-1140, 2006.

- TOMA, J. G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K. J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 778-84, 2001.
- TULLBERG-REINERT, H.; JUNDT, G. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor β 2 and ascorbic acid 2-phosphate. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 112, p. 271-276, 1999.
- VALERIO, P.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. **Biomaterials**, v. 25, p. 2941-2948, 2004.
- VAN DER VALK, J.; BRUNNER, D.; DE SMET, K. et al. Optimization of chemically defined cell culture media – replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.
- VIEIRA, N. M.; BUENO, C. R. JR; BRANDALISE, V. et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2391-2398, 2008.
- VOLAREVIC, V.; LJUJIC, B.; STOJKOVIC, P. et al. Human stem cell research and regenerative medicine: present and future. **British Medical Bulletin**, v. 99, p. 155-168, 2011.
- WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, p. 639-648, 2004.
- WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 1402–1416, 2005.
- WANG, J.; YAPING, Y.; TIAN, H. et al. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, n. 1, p. 143-149, 2011.
- WANG, J.; YE, Y; TIAN, H. et al. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 412, n. 1, p. 143-149, 2011.
- WILLIAMS, A. R.; JOSHUA, M. H. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circulation Research**, v. 109, p. 923-940, 2011.
- ZHU, J.; ZHANG, K.; SUN, Y. ET AL. Reconstruction of functional ocular surface by acellular porcine cornea matrix scaffold and limbal stem cells derived from human embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, 2013.

ZHU, X.; SHI, W.; TAI, W. et al. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Research**, v. 58, p. 897-903, 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 4279-4295, 2002.

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



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 02887512.6.0000.5149

**Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de julho de 2012, o projeto de pesquisa intitulado **"Identificação e caracterização de células-tronco humanas derivadas do tecido adiposo e fibroblastos da pálpebra"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**