

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS**

**Células-tronco derivadas de tecido adiposo de diferentes  
espécies animais: caracterização e associação com  
biomateriais**

**Luiz Irineu Deimling**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Dra. Nance Beyer Nardi

Porto Alegre

Abril de 2013

## INSTITUIÇÕES

Instituição de origem:

\* Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Instituição colaboradora:

\* Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde (PPGBioSaude)

Universidade Luterana do Brasil (ULBRA).

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Células-Tronco e Engenharia de Tecidos da Universidade Luterana do Brasil, com financiamento da FAPERGS e CNPq.

*“O maior mistério da natureza é que ela  
pode conhecer-se a si mesma”.*

Albert Einstein

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, pela vida, pelo exemplo de dignidade, pela formação de valores e pelo apoio, ainda que distante, em todos os momentos. Aos meus irmãos, pelas manifestações de solidariedade em momentos decisivos.

À minha família, Lorena e Isabela, pela compreensão em momentos difíceis, pelo estímulo em continuar e pela satisfação proporcionada ao compartilhar momentos agradáveis.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Nance Beyer Nardi, pela acolhida no laboratório, paciência e confiança. Obrigado por poder compartilhar de sua experiência.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Melissa Camassola, pela contribuição no delineamento e realização dos experimentos e pelas sugestões na elaboração do artigo.

A todos que de alguma forma participaram, ao longo dos anos, da minha formação. Não mencionarei nomes de colegas para não cometer injustiça com ninguém, mas a todos, muito obrigado. À turma do lab, um agradecimento especial.

Aos demais professores e colegas do PPGBioSaude-ULBRA, pela relação de parceria na execução das atividades de laboratório.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	10
1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. Células-tronco (CT).....	11
1.1.1. Células-tronco mesenquimais (CTM).....	11
1.1.2. Células-tronco adiposo derivadas (CTAD).....	12
1.1.3. Aplicações das CTAD.....	14
1.2. Engenharia de tecidos.....	15
1.2.1. Biomateriais e Cultivos Tridimensionais .....	15
1.2.2. Biomateriais BD.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. ARTIGO CIENTÍFICO.....	20
4. DISCUSSÃO .....	28
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

## LISTA DE ABRVIATURAS

2D - bidimensional

3D - tridimensional

AsAP - *ascorbic acid 2-phosphate*

$\alpha$ -TCP - *alpha-tricalcium phosphate*, alfa-trifosfato de cálcio

$\beta$ -TCP - *beta-tricalcium phosphate*, beta-trifosfato de cálcio

BD Biosciences - Becton, Dickinson and Company

BMPs - *bone morphogenetic proteins*, proteínas morfogenéticas do osso

C/EBPs - *CCAAT/enhancer binding proteins*

CD - *cluster of differentiation*

CFU-F - *colony forming units-fibroblastic*, unidade formadora de colônias de fibroblastos

CT - célula-tronco

CTAD - célula-tronco adiposo-derivada

CTE - célula-tronco endotelial

CTH - célula-tronco hematopoiética

CTM - célula-tronco mesenquimal

DMEM - *Dulbecco's modified Eagle's medium*

FCS - *fetal calf serum*, soro fetal bovino

FGF-1 - *fibroblast growth factor-1*, fator de crescimento de fibroblasto-1

FITC - *fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

GAGs - *glycosaminoglycans*, glicosaminoglicanos

GM-CSF - *granulocyte/macrophage colony stimulating factor*, fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos

GvHD - *graft-versus-host disease*, doença do enxerto contra o hospedeiro

HLA - *human leucocyte antigen*, antígeno leucocitário humano

IGF-1 - *insulin growth factor-1*, fator de crescimento da insulina-1

ISCT - *International Society for Cellular Therapy*, Sociedade Internacional para Terapia Celular

MEC - matriz extracelular

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

OD - *optical density*, densidade ótica

OPLA - *open-cell poly(L-lactic acid)*

PE - *phycoerythrin*, ficoeritrina

PPAR- $\gamma$  - *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*

TAF7L - *TATA binding protein (TBP) associated factor 7*

TFIID - *transcription factor II D*

TGF- $\beta$  - *transforming growth factor-beta*, fator transformador de crescimento-beta

VEGF - *vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular

## RESUMO

A engenharia de tecidos tem despontado como uma estratégia promissora à regeneração de tecidos danificados, especialmente quando da associação de células-tronco biomateriais. As características das células-tronco adiposo-derivadas (CTAD), membro da família das células-tronco mesenquimais, tornam estas células uma ferramenta com grande potencial para este propósito. Por outro lado, biomateriais podem ser utilizados como substitutos artificiais da matriz extracelular, propiciando uma matriz de suporte para as células cultivadas *in vitro*. O objetivo deste trabalho foi investigar os parâmetros de aderência e de proliferação de CTAD humanas, caninas e murinas associadas a matrizes de biomateriais à base de colágeno, fosfato de cálcio e *open-cell poly (L-lactic acid)* (OPLA) (BD Biosciences). Tecido adiposo foi obtido a partir de pacientes submetidos à lipoaspiração eletiva, cães saudáveis e camundongos da linhagem C57BL/6, respectivamente. O tecido adiposo foi submetido à digestão com colagenase e as CTAD isoladas foram cultivadas e caracterizadas quanto à morfologia, taxa de proliferação e diferenciação e imunofenótipo. As células-tronco foram associadas às matrizes, em cultivos tridimensionais (3D), entre as passagens 4 e 7. As matrizes foram divididas em dois grupos: pré-incubadas em meio de cultivo suplementado com 10% de soro fetal bovino (*pre-coating*, PC), ou secas (*dry*, D). Duas concentrações celulares foram utilizadas:  $10^4$  e  $5 \times 10^4$  células/matriz, e cultivos celulares convencionais (2D) foram realizados para comparar o índice de proliferação nas condições 2D x 3D. A taxa de aderência aos biomateriais foi avaliada pela contagem de células não aderidas após incubação de 3 horas. O índice de proliferação das CTAD, nas condições 2D e 3D, foi avaliado após 3 dias de incubação através do teste MTT. Os resultados mostram que as CTAD das três espécies apresentam as características típicas das células-tronco da linhagem mesenquimal e aderem preferencialmente aos biomateriais não submetidos à pré-incubação (D), na concentração de  $5 \times 10^4$  células/peça. As CTAD humanas apresentaram índice de proliferação mais elevado na condição 2D do que na condição 3D, enquanto as CTAD caninas e murinas tiveram comportamento oposto. Juntos, estes resultados indicam a possibilidade da associação de



CTAD de diferentes espécies a biomateriais e a sua utilização em aplicações clínicas.

Palavras-chave: CTAD, biomateriais, colágeno, OPLA, fosfato de cálcio.

## ABSTRACT

Tissue engineering has emerged as a promising strategy for regeneration of damaged tissues, especially when stem cells are associated to biomaterials. The characteristics of adipose-derived stem cells (ADSC), which are a type of mesenchymal stem cells, makethem a tool with great therapeutic potential. Different types of biomaterials can be used as artificial substitutes of the extracellular matrix, providing a support matrix for *in vitro* cell culture. The present study aimed to isolate and characterize human, canine and murine ADSC, and toinvestigate the patterns of adhesion and proliferation of these cells after association with collagen-based biomaterials, open-cell poly (L-lactic acid) (OPLA) and calcium phosphate (BD Biosciences). Adipose tissue was obtained from patients undergoing elective liposuction, healthy dogs, and C57BL/6 mice, respectively. The tissue was digested with collagenase and the isolated ADSC were cultured and characterized for morphology, immunophenotype and proliferation and differentiation potential. Cells were associated to biomaterials scaffolds, for tridimensional (3D) cultivation, between passages 4 and 7. The biomaterials were divided into two groups: one was previously pre-incubated with culture medium supplemented with 10% of fetal bovine serum (pre-coating, PC), and the other was not (dry, D). Two cell concentrations were used,  $10^4$  and  $5 \times 10^4$  cells/scaffold, and conventional cell cultures (2D) were performed to compare the rate of proliferation in 3D x 2D systems. The rate of adhesion was assessed by counting the non-adhered cells after 3-hour incubation with the scaffolds. The proliferation index of ADSC cultivated under 2D conditions was measured after 3-day incubation by the MTT assay. The results show that ADSC from the three species present features characteristic of mesenchymal stem cells, and adhere more to scaffolds not submitted to pre-incubation (D),at the concentration of  $5 \times 10^4$  cells/scaffold. Human ADSC showed higher proliferation index in 2D condition than in the 3D condition, contrary to canine and murine ADSC. Together, these results indicate that association of ADSCfrom different species to biomaterials is feasible and may be exploited for clinical applications.

Keywords: ADSC, biomaterials, collagen, OPLA, calcium phosphate.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Células-tronco (CT)**

Operacionalmente, as células-tronco (CT) são caracterizadas como células capazes de se multiplicar por longos períodos, mantendo-se indiferenciadas, e capazes ainda de diferenciação, especializando-se, no mínimo, em um tecido particular (Nardi e Meirelles, 2006; Csaki et al, 2007).

As CT foram descritas inicialmente a partir das células progenitoras do sangue. Friedenstein e colaboradores, na década de 1960, identificaram a partir da medula óssea de cobaias o que designaram como unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F) (referido por Chen et al, 2008). Na década de 1980, estas células passaram a ser enfatizadas como responsáveis pelo sistema estromal que dava suporte às células-tronco hematopoiéticas (Owen, 1985). Caplan, em 1991, sugeriu que estas células fossem denominadas como células-tronco mesenquimais (revisado por Meirelles e Nardi, 2009).

Atualmente, admite-se que reservas de CT são encontradas virtualmente em todos os tecidos adultos (Meirelles et al, 2006). Além daquelas descritas na medula óssea – células-tronco hematopoéticas (CTH), mesenquimais (CTM) e endoteliais (CTE) – as CT também são encontradas em tecidos como a pele, a mucosa intestinal, o epitélio olfativo, o cérebro, o fígado, a gordura, a córnea, a retina, a polpa dentária, os pulmões, músculos esqueléticos e músculos cardíacos (Nardi, 2005; Payushina et al, 2006; Krampera et al, 2006; Meirelles et al, 2008, 2009).

### **1.1.1. Células-tronco mesenquimais (CTM)**

As CTM compreendem uma classe muito heterogênea de células. São células-tronco multipotenciais que, assim como as identificadas inicialmente por Friedenstein e colaboradores (referido por Chen et al, 2008; Afanasyev et al, 2009), são responsáveis pelo suporte à hematopoese e capazes de

diferenciação em diversas linhagens celulares – a saber, condrócitos, osteócitos, adipócitos e tenócitos. A partir da última década elas passaram a ser descritas em vários outros tecidos além da medula óssea (Meirelles et al, 2006; Orbay et al, 2012).

A partir de 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs um conjunto de critérios para definir as CTM humanas: (1) capacidade de adesão ao plástico, quando cultivadas; (2) a necessidade da maioria ( $\geq 95\%$ ) da população ser positiva para os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e negativa ( $\leq 2\%$  positiva) para CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79a/CD19 e HLA classe II; e (3) a capacidade, sob condições adequadas *in vitro*, de diferenciarem osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Horwitz et al, 2005; Dominici et al, 2006).

Atualmente são descritos vários métodos visando o isolamento das CTM obtidas a partir de diversos tecidos (Eslaminejad et al, 2009). Vários estudos indicam haver diferenças com relação às características dos marcadores de superfície (Meirelles e Nardi, 2009). Tais diferenças podem ser parcialmente explicadas pela variação nos métodos de cultura e/ou pelo estágio de diferenciação das células (Meirelles et al, 2006). Embora não existam marcadores específicos para as CTM, a análise de um conjunto de anticorpos preferencialmente expressos nestas células, quando expandidas em cultura, permite determinar seu perfil imunofenotípico (Boxall e Jones, 2012).

Portanto, nem todos os estudos concordam com relação aos critérios de identificação específica das CTM. Um dos critérios adotados por vários grupos de pesquisa que melhor descreve as CTM baseia-se na sua capacidade de diferenciação *in vitro* em tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso (Pratheesh et al, 2011).

### **1.1.2. Células-tronco adiposo-derivadas (CTAD)**

No decorrer dos últimos 10 anos foi dada especial atenção a dois distintos modelos experimentais *in vitro* utilizando proliferação e diferenciação de adipócitos e secreção de adipocinas: o estudo dos pré-adipócitos, já

comprometidos com a linhagem adipocítica; e, a investigação de CT multipotentes, que demonstram potencial de diferenciação adipogênica, osteogênica e de células musculares (revisado em Moreno-Navarrete e Fernández-Real, 2012). Esta população de CTM vem recebendo recentemente particular atenção.

São CT isoladas a partir de tecido adiposo (células-tronco adiposo-derivadas, CTAD), um tecido altamente complexo, formado basicamente por adipócitos maduros (aproximadamente um terço do compartimento estromal), pré-adipócitos, fibroblastos, células T-reguladoras (Treg), macrófagos, células de músculo liso vascular e células endoteliais, além de ser povoado por monócitos/macrófagos e linfócitos (Zuk et al, 2001; Rodriguez et al, 2005; Bunnell et al, 2008; Hernández, 2008; Arrigoni et al, 2009; Golipoor et al, 2010). Mais especificamente, tem sido aceito que as CTAD correspondam a células multipotentes obtidas a partir da fração vascular-estromal do tecido adiposo (Colleoni et al, 2009; Meirelles e Nardi, 2009; Sorrell et al, 2011).

A capacidade de diferenciação em várias linhagens demonstrada pelas CTAD ocorre pela concorrência de diversos eventos, tais como a coordenação de uma complexa rede de fatores de transcrição (PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  e TAF7L) e a participação de cofatores em várias vias de sinalização celular. A contribuição de fatores epigenéticos, a participação de microRNAs e a cronobiologia também demonstram ser mecanismos que desempenham importantes funções na regulação da adipogênese (Romao et al, 2011; revisado em Moreno-Navarrete e Fernández-Real, 2012; Zhou et al, 2013).

Esta intrincada rede associativa de elementos resulta num tecido muito complexo. Esta heterogeneidade do tecido adiposo se manifesta em diferenças observadas nos padrões de comportamento celular. Guilak (2006) relatou que CTAD de uma mesma população podem exibir diferentes estágios de diferenciação entre si. Isso poderia ser apontado como uma das causas das diferenças observadas entre elas quanto à proliferação e à capacidade de diferenciação (referido por Chen et al, 2008). Outro estudo comparou as diferenças de células de tecido adiposo, visando sua utilização em engenharia de tecidos, isoladas a partir de omento e de tecido subcutâneo

(Marappagoundar et al, 2010). Além da diferença observada na proporção de células hematopoiéticas entre os dois tecidos, também o perfil de expressão de marcadores de superfície indicava diferenças entre eles.

As CTAD exibem propriedades – aderência ao plástico, expressão imunofenotípica específica e capacidade de diferenciação – que as correlacionam com as CTM (Zuk, 2010; Witkowska-Zimny e Walenko, 2011). Todavia, enquanto as CTAD humanas e murinas já estão relativamente bem descritas, a biologia destas células em outras espécies ainda é pouco conhecida (Zuk et al, 2002; Strem et al, 2005). Justamente as dúvidas subjacentes à sua biologia, por vezes, limitam o seu emprego e sua difusão para outras aplicações (Taylor et al, 2007; Spencer et al, 2012).

### **1.1.3. Aplicações das CTAD**

As características descritas anteriormente tornam as CTAD células muito interessantes em várias frentes de investigação, notadamente na área da medicina regenerativa (Caplan, 2009; Pawitan, 2009). Vários estudos têm demonstrado sua aplicação como uma estratégia alternativa ao tratamento de patologias como a miocardiopatia isquêmica, doença vascular periférica, acidente vascular cerebral isquêmico, necrose tubular aguda, retinopatia diabética, lesões e transplante de isquemia espinhal traumática (Giordano et al, 2007; Daley e Scadden, 2008).

Na medicina veterinária, as CTAD têm sido empregadas no tratamento de lesões ligamentares e tendinosas e patologias articulares em cavalos e outras espécies (Black et al, 2007, 2008). Condições ortopédicas em cavalos e cães são tratadas com sucesso com CTAD autólogas (Dahlgren, 2006). CTAD cultivadas sobre uma matriz de fibrina demonstraram ser eficientes no reparo de defeitos osteocondrais de côndilos femorais de coelhos (Nathan et al, 2003). Por representarem uma fonte alternativa de CT adultas autólogas, as CTAD apresentam um valioso potencial clínico para a terapia celular e a engenharia de tecidos (Tapp et al, 2009; Raabe et al, 2011; Russo e Parola, 2011).

Dentre as vantagens de sua utilização e a difusão de seu emprego, destacam-se: a facilidade com que são obtidas; a coleta baseada em procedimentos minimamente invasivos; e a quantidade abundantemente disponível (Strem et al, 2005).

## **1.2. Engenharia de tecidos**

Para alcançar padrões de vida cada vez mais longevos e com mais conforto, o homem tem lançado mão de várias estratégias para o auxílio no reparo e substituição de órgãos e tecidos acometidos por traumas ou patologias. Neste contexto, a introdução de biomateriais aparece como uma real opção (Chan e Mooney, 2008), ao lado de alternativas como autoenxertos (Akhyari et al, 2011), aloenxertos (Hu et al, 2007; Wang et al, 2012) e xenoenxertos (Zhang et al, 2010). Como resultado da afluência multidisciplinar dessas tecnologias, a engenharia de tecidos desponta como uma promissora abordagem da medicina regenerativa. Trata-se de uma estratégia que combina o cultivo celular convencional bidimensional (2D) e a utilização de biomateriais. Pela possibilidade de as células assim mantidas em cultura proliferarem sobre uma estrutura tridimensional, estes cultivos são denominados tridimensionais (3D).

Neste cenário, uma ênfase particular está sendo dada aos processos bioquímicos subjacentes à função celular. Mecanismos relacionados à expansão (Pei et al, 2011), diferenciação (Endres et al, 2003; Cherubino e Marra, 2009), sinalização e comunicação celular (Chan e Mooney, 2008; Dormer et al, 2010) são alguns dos aspectos envolvidos na sinergia desta abordagem. A interação entre os vários componentes que participam deste processo também desempenha um papel importante: um exemplo é capacidade que as proteínas exibem de modificar a resposta celular na interface biomaterial-célula (Nuffer et al, 2010; Tour et al, 2011).

### **1.2.1. Biomateriais e Cultivos Tridimensionais**

Biomateriais, de modo geral, são artefatos utilizados em sistemas biológicos para aumentar, tratar, ou substituir, total ou parcialmente, órgãos ou tecidos. Uma gama muito grande de materiais se presta para esses propósitos e muitos deles já são utilizados corriqueiramente na prática clínica (revisado por Helsen e Missirlis, 2010). Em uma revisão genérica sobre a utilização de biomateriais, Hench (2006) cita aplicações que vão desde implantes (próteses, cateteres, *shunt*) a sistemas de liberação controlada (por ex., liberação progressiva de fármacos ou imobilização de enzimas). Aconotação de biomaterial aqui utilizada, todavia, é aquela assumida pela engenharia de tecidos.

Uma grande variedade de biomateriais é utilizada, fundamentalmente, como substitutos artificiais da matriz extracelular (MEC). A vantagem dos cultivos tridimensionais, em relação aos sistemas convencionais de cultura de células, é de os biomateriais fornecerem um substrato adesivo que serve como uma matriz de suporte físico para culturas de células *in vitro* (Willerth e Sakiyama-Elbert, 2008; Wu et al, 2011). Além disso, os biomateriais servem como uma plataforma para o transporte e transplante de células, especialmente em intervenções baseadas na terapia celular (Orsi et al, 2007).

Alguns requerimentos mínimos são essenciais para o sucesso dos protocolos, como a manutenção de propriedades bioquímicas, químicas e físicas do tecido nativo a ser reparado. A biocompatibilidade, vascularização e quimiotaxia são características vitais. Além disso, a estrutura do biomaterial deve mimetizar a interação existente entre receptores de superfície celular e moléculas da MEC.

Além destas observações, algumas características físicas das matrizes parecem contribuir para a otimização de metodologias, como as propriedades morfológicas adequadas (arquitetura dos poros, tamanho e interconectividade) (Machado et al, 2011).

Alguns materiais comumente utilizados incluem cerâmicas de fosfato de cálcio, polímeros (alfa-hidroxi ácidos) e colágeno. Hee e colaboradores (2006) examinaram o efeito de dois biomateriais tridimensionais disponíveis comercialmente (beta-trifosfato de cálcio ou beta-TCP e *open-cell poly(lactic acid)*



ou OPLA) quanto ao potencial de diferenciação osteogênica de fibroblastos dermais humanos. Os resultados sugerem que as matrizes beta-TCP, às quais foram associados os fibroblastos, são melhor adaptadas para aplicações em engenharia de tecidos ósseos.

### **1.2.2. Biomateriais BD Biosciences**

Contribuindo para a oferta de uma variedade maior destes materiais no mercado, a BD Biosciences produziu alguns biomateriais. Entre outros, citam-se aqueles utilizados nos experimentos do presente estudo: matrizes à base de fosfato de cálcio, colágeno e OPLA.

As matrizes de fosfato de cálcio são biocerâmicas naturais à base de fosfato de cálcio. Entre outras características físicas, citam-se: tamanho dos poros entre 200 e 400 $\mu\text{m}$ ; capacidade de hidratação de 30 $\mu\text{L}$  (por peça); e volume de 0,058 $\text{cm}^3$  (estruturas cilíndricas, 5 mm de diâmetro e 3 mm de altura) (descrição do próprio fabricante, BD Bioscience). São recomendados para estudos *in vitro* e *in vivo* que envolvem o metabolismo ósseo. Todavia, cristais de fosfato de cálcio, sob diversas formas, presentes na cartilagem estão associados a diversas formas de osteoartrite (Ea et al, 2005; 2008).

As matrizes à base de colágeno são classificadas como polímeros naturais e são obtidos a partir de pele bovina. Compõem-se de uma mistura rica de componentes da matriz cartilaginosa. Segundo informações do fabricante, algumas das suas características físicas são: tamanho dos poros entre 100 e 200 $\mu\text{m}$ ; capacidade de hidratação de 25 $\mu\text{L}$  (por peça); e volume de 0,054 $\text{cm}^3$  (cilindro de 4,2-5,2mm de diâmetro e 3,9-4,5mm de altura).

O OPLA pertence à classe dos polímeros sintéticos. A sua síntese se dá a partir do *D,D-L,L poly(lactic acid)*. Apresenta, dentre outras, características físicas tais como: tamanho dos poros entre 100 e 200 $\mu\text{m}$ ; capacidade de hidratação de 30 $\mu\text{L}$  (por peça); e volume de 0,054 $\text{cm}^3$  (cilindro de 4,2-5,2mm de diâmetro e 3,9-4,5mm de altura).

Apesar da interação destes biomateriais com células-tronco mesenquimais ter sido explorada em alguns estudos (revisado por Szpalski et al, 2012), uma comparação mais detalhada da capacidade de aderência e proliferação de CTAD no conjunto de biomateriais ainda não foi realizada. É principalmente importante comparar células animais com células humanas, considerando a possibilidade de uso de modelos animais para doenças humanas.

## **2. OBJETIVOS**

Visando contribuir para o melhor entendimento sobre a biologia das CTAD e seu comportamento em associação com biomateriais, o presente trabalho teve como objetivo principal explorar a padronização e caracterização de cultivos tridimensionais (3D) dessas células obtidas a partir de cães, camundongos e humanos. Os objetivos podem ser detalhados como segue:

Objetivo 1 - Padronização do isolamento de CTAD a partir das três espécies.

Objetivo 2 - Caracterização das CTAD quanto à cinética do cultivo celular (proliferação), morfologia e capacidade de diferenciação celular (adipogênica, condrogênica e osteogênica).

Objetivo 3 - Avaliação da interação das CTAD destas três espécies com os biomateriais OPLA, fosfato de cálcio e colágeno, determinando-se a taxa de aderência e de proliferação das células quando associadas aos biomateriais.

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo apresentado na 5th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering e publicado em IFMBE Proceedings Volume 37, 2012, pp 1315-1321 (14-18 September 2011, Budapest, Hungary) ([http://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-23508-5\\_340](http://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-23508-5_340)).



## Interaction of Human, Canine and Murine Adipose-Derived Stem Cells with Different Biomaterials

Luiz I. Deimling<sup>1</sup>, Carolina Franke<sup>2</sup>, Sabrina B. Faganello<sup>1</sup>, Maria Ines Witz,<sup>3</sup> Eduardo M. Chem,<sup>2</sup> Melissa Camassola<sup>1</sup>, Nance B. Nardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Stem Cells and Tissue Engineering, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

<sup>2</sup>Irmãdade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Veterinary Hospital, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

**Abstract-** Due to ease of collection and in vitro expansion, abundance and plasticity, adipose-derived stem cells (ADSC) represent an attractive option for cell therapy and tissue engineering. A variety of biodegradable scaffolds are used as substitutes for the artificial extracellular matrix. Among them are biomaterials consisting of biomolecules such as collagen and poly (L-lactic acid) (OPLA), and bioceramics such as calcium phosphate. As an advantage compared to conventional two-dimensional (2D) cell culture, scaffolds provide an adhesive substrate that also serves as a physical support matrix for cell culture in vitro. The present work aimed to investigate the patterns of adherence and proliferation of human, canine and murine ADSC on these three types of biomaterials. Adipose tissue was obtained from patients undergoing elective liposuction, adult C57BL/6 mice and canine healthy donors. ADSC were isolated with use of collagenase, cultured and characterized. Cells between passages 4 and 7 were associated with 3D scaffolds of calcium phosphate, collagen and OPLA (BD Biosciences), dry or pre-coated with medium with 10% fetal calf serum. Different cell concentrations were used:  $10^4$  and  $5 \times 10^4$  cells/scaffold. Cell adherence was evaluated by counting non-adhered cells stained with Giemsa. The proliferation of ADSC in 2D and 3D conditions after 3-day incubation was determined using the MTT test. The cells adhered best to dry scaffolds, and the concentration of  $5 \times 10^4$  cells/scaffold was the most adequate for adherence and proliferation. Human ADSC proliferated more rapidly on 2D than in 3D conditions, contrary to murine and canine cells. These results show that cultivation of ADSC from different species in degradable biomaterials is feasible and may be exploited for the therapeutic use of these compounds.

**Keywords-** Adipose-derived stem cell, proliferation, calcium phosphate, collagen, poly (L-lactic acid).

### I. INTRODUCTION

Mesenchymal stem cells (MSCs) can be defined by their ability to self-renew, to differentiate into one or more specialized cell types, to adhere to plastic and by a specific panel of surface markers [1]. Cultured MSCs exhibit great plasticity, suggesting a great potential to treat different diseases (reviewed in Beyer Nardi and da Silva Meirelles,

2006) [2]. More recently, MSCs were also found to secrete various bioactive molecules with anti-apoptotic, immunomodulatory, angiogenic, and chemoattractant properties, which explain their potential as tools to create local regenerative environments, with a paracrine mechanism of action [3].

Initially described as adherent cells derived from the stromal compartment of bone marrow, MSCs are now known to reside in virtually all post-natal organs and tissues [2]. The main source of MSCs is still the bone marrow, in a procedure that can be painful for patients and may yield low quantities of MSCs. In practical terms, an ideal source of autologous stem cells should be easily accessible, resulting in minimal discomfort for the patient, and capable of providing a substantial amount of cells. The adipose tissue may represent such a source.

The stromal-vascular fraction of adipose tissue contains around 500-fold more MSC-like stem cells than bone marrow mononuclear cells plated at the same cell density [4]. Stem cells in adipose tissue, called adipose-derived stem cells (ADSC), exhibit great plasticity and can differentiate into multiple cell types *in vitro*, including osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and smooth muscle cells [5,6]. Differentiation in ectoderm and endoderm cell types such as neurons and hepatocytes is still controversial [7,8]. The growth of ADSC in combination with different biomaterials has been described, and the results show a great potential of these cells for tissue engineering [9,10]. Important applications of ADSC have also been described in preclinical and clinical trials, as an alternative to promote the regeneration of periodontal tissue [11], the reconstruction of novel maxillary [12], to help control graft-versus-host disease associated with allogeneic hematopoietic transplantation [13], in the regeneration of radiotherapy-damaged tissue [14] and in cardiovascular repair [15].

Synthetic implants and tissue grafts are finding increased application in reconstructive surgery [16], and the investigation of combinations of new biomaterials with cells and biological molecules is of great importance for the advancement of tissue engineering.

A variety of biomaterials are under study, and adequate morphological properties (pore architecture, size and interconnectivity) have been described [17]. Some minimum requirements are essential to the maintenance of the biochemical, chemical and physical properties of the native tissue to be repaired. Biocompatibility, vascularization and chemotaxis are vital characteristics. The structure of the biomaterial should mimic the interaction between cell surface receptors and extracellular matrix molecules. This interaction is essential in regulating cellular functions such as adhesion, survival, proliferation, migration and differentiation. Furthermore, the biomaterial must be non-immunogenic and free of prions involved in disease transmission.

Many classes of biomaterials have been used for applications related to bone and cartilage tissue engineering. Some materials commonly used include calcium phosphate ceramics, polymers (alpha-hydroxy acids) and collagen. Hee et al., 2006 [17] examined the effect of two commercially available three-dimensional biomaterials (beta-TCP and OPLA) regarding the potential for osteogenic differentiation of human dermal fibroblasts. The results suggest that beta-TCP scaffolds (ultra porous calcium phosphate-based ceramics) with cultured fibroblasts are better suited for applications in bone tissue engineering.

Tissue engineering processes aim to develop a functional replacement of damaged tissue without the intrinsic shortcomings of autografts, allografts and biomaterials. This can be achieved by the combination of a triad formed by the biomaterial, tissue-forming cells and molecules such as growth factors, cytokines, compounds of the extracellular matrix (ECM) and others involved in cell differentiation and expansion [18]. A range of molecules are described in these studies. Some groups describe factors that have important roles as FGF-1 (fibroblast growth factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor), bone morphogenetic proteins (BMPs), VEGF (vascular endothelial growth factor), IGF-1 (insulin growth factor type 1). Such molecules are directly involved in tissue formation [19-21].

Various glycoproteins, glycosaminoglycans (GAGs) and other extracellular matrix proteins, including collagen, have also demonstrated regulatory effects on the growth of blood vessels. Therefore, a possible way to enhance the angiogenic response to exogenous biomaterials could be to introduce more of a growth factor in implantation [20]. Studies have also shown that heparin (GAG) covalently immobilized within gel conjugated to hyaluronic acid can mimic chemically and functionally proteoglycans normally present in the extracellular matrix and produce an angiogenic response *in vivo* [20].

The repair of lesions in articular cartilage is a major concern in surgery, due to the low capacity for healing presented by this tissue. Therefore, strategies based on tissue

engineering biomaterials, cell supplementation and biologically active molecules have been widely studied in this context [22]. This approach requires a suitable source of chondrogenic cells, easily accessible and immunocompatible. Some studies use the bioengineering of tissues through the reconstruction of functional cartilage by the *in vitro* distribution of chondrocytes on biomaterials. The characteristics of this new cartilage differ according to the biomaterial, and recent studies have determined the appropriate scaffold for such reconstruction [23].

In this study, we investigated the best conditions for the association of human, murine and canine adipose-derived stem cells with three different types of biomaterials: 3D collagen, calcium phosphate and poly (L-lactic acid) (OPLA).

## II. MATERIALS AND METHODS

### A. Isolation and Culture of ADSC

Human subcutaneous adipose tissue samples were obtained from patients undergoing elective superwet liposuction surgery following informed patient consent and according to the guidelines set by our institution's Committee on Human Research. Inguinal adipose tissue was collected from adult C57BL/6 mice housed under standard conditions and from healthy male dogs of unknown breeds, with a mean weight of 13.5 kg. All animal procedures were performed in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences, and approved by a local Research Ethics Committee.

The samples were washed extensively with phosphate buffered saline (PBS) and digested with 1 mg/ml of collagenase type I solution (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) for 30 min at 37 °C, under gentle agitation. The enzyme was inactivated with an equal volume of Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Cultilab, Sao Paulo, Brazil) and centrifuged at 400 g for 10 min. The pellet was resuspended in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lysis buffer, incubated at room temperature (RT) for 10 min and centrifuged at 400 g for 10 min. The ADSC fraction was washed with Hank's balanced salt solution (HBSS) (Sigma) and centrifuged at 350 g for 5 min. The cell pellet was resuspended in DMEM with HEPES (Sigma) (free acid, 2.5 g/l) supplemented with 10% FCS and cultured in 5%  $\text{CO}_2$  at 37° C. The medium was changed every 2-3 days. Cells between passages 4 and 7 were used, and at least 3 cultures were analyzed.

### B. Differentiation of ADSC

Differentiation was induced by incubation for up to 4 weeks with culture medium supplemented with specific factors for adipogenic and osteogenic lineages, as described by da Silva Meirelles et al. (2006) [2]. Chondrogenic differentiation was induced for up to 4 weeks with culture medium supplemented with 6.25  $\mu\text{g/ml}$  insulin (Sigma), 10  $\text{ng/ml}$  TGF $\beta$ 1 (Millipore, Billerica, MA) and 50  $\text{nM}$  ascorbic acid 2-phosphate (AsAP) (Sigma). In order to observe calcium deposition, osteogenic cultures were washed once with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15-30 minutes at RT, and stained for 5 minutes at RT with Alizarin Red S stain at pH 4.1. Excess staining was removed by several washes with distilled water. Adipocytes were identified from the undifferentiated cells by phase-contrast microscopy. To further confirm their identity, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 1 hour at RT, and stained with Oil Red O solution for 5 minutes at RT. Chondrogenesis was confirmed using Alcian Blue at acidic pH. Cultures were washed once with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 15-30 minutes and stained for 5 minutes at RT. All procedures had negative control cultures (undifferentiated cultures). Photomicrographs were taken with a digital camera (AxioCam MRc, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), using AxioVision 3.1 software (Carl Zeiss).

#### C. Immunophenotyping of Human and Murine ADSC

Surface markers of human and murine ADSC were analyzed by flow cytometry. The cells were trypsinized, centrifuged, and incubated for 30 minutes at 4°C with phycoerythrin (PE)- or fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated antibodies specific for CD13, CD34, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD117, and HLA-DR (Pharmingen BD, San Diego, CA). The cells were analyzed using a FACSCalibur flow cytometer equipped with 488 nm argon laser (Becton Dickinson, San Diego, CA) with the CellQuest software. At least 10,000 events were collected. The WinMDI 2.8 software was used to build histograms.

#### D. Adherence and Proliferation of ADSC to Biomaterials

ADSC were associated with collagen, calcium phosphate and poly (L-lactic acid) (OPLA) scaffolds (BD Biosciences, Sao Paulo, Brazil). Dry (D) or pre-coated (PC) scaffolds, prepared by 2 h-incubation with DMEM containing 10% FCS, were individually placed in wells of a 24-well culture plate. Cells were suspended in DMEM at concentrations of  $2 \times 10^5$  or  $10^6$  cells/ml, and 50  $\mu\text{l}$  were placed on each scaffold. After 2 h incubation in 5% CO $_2$  at 37°C, 200  $\mu\text{l}$  of DMEM were added to each well and the scaffolds were placed in new wells, completed with DMEM with 10% FCS. The cells remaining in the first well were stained with Giemsa and counted, so that

the number of cells adhered to each scaffold was determined. The scaffolds were maintained in 5% CO $_2$  at 37°C for 3 days, and analyses of cell proliferation were performed using the MTT test [24]. The data of optical density were obtained from spectrophotometer reading at a wavelength of 540 nm. The same number of cells, as determined by the adherence test, was cultivated in conventional 2D conditions for 3 days.

#### E. Statistical Analyses

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Differences among the groups were compared using a two-way ANOVA followed by the Tukey's test, with the GraphPad Prism 5.0 software. A P value < 0.05 was considered statistically significant.

### III. RESULTS

#### A. Isolation and Morphologic Characterization of ADSC

The yield of stromal cells collected from human, murine and canine adipose tissue varied from 2 to  $10 \times 10^7$  cells per ml of tissue. Adipose-derived stem cells of human (hADSC), canine (cADSC) and murine (mADSC) origin showed the typical morphology of isolated cells in culture, with a fibroblast-like morphology maintained for all the passages analyzed (Figure 1).

#### B. Differentiation of ADSC

All cultures analyzed were able to differentiate in adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages (Figure 1). Adipogenic differentiation could be observed without specific staining in one week, by the development of lipid intracellular vacuoles. The cells in chondrogenic medium generated cellular nodules characteristic of chondrogenic differentiation at all three culture stages. Isolated cells showed high adipogenic differentiation capacity, with lipidic vacuoles appearing in the first week of incubation; this propensity is probably due to the niche they were isolated from.

#### C. Immunophenotype of Human and Murine ADSC

The analyses of surface markers indicated that hADSC are consistently positive for CD13, CD44, CD73, CD90 and CD105, and negative for CD45, CD69, CD117 and HLA-DR (Figure 2A). CD34 expression showed variable results, but no variation with age. Murine ADSC were negative for CD11b and CD45, and positive for CD29, CD44 e CD49e (Figure 2B). The expression of CD90 was variable among cultures analyzed.

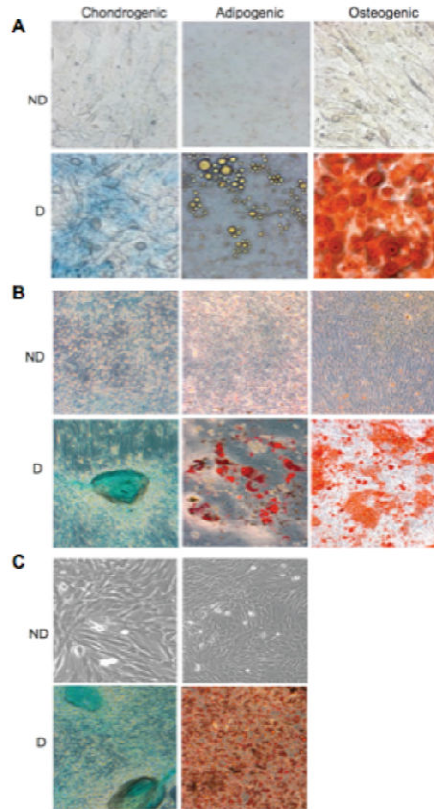


Fig 1 Morphology and differentiation potential of ADSC. Representative images of (A) human, (B) murine and (C) canine ADSC differentiated to chondrogenic, adipogenic and osteogenic lineages. D, differentiated cells stained with specific stain for each lineage. ND, Non-differentiated cells. Magnification: (A) 200x, (B) and (C) 100x.

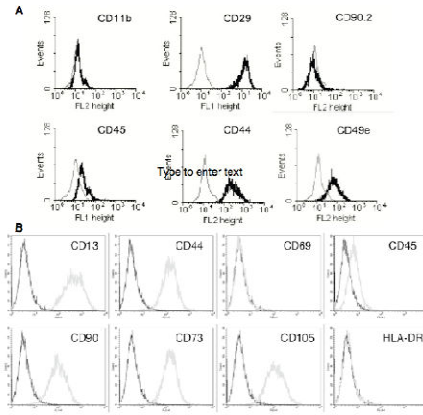


Fig 2 Immunophenotyping of (A) murine and (B) human ADSC

#### D. Adherence and Proliferation of Human, Murine and Canine ADSC on Biomaterials

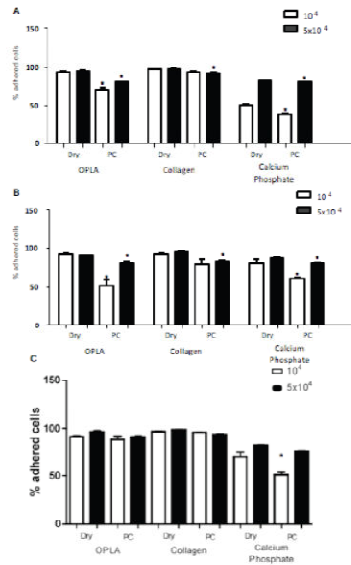
All ADSC cultures analyzed showed good adherence to the three types of biomaterial. In average, 81.3% of cell adhered to scaffolds (Figure 3). A more detailed analysis showed that at cell concentration of  $5 \times 10^4$  cells/scaffold, adherence levels were higher (88%, 87% and 92%, respectively, for human, canine and murine ADSC) than at a cell concentration of  $10^4$  (74%, 77% and 82%, respectively).

Adhesion was significantly reduced when comparing the percentages of adhered cells to biomaterials not previously treated (dry) or pre-coated with medium and 10% FCS (Figure 3). The only exception is in the association of cADSC and hADSC at concentration of  $10^4$  cells/scaffold with collagen. The cells had an average adherence rate of 74% and 88% for dry and pre-coated conditions, respectively.

Analysis of the proliferation of ADSC in association with the biomaterials, as compared to the same number of cells cultivated in conventional conditions, showed that human ADSC seeded on scaffolds proliferated significantly less than in 2D cultures (Figure 4). This was seen more markedly in cultures in cultures started with seeding of  $5 \times 10^4$  cells/scaffold (Figure 4B).

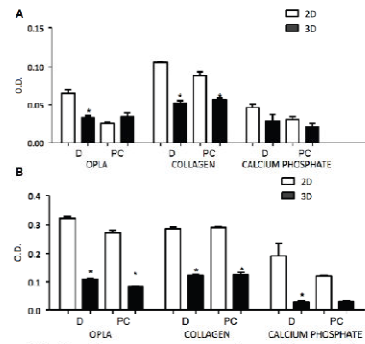
For canine ADSC seeded on calcium phosphate and OPT.A at  $10^4$  cells/scaffold, proliferation was significantly higher than in 2D cultures (Figure 5A). When seeded on collagen, no differences were observed. For cultures with original seeding of  $5 \times 10^4$  cells/scaffold, proliferation was significantly higher for cells cultivated on dry OPLA and calcium phosphate



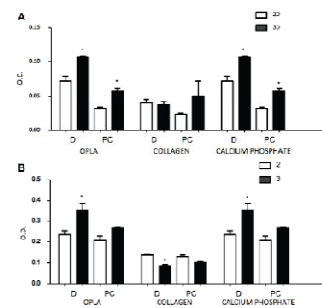


**Fig. 3** Adherence of (A) human ADSC, (B) canine ADSC, and (C) murine ADSC on each of the three biomaterials in dry and pre-coated (PC) seeding conditions and at the two original cell concentrations. The (\*) on the columns indicates a statistically significant difference (reduction) on the percentage of cells adhering to biomaterials, between samples seeded at the same cell concentrations.

scaffolds (Figure 5B). Murine ADSC proliferated consistently more when cultivated with biomaterials, in all the conditions analyzed. The difference was more markedly seen when seeding was on dry scaffolds (Figure 6).



**Fig. 4** Proliferation of human ADSC on 2D cultures and in association with biomaterials, after seeding on dry (D) or pre-coated (PC) conditions, at cell concentrations of (A) 10<sup>4</sup> or (B) 5x10<sup>4</sup> cells/scaffold. O.D., optical density. \* P < 0.01.



**Fig. 5** Proliferation of canine ADSC on 2D cultures and in association with biomaterials, after seeding on dry (D) or pre-coated (PC) conditions, at cell concentrations of (A) 10<sup>4</sup> or (B) 5x10<sup>4</sup> cells/scaffold. O.D., optical density. \* P < 0.01.

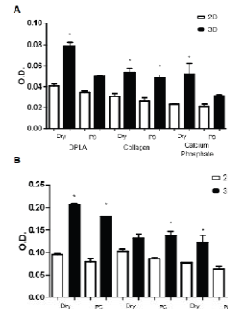


Fig. 6 Proliferation of murine ADSC on 2D cultures and in association with biomaterials, after seeding on dry (Dy) or pre-coated (PC) conditions, at cell concentrations of (A)  $10^6$  or (B)  $5 \times 10^6$  cells/scaffold. O.D., optical density \*  $P < 0.01$ .

#### IV. CONCLUSION

Many technologies have been tested for the expansion of adipose-derived stem cells in combination with biomaterials, allowing for the expansion, differentiation and organization of cells into new tissues (reviewed in [24]). Our results show that, adequately isolated and expanded, ADSC from three species are able to adhere and proliferate in association with collagen, calcium phosphate and poly (L-lactic acid) scaffolds, which have different compositions.

Although the investigation of biomaterials, stem cells and their combination is well advanced, many important scientific and medical issues remain to be better explored (reviewed in [25]). These include the definition of the best conditions for adherence and proliferation of cells in combination with biomaterials. In the present work, cell density had an important role on adhesion, and the incubation of cells with dry scaffolds presented also better results than pre-coating with medium and fetal calf serum. The ability of murine cells to interact with these biomaterials is relevant for the implementation of experimental models based on this species. The ability of canine cells to interact with biomaterials, on the other hand, is also of great interest in view of the potential therapeutic application of tissue engineering in veterinary medicine. Finally, the positive results seen for human cells may be directly translated into more efficient therapeutic protocols for different types of diseases.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by FAPERGS and CNPq/MCT, Brazil.

#### REFERENCES

1. Dumortier M, Le Blanc K, Mueller I et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
2. da Silva LM, Chagas PC, Nardi NB. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2704-2713.
3. da Silva LM, Nardi NB. (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 14:4281-4298.
4. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z et al. (2005). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24:150-154.
5. Kern S, Eichler H, Stoeve J et al. (2006). Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem cells* 24:1294-1301.
6. Gimble J, Guilak F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5:362-369.
7. Xu Y, Liu Z, Liu L et al. (2008). Neurospheres from rat adipose-derived stem cells could be induced into functional Schwann cell-like cells *in vitro*. *BMC Neurosci* 12:9-21.
8. Ruiz JC, Ludlow JW, Sherwood S et al. (2010). Differentiated human adipose-derived stem cells exhibit hepatogenic capability *in vitro* and *in vivo*. *J Cell Physiol* 225:429-436.
9. Wang Y, Zhao L, Hantash BM. (2010). Support of human adipose-derived mesenchymal stem cell multipotency by a poloxamer-octapeptide hybrid hydrogel. *Biomaterials* 31:5122-5130.
10. Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA et al. (2004). Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 25:3211-3222.
11. Tobita M, Uysal C, Ogawa R et al. (2008). Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* 14:945-953.
12. Mesinaki K, Lindhous B, Thornhill J et al. (2009). Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38:201-209.
13. Yanter R, Lamana LM, Garcia-castro J et al. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have *in vivo* immunosuppressive properties applicable for the control of the graft versus host disease. *Stem Cells* 24:2582-2591.
14. Rigotti G, Marchi A, Galie M et al. (2007). Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by liposyringe transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg* 119:1409-1422.
15. Braga LM, Rosa K, Rodrigues B et al. (2008). Systemic delivery of adult stem cells improves cardiac function in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:113-119.
16. Caplan AL, JE Dennis. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-84.
17. Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB. (2006). Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 27:875-884.
18. Langer R, Vacanti JP. (1993). Tissue engineering. *Science* 260:920-926.
19. Marikowicz M, Hotliand A, Steffens GCM et al. (2005). Human mesenchymal stem cell implantation and collagen modification as a tool for tissue engineering. *Eur J Plast Surg* 28:284-289.
20. Riley CM, Fugy JW, Furpo MA et al. (2006). Stimulation of *in vivo* angiogenesis using dual growth factor-loaded crosslinked glycosaminoglycan hydrogels. *Biomaterials* 27:5935-5943.

21. Hutmacher DW, Cool S. (2007). Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *J Cell Mol Med.* 11:654-669.
22. Betre H, Ong SR, Guilak F et al. (2006). Chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells in elastin-like polypeptide. *Biomaterials.* 27:91-99.
23. Chajra H, Rousseau CF, Cortial D et al. (2008). Collagen-based biomaterials and cartilage engineering. Application to osteochondral defects. *Biomater Eng.* 18(1 Suppl):S33-S45.
24. Peres A, Bauer M, da Cruz IB et al. (2003). Immunophenotyping and T-cell proliferative capacity in a healthy aged population. *Biogerontology.* 4(5):289-296.

#### 4. DISCUSSÃO

A otimização de parâmetros relativos aos procedimentos utilizados nos experimentos geralmente faz parte da metodologia dos estudos. Assim sendo, no presente estudo investigamos aspectos relacionados ao isolamento, manutenção e caracterização de CTAD humanas, caninas e murinas. Entre as principais propriedades das CTAD, como células da família das CTM, citam-se: capacidade de autorrenovação; potencial de diferenciação; secreção de mediadores parácrinos e fatores tróficos; quimiotaxia e capacidade de migração para regiões de dano e inflamação; potencial de imunomodulação; potencial angiogênico (Meirelles e Nardi, 2009).

Neste estudo, estabelecemos culturas de CTAD isoladas a partir de humanos, caninos e murinos. O rendimento do isolamento dessas células oscilou entre 2 a  $10 \times 10^5$  células/mL de tecido. As células-tronco adiposo-derivadas de humanos (hCTAD), caninos (cCTAD) e de murinos (mCTAD) originaram culturas de células com a morfologia típica das CTM, mantendo o aspecto fibroblastóide no decorrer de todas as passagens (Figura 1) (Meirelles e Nardi, 2009). Também uma alta taxa de proliferação das CTAD foi observada, estando em consonância com a literatura (Payushina et al, 2006; Yoshimura et al, 2007).

Após expansão das CTAD, todas as culturas analisadas foram capazes de diferenciar nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica (Figura 1). Após cultivo por 1 semana em meio indutor adipogênico, a revelação do corante Oil Red O demonstrou a presença de vacúolos intracelulares de lipídio. As células mantidas em meio indutor condrogênico geraram nódulos celulares característicos de diferenciação condrogênica. Nas culturas mantidas com meio indutor osteogênico foi possível observar grande deposição de matriz de cálcio. As células mantidas em meio normal de cultura (controle) não exibiram nenhuma das morfologias mencionadas. Estes resultados estão em acordo com os dados da literatura, demonstrando coerência na metodologia utilizada (Dicker et al, 2005; Dominici et al, 2006; Gaiba et al, 2012).

Todas as CTAD cultivadas em meio indutor adipogênico exibiram elevada capacidade adipogênica, com células evidenciando vacúolos lipídicos já na primeira semana de cultivo. Possivelmente o nicho destas células seja uma das explicações para esta propensão (Sakaguchi et al, 2005; revisado por Vater et al, 2011).

A análise dos marcadores de superfície das hCTAD, por citometria de fluxo, indicou a presença de CD13, CD44, CD73, CD90 e CD105 e a ausência de CD45, CD69, CD117 e HLA-DR (Figura 2A). A expressão do marcador CD34 mostrou variação nos resultados, mas não variação com a idade. As CTAD murinas exibiram um perfil imunofenotípico negativo para CD11b e CD45 e positivo para CD29, CD44 e CD49e (Figura 2B). A expressão de CD90 variou entre as culturas analisadas. O perfil imunofenotípico das CTAD corresponde àquele descrito em estudos anteriores (Shi et al, 2001; Sharifi et al, 2012).

A associação das CTAD aos biomateriais é uma medida da função de fatores exercidos pela natureza da interface célula-matriz e as condições de pré-tratamento da superfície com a qual as células interagem (Nuffer et al, 2010; Tour et al, 2011). Curran e colaboradores (2006) sugerem que a adsorção de proteínas na superfície sobre a qual as células são cultivadas desempenha um papel importante no potencial de diferenciação de CTM humanas. Além disso, estímulos externos, tal como a mecânica do ambiente, podem intervir ou até mesmo se sobrepor aos sinais presentes na cultura (Thorpe et al, 2012). Estas observações reportam aspectos relevantes constantes nos estudos dos cultivos celulares tridimensionais.

Todas as CTAD demonstraram boa capacidade de adesão aos biomateriais testados. Após 3 horas de incubação, em média, 81,3% das células permaneciam aderidas à matriz (Figura 3).

Na associação das CTAD com os biomateriais, na maior concentração avaliada ( $5 \times 10^4$  células/matriz), a aderência foi, em termos gerais, maior (88%, 87% e 92%, respectivamente para hCTAD, cCTAD e mCTAD) do que quando comparada à menor concentração testada,  $10^4$  células/matriz (74%, 77% e 82%, respectivamente).

O potencial de adesão das células aos biomateriais mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos cujas matrizes foram previamente pré-incubadas (PC, *pre-coating*) ou não (D, *dry*) com meio de cultura normal suplementado com 10% de SFB (Figura 3). De modo geral, a pré-incubação das matrizes reduz a capacidade de aderência das CTAD ao biomaterial, em relação à condição de associação a seco. Todavia, a associação de cCTAD e hCTAD, na menor concentração testada ( $10^4$  células/matriz), com o colágeno não mostrou diferenças estatisticamente quanto a esta condição de pré-tratamento do biomaterial.

Na avaliação da proliferação celular, comparamos CTAD associadas aos biomateriais (3D, tridimensionais) e CTAD cultivadas em condições convencionais de cultura (2D), semeadas na mesma concentração. Para células humanas, em ambas as concentrações, o índice de proliferação celular foi menor quando as hCTAD eram associadas aos biomateriais (condição 3D) do que quando cultivadas em condições convencionais (2D) (Figura 4). Via de regra, as diferenças observadas são estatisticamente significativas, à exceção das hCTAD na menor concentração ( $10^4$  células/matriz) associadas ao OPLA, após pré-incubação. Estas diferenças são mais evidentes quando as condições de cultivo (2D x 3D) são comparadas na maior concentração ( $5 \times 10^4$  células/matriz) (Figura 4B).

As CTAD caninas associadas ao OPLA e ao fosfato de cálcio demonstraram maior índice proliferativo do que aquelas cultivadas em sistemas convencionais (2D). Estas diferenças são estatisticamente significativas para ambas as concentrações de semeadura inicial ( $10^4$  e  $5 \times 10^4$  células/matriz). As cCTAD cultivadas sobre matrizes de colágeno mostraram um comportamento oposto: o índice de proliferação das células na condição 3D foi menor do que aquele avaliado na condição 2D.

A taxa de proliferação de CTAD murinas demonstrou ser maior quando as células são associadas aos biomateriais (grupos 3D) do que quando cultivadas de acordo com o sistema convencional (2D). A diferença é estatisticamente significativa para ambas as concentrações. Esta diferença é

visivelmente maior quando compara mCTADsemeadas sobre matrizes secas (D) (3D-*dry*) e células mantidas em cultivos 2D.

Os resultados do presente estudo contribuem para o aporte de dados à engenharia de tecidos. Eles mostram que as CTAD das três espécies investigadas, quando adequadamente isoladas e expandidas, são capazes de adesão e de proliferação quando associadas a biomateriais a base de colágeno, de fosfato de cálcio e de OPLA. Desta forma, podem contribuir como importante ferramenta para esta nova tecnologia.

Todavia, a aplicação desta tecnologia dependerá fundamentalmente do estabelecimento de protocolos clínicos adequados. Aspectos relativos a melhores condições de aderência e de proliferação das células associadas aos biomateriais ainda deverão ser melhores explorados. De acordo com os dados apresentados acima, a densidade celular parece desempenhar um papel importante neste sentido. As condições de pré-tratamento das matrizes também demonstraram exercer influência sobre a associação das células com os biomateriais.

Por fim, as diferenças observadas no comportamento entre as hCTAD, cCTAD e mCTAD sugerem que novos estudos possam implementar modelos experimentais, baseados em dados específicos, para diferentes espécies.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afanasyev BV, Elstner EE, Zander AR. **A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal concept.** Cell Therap & Transplant. 2009;1(3):35-8.
- Akhyari P, Minol P, Assmann A, Barth M, Kamiya H, Lichtenberg A. **Tissue Engineering von Herzklappen.** Chirurg. 2011;82:311-18.
- Arrigoni E, Lopa S, Girolamo L, Stanco D, Brini AT. **Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models.** Stem Cells. 2009;338:401-11.
- Black LL, Gaynor J, Gahring D, et al. **Effect of adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on lameness in dogs with chronic osteoarthritis of the coxofemoral joints: a randomized, double-blinded, multicenter, controlled trial.** Veter Ther. 2007;8(4):272-84.
- Black LL, Gaynor J, Adams C, et al. **Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs.** Veter Ther. 2008;9(3):192-200.
- Boxall SA, Jones E. **Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells.** Stem Cells Intern. 2012; in press.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. **Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation.** Methods. 2008;45:115-20.
- Caplan AI. **Mesenchymal stem cells.** J Orthop Res. 1991;9:641-50.
- Caplan AI. **Why are MSCs therapeutic? New data: new insight.** J Pathol. 2009;217:318-24.
- Chan G, Mooney DJ. **New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response.** Trends in biotech. 2008;26(7):382-92.



- Chen Y, Shao J-Z, Xiang L-X, Dong X-J, Zhang C-R. **Mesenchymal stem cells: A promising candidate in medicine regenerative.** Int J Biochem & Cell Bio. 2008;40:815-20.
- Cherubino M, Marra KC. **Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction.** Regenerative Medicine. 2009;4(1):109-19.
- Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, et al. **Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor.** Veter Res Commun. 2009;33:811-21.
- Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. **Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study.** Histochem Cell Biol. 2007;128:570-20.
- Curran JM, Chen R, Hunt JA. **Guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate.** Biomaterials. 2006;27:4783-93.
- Dahlgren LA. **Use of adipose derived stem cells in tendon and ligament injuries.** Proc. Amer. Coll. Veter. Surg. Symp. 2006; 150-1.
- Daley GQ, Scadden DT. **Prospects for stem cell-based therapy.** Cell 2008;132:544-8.
- Dicker A, Le Blanc K, Aström G, van Harmlen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Rydén M. **Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue.** Exper Cell Res. 2005;308:283-90.
- Dormer NH, Singh M, Wang L, Berkland CJ, Detamore MS. **Osteochondral Interface Tissue Engineering using Macroscopic Gradients of Bioactive Signals.** An Biomed Engin. 2010;38(6):2167-82.

- 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.** Cryotherapy. 2006;8(4):315-17.
- Ea H-K, Uzan B, Rey C, Lioté F. **Ostacalcium phosphate crystals directly stimulate expression of inducible nitric oxide synthase through p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in articular chondrocytes.** Arthrit Res Ther. 2005;7:R915-26.
- Ea H-K, Monceau V, Camors E, Cohen-Solal M, Charlemagne D, Lioté F. **Annexin 5 overexpression increased articular chondrocyte apoptosis induced by basic calcium phosphate crystals.** Ann Rheum Dis. 2008;67:1617-25.
- Endres M, Huttmacher DW, Salgado AJ, Kaps C, Ringe J, Reis RL, Sittlinger M, Brandwood A, Schantz JT. **Osteogenic Induction of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells in novel Synthetic Polymer-Hydrogel Matrices.** Tissue Engin. 2003;9(4):689-702.
- Eslaminejad MRB, Taghiyar L, Dehghan MM, Falahi F, Mehrjerdi HK. **Equine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, differentiation and culture optimization.** Iran Journ Veter Res. (Shiraz Uni). 2009;10(1-26):1-11.
- Gaiba S, França LP, França JP, Ferreira LM. **Characterization of human adipose-derived stem cells.** Acta Cirurgica Brasileira. 2012;27(7):471-76.
- Giordano A, Galderisi U, Marino IR. **From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells.** J Cell Physiol. 2007;211(1):27-35.
- Golipoor Z, Kashani IR, Akbari M, Hassanzadeh G, Malek F, Mahmoudi R. **Differentiation of adipose-derived stem cells into Schwann cell phenotype in comparison with bone marrow stem cells.** Iran J Bas Medic Sci. 2010; 13(3):76-84.

- Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, Gimble JM. **Clonal Analysis of the Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Adult Stem Cells**. J Cell Physiol. 2006; 206:229-37.
- Hee CK, Jonikas MA, Nicoll SB. **Influence of three-dimensional scaffold on the expression of osteogenic differentiation markers by human dermal fibroblasts**. Biomaterials. 2006; 27:875-84
- Helsen JA, Missirlis Y. **The perfect Human Machine**. In Helsen JA, Missirlis Y. **Biomaterials - a Tantalus Experience. (Biological and Biomedical Physics, Biomedical Engineering Series)**. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, pp. 1-18.
- Hench LL. **Biomateriais: uma introdução**. In Orefice RL, Pereira MM, Mansur HS. **Biomateriais - Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006, pp. 1-7.
- Hernández BP. **Isolation, culture and characterization of mesenchymal stem cells from adipose tissue**. Av Diabetol. 2008;24(2):138-42.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. **Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy Position statement**. Cryotherapy. 2005;7(5):393-95.
- Hu J, Zhu Q-T, Liu X-L, Xu Y-b, Zhu J-K. **Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogeneic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells**. Exper Neurol. 2007;204:658-66.
- Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. **Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair**. Bone. 2006;39:678-83.
- Machado JLM, Giehl IC, Nardi NB, Santos LA. **Evaluation of Scaffolds based on  $\alpha$ -Tricalcium Phosphate Cements for Tissue Engineering Applications**. IEEE Transact Biomedic Engin. 2011;58(6):1814-19.

- Marappagounder D, Somasundaram I, Sankaran R, Viswanathan P, Gnanasekaran SK, Vipparala V, Dorairaj S, Mayakesavan B. **Characterization of Human Adipose Tissue Derived Hematopoietic Stem Cell, Mesenchymal Stem Cell and Side Population Cells.** Int J Biol. 2010;2(1):71-8.
- Meirelles LS, Chagastelles PC, Nardi NB. **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues.** J Cell Sci. 2006;119(Pt 11):2204-13.
- Meirelles LS, Caplan AI, Nardi NB. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** Stem Cells. 2008;26(9):2287-99.
- Meirelles LS, Nardi NB. **Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.** Front Biosci. 2009;14:4281-98.
- Moreno-Navarrete JM, Fernández-Real JM. **Adipocyte Differentiation.** In SymondsME (ed). **Adipose Tissue Biology.** New York: Springer, 2012, pp. 17-38.
- Nardi NB. **All the adult stem cells, where do they all come from? An external source for organ-specific stem cell pools.** Med Hypotheses. 2005;64(4):811-7.
- Nardi NB, Meirelles LS. **Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization.** In Wobus AM, Boheler KR. **Handbook of Experimental Pharmacology, Vol 174. Stem Cells.** Berlin: Springer Verlag, 2006, pp. 249-82.
- Nardi NB, Camassola M. **Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells.** In Vemuri MC, Chase LG, Rao MS (ed). **Methods Mol Biol., Vol 698. Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications.** New York: Springer, 2011, pp. 151-60.
- Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. **Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue.** Tissue Eng. 2003;9(4):733-44.

- Nuffer JH, Siegel RW. **Nanostructure-Biomolecule Interactions: Implications for Tissue Regeneration and Nanomedicine.** Tissue Eng (Part A). 2010;16(2):423-30.
- Orbay H, Tobita M, Mizuno H. **Mesenchymal stem cells isolated from adipose and other tissues: basic biological properties and clinical applications.** Stem Cells Internat. 2012;in press.
- Orsi VV, Collares MVM, Nardi NB, et al. **Osso liofilizado bovino não-desmineralizado com células-tronco mesenquimais para engenharia tecidual: estudo experimental em sítio heterotópico.** Rev Soc Bras Cir Craniomaxilofac. 2007;10(4):133-9.
- Owen M. **Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system.** In Peck WA. **Bone and mineral research.** New York: Elsevier, 1985, pp. 1-25.
- Payushina OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. **Mesenchymal Stem Cells: Sources, Phenotype and Differentiation Potential.** Biol Bullet. 2006;33(1):2-18.
- Pawitan JA. **Prospect of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in regenerative medicine.** Cell & Tissue Transplant & Therap. 2009;2:7-9.
- Pei M, Li JT, Shoukry M, Zhang Y. **A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering.** Eur Cells Mater. 2011;22:333-43.
- Pratheesh MD, Dubey PK, Nath A, et al. **Mesenchymal stem cells and its characterization.** Vet. World. 2011;4(12):571-74.
- Raabe O, Shell K, Würtz A, Reich CM, Wenish S, Arnhold S. **Further insights into the characterization of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.** Veter Res Commun. 2011;35:355-65.
- Rodriguez A-M, Elabd C, Amri Ez-Z, Ailhaud G, Dani C. **The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** Biochemie. 2005;87:125-28.

- Romao JM, Ji W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL. **MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis**. *Exper Biol Medic*. 2011;236:997-1004.
- Russo FP, Parola M. **Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair**. *Cytotherapy*. 2011;13(2):135-44.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. **Comparison of Human Stem Cells derived from various Mesenchymal Tissues**. *Arthrit & Rheum*. 2005;52(8):2521-29.
- Sharifi AM, Ghazanfari R, Tekiyehmaroof N, Sharifi MA. **Isolation, Cultivation, Characterization and Expansion of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell for Use in Regenerative Medicine**. *IJHOSCR*. 2012;6(1):1-5.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S. **Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis**. *Bone*. 2001;29:532-39.
- Sorrell JM, Baber MA, Traktuev DO, March KL, Caplan AI. **The creation of an in vitro adipose tissue that contains a vascular-adipocyte complex**. *Biomaterials*. 2011;32:9667-76.
- SpencerND, ChunR, VidalMA, GimbleJM, LopezMJ. **In vitro expansion and differentiation of fresh and revitalized adult canine bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells**. *Veter Journ*. 2012;191:231-39.
- Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. **Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells**. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
- Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM. **Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds**. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012;18(4):246-57.

- Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction.** Equine Vet J. 2007; 39(2):172-80.
- Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. **Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair.** Exp Biol Med (Maywood). 2009;234(1):1-9.
- Thorpe JD, Buckley CT, Steward AJ, Kelly DJ. **European Society of Biomechanics S.M. Perren Award 2012: The external mechanical environment can override the influence of local substrate in determining stem cell fate.** J Biomech. 2012;45:2483-92.
- Tour G, Wendel M, Tcacencu I. **Cell-Derived Matrix enhance Osteogenic Properties of Hydroxyapatite.** Tissue Eng (Part A). 2011;17(1&2):127-37.
- Vater C, Kasten P, Stiehler M. **Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells.** Acta Biomaterialia. 2011;7:463-77.
- Wang Y, Zhao Z, Ren Z, Zhao B, Zhang L, Chen J, Xu W, Lu S, Zhao Q, Peng J. **Recellularized nerve allografts with differentiated mesenchymal stem cells promote peripheral nerve regeneration.** Neurosci Lett. 2012;514:96-101.
- Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. **Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery.** In **StemBook (www.stembook.org)**, 2008, pp. 1-18.
- Witkowska-Zimny M, Walenko K. **Stem cells from adipose tissue.** Cell Mol Biol Lett. 2011;16(2):236-57.
- Wu X, Liu X, Wang S. **Implantation of biomaterials as an efficient method to harvest mesenchymal stem cells.** Exp Biol Med. 2011;236(12):1477-84.
- Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. **Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue and muscle.** Cell Tissue Res. 2007;327:449-62.

- Zhang Y, Luo H, Zhang Z, Lu Y, Huang X, Yang L, Xu J, Yang W, Fan X, Du B, Gao P, Hu G, Jin Y. **A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells.** *Biomaterials*. 2010;31:5312-24.
- Zhou H, Kaplan T, Li Y, Grubisic I, Zhang Z, Wang PJ, Eisen MB, Tjian R. **Dual functions of TAF7L in adipocyte differentiation.** *eLife*. 2013;2:e00170.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. **Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
- Zuk PA. **The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead.** *Mol Biol Cell*. 2010;21:1783-87.