



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS BIOLOGIA CELULAR**

RAFAEL VILAR SAMPAIO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA MULTIPOTÊNCIA DE
CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO DE
BOVINOS E BUBALINOS**

**Belém
2011**

RAFAEL VILAR SAMPAIO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA MULTIPOTÊNCIA DE
CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
BOVINOS E BUBALINOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociência e Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

**Belém
2011**

RAFAEL VILAR SAMPAIO

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA MULTIPOTÊNCIA DE
CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE
BOVINOS E BUBALINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia Celular – Área de concentração Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular à comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi (Orientador)
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Prof^a. Dr^a. Edna Cristina Santos Franco
Instituto de Ciências Biológicas - UFPA

Dr. Igor Schneider
University of Chicago, U.C., Estados Unidos

Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda
Instituto de Ciências Biológicas – UFPA (Suplente)

Belém, 16 de Junho de 2011

Sampaio, Rafael Vilar;

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA MULTIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO DE BOVINOS E BUBALINOS. Belém, Pará, UFPA / ICB, 2011.

x, 44 f

Dissertação: Mestre em Biologia Celular

1. Células-tronco. 2. Bovinos. 3. Bubalinos. 4. Tecido Adiposo. I. Universidade Federal do Pará / Instituto de Ciências Biológicas. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, que sempre me guiou e carregou quando eu achava estar sozinho;

A minha família, maior motivação para conseguir qualquer objetivo;

A todos os amigos, sempre do lado não importando a situação ou a distância;

Ao meu orientador Otávio Ohashi, por todas as oportunidades, pelo conhecimento e pelo projeto.

Ao meu orientador Moysés Miranda, pelas idéias, conselhos e exemplo de pessoa.

A minha orientadora Simone Damasceno, por ter acreditado e confiado em meu trabalho desde o início, apoiando sempre.

Ao meu companheiro de trabalho e amigo Daví César, que dividiu comigo as responsabilidades do projeto.

Aos amigos do Laboratório de FIV, Thiago, Nathália, Mohamed (André), Bruno, Chamusca (Renato), Marcela e Priscilinha, pelo apoio direto e indireto ao trabalho, e pela amizade além do laboratório.

Aos amigos do LMMD, Marquinhos, Manfredini (Juliano), Martini (Fabiana), Tiago, Rodrigo, Lília e Dr. Carlos Ambrósio que sempre deram apoio incondicional em todos os momentos;

Ao Dr. Flávio Meirelles, pelas portas abertas de seu laboratório e apoio ao projeto.

Aos amigos da UNOPAR, Samuca, Paulinho, Renato, Eriko, Pinetti, Guta, Rachel, Paulo Adona, Zé Padilha, Vanieuzza, Sr. Sebastião, D. Bete, e Silvana, pela ajuda de diversas formas.

À Universidade Norte do Paraná, pelo apoio técnico e financeiro;

À Universidade Federal do Pará pela formação e estrutura;

A SOCIPE, pela disponibilidade de material;

À FAPESPA e Vale, pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq, pelo fomento ao projeto que gerou todo o trabalho.

EPÍGRAFE

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”

Albert Einstein

RESUMO

Células-tronco adultas são conhecidas por seu potencial e plasticidade para se diferenciar em vários tipos celulares diferentes (multipotência), tendo assim, implicações para a terapia celular, bem como biotecnologias reprodutivas. No presente trabalho relatamos o isolamento e caracterização de células-tronco mesenquimais (CTM) derivadas de tecido adiposo de bovinos e bubalinos. As células foram isoladas por digestão enzimática da biópsia do tecido adiposo e cultivadas por pelo menos dez passagens *in vitro*, dando apoio a sua capacidade proliferativa. Estas células também foram submetidas à caracterização imunofenotípica para visualizar a presença de marcadores de CTM, CD90, CD105 e CD79, e ausência de marcadores de Células-Tronco Hematopoiéticas, CD45, CD34 e CD73. A fim de provar a sua multipotência, as células foram induzidas a diferenciação em três tipos de células diferentes e coradas com corantes tecidos-específicos (condrogênico-Alcian Blue, osteogênica-Alizarina Red e adipogênica-Oil-Red O) para confirmar a sua diferenciação em condrócitos, ostoblastos e adipócitos. Nossos resultados indicam que o tecido adiposo de bovinos e bubalinos podem ser usados como fonte de células-tronco mesenquimais (CTM), transformando-as em uma opção interessante de modelos animais para terapia celular e medicina regenerativa. Além disso, essas células podem ser relevantes para a biotecnologia reprodutiva desde o uso de CTM de doadoras nucleares, pois têm sido associadas com um aumento nas taxas de desenvolvimento de embriões clonados.

Palavras-Chaves: Células-Tronco; Bovinos; Bubalinos; Tecido Adiposo

ABSTRACT

Adult stem cells are known for their potential and plasticity to differentiate into several different cell types (multipotency), which has implications for cell therapy as well as reproductive biotechnologies. In the present work we report isolation and characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue of cattle and buffaloes. Cells isolated by enzymatic digestion of adipose-tissue biopsy were grown for at least ten passages *in vitro* giving support to of their proliferative capacity. These cells were also subjected to immunophenotypic characterization to visualize the presence, of CD90, CD105 and CD79, and absence, of CD45, CD34 and CD73, wich are positive and negative markers of MSCs, respectively. In order to determine their multipotency, the cells were induced to differentiate into three different cell types and stained with tissue-specific dyes (Chondrogenic-Alcian Blue, Osteogenic- Alizarin Red and Adipogenic-Oil-Red O) to ensure their differentiation into chondrocytes, ostoblasts and adipocytes. Our results indicate that adipose tissue of cattle and buffaloes can be used as a source of mesenchymal stem cells (MSCs), turning them into an interesting option of animal models for cell therapy and regenerative medicine. Additionally, these cells may be relevant for reproductive biotechnology since the use of MSCs as nuclear donors has been linked to an increase in the developmental rates of cloned embryos.

Keywords: Stem Cell; Bovine; Bubaline; Adipose Tissue

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	Cluster of Differentiation
CT	Células-Tronco
CTA	Células-Tronco Adultas
CTE	Células-Tronco Embrionárias
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
CTDTA	Células-Tronco Derivadas do Tecido Adiposo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DMEM	DUBECO Modified Epidermal Medium
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanate
HE	Hematoxilina -Eosina
IBMX	Isobutylmethylxanthine
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFA	Paraformaldeído
RNAse	Enzima de Ácido Ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
TN	Transferência Nuclear
TNCS	Transferência Nuclear de Células Somáticas
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	4
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 CÉLULAS-TRONCO EMRIONÁRIAS E FETAIS.....	5
2.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS	7
2.3 PERFIL DAS CÉLULAS-TRONCO	8
2.4 CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSO	11
2.5 CTDTA COMO DOADORAS DE NÚCLEO.....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CTDTA	18
3.2 CRESCIMENTO CELULAR	19
3.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA	20
3.4 DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i>	21
3.5 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	29
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1 INTRODUÇÃO

Muito se fala hoje em dia sobre células-tronco (CT), embora estejam presentes no dia-a-dia, com exceção dos pesquisadores, poucas pessoas conhecem realmente o que são e quais suas possíveis aplicações. Essa falta de conhecimento faz com que se crie toda uma “mística” em torno dessas células, ainda que tenham um alto potencial terapêutico e diversas possibilidades científicas, pesquisas são necessárias para conhecê-las melhor (Rehen e Paulsen, 2007).

Usando o termo “stem cell” (células-tronco em inglês) na base de dados do Pubmed resulta em 176461 artigos demonstrando o interesse científico internacional. No Brasil, esse interesse também é grande, ao procurar o mesmo termo na opção “Brasil” no banco de dados da Scielo, o maior banco sul-americano, encontramos 316 artigos.

Na tentativa de caracterizar uma célula-tronco, Gimble *et al.* (2003), explicaram que CT são todas as células que possuem a capacidade de auto-renovação e capacidade de diferenciação em linhagens de diferentes tipos celulares. Para aplicações médicas, essas células devem satisfazer critérios como: ser encontrada em quantidades abundantes; possibilidade de serem coletadas por um procedimento minimamente invasivo; poderem ser diferenciadas por múltiplos caminhos de linhagens celulares de uma forma reproduzível e serem seguras e eficazes para um transplante autólogo ou alogênico (Gimble *et al.*, 2003).

Essa capacidade de se manter indiferenciada e gerar outros tipos celulares é o que as tornam diferentes das outras células, pois mesmo em adultos, as CT ficam quiescentes, estado de indiferenciação, podendo ou não gerar outros tipos celulares.

Diferente das células já diferenciadas, que entram em senescência, estado irreversível do crescimento celular (Collado *et al.*, 2007; Kawai *et al.*, 2010).

Mesmo entre as CT, existem diferenças quanto a origem e o potencial de diferenciação. Por exemplo, as CT em estágios embrionários iniciais (CTE) dão origem a todos os tecidos do corpo adulto e por isso são chamadas de “pluripotentes”. CT em alguns tecidos adultos, envolvidas em reposição tecidual e reparo, usualmente dão origem a somente tipos celulares já presentes no próprio tecido do qual elas são derivadas, por exemplo, CT da medula óssea dão origem a células sanguíneas (Vats *et al.*, 2002). CT da medula óssea, por exemplo, dão origem à células da linhagem hematopoiética e esse tipo de célula-tronco adulta é chamado de “multipotente” (Passier e Mummery, 2003).

No entanto, essa capacidade de gerar diversos tipos celulares tanto *in vivo* como *in vitro*, bem como os mecanismos que modulam a diferenciação em um tipo celular específico, ainda são muito discutidos. O grau de “plasticidade”, capacidade de gerar outro tipo de tecido, permanece alvo de muitas discussões e pesquisas (Bjornson *et al.*, 1999; Vats *et al.*, 2002).

Apesar das CTE serem classificadas como totipotentes, pois geram células dos três folhetos embrionários, essa propriedade requer certos cuidados tecnológicos para ser aplicada na engenharia de tecidos (Poulsom *et al.*, 2002). Além disso, esse tipo celular enfrenta sérias barreiras éticas em sua pesquisa, pois é necessária a morte de embriões para o seu isolamento (Diniz e Avelino, 2009). Em contrapartida, as CT adultas, multipotentes, aparecem como opção, já que células do próprio indivíduo podem ser usadas para seu tratamento (Poulsom *et al.*, 2002).

Por isso, as CT adultas, como as células-tronco mesenquimais (CTM), representam uma fonte de células multipotentes, que são células progenitoras das células de tecidos específicos (Pittenger *et al.*, 1999). Por exemplo, células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) são células fibroblastóides capazes de apoiar tanto a hematopoiese quanto de se diferenciar em adipócitos, fibroblastos, mioblastos, condrócitos e osteoblastos (Zuk *et al.*, 2002). Além disso, embora CT tenham origem mesodérmica, há dados mostrando que eles também são capazes de transdiferenciar em células neurais (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000). Apesar deste potencial limitado de diferenciação em relação às CTE, elas têm atraído muito interesse a partir dos estudos em pesquisa básica e aplicada envolvendo sua multipotência. CTDTA podem ser facilmente obtidas em grandes quantidades a partir do tecido adiposo de indivíduos adultos e cultivadas *in vitro*, tornando viável a sua utilização para aplicações a jusante, como por exemplo, os transplantes autólogos (Mccoy *et al.*, 2008; Gimble e Floyd, 2009).

Comparada com a medula óssea, o que representa outra importante fonte de CTM, o isolamento da gordura tem a vantagem de ser menos invasivo e resultar em maiores quantidades de CT (Zuk *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2005). Além disso, o tecido adiposo resulta em culturas *in vitro*, composta quase exclusivamente de CTM, enquanto a medula óssea resulta em culturas de células menos purificadas, uma vez que é a principal fonte de células hematopoéticas (Zhu *et al.*, 2008).

Além da importância das CTM em terapias com células humanas, elas são uma ferramenta extremamente valiosa na ciência básica e na produção de gado, uma vez que a sua utilização como doadoras de núcleos pode aumentar a eficiência da transferência nuclear de células somáticas (TNCS) (Kato *et al.*, 2004; Faast *et al.*, 2006).

No entanto, poucos são os trabalhos com animais de grande porte, como bovinos e bubalinos, pois a maioria das pesquisas com CT são realizadas em humanos, roedores, felinos e suínos (Bosnakovski *et al.*, 2005). Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que o tecido adiposo de bovinos e bubalinos pode ser uma nova fonte de CTM.

1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo Geral

Estabelecer a técnica de isolamento, caracterização e manutenção do potencial de diferenciação em diversos tecidos (multipotência) de células-tronco adultas derivadas do tecido adiposo de bovinos e bubalinos, visando futuramente a sua utilização na técnica de transferência nuclear animal.

1.1.3 Objetivos Específicos

- Estabelecer um protocolo de colheita de tecido adiposo e isolamento de células-tronco adultas obtidas de bovinos e bubalinos.
- Confirmar o isolamento das CT por meio da análise de marcadores específicos, mediante o uso de imuno-fluorescência, bem como, através da indução da diferenciação das CT isoladas nas linhagens: osteogênica, condrogênica e adipogênica.
- Caracterizar a eficiência da diferenciação das CT, mediante o uso de marcadores teciduais específicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As células-tronco (do inglês “stem cells”) ou células mãe foram descritas pela primeira vez por Friedenstein *et al.* (1974), os quais caracterizaram estas células como células fibroblastóides capazes de formar colônias (fibroblastos formadores de colônias: CFU-f). Tais células podem ser divididas em células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco fetais (CTF) e células-tronco adultas (Schwindt *et al.* 2005), no entanto, iremos focar nas CT adultas, que são as células alvo deste trabalho.

3.1 CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS E FETAIS

As CTE são ditas pluripotentes por terem a capacidade de gerar todos os diferentes tipos celulares. Elas podem ser removidas da massa celular interna do embrião, no 4° ao 7° dia, dependendo da espécie, após a fecundação, no período em que é denominado de blastocisto. Estas células retiradas da massa celular interna podem ser cultivadas, tornando-se uma linhagem de célula-tronco embrionária. Também são conhecidos outros tipos de células pluripotentes, como as células germinais embrionárias, encontradas em uma fase mais avançada do desenvolvimento fetal (5° a 10° semana), e as células obtidas por transferência de núcleo somático em adultos (Zago e Covas, 2006).

Essas células possuem a capacidade de gerar os tecidos derivados dos três folhetos embrionários e, quando cultivadas em condições apropriadas, essas dão origem a células que se proliferam e se renovam indefinidamente (Odorico *et al.*, 2001). Como envolve a “morte” de embriões, essa biotecnologia enfrenta grande resistência por questões éticas, sendo proibida em alguns países. Apesar dessa dificuldade, vários países vêm permitindo a pesquisa com CTE. Como mostraram

Diniz e Avelino (2009), a tendência internacional é reconhecer a legitimidade ética da pesquisa científica com células-tronco embrionárias (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos países estudados quanto à regulação de pesquisa com células-tronco embrionárias. Fonte: Adaptado de Diniz e Avelino, 2009.

1-Países que permitem a pesquisa com CTE com linhagens importadas.	2- Países que permitem a pesquisas com linhagens nacionais e importadas	3- Países que não permitem pesquisas com CTE.
República Federal da Alemanha	Canadá Comunidade da Austrália Confederação Suíça Coréia Estado de Israel Estados Unidos da América Estados Unidos Mexicanos Federação Russa Japão Reino da Dinamarca Reino da Espanha Reino da Noruega Reino da Suécia Reino dos Países Baixos Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte República da África do Sul República da Finlândia República da França República da Índia República de Cingapura República de Portugal República Islâmica do Irã República Popular da China	República Italiana

No Brasil, a pesquisa com CTE foi aprovada pela Lei n.º 11.105 de 24 de março de 2005, conhecida como Lei de Biossegurança. O artigo 5º da lei permite, com restrições, a manipulação de embriões humanos, produzidos por fertilização *in vitro* para coleta de CT. Posteriormente, foi regulamentada pelo Decreto n.º 5.591, de 22 de novembro de 2005, que definiu como “embriões inviáveis” aqueles com alterações genéticas comprovadas que impedem o desenvolvimento por ausência de clivagem (Diniz e Avelino, 2009).

Já as CTF, assim como as adultas, não se diferenciam espontaneamente e ainda apresentam outras vantagens: estão presentes em abundância por todo o organismo em desenvolvimento e possuem maior potencial de auto-renovação. Teoricamente, pode-se isolar CTF de qualquer tecido, desde que a extração ocorra durante a formação destes tecidos no período fetal. No entanto, assim como as CTE, há importantes questões éticas envolvidas na extração de tais células em humanos (Schwindt *et al.* 2005).

Além de serem livres de questões éticas, bovinos e bubalinos possuem um grande apelo econômico, já que, segundo o Ministério da Agricultura, a bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, além disso, o rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos: as cadeias produtivas da carne e do leite. O valor bruto da produção desses dois segmentos é estimado em R\$ 67 bilhões, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros.

O Ministério da Agricultura destaca também a importância da bubalinocultura, pois está se desenvolvendo no país como uma alternativa rentável e saudável. Isso porque o búfalo se adapta facilmente em qualquer ambiente. A produção e o consumo de leite de búfalo vêm crescendo em função da demanda por alimentos como queijo e manteiga. Os elevados teores de gordura e sólidos totais no leite de búfala aumentam o rendimento na fabricação dos derivados em relação ao leite de vaca.

Em relação a exportação, o Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior explica que o Brasil hoje é o maior exportador mundial de carne bovina, maior exportador mundial de carne de aves; e o quarto maior exportador mundial de carne suína, desta forma, atingindo a marca histórica de US\$ 11 bilhões

em exportações de carnes em 2007. O complexo *carnes* é o segundo item da pauta de exportações do agronegócio brasileiro, com a tendência de, em breve, se tornar o líder em vendas para o exterior. Hoje fica atrás apenas do complexo *soja*. Sobretudo, no âmbito social, o complexo *carnes* desempenha um importantíssimo papel e já é responsável pelo maior número de empregos no agronegócio brasileiro, gera mais de 4 milhões de postos de trabalho (20% do total da nossa agropecuária).

Já a bubalinocultura tem um grande impacto sobre o Pará, pois o rebanho brasileiro está estimado em torno de 1,15 milhão de bubalinos, sendo a região Norte, com 720 mil animais, a maior produtora do País, com destaque para o Pará, que responde por 39% do rebanho nacional. Em seguida aparecem o Nordeste e o Sudeste, com 135 e 104 mil cabeças, respectivamente.

3.2 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Embora apenas as células-tronco derivadas de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento sejam totipotentes, indivíduos adultos também mantêm células capazes de se diferenciar em vários tipos celulares (Passier e Mummery, 2003). Células-tronco adultas (CTA) são conhecidas por seu potencial e plasticidade em se diferenciar em vários tipos diferentes de células de um indivíduo (multipotência) (Bjornson *et al.*, 1999). Isto têm implicações importantes para muitas áreas da medicina, uma vez que podem ser utilizadas para terapia celular em humanos e animais. Teoricamente, terapias baseadas em CTA podem ser usadas para regenerar um tecido comprometido, restabelecendo sua função e até mesmo reverter a deficiência física do paciente (Karp e Leng Teo, 2009).

Bjornson *et al.* (1999) demonstraram que uma CTA derivada de um tecido altamente diferenciado e com limitada capacidade de proliferação pode seguir um

programa de diferenciação totalmente diverso se colocada em um ambiente adequado. Eles utilizaram CT neurais para gerar células sanguíneas geradas normalmente por CT hematopoiéticas da medula óssea. Sugeriram com isso que a reativação de programas genéticos silenciados não requer transferência nuclear e modificação do genoma. Hoje em dia já há evidências que as CTA têm capacidade de diferenciação maior do que se tinha previsto anteriormente. Essas células, portanto, entraram na discussão como uma alternativa a “destruição” de embriões.

3.3 PERFIL DAS CÉLULAS-TRONCO

As CT apresentam algumas características em comum dependendo de sua origem, tipo ou estado. Alguns termos são bem conhecidos, como plasticidade e pluripotência, mas alguns termos são tão novos que ainda nem possuem tradução para o português, como o termo “*stemness*”. Neste tópico, falaremos um pouco sobre o perfil dessas células.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) criou requisitos mínimos para caracterizar uma célula como sendo CTM. Esses requisitos são três: o primeiro é que as células devem ser isoladas de uma população de células mononucleares com base em sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico. Comparando, no caso da medula óssea, as células mesenquimais com as células hematopoiéticas, uma desvantagem deste método é uma possível contaminação da cultura com células hematopoiéticas e/ou a heterogeneidade celular com relação ao potencial de diferenciação; o segundo é que as proteínas de membrana CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que as proteínas CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressas em mais de 95% das células em cultura; o terceiro é que essas células

possam ser induzidas à diferenciação em tecido ósseo, cartilaginoso e adiposo (Horwitz *et al.*, 2005).

À microscopia de luz ou em contraste de fase, as CTM apresentam-se como células fibroblastóides alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e, citoplasma abundante. Também pode ser observado à microscopia eletrônica cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de polirribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (Tagami *et al.*, 2003).

As CTM, quando senescentes são bem características, apresentando-se grandes, largas, achatadas, proliferam-se lentamente e expressam uma β -galactosidade associada à senescência (Fehrer e Lepperdinger, 2005). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (Digirolamo *et al.*, 1999).

Quanto ao potencial de diferenciação, Smith (2006) classificou as CT em seu glossário: totipotência é vista nas células do zigoto e do meristema de plantas; pluripotência é observada em células capazes de formar linhagens celulares de todo o corpo, incluindo células germinativas, e alguns ou mesmo todos os tipos celulares extra-embrionárias, por exemplo, CTE; multipotência é uma característica de células que podem formar várias linhagens capazes de constituir um tecido inteiro, por exemplo, CT hematopoiéticas e mesenquimais; oligopotência é a capacidade de algumas células formarem duas ou mais linhagens dentro de um tecido, por exemplo, CT neurais, que pode criar um subconjunto de neurônios no cérebro; unipotência a capacidade presente em determinadas células de formar uma única linhagem, por exemplo, CT de espermatogônias.

O potencial de diferenciação está intimamente ligado à plasticidade das CT, por exemplo, CTE são conhecidas por possuírem a maior gama de potencial; visto que células pluripotentes são, essencialmente, capazes de dar origem a células encontradas em todas as três camadas germinativas do embrião e esta propriedade, juntamente com certos requisitos tecnológicos, tem permitido que CTE sejam usadas para projetar cepas de humanos, ratos, porcos e ovelhas (Poulsom *et al.*, 2002).

Lanza *et al.* (2009), em seu livro, explica o termo “*stemness*” relacionado a características moleculares. “‘Stemness’ se refere a processos moleculares comuns relacionados ao núcleo das CT com propriedades de auto-renovação e a geração de descendentes diferenciados. Apesar das CT possuírem diferentes microambientes celulares ou nichos que, por necessidade, têm diferentes demandas fisiológicas e, portanto, distintos programas moleculares, provavelmente existem certas características genéticas específicas e compartilhadas por todas as células-tronco”.

Bydlowski *et al.* (2009) descreveram que o grande problema na caracterização das CTM é que não há um marcador positivo definitivo para elas. Há uma gama ampla de marcadores positivos descritos, mas cada grupo de pesquisadores usa diferentes marcadores, nenhum deles específico ou exclusivo às estas células. Talvez as diferenças entre os estudos possam ser atribuídas a variações nos métodos de cultura ou ao estágio de diferenciação das células. De qualquer modo, sem marcadores definidos, os estudos *in vivo* das linhagens celulares tornam-se muito difíceis.

3.4 CÉLULAS-TRONCO DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é um tecido altamente complexo e é composto de adipócitos maduros, preadipócitos, fibroblastos, músculo liso, células endoteliais,

macrófagos/monócitos residentes (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003) e linfócitos (Caspar-Bauguil *et al.*, 2005). Assim como a medula óssea, o tecido adiposo é derivado do mesênquima, contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado e permite a extração de um grande volume de tecido com uma baixa morbidade. Baseado nisso, o tecido adiposo pode representar uma fonte de CTA e que pode ter uma grande utilidade em diversos campos da ciência e da medicina regenerativa (Rodriguez *et al.*, 2005).

Rodbell e Jones (1966) realizaram os primeiros trabalhos com o isolamento de células da gordura. Eles picaram gordura de ratos, lavaram para retirar células de origem hematopoiética e incubaram fragmentos do tecido com colagenase, centrifugando o material resultante, eles separaram a porção flutuante de adipócitos maduros do *pellet* da fração vascular estromal. A fração vascular estromal é composta de uma população heterogênea de células, incluindo células circulantes do sangue, fibroblastos, pericitos e células endoteliais bem como “pré-adipócitos” ou progenitores de adipócitos (Rodbell e Jones, 1966).

Zuk *et al.* (2001) mostraram a existência de CT da família das CTM no tecido adiposo e desde então vários grupos passaram a estudar essas células (CTDTA) que já provaram ter o potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico, condrogênico e miogênico (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002). Hoje em dia, estas células podem ser consideradas como uma das melhores fontes de CT para vários tipos de estudos clínicos, pela sua facilidade de isolamento e multipotência (Zhu *et al.*, 2008).

Com relação ao seu potencial terapêutico, já foram obtidas células semelhantes a cardiomiócitos (Planat-Benard *et al.*, 2004) e células endoteliais (Planat-Benard *et al.*, 2004) após a cultura de células estromais de tecido adiposo.

Além do mais, artigos reportando que CTDTA têm a capacidade de participar na regeneração muscular (Bacou *et al.*, 2004) e promover neovascularização (Planat-Benard *et al.*, 2004) após a sua transferência em modelos animais, dão suporte para o conceito de que o tecido adiposo é uma nova fonte de CT (Rodriguez *et al.*, 2005), podendo não originar, mas sim reservar estas células (Crisan *et al.*, 2008).

CTDA podem ser mantidas *ex vivo* utilizando-se um procedimento padrão (Rodriguez, *et al.*, 2005). Elas apresentam uma vasta capacidade de renovação *in vitro*, cariótipo diplóide normal, mantém a capacidade de sofrer diferenciação em muitos tipos celulares mesenquimais, como adipócitos, mesmo após grande período de expansão e suportam o procedimento de criopreservação sem perda da propriedade multipotencial (Rodriguez *et al.*, 2005).

Mais recentemente, Zhu *et al.* (2008) trabalhando com humanos, otimizaram um método de colheita destas células e no laboratório conseguiram mantê-las em estágio indiferenciado por cerca de 25 passagens celulares, confirmaram o seu grande potencial de diferenciação e chegaram a afirmar que se tratam de CT melhores que as obtidas a partir da medula óssea.

3.5 CTDTA COMO DOADORAS DE NÚCLEO

A clonagem animal envolve a transferência do núcleo de uma célula somática de origem embrionária (clonagem embrionária), fetal ou adulta (clonagem somática) para o interior de um ovócito maduro cujo material genético foi previamente removido com o embrião resultante sendo transferido para o útero de uma receptora (Wilmut *et al.*, 1997). Nos últimos 10 anos, desde o nascimento da ovelha Dolly, gerada a partir de uma célula diferenciada da glândula mamária (Wilmut *et al.*, 1997), animais clonados de células somáticas já foram gerados em 15 espécies

diferentes - bovinos, camundongos, cabras, ovelhas, porcos, coelhos, gatos, ratos, cavalos, mulas, cachorros, cervo, lobo, furões [ferrets] e mais recentemente em búfalos (Shi *et al.*, 2007).

Embora existam dificuldades em todas as espécies, algumas chamam mais atenção dada sua importância na aplicação médica como é o caso de primatas não-humanos, por exemplo, o macaco *Rhesus* cujo grupo de Mitalipov fez a primeira clonagem deste animal (Mitalipov *et al.*, 2007). A técnica utilizada foi a clonagem terapêutica, pois produziram linhagens de CTE a partir de embriões clonados, mostrando que podem servir como modelo para terapias em humanos (Byrne *et al.*, 2007).

Sabe-se que o oócito possui todos os elementos necessários para reprogramar o núcleo de uma célula especializada, como um fibroblasto em uma célula indiferenciada e mais que isso, a eficiência deste processo depende, entre outros fatores, do nível da diferenciação celular. Já foi relatado que, quando blastômeros provenientes de embriões (estágio 32-64 células) são utilizados como doadores nucleares, as taxas de desenvolvimento são muito mais elevadas do que aquelas obtidas quando as células adultas são empregadas na transferência nuclear (TN) (Cheong *et al.*, 1993; Hiiiragi e Solter, 2005; Ono e Kono, 2006).

Tipicamente a eficiência da clonagem somática a partir de células adultas, medida como a proporção de proles viáveis em função do número de embriões clonados transferidos para receptoras, gira em torno de 1-5% (Heyman, 2005).

Durante a diferenciação celular, o genoma somático adquire modificações altamente especializadas no DNA e nas proteínas associadas ao DNA, sendo que tais modificações, chamadas de epigenéticas, são responsáveis pelo padrão espaço-temporal dos genes de uma determinada célula de um determinado tecido

(Francastel *et al.*, 2000; Muller e Leutz, 2001). Essas mudanças incluem o aparecimento da metilação do DNA, trimetilação de histonas e outras modificações inativas da cromatina.

Assim, foi levantada a hipótese de que o uso de CTDTA doadoras de núcleo podem representar um aumento nas taxas de NT , pois são menos diferenciadas (ou pelo menos ainda abrigam fatores tróficos) que outras células somáticas comumente utilizadas para esta finalidade (como as células da granulosa e fibroblastos) (Faast *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2007). Como CTDTA podem ser facilmente isoladas e cultivadas *in vitro*, como os fibroblastos, sua utilização não exigiria mudanças no protocolo de transferência nuclear padrão ou representaria custos adicionais à técnica (Rodriguez *et al.*, 2005).

Essa hipótese é suportada principalmente por três linhas de evidência oriundas de experimentos com clonagem de camundongos nos quais foram utilizados: 1) blastômeros em estádios progressivamente mais avançados (Cheong *et al.*, 1993; Hiiragi e Solter, 2005; Ono e Kono, 2006); 2) CTE (Rideout *et al.*, 2000; Eggan *et al.*, 2001; Humpherys *et al.*, 2001); 3) e células somáticas permanentemente diferenciadas como linfócitos (Hochedlinger e Jaenisch, 2002; Inoue *et al.*, 2005) e neurônios (Wakayama *et al.*, 1998; Yamazaki *et al.*, 2001; Eggan *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Makino *et al.*, 2005). Estas comparações têm demonstrado que o uso de blastômeros, em estádios iniciais, resulta em uma eficiência muito maior de clonagem em comparação as células somáticas (Hiiragi e Solter, 2005). Além do mais, quando comparada com outras técnicas de reprodução assistida, como a fecundação *in vitro*, a clonagem se destaca pela sua baixa eficiência em torno de 5% (Heyman, 2005). O que indica um claro efeito da

dificuldade de reprogramação nuclear em função do grau de diferenciação celular (Figura 1).

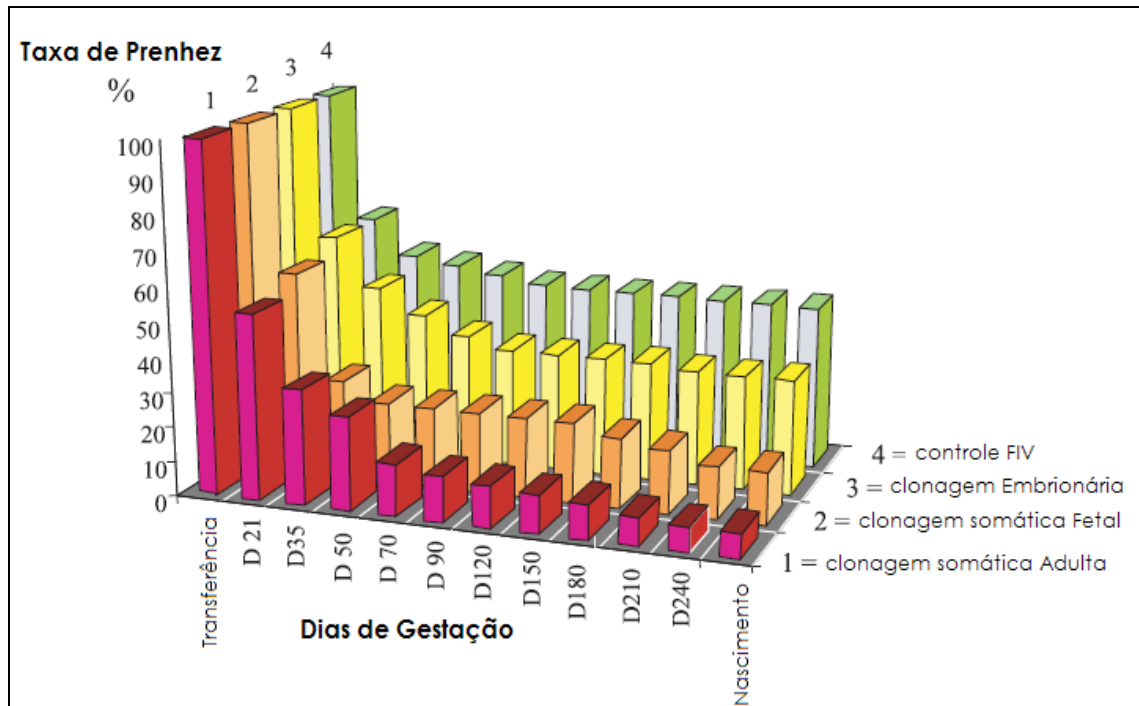


Figura 1. Comparação entre os tipos de clonagem e a fecundação *in vitro* com relação ao estabelecimento e a progressão da gestação. Fonte :Adaptado de Heyman, 2005.

Faast *et al.*, (2006) sugeriram que o uso de células menos diferenciadas, por serem mais facilmente reprogramáveis, poderia aumentar a eficiência da técnica em comparação ao uso de células mais diferenciadas. Kato *et al.* (2004) foram os pioneiros na tentativa de utilização de CTA como doadoras de núcleo na técnica de clonagem. Os autores isolaram CTA, CTM bovinas da medula óssea e mostraram que estas células foram reprogramadas pelo citoplasma oocitário, apresentando um índice elevado de desenvolvimento embrionário e de indivíduos a termo.

Posteriormente, foi demonstrado que embriões clonados derivados de CTA de bovinos e suínos resultaram em alta taxa de desenvolvimento pré-implantacional quando comparados aos embriões clonados de fibroblastos adultos (Colleoni *et al.*,

2005). Além disso, foi demonstrado que as CT da medula óssea suína podem ser modificadas geneticamente de forma transitória ou permanente quando tratadas com vetores virais e não virais o que as torna atrativas para modelos de doenças e para a produção de animais transgênicos (Colleoni *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2006).

Faast *et al.* (2006) isolaram células mesenquimais da medula óssea de suínos e as utilizaram como doadoras de núcleo para a clonagem. Neste estudo os autores relataram que apesar de não ter havido diferença da taxa de clivagem entre embriões clonados de CTM e de fibroblastos (grupo controle), a produção de blastocistos foi duas vezes maior no grupo de onde foram utilizadas CT, resultado que, segundo os autores, reforça a hipótese de que o uso de células menos diferenciadas pode aumentar a eficiência da clonagem.

Mais recentemente, Jin *et al.* (2007) utilizaram também CTA da medula óssea de suínos para a clonagem e mostraram que o desenvolvimento embrionário dos embriões clonados a partir destas células foi quantitativamente (taxas de clivagem e formação de blastocisto) e qualitativamente (taxa de apoptose – técnica de TUNEL) similar ao desenvolvimento de embriões fecundados *in vitro* e superior quando comparado aos embriões clonados a partir de fibroblastos adultos.

Embora o uso de CTE como doadora nuclear possa resultar em um aumento na eficiência da TN em relação ao TNCS, a sua cultura *in vitro* ainda não foi bem estabelecida para algumas espécies como, por exemplo, em bovinos e bubalinos. Além disso, há evidências de que o uso de CTM como doadoras de núcleo aumenta as taxas de desenvolvimento da clonagem de animais domésticos, como suínos e bovinos (Lee *et al.*, 2010.; Colleoni *et al.*, 2005). As CTM utilizadas nestes estudos foram derivadas de tecidos como medula óssea, que não pode ser adquirido tão facilmente quanto aqueles recuperados do tecido adiposo, implicando em limitações

práticas. Além disso, embora existam protocolos para o isolamento de CTM derivadas de tecido adiposo de muitas espécies, incluindo seres humanos e eqüinos (Zuk *et al.*, 2002; De Mattos Carvalho *et al.*, 2009), até o presente momento não há dados publicados que descrevem tal procedimento para grandes ruminantes (bovinos e bubalinos). Portanto, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e investigar o potencial de diferenciação multilinhagens de CTM provenientes de tecido adiposo de bovinos (*Bos indicus*) e bubalinos (*Bubalus bubalis*) adultos .

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os materiais de plástico foram comprados da Corning Inc. (Corning, NY) e os produtos químicos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Os procedimentos experimentais *in vitro* foram realizados em incubadoras umidificadas e mantidas à 38,5 °C com atmosfera gasosa com 5% CO₂. O estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes internacionais para o tratamento e a utilização de animais experimentais. Cinco e três isolamentos de CTDTA foram realizados para bovinos e bubalinos, respectivamente.

4.1 ISOLAMENTO E CULTURA DAS CTDTA

O tecido adiposo de bovinos adultos (*B. indicus*) e bubalinos adultos (*B. bubalis*) foi coletado de abatedouro (SOCIPE/PA), o tecido adiposo foi extraído com auxílio de materiais cirúrgicos para a recuperação de cerca de 5 g de tecido adiposo, que foi extensivamente lavado com solução salina fria suplementada com 400 µg/ml de estreptomicina (Gibco) e 400 unidades/mL de penicilina (Gibco).

No laboratório de Fertilização *in vitro* da UFPA, o tecido foi macerado por 30 minutos com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril em uma placa de petri e digeridos com 0,001% de colagenase tipo I (Gibco, Grand Island, NY) diluído em *alpha meio essencial mínimo* (α-MEM, Gibco), com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 unidades/mL de penicilina e 50 µg/mL de nistatina. Após um período de 3 horas de digestão por colagenase, com temperatura controlada a 38,5 °C, a atividade da enzima foi neutralizada por adição de igual volume de α-MEM contendo 15% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 83,4 µg/ml de sulfato de amicacina e 50 µg/mL de nistatina. O tecido tratado foi centrifugado a 300 x g por 10 min e o precipitado

ressuspendido em α -MEM suplementado com SFB 15%, 83,4 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de amicacina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de nistatina. Ele foi novamente centrifugado a 300 x g por 10 min e o *pellet* foi ressuspendido e plaqueado em placas de plásticos de, 35 mm no mesmo meio de cultura. As células foram mantidas em incubadoras e o meio de cultura foi substituído a cada dois dias, exceto para a primeira mudança de meio foi realizada 24 horas após a cultura das células. As células não-aderentes, incluindo as hematopoiéticas, foram retiradas com a primeira mudança de meio. Quando a cultura alcançou 60-75% de confluência, as células foram tripsinizadas (Tryple Express, Gibco) e plaqueadas em novas placas em α -MEM com 15% de SFB e 83,4 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de amicacina.

4.2 CRESCIMENTO CELULAR

O crescimento celular foi acompanhado através de dez passagens seguindo o protocolo sugerido por Bruder *et al.* (1997). Neste caso, 3×10^4 ou 4×10^4 células foram semeadas em placas de 35 mm e replaqueadas a cada dois e três dias, respectivamente para os bovinos e bubalinos. Além disso, para testar a resistência da célula ao crescer após o descongelamento, as células foram congeladas em 90% de SFB e 10% de DMSO na primeira, segunda, terceira e quarta passagem, foram descongeladas e novamente submetidas à cultura *in vitro*.

4.3 CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA.

As células foram caracterizadas pela presença de marcadores de superfície exclusivos de CTM: CD105 (endoglin), CD90 (Thy-1) e CD73; e também para a ausência de marcadores exclusivos de células hematopoiéticas: CD34, CD45 e

CD79a, como relatado anteriormente (Horwitz *et al.*, 2005), a fim de excluir a possibilidade de contaminação de cultivos celulares.

Os anticorpos primários foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 e Alexa 594 foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), e o anticorpo secundário conjugado com Cy3 foi comprado de Jackson Immunoresearch Laboratories (West Grove, PA). Células na primeira ou segunda passagem foram plaqueadas em lamínulas e cultivadas por dois dias. Elas foram então lavadas em PBS e fixadas em Paraformaldeído 4% em PBS por 15 min em temperatura ambiente e novamente lavada em PBS. Em seguida, as células foram incubadas em 0,4% de albumina bovina (BSA) em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Com os anticorpos primários (CD105, CD90, CD73, CD34, CD45 e CD79) foi feita incubação durante a noite a 4 °C diluídos (1:50) em PBS. Os controles negativos foram considerados em todas as análises de incubação, sem anticorpos primários. As células foram então extensivamente lavadas em PBS e incubadas por 45 min a temperatura ambiente, com 1:50 (Alexa488 e Alexa594) - ou 1:200 (Cy3). Os núcleos das células foram corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas, montadas em lâminas de microscópio e analisadas em um microscópio de fluorescência em ampliação de 200x (Nikon Eclipse TE 300, Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão). Os controles negativos foram analisados para remover o *background* dos anticorpos secundários devido à coloração inespecífica das células.

4.4 DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO*

As células foram testadas quanto à sua capacidade de diferenciação em células osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas baseado no protocolo sugerido por Zuk *et al.*, 2002. Para a diferenciação osteogênica 3×10^4 células na terceira a quinta passagem foram cultivadas em placas de plástico durante a noite. Para a diferenciação osteogênica o meio de cultura foi substituído por α -MEM com 2% de SFB, 0,1 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico-2-fosfato, 10 mM de β -glicerofosfato e 83,4 μ g/mL de sulfato de amicacina e cultivadas *in vitro* por três semanas. Para diferenciação adipogênica as células foram cultivadas como descrito anteriormente e cultivadas com D-MEM (Gibco) suplementado com 2% de SFB, 1 μ M de dexametasona, 10 μ M de insulina, 100 μ M de indometacina, 0,5 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) e 83,4 mg/mL de sulfato de amicacina durante três semanas. Para a diferenciação condrogênica as células foram plaqueadas como mencionado acima e cultivadas por três semanas com α -MEM, 6,25 μ g/mL de insulina, 10 ng/ml de TGF- β 1, 50 nM de ácido ascórbico-2-fosfato e 83,4 μ g/ml de sulfato de amicacina. Como controles negativos, as células foram plaqueadas como acima e cultivadas em meio de cultura normal (α -MEM com 15% de SFB e 83,4 μ g/ml de sulfato de amicacina). Para os três protocolos de diferenciação, o meio foi trocado a cada dois dias. As células foram analisadas para alterações morfológicas a cada dois dias.

4.5 ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO

Para confirmar a diferenciação celular após a exposição a cada um dos protocolos, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em PFA a 4% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS e coradas como descrito abaixo. Resumidamente, para a diferenciação osteogênica a

deposição de cálcio foi visualizada através da coloração de células com 2% de Alizarin Red S na água (pH 4,1) como descrito anteriormente (Yamamoto *et al.*, 2007). Para diferenciação adipogênica a acumulação intracelular de vacúolos enriquecidos de lipídeos foram visualizados através da coloração de células com 1,25% Oil Red O em Isopropanol em 30% por 10 min a temperatura ambiente, seguido por lavagem com Isopropanol 60% (Zuk *et al.*, 2002). A diferenciação condrogênica foi verificada a presença de proteoglicanos nas células pela coloração de Alcian Blue 1% em 3% de ácido acético (pH 2,5) como já foi relatado por (Zuk *et al.*, 2002). Células marcadas foram visualizadas em microscópio invertido a ampliação de 400 x (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com relatórios anteriores (Zhu *et al.* 2008; Zuk *et al.* 2002), o tecido adiposo de bovinos e bubalinos resultou em uma grande quantidade de CTA, pelo menos 10^5 células, após três dias de cultura para cada 5 g de tecido adiposo, que aderiram a as placas de cultura pouco depois do plaqueamento e apresentou uma morfologia fibroblastóide com um único núcleo (Figura 2a e 2b).

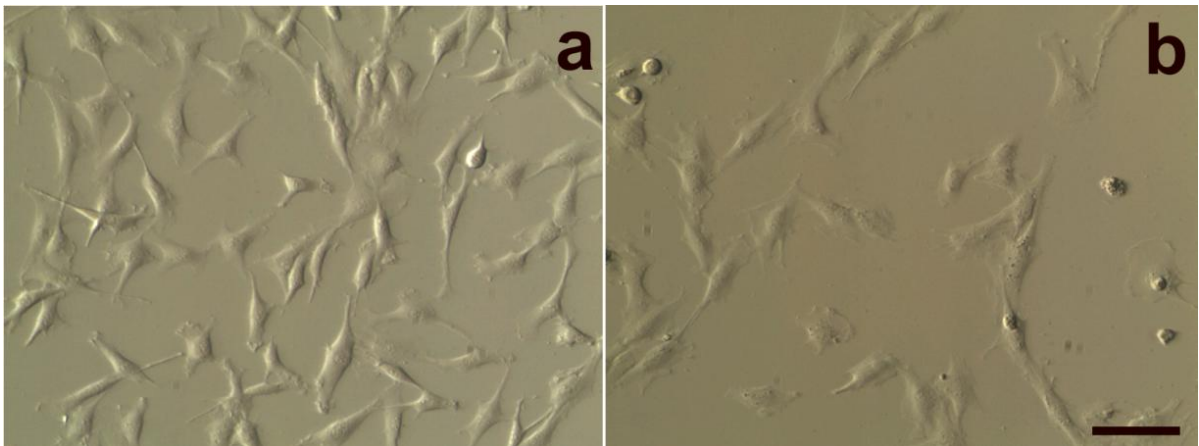


Figura 2. Células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) de bovinos (a) e bubalinos (b). Barra de escala = 50 μ m.

Nenhuma diferença morfológica foi observada entre CTA de bovinos e bubalinos. CTA de bovinos mostrou uma curva de crescimento exponencial durante as primeiras oito passagens (até o 14^o dia de cultura), enquanto as CTA de bubalinos cresceram exponencialmente durante as dez primeiras passagens ou até o 27^o dia de cultura (Figura 3).

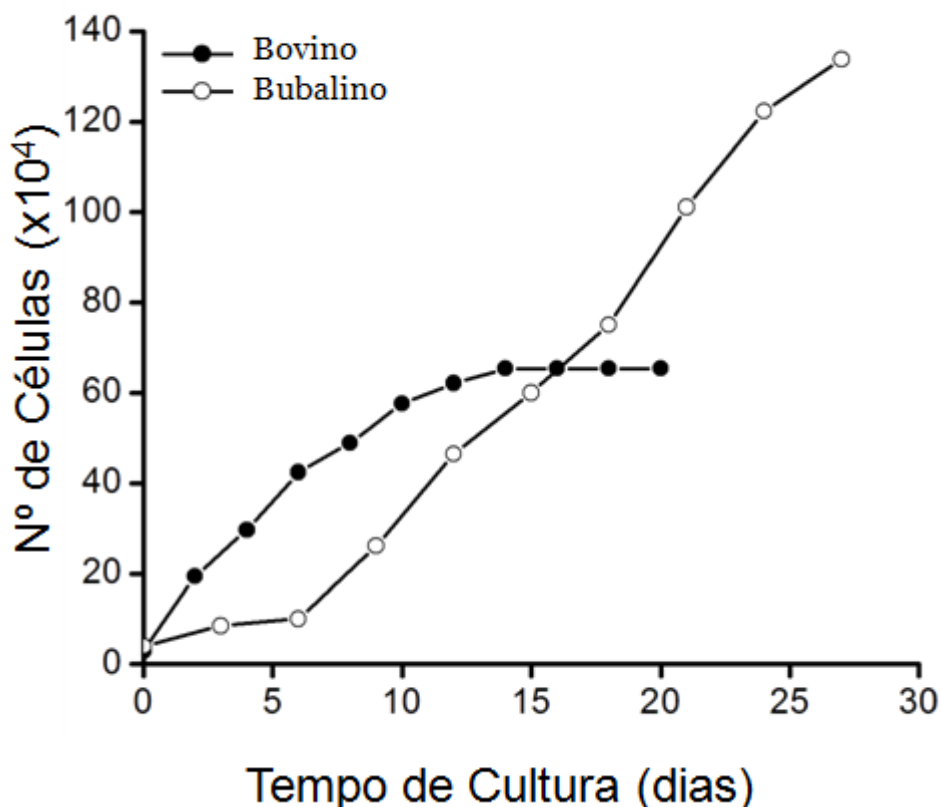


Figura 3. Curvas de crescimento das células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTDTA) de bovino e bubalinos. CTDTA foram replaqueadas a cada dois ou três dias, respectivamente.

Em resumo, as CTA foram morfológicamente similares às CTM previamente isoladas de outras espécies (Bourzac *et al.* 2010;. De Mattos Carvalho *et al.*, 2009;. Neupane *et al.*, 2008;. Rodriguez *et al.*, 2005;. Yamamoto *et al.*, 2007) ou de outros tecidos (Bosnakovski *et al.*, 2005;. Raoufi *et al.*, 2010), dando suporte à sua origem MSC.

Em relação à caracterização das CTDTA por imunocitoquímica, nós fornecemos um painel com marcadores específicos positivos e negativos para ambas as CTDTA de bovinos e bubalinos. A cultura das duas espécies foram consideradas positivas para CD105, CD90, CD73 (Figura 4 a-c e a'-c'), que são exclusivamente encontrados em CTM.

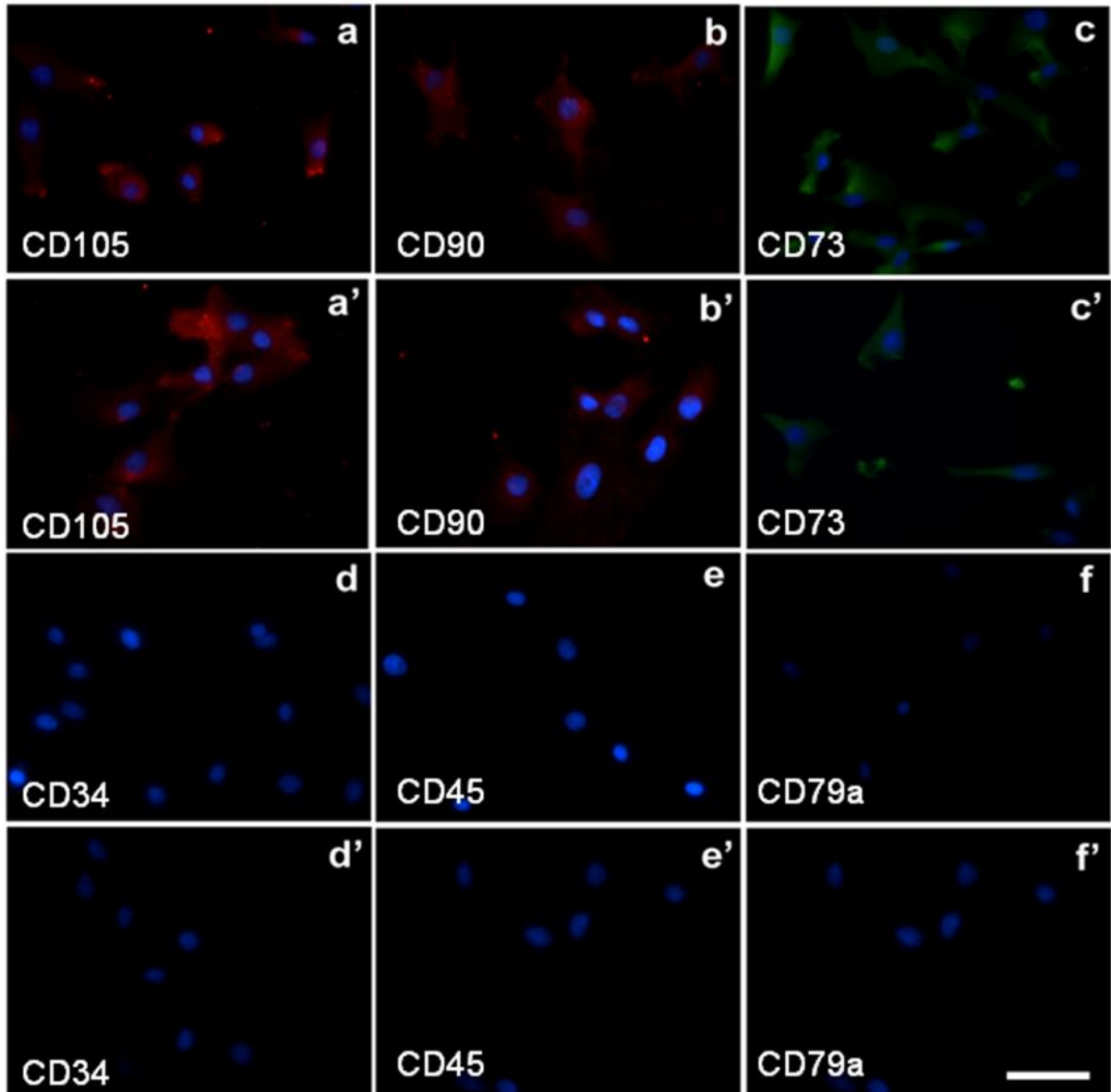


Figura 4. Caracterização imunofenotípica das CTDTA de Bovinos (af) e bubalinos (a'-f'). As CTDTA foram analisadas para a presença demarcadores de CT positivos, CD105 (a e a'), CD90 (b e b') e CD73 (c e c'), e negativos, CD 34 (d e d'), CD45 (e e e') e CD79a (F e F'), marcadores de CTM. Estes marcadores são indicados por cores vermelha ou verde. Todas as células foram coradas com Hoechst 33342 (indicado pela cor azul) que cora exclusivamente o núcleo das células. Barra de escala = 25 mm.

Por outro lado, os marcadores negativos para CTM, CD34, CD45 e CD79, não marcaram as CTDTA de bovinos ou bubalinos (Figura 4 d-f e d'-f'), indicando ausência de contaminação de células hematopoiéticas na cultura. As células hematopoiéticas são conhecidas por serem menos capazes de se grudar à

superfície das placas de cultivo o que permite a sua remoção após a mudança do meio de cultura (Horwitz *et al.*, 2005). Não foi observada diferença entre bovinos e bubalinos quanto à coloração imunocitoquímica. Assim, as células de bovinos e bubalinos são positivas para marcadores específicos de CTM, caracterizando assim, o tipo de CT presente no tecido adiposo (Dominici *et al.*, 2006).

O potencial de diferenciação em multilinhagens foi testado *in vitro*, o padrão de alterações morfológicas foi observado nas células dependendo do protocolo de diferenciação e tempo de tratamento. A primeira alteração morfológica foi observada dentro de uma semana de tratamento para os três protocolos de diferenciação. É importante ressaltar que as alterações morfológicas em resposta aos tratamentos foram vistas pela primeira vez em células de búfalos do que em bovinos. Estas alterações incluíram acúmulo de lipídios durante a diferenciação em adipócitos e aumento do tamanho das células durante a diferenciação osteogênica e condrogênica. Células submetidas à diferenciação em osteócitos mostraram um aumento em seu tamanho após uma semana de tratamento e dentro de três semanas coraram positivamente para Alizarin Red, indicando a deposição de matriz mineralizada (Figura 5 a e a').

Um aumento no tamanho das células também foi observado nas células submetidas à diferenciação em adipócitos, que começou a desenvolverem-se como vesículas lipídicas dentro de uma semana de tratamento. Após duas a três semanas essas vesículas estavam presentes em quase todo o citoplasma e eram coradas positivamente para o Oil Red O (Figura 5b e b'). Finalmente, matrizes ricas em glicosaminoglicanos foram encontradas em células submetidas à diferenciação condrogênica após uma a duas semanas de tratamento através da coloração com Alcian Blue (Figura 5c e c').

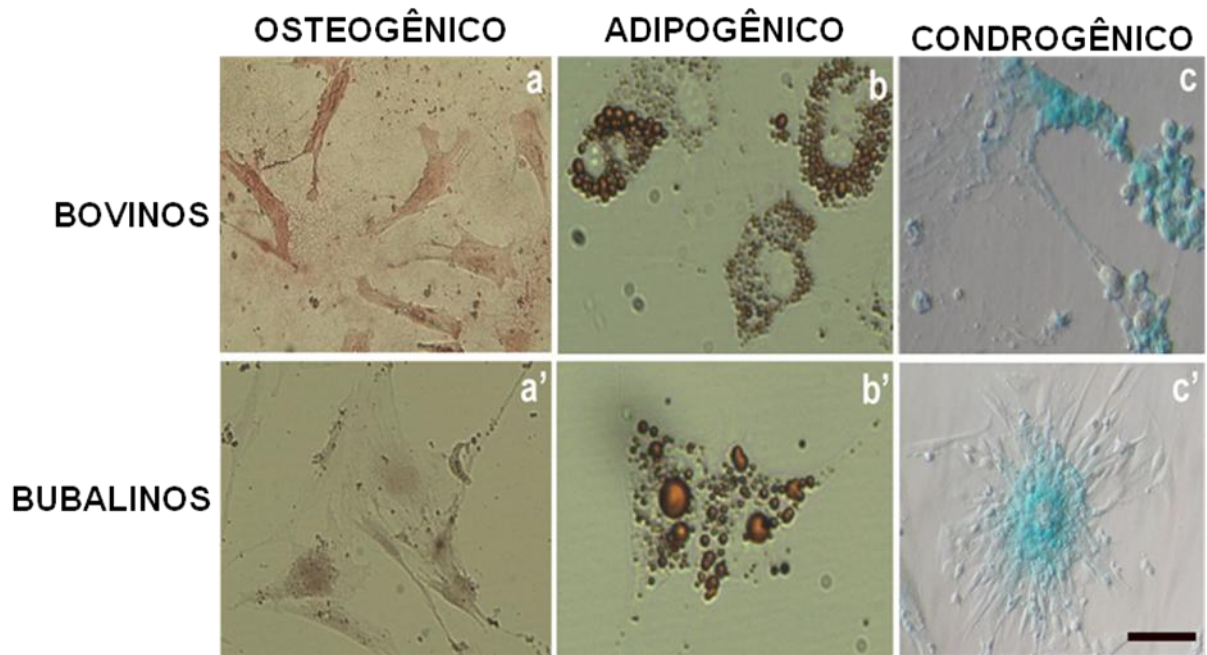


Figura 5. Análise da diferenciação das células-tronco derivadas de tecido adiposo. Osteogênico (a e a'), adipogênico (b e b') e condrogênico (c e c') de bovinos (a-c) e bubalinos (a'-c') CTDTA. Barra de escala = 50 μ m.

Outros relatos já descreveram o isolamento de CTM de diversas espécies e tecidos (Neupane *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2007; Carvalho *et al.* 2010; Raoufi *et al.* 2010), mas nunca tinham relatado o isolamento de CTDTA de bovinos e bubalinos. Nossos resultados estão de acordo com os relatórios anteriores sobre a morfologia das células, o tempo de duplicação e diferenciação. Conforme descrito aqui, o tecido adiposo pode ser facilmente extraído para o isolamento das CTM sem contaminação por células hematopoiéticas. Além disso, a abundância de CTM é derivada de uma pequena biópsia de tecido adiposo (5 g), tornando esta técnica viável para ser utilizada em larga escala e aplicações a jusante (Zhu *et al.*, 2008).

Terapias emergentes baseadas em células podem beneficiar-se de uma fonte de CT autólogas multipotentes, e tecido adiposo representam uma fonte potencial de CTA para aplicações de engenharia de tecidos no presente e em muitos outros campos (Satija *et al.*, 2007) É sabido, entretanto, que vários estudos e ensaios

clínicos são necessários para antes que estas terapias estejam disponíveis em seres humanos (Satija *et al.*, 2007). Esses estudos incluem modelos de origem animal que podem ser realizados em bovinos, uma vez que se tem reconhecido como um modelo válido para tal finalidade (Chacko e Ranganathan, 2009). Comparado com o modelo do rato, o modelo bovino é geneticamente mais próximo aos seres humanos (Miziara *et al.*, 2004), apresentam um maior tempo de vida (Clark *et al.*, 2003), etc. Além disso, estudos sobre bovinos é eticamente mais aceitável do que os estudos baseados em modelo de primata não-humanos. Neste contexto, a descrição de um método de isolamento e cultura de CTM de tecido adiposo de bovinos e bubalinos é relevante como um modelo para estudos básicos e aplicados envolvendo CT humanas (Miziara *et al.*, 2004). Por outro lado, nos relatórios anteriores têm demonstrado um efeito positivo do uso de CTM de doadores nucleares no NT, quando comparado às células somáticas como, por exemplo, fibroblastos (Faast *et al.*, 2006), o que torna a sua utilização com esse fim cada vez mais interessante, pois isso pode levar a um aumento na eficiência da clonagem de animais através da técnica de NT. Portanto, criar um método simples para isolamento e cultivo das CTM é determinante para viabilizar seu uso.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os nossos resultados, podemos concluir que CTM estão presentes no tecido adiposo de bovinos e bubalinos, podem ser isoladas por um procedimento simples e mantidas *in vitro* sem perda aparente de sua capacidade proliferativa nas passagens iniciais. Por essa facilidade, essas células podem ser uma alternativa como doadoras de núcleo na TN. Além disso, elas foram capazes de gerar tecidos diferentes (condrogênico, osteogênico e adipogênico), provando seu

potencial de diferenciação em multilinhagens, o que as tornam um novo modelo de terapias celulares e engenharia de tecido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACOU, F.; EL ANDALOUSI, R. B.; DAUSSIN, P. A.; MICALLEF, J. P.; LEVIN, J. M.; CHAMMAS, M.; CASTEILLA, L.; REYNE, Y.; NOUGUES, J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. **Cell Transplant**, v. 13, n. 2, p. 103-11, 2004.

BJORNSON, C. R.; RIETZE, R. L.; REYNOLDS, B. A.; MAGLI, M. C.; VESCOVI, A. L. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. **Science**, v. 283, n. 5401, p. 534-7, Jan 22 1999.

BOSCH, P.; PRATT, S. L.; STICE, S. L. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. **Biol Reprod**, v. 74, n. 1, p. 46-57, Jan 2006.

BOSNAKOVSKI, D., MIZUNO, M., KIM, G., TAKAGI, S., OKUMURA, M., FUJINAGA, T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Tissue Res** 319, 243-253, 2005.

BOURZAC, C., SMITH, L.C., VINCENT, P., BEAUCHAMP, G., LAVOIE, J.P., LAVERTY, S., Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. **Equine Vet J**.v 42, 519-527.2010

- BRUDER, S.P., JAISWAL, N., HAYNESWORTH, S.E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **J Cell Biochem.** v 64(2):278-94.1997.
- BYDLOWSKI, S. P.; DEBES, A. A.; DUARTE, S. A.; JANZ, F. L.; CAVAGLIERI, R. C.; MASELLI, L. M. F. Células-tronco do líquido amniótico. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, Rio de Janeiro, v.31, supl.1, p.45-52, 2009.
- BYRNE J.A., PEDERSEN, D.A., CLEPPER, L.L, NELSON, M., SANGER, W.G., GOKHALE, S., WOLF, D.P., MITALIPOV, S.M. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. **Nature.** v. 22;450(7169) p.497-502. 2007.
- CASPAR-BAUGUIL, S.; COUSIN, B.; GALINIER, A.; SEGAFREDO, C.; NIBBELINK, M.; ANDRE, M.; CASTEILLA, L.; PENICAUD, L. Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. **FEBS Lett**, v. 579, n. 17, p. 3487-92, Jul 4 2005.
- CHACKO, E., RANGANATHAN, S. Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: implications in bovine as a model for human diseases. **BMC Genomics** 10 Suppl 3, S11.2009

CHEONG, H. T.; TAKAHASHI, Y.; KANAGAWA, H. Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. **Biol Reprod**, v. 48, n. 5, p. 958-63, May 1993.

COLLADO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. Cellular Senescence in Cancer and Aging. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 223 - 233, 2007.

COLLEONI, S.; DONOFRIO, G.; LAGUTINA, I.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. **Cloning Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 154-66, 2005.

CURZER, H. The ethics of embryonic stem cell research. **J Med Philos**, v. 29, n. 5, p. 533-62, Oct 2004.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; DE OLIVEIRA, P. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 132, n. 2-4, p. 303-6, Dec 15 2009.

DIGIROLAMO, C. M.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D. G.; CLASS, R.; PROCKOP, D. J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest

potential to propagate and differentiate. **Br J Haematol**, v. 107, n. 2, p. 275-81, Nov 1999.

DINIZ, D.; AVELINO, D. International perspective on embryonic stem cell research. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 3, p. 541-7, Jun 2009.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D., HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v 8, 315-317.2006

EGGAN, K.; AKUTSU, H.; LORING, J.; JACKSON-GRUSBY, L.; KLEMM, M.; RIDEOUT, W. M., 3RD; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 11, p. 6209-14, May 22 2001.

EGGAN, K.; BALDWIN, K.; TACKETT, M.; OSBORNE, J.; GOGOS, J.; CHESS, A.; AXEL, R.; JAENISCH, R. Mice cloned from olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 44-9, Mar 4 2004.

FAAST, R.; HARRISON, S. J.; BEEBE, L. F.; MCILFATRICK, S. M.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone

marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. **Cloning Stem Cells**, v. 8, n. 3, p. 166-73, Fall 2006.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 12, p. 926-30, Dec 2005.

FRANCASTEL, C.; SCHUBELER, D.; MARTIN, D. I.; GROUDINE, M. Nuclear compartmentalization and gene activity. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 1, n. 2, p. 137-43, Nov 2000.

FRIEDENSTEIN, A. J.; DERIGLASOVA, U. F.; KULAGINA, N. N.; PANASUK, A. F.; RUDAKOWA, S. F.; LURIA, E. A.; RUADKOW, I. A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. **Exp Hematol**, v. 2, n. 2, p. 83-92, 1974.

GIMBLE, J. M. Adipose tissue-derived therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 5, p. 705-13, Aug 2003.

GIMBLE, J. M.; FLOYD, Z. E. Fat circadian biology. **J Appl Physiol**, v. 107, n. 5, p. 1629-37, Nov 2009.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reprod Nutr Dev**, v. 45, n. 3, p. 353-61, May-Jun 2005.

HIRAGI, T.; SOLTER, D. Reprogramming is essential in nuclear transfer. **Mol Reprod Dev**, v. 70, n. 4, p. 417-21, Apr 2005.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1035-8, Feb 28 2002.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-5, 2005.

HUMPHERYYS, D.; EGGAN, K.; AKUTSU, H.; HOCHEDLINGER, K.; RIDEOUT, W. M., 3RD; BINISZKIEWICZ, D.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. **Science**, v. 293, n. 5527, p. 95-7, Jul 6 2001.

INOUE, K.; WAKAO, H.; OGONUKI, N.; MIKI, H.; SEINO, K.; NAMBU-WAKAO, R.; NODA, S.; MIYOSHI, H.; KOSEKI, H.; TANIGUCHI, M.; OGURA, A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. **Curr Biol**, v. 15, n. 12, p. 1114-8, Jun 21 2005.

JIN, H. F.; KUMAR, B. M.; KIM, J. G.; SONG, H. J.; JEONG, Y. J.; CHO, S. K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S. Y.; RHO, G. J. Enhanced development

of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. **Int J Dev Biol**, v. 51, n. 1, p. 85-90, 2007.

KARP, J. M.; LENG TEO, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 206-16, Mar 6 2009.

KATO, Y.; IMABAYASHI, H.; MORI, T.; TANI, T.; TANIGUCHI, M.; HIGASHI, M.; MATSUMOTO, M.; UMEZAWA, A.; TSUNODA, Y. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. **Biol Reprod**, v. 70, n. 2, p. 415-8, Feb 2004.

KAWAI,S., AMANO, A., Odd-skipped related 2 is epigenetically regulated in cellular quiescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v 396, n 4 p. 831-836,2010.

LANZA, R., THOMAS, E.D., THOMSON, J., PEDERSEN, R., GEARHART, J., HOGAN, B., MELTON, D., M WEST . Essentials of Stem Cell Biology. **Academic Press**, 680 p. 2009.

LEE, S. L.; KANG, E. J.; MAENG, G. H.; KIM, M. J.; PARK, J. K.; KIM, T. S.; HYUN, S. H.; LEE, E. S.; RHO, G. J. Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells. **J Reprod Dev**, v. 56, n. 2, p. 256-62, Apr

LI, J.; ISHII, T.; FEINSTEIN, P.; MOMBAERTS, P. Odorant receptor gene choice is reset by nuclear transfer from mouse olfactory sensory neurons. **Nature**, v. 428, n. 6981, p. 393-9, Mar 25 2004.

MAKINO, H.; YAMAZAKI, Y.; HIRABAYASHI, T.; KANEKO, R.; HAMADA, S.; KAWAMURA, Y.; OSADA, T.; YANAGIMACHI, R.; YAGI, T. Mouse embryos and chimera cloned from neural cells in the postnatal cerebral cortex. **Cloning Stem Cells**, v. 7, n. 1, p. 45-61, 2005.

MCCOY, M. K.; MARTINEZ, T. N.; RUHN, K. A.; WRAGE, P. C.; KEEFER, E. W.; BOTTERMAN, B. R.; TANSEY, K. E.; TANSEY, M. G. Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 14-29, Mar 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em: 20/02/2011.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR: Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/>> Acessado em: 20/02/2011.

MIZIARA, M.N., RIGGS, P.K., AMARAL, M.E. Comparative analysis of noncoding sequences of orthologous bovine and human gene pairs. **Genet Mol Res** 3, 465-473.2004.

MULLER, C.; LEUTZ, A. Chromatin remodeling in development and differentiation.

Curr Opin Genet Dev, v. 11, n. 2, p. 167-74, Apr 2001.

NEUPANE, M., CHANG, C.C., KIUPEL, M., YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells.

Tissue Eng Part A, v 14, 1007-1015.2008

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation

from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.

ONO, Y.; KONO, T. Irreversible barrier to the reprogramming of donor cells in

cloning with mouse embryos and embryonic stem cells. **Biol Reprod**, v. 75, n. 2, p. 210-6, Aug 2006.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in

differentiation and tissue repair. **Cardiovasc Res**, v. 58, n. 2, p. 324-35, May 1 2003.

PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS,

R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 2 1999.

PLANAT-BENARD, V.; MENARD, C.; ANDRE, M.; PUCEAT, M.; PEREZ, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circ Res**, v. 94, n. 2, p. 223-9, Feb 6 2004.

PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J. S.; COUSIN, B.; ANDRE, M.; NIBBELINK, M.; TAMARAT, R.; CLERGUE, M.; MANNEVILLE, C.; SAILLAN-BARREAU, C.; DURIEZ, M.; TEDGUI, A.; LEVY, B.; PENICAUD, L.; CASTEILLA, L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. **Circulation**, v. 109, n. 5, p. 656-63, Feb 10 2004.

POULSOM, R.; ALISON, M. R.; FORBES, S. J.; WRIGHT, N. A. Adult stem cell plasticity. **J Pathol**, v. 197, n. 4, p. 441-56, Jul 2002.

PUBMED. Disponível em: <[http/ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)>. Acesso em: 25/01/2011.

RAOUFI, M., TAJIK, P., DEHGHAN, M., EINI, F., BARIN, A. Isolation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Bovine Umbilical Cord Blood. **Reprod Domest Anim**.2010.

RIDEOUT, W. M., 3RD; WAKAYAMA, T.; WUTZ, A.; EGGAN, K.; JACKSON-GRUSBY, L.; DAUSMAN, J.; YANAGIMACHI, R.; JAENISCH, R. Generation

of mice from wild-type and targeted ES cells by nuclear cloning. **Nat Genet**, v. 24, n. 2, p. 109-10, Feb 2000.

REHEN, S.; PAULSEN, B. Células-tronco: O que são? Para que servem? Rio de Janeiro: **Vieira e Lent**, 2007.90p.

RODBELL, M.; JONES, A. B. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. **J Biol Chem**, v. 241, n. 1, p. 140-2, Jan 10 1966.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 125-8, Jan 2005.

SANCHEZ-RAMOS, J.; SONG, S.; CARDOZO-PELAEZ, F.; HAZZI, C.; STEDEFORD, T.; WILLING, A.; FREEMAN, T. B.; SAPORTA, S.; JANSSEN, W.; PATEL, N.; COOPER, D. R.; SANBERG, P. R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. **Exp Neurol**, v. 164, n. 2, p. 247-56, Aug 2000.

SATIJA, N.K.; GURUDUTTA, G.U.; SHARMA, S.; AFRIN, F.; GUPTA, P.; VERMA, Y.K.; SINGH, V.K; TRIPATHI, R.P. Mesenchymal stem cells: molecular targets for tissue engineering. **Stem Cells Dev**. Feb; 16(1):7-23. 2007.

SCIELO. Disponível em: < <http://www.scielo.org/php/index.php>>. Acessado em: 26/01/2011

SHI, D.; LU, F.; WEI, Y.; CUI, K.; YANG, S.; WEI, J.; LIU, Q. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 285-91, Aug 2007.

SMITH, A. A glossary for stem-cell biology. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1060-1060, 2006.

SCHWINDT, T.T, BARNABÉ, G.F., MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg.**;16(1):13-9, 2005

TAGAMI, M.; ICHINOSE, S.; YAMAGATA, K.; FUJINO, H.; SHOJI, S.; HIRAOKA, M.; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res**, v. 312, n. 1, p. 31-40, Apr 2003.

VATS, A. TOLLEY, N.S. POLAK, J.M. BUTTERY, L.D.K. Stem cells: sources and applications. **Blackwell Science Ltd Clinical Otolaryngology & Allied Sciences**. v 27. p 1365-2273 2002.

WAKAYAMA, T.; PERRY, A. C.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K. R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes

injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, n. 6691, p. 369-74, Jul 23 1998.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE, A. W., JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-3, Feb 27 1997.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C. J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J. S.; TARTAGLIA, L. A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821-30, Dec 2003.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **J Dermatol Sci**, v. 48, n. 1, p. 43-52, Oct 2007.

YAMAZAKI, Y.; MAKINO, H.; HAMAGUCHI-HAMADA, K.; HAMADA, S.; SUGINO, H.; KAWASE, E.; MIYATA, T.; OGAWA, M.; YANAGIMACHI, R.; YAGI, T. Assessment of the developmental totipotency of neural cells in the cerebral

cortex of mouse embryo by nuclear transfer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 24, p. 14022-6, Nov 20 2001.

ZAGO, M. A., COVAS, D. T. Células-Tronco: a Nova Fronteira da Medicina. São Paulo: **Editora Atheneu**, 245 p. 2006.

ZHU, Y.; LIU, T.; SONG, K.; FAN, X.; MA, X.; CUI, Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 6, p. 664-75, Aug 2008.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, Dec 2002.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-28, Apr 2001.