

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E DO DESENVOLVIMENTO

Adriane Cristina Fagundes

Análise comparativa da biologia de células estromais
mesenquimais da derme humana provenientes de prepúcio,
abdômen e face

Dissertação de mestrado submetido ao
programa de Pós-Graduação em
Biologia celular e do Desenvolvimento
da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa
Gonçalves Trentin

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Fagundes, Adriane Cristina

Análise comparativa da biologia de células estromais mesenquimais da derme humana provenientes de prepúcio, abdômen e face / Adriane Cristina Fagundes ; orientador, Andréa Gonçalves Trentin, 2019.
78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. células-tronco. 3. terapia celular. 4. biologia celular. I. Gonçalves Trentin, Andréa . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

“Análise comparativa da biologia de células estromais mesenquimais da derme humana provenientes de prepúcio, abdômen e face”

Por

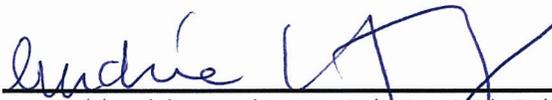
Adriane Cristina Fagundes

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (004/2019/PPGBCD) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento - UFSC.



Prof.(a) Dr.(a) Geison de Souza Izídio
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:



Dr.(a) Andréa Gonçalves Trentin (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Aloísio Benedetti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Luciane Maria Perazzolo (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2019.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento pela oportunidade de realizar esse trabalho e a CAPES pelo apoio financeiro durante a produção dessa dissertação.

Agradeço a minha orientadora, profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin pela orientação e pelas oportunidades proporcionadas durante estes dois anos de mestrado.

Ao médico Dr. Maurício José Lopes Pereima pela disponibilidade nas questões burocráticas do comitê de ética. E também ao Hospital Infantil Joana de Gusmão por aceitar realizar este trabalho em parceria conosco.

Um agradecimento ao Dr. Juliano Tibola por toda a ajuda e todas as dúvidas que me tirou durante o processo de escrita do projeto para o Comitê de Ética ao Hospital Infantil Joana de Gusmão. Muito obrigada, Juliano!

Ao LACERT e todos os seus integrantes pelo auxílio recebido, em especial às amigas que eu fiz e que levo em meu coração, Camila Acordí da Silva, com quem entrei no mestrado e com quem compartilhei todas as alegrias e angústias desse processo. Priscilla Barros Delben, um dos maiores corações que já conheci, além de uma pesquisadora incrível. E Laís Andrade, que chegou de Pelotas pra roubar nossos corações. Obrigada, sem vocês esse trabalho não existiria.

Ao Marcelo Falchetti, parceiro de cafés e de **tantos** papos literários, majoritariamente sobre Stephen King. O tempo que passei contigo foi essencial pra minha saúde mental, você sabe disso. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos e parceiros André Trevisol (meu amigo John!), Camila Barcella Leal, Diego Feijó e Henrique Lobo. Obrigada pelos fins de semana de jogos e RPG. E também à todos

os integrantes da Casa da Esquina por todos os momentos de descontração. Vocês são demais!

Agradeço também ao meu noivo, Luan da Silva Gomes, por estar sempre ao meu lado comemorando minhas vitórias e consolando minhas perdas. Te amo muito!

Aos meus pais, Daysi Maria e Jader Marques Fagundes e aos meus irmãos Lisiane Cristina e Rodrigo Fagundes pelo apoio e pelos momentos compartilhados durante essa trajetória. Amo muito todos vocês.

“All the secrets of the world are contained in books.

Read at your own risk.”

Lemony Snicket

RESUMO

As Células Estromais Mesenquimais (CEM) representam uma alternativa atrativa para a terapia celular pois são multipotentes e de fácil obtenção porém sem apresentar as ressalvas éticas das células-tronco embrionárias. As CEM podem ser obtidas de diversas fontes, como a derme (CEMd) de fragmentos de descarte de pele em vários tipos de cirurgia, como de prepúcio (postectomia), abdômen (abdominoplastia) e face (ritidoplastia). Além disso, a funcionalidade e a potencialidade das CEM pode ser alterada em função da idade cronológica dos doadores e região anatômica do tecido, informações bastante limitadas ainda na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho é comparar as CEMd obtidas de prepúcio (CEMd-PR) de pacientes jovens (2-15 anos), do abdômen (CEMd-AB) de adultos (20-50 anos) e da face (CEMd-FA) de adultos mais velhos (55-70 anos). Para tanto, foram avaliadas comparativamente a eficiência de isolamento dessas CEMd, o perfil de proliferação e expansão celular, as características mesenquimais (morfologia, capacidade de adesão ao plástico, perfil de marcadores de superfície e potencial de diferenciação celular) e a capacidade de formação de colônias. Os resultados demonstraram que as três CEMd analisadas foram equivalentes quanto às características mesenquimais, porém as CEMd-PR apresentaram maior capacidade de expansão e proliferação celular quando comparados às CEMd-AB e CEMd-FA, além de uma maior eficiência de formação de colônias. Por outro lado, as CEMd-FA apresentaram uma capacidade reduzida de fechamento de lesão *in vitro* comparadas às CEMd-PR e CEMd-AB. Assim, nossos resultados sugerem que a idade do doador do tecido afeta a funcionalidade da CEMd e que as CEMd-PR representam uma alternativa viável para pesquisas e procedimentos de terapia celular.

Palavras chave: células tronco, diferenciação celular, terapia celular, células tronco mesenquimais, r, proliferação celular.

ABSTRACT

Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) are attractive to cell therapy since they are multipotent cells easily isolated from a myriad of tissues including the dermis (dermal stromal cells, DSC) of skin fragments wasted during surgeries, such as foreskin (postectomy), abdomen (abdominoplasty) and face (rhytidoplasty). In addition, they do not show the ethical drawback of the embryonic stem cells. Moreover, the functionality and potentiality of MSCs could be affected by the chronological age of tissue donors, despite the little information in the literature. Therefore, this study aimed to comparatively evaluate the isolation efficiency of the DSCs derived from the foreskin (FSK-DSCs), from 2-15 years old donors, abdomen (AB-DSCs) from 35-55 years old donors and face (FA-DSCs) from 55-70 years old donors. In addition, their proliferation and expansion profile, mesenchymal characteristics (cell morphology, plastic adhesion, cell surface marker profile and differentiation potential) and colony forming efficiency were assessed. The results showed that the three evaluated DSCs were equivalents according to the mesenchymal characteristics. However, FSK-DSCs displayed *in vitro* an improvement relating to the expansion and proliferative capacities, as well as colony forming efficiency compared to the AB-DSCs and FA-DSCs. Additionally, the decreased wound healing capacity of FA-DSCs. In conclusion, these findings suggest that the chronological age of the tissue donor affects the functionality of DSCs and that the FSK-DSCs are viable alternatives for the use in cell therapy.

Keywords: stem cells, mesenchymal stem cells, cell therapy, cell differentiation, cell proliferation, cell senescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da pele.....	22
Figura 2 – Mapa Experimental.....	29
Figura 3 – Isolamento de CEM-PR, CEM-AB e CEM-FA	36
Figura 4 – Diferenciação mesenquimal.....	38
Figura 5 – Expansão e crescimento das CEMd.....	40
Figura 6 – Análise da capacidade de formação de colônias (CFU-F).....	42
Figura 7 – Ensaio de Cell Scratch.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AB-MSCs – *Abdominal mesenchymal stromal cells*

CEM – Células estromais mesenquimais

CEMd – Células estromais mesenquimais derivadas da derme

CEMd-PR – Células estromais mesenquimais derivadas da derme de prepúcio

CEMd-AB – Células estromais mesenquimais derivadas da derme de abdômen

CEMd-FA – Células estromais mesenquimais derivadas da derme da face

CFU-F - *Colony-forming unit-fibroblasts*

CT – Células-tronco

DNA – *deoxyribonucleic acid*

DSC – *Dermal Stromal cells*

FA-MSCs – *Facial mesenchymal stromal cells*

FSK-MSCs – *Foreskin mesenchymal stromal cells*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Pele.....	21
1.2 Células-tronco	22
1.3 Células estromais mesenquimais (CEM)	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Mapa experimental.....	29
3.2 Isolamento, cultura e avaliação da morfologia das CEMs humanas.....	29
3.3 Citometria de Fluxo.....	30
3.3 Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica	31
3.4 Avaliação da capacidade de diferenciação condrogênica	31
3.5 Análise de crescimento e expansão celular	32
3.6 Colony Forming Units Assay	32
3.7 Ensaio de <i>scratch</i>	33
3.8 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Cultura e caracterização morfológica das CEMd.....	35
4.2 Diferenciação mesenquimal e caracterização imunofenotípica.....	37
4.3 Análise de crescimento e expansão celular	39

4.4	Potencial clonogênico das CEMd.....	41
4.5	Capacidade de fechamento de ferida (wound healing) das CEMd utilizando o ensaio scratch.....	42
5.	DISCUSSÃO.....	45
6.	CONCLUSÃO.....	49
7.	REFERÊNCIAS.....	51
8.	ANEXOS.....	59
	Anexo 01 – Termo de consentimento livre e esclarecido...	59
	Anexo 02 – Termo de assentimento	64
	Anexo 03 – Parecer consubstanciado do CEP.....	68

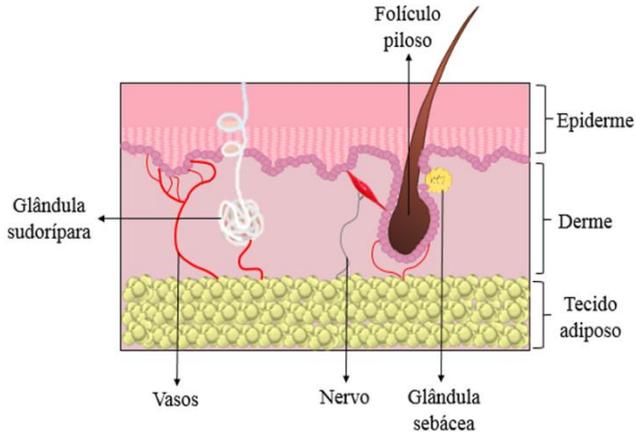
1. INTRODUÇÃO

1.1 Pele

A pele é um órgão multifuncional que reveste toda a superfície do corpo, protegendo-o contra a perda de água, microrganismos, danos mecânicos e químicos e os efeitos da radiação solar (ALONSO & FUCHS, 2003). A pele é altamente relevante para a sobrevivência do organismo e por isso alvo de inúmeras pesquisas que visam tratamentos clínicos (FUCHS, 2007; TAKEO *et al.*, 2015; ZOUBOULIS *et al.*, 2008) .

Estruturalmente a pele é composta pela epiderme e pela derme (**Figura 1**). A epiderme é constituída por uma fina camada estratificada pavimentosa de queratinócitos, contendo ainda melanócitos, células de Langerhans e de Merkel (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Nesta camada, estão presentes os anexos epidérmicos: folículos pilosos, glândulas sudoríparas e glândulas sebáceas. No caso da derme, está localizada de modo sub-adjacente à epiderme sendo rica em matriz extracelular composta de colágeno, glicosaminoglicanos e elastina. A derme é subdividida em papilar e fibrilar. A primeira está localizada abaixo da epiderme e possui sistema circulatório associado, enquanto a segunda, mais profunda e próxima ao tecido subcutâneo, contém matriz extracelular mais densa. A derme é composta majoritariamente por fibroblastos, porém também contém células do sistema imunológico e endoteliais vasculares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). A espessura da derme, bem como a quantidade de fibras elásticas e a estrutura de órgãos anexos pode variar de acordo com a localização anatômica (ARDA *et al.*, 2014). De fato, é sabido que células estromais mesenquimais possuem uma assinatura transcriptômica bastante variada dependendo de sua localização tecidual. Além disso, também variam na sua capacidade de diferenciação para fenótipos mesenquimais (SACCHETTI *et al.*, 2017).//

Figura 1. Representação esquemática da pele



Na figura pode-se observar as três camadas que compõe a pele, a epiderme, derme e tecido adiposo. Além de anexos epidermais (glândulas sudorípara e sebácea e o folículo piloso).

A pele é um órgão superficial e o maior do organismo, abrigando diversas populações de células-tronco (CT), encontradas em diferentes localizações, como na camada basal da epiderme, no bulge e na papila do folículo piloso e na derme (STELLHEYER & KRAHL, 2010; GONZALES & FUCHS, 2017).

1.2 Células-tronco

As CT vem sendo utilizadas em trabalhos que visam a aplicação clínica devido à sua alta taxa de proliferação *in vitro*, capacidade de autorenovação e geração de tipos celulares especializados. A capacidade de diferenciação celular é estabelecida dependendo da sua origem (embrionária, fetal ou adulta) e potencialidade (totipotente, pluripotente e multipotente) (WAGERS & WEISSMAN, 2004; SOBHANI *et al.*, 2017). As CT de origem embrionária podem ser totipotentes ou pluripotentes,

sendo que ambos tipos são capazes de originar todos os tipos celulares do embrião, além das estruturas anexas, no caso das totipotentes. Além disso, podem ocasionar rejeição imunológica, diferenciação celular indesejada ou formar tumores em caso de aplicação clínica (DOSS *et al.*, 2004; ESPINOZA & PETERSON, 2012). No caso das CT multipotentes, elas estão presentes nos tecidos fetais e adultos e são capazes de gerar células de uma camada germinativa ou linhagem celular específica (ALISON, 2009; SOBHANI *et al.*, 2017), porém não formam teratomas (CHAGASTELLES & NARDI, 2011; LIU *et al.*, 2016). Assim, estudos com CT adultas vem sendo conduzidos afim de verificar o seu potencial uso em transplantes autólogos, visando diminuir a não pega do enxerto e a necessidade de imunossupressores (NARDI & MEIRELLES, 2006). Um tipo de CT provenientes de tecidos adultos muito estudado para fins terapêuticos são as CT mesenquimais, encontradas em diversos tecidos, incluindo a derme (MEIRELLES *et al.*, 2008; KOBOLAK *et al.*, 2016).

1.3 Células estromais mesenquimais (CEM)

Em 1991, Caplan propôs pela primeira vez o conceito de CT mesenquimal tendo em vista observações da década de 1960 de diferenciação osteogênica após transplante de células de medula óssea (CAPLAN, 1991). Apenas em 1968 essa questão foi respondida, quando Friedsten e colaboradores associaram o potencial osteogênico à uma população de CT localizada na medula-óssea com a característica mesenquimal e diferente das CT hematopoiéticas. Atualmente acredita-se que estas células estejam presentes em grande parte dos tecidos adultos (MEIRELLES *et al.*, 2008; CAPLAN, 2015) e são chamadas de “células estromais mesenquimais multipotentes” ou “células estromais mesenquimais” (CEM) (SIDNEY *et al.*, 2014), nomenclatura adotada no presente estudo.

As CEM se caracterizam pela morfologia fibroblastóide, adesão ao plástico e por serem positivas para os marcadores de superfície mesenquimais CD29, CD44, CD71, CD73, CD105, CD90 e CD166 e negativas para os marcadores hematopoiéticos

CD45, CD14, CD34, CD133 e HLA-DR, de acordo com o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (2006). São também multipotentes e capazes de diferenciar-se em células mesodermiais como osteoblastos, adipócitos e condrócitos (BIANCO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2016). Além disso, tem capacidade de formar unidades formadoras de colônia (CFU-F), um indicativo da quantidade de células progenitoras presentes no tecido de origem.

As CEM de diferentes localizações anatômicas têm sido associadas à manutenção da homeostase tecidual e reparação após lesões, seja por sua atuação direta ou por seu efeito parácrino (CHEN *et al.*, 2008; NAKAMURA *et al.*, 2013; KLIMCZAK & KOZLOWSKA, 2016). De fato, a análise do meio condicionado, produto de secreção das CEM, contém diversos mediadores do processo de reparo, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, e moléculas de matriz extracelular (CHEN *et al.*, 2008; KONALA *et al.*, 2016). Além disso, estudos demonstraram que condições adversas ambientais, como hipóxia e radiação ultravioleta, estimulam as CEM a sobreviver e a aumentar a secreção dessas moléculas (RAJENDRANNAIR *et al.*, 2016; JEONG *et al.*, 2013). Assim, essas células tem potencial de utilização em diferentes tipos de terapia celular.

É sabido que CEM de tecidos envelhecidos tem participação na origem de doenças associadas ao envelhecimento como câncer, doenças autoimunes, declínio cognitivo, distúrbios neurológicos, entre outros (AHMED *et al.*, 2017). Acredita-se que o microambiente de organismos humanos mais velhos afeta a funcionalidade das CEM, alterando o efeito parácrino dessas células, no próprio tecido ou nos órgãos com os quais há troca de informação (SUI *et al.*, 2016). Além disso, quando comparadas a células mais jovens, as CEM envelhecidas possuem mais danos de DNA e mudanças epigenéticas que diminuem suas capacidades celulares (CHUA *et al.*, 2005; CAKOUROS & GRONTHOS, 2019). CEM derivadas de tecido adiposo de pacientes mais velhos (acima de 50 anos) possuem diferenças em sua capacidade de

diferenciação quando comparados às células de indivíduos mais jovens (YANG *et al.*, 2014).

As CEM podem ser encontradas em diversos tecidos do organismo humano. A derme é uma fonte abundante de células, abrangendo diversos nichos de CT que, além de serem facilmente obtidas, também demonstram potencial de aplicação no reparo neural (HIGASHIDA *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2017), reparo tecidual (CHUNMENG & TIANMING, 2004; FERREIRA & GOMES, 2018) e na recuperação da homeostase do tecido (SHI *et al.*, 2004; KFOURY & SCADDEN, 2015). Dependendo da localização anatômica, podem ocorrer alterações estruturais na derme, como a espessura do tecido ou diferença na quantidade de componentes da matriz extracelular, o que por sua vez pode influenciar as propriedades das CT e seu potencial terapêutico (ARDA *et al.*, 2014).

Alterações das capacidades funcional e de replicação das CEM podem ocorrer também durante a expansão da cultura celular levando à senescência replicativa (BONAB *et al.*, 2006; CHARIF *et al.*, 2017). Além disso, a idade cronológica do doador das CEM deve ser levada em consideração pois é consenso na literatura que também influencia a sua funcionalidade (viabilidade e proliferação) (PANEPUCCI *et al.*, 2004; BYDLOWSKI *et al.*, 2009; BEANE *et al.*, 2014; SISAKHTNEZHAD *et al.*, 2017). A média de idade dos pacientes que se submetem à ritidoplastias (*Lifting facial*) é de cinquenta e sete anos, variando entre quarenta e setenta anos (CASTRO *et al.*, 2005; MENEZES *et al.*, 2010; PITA *et al.*, 2010) enquanto pacientes de abdominoplastia tem idade entre quinze a setenta anos, com média de quarenta e quatro anos (KALUF *et al.*, 2006). Tendo em mente que a idade dos doadores pode influenciar a qualidade das células obtidas *in vitro*, uma fonte mais jovem para obtenção de CEM se mostra necessária.

O prepúcio, material de descarte biológico de cirurgias de postectomia normalmente realizada em pacientes de 2 a 15 anos em função de casos de fimose ou circuncisão, se mostra uma fonte importante de pele para enxerto (ASHLEY 1937; ZAROO *et al.*,

2011) ou até mesmo de CEM de origem de pacientes jovens (SOMUNCU *et al.*, 2015). Além disso, foi relatada a ação de CEM de prepúcio em inibir o crescimento de células de adenocarcinoma gástrico humano *in vitro* e *in vivo* (LI *et al.*, 2013), ao contrário de CEM derivadas de medula óssea, que facilitam o crescimento tumoral (TSUKAMOTO *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2012). Adicionalmente, foi demonstrado que CEM derivadas de prepúcio de neonatos humanos são capazes de se diferenciar em linhagens endoteliais, sugerindo que essas células podem representar uma fonte importante de células para estudos voltados à regeneração de tecidos (VISHNUBALAJI *et al.*, 2012).

No Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da UFSC foram previamente isoladas e caracterizadas CEM derivadas da derme/CEMd (*Dermal Stromal Cell - DSC*) facial humana a partir de descartes de ritidoplastias (JEREMIAS *et al.*, 2014).. Essas células foram cultivadas sobre biomateriais e então analisadas quanto à capacidade *in vitro* de adesão, proliferação e migração celular Além disso, dois trabalhos do grupo avaliaram o potencial terapêutico das DSC (CEMd) da face humana associadas a biomateriais na regeneração da pele de camundongos. Os resultados mostraram aumento no tecido de granulação, recrutamento de células inflamatórias, vascularização, reepitelização e depósito de colágeno que, em conjunto, promoveram aceleração do reparo tecidual (JEREMIAS *et al.*, 2014; GRECCO *et al.*, 2016). Recentemente, o grupo demonstrou ainda que as CEMd expressam marcadores neuronais, sobrevivem em cultura e respondem *in vitro* a estimulação neurogênica e em modelo de lesão em medula espinhal de ratos promovem recuperação motora (MELO *et al.*, 2017). Apesar dos resultados positivos, esses trabalhos foram realizados com células obtidas a partir de ritidoplastias e, portanto de pacientes majoritariamente idosas ou de adultas mais velhas. No presente trabalho, hipotetizamos que CEMd provenientes de fonte mais jovem apresentará um potencial elevado em relação às CEMd mais velhas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

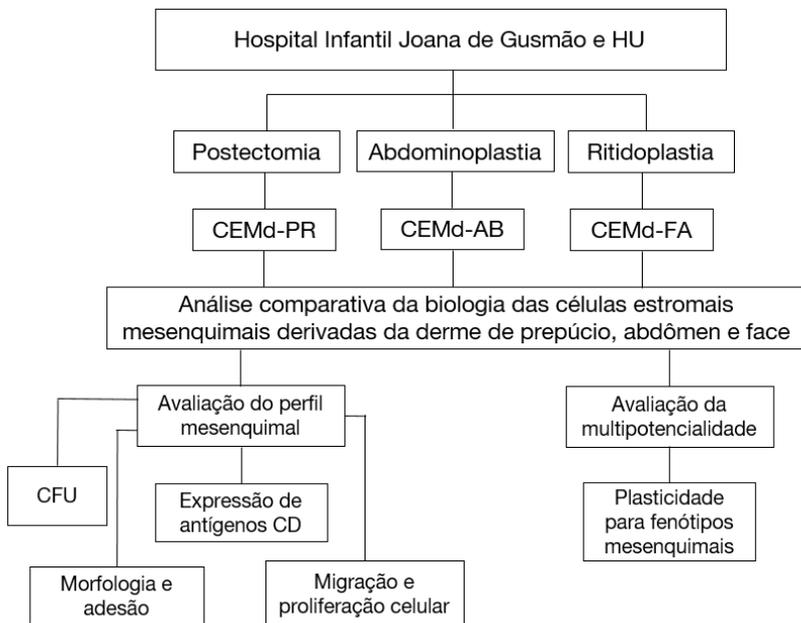
Avaliar *in vitro* o potencial biológico para uso futuro em terapias celulares de células estromais mesenquimais derivadas da derme humana (CEMd) provenientes de diferentes regiões anatômicas de doadores em diferentes idades

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Caracterizar as CEMd derivadas do prepúcio;
- 2.2.2 Analisar comparativamente as CEMd de prepúcio, abdômen e face quanto:
 - 2.2.2.1 Comparar a expressão de marcadores mesenquimais;
 - 2.2.2.2 O potencial de diferenciação para fenótipos mesenquimais osteogênico e condrogênico;
 - 2.2.2.3 A capacidade de migração, proliferação e expansão celular;
 - 2.2.2.4 O potencial clonogênico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Mapa experimental



3.2 Isolamento, cultura e avaliação da morfologia das CEMs humanas

Fragments de pele humana foram obtidos por consentimento (anexo 01 e 02) de três pacientes saudáveis com idades entre 2 e 15 anos (Pac.01: 2 anos, pac. 02: 5 anos e Pac.03: 15 anos de idade) que foram submetidos a cirurgia de postectomia (n=3). O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Infantil Joana de Gusmão, Brasil (2.650.783/2018). CEMd-AB e CEMd-FA foram obtidos de três pacientes saudáveis com idades entre 30 e 50 anos e 55 e 75 anos, respectivamente, que

se submeteram a cirurgias de abdominoplastias (Grazer, 1973) ritidoplastias (Guerrero-Santos et al., 1974) (n=3). O Comitê de Ética Humana do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, aprovou esses procedimentos (1.076.626 e 98, respectivamente). Amostras de tecidos de cerca de 3x3cm foram adicionados a tubos (50 ml) contendo meio *Dulbecco's Eagle's* modificado (DMEM) e transportado ao Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (UFSC), Após lavagem em PBS a epiderme foi removida mecanicamente com auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas e a derme foi macerada e incubada com uma solução de tripsina contendo EDTA 0,25% (1h, 37°C, Invitrogen). A suspensão de células obtidas foi filtrada (filtro de 70-mm [BD]), centrifugada (500g, 7 min) e plaqueada em garrafas de cultura (25-cm²) contendo meio completo DMEM suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal (SBF) e 1 % (v/v) PS (10.000 unidade/mL penicilina, 10.000 µg/mL streptomicona) (Invitrogen, Gibco, UK). Células em cultura primária (passagem zero, P0) foram mantidas à 37 °C em atmosfera úmida de 5% CO² até atingirem 90% de confluência, quando foram desagregadas com tripsina-EDTA 0.05% e replaqueadas em meio completo (1:2 da densidade inicial). O procedimento foi repetido 3 a 4 vezes até P3 ou P4 quando os experimentos foram realizados.

Células em cultura primária foram observadas diariamente em microscópio invertido de contraste de fase (Olympus IX71) para verificação da aderência celular e morfologia. As imagens foram capturadas por sistema Olympus DP71.

3.3 Citometria de Fluxo

Análises de citometria de fluxo foram utilizadas para caracterizar CEMs de acordo com seu perfil de expressão de antígenos de superfície, como descrito previamente com algumas modificações (Jeremias et al, 2014). Resumidamente, $2,5 \times 10^4$ células/tubo foram lavadas em solução salina (PBS) e incubadas em separado com fluoresceína isothiocyanato (FITC) ou phycoerythrina (PE)-conjugado à anticorpos anti-humanos do tipo IgG de camundongo contra marcadores de superfície

mesenquimais (anti-CD73, anti-CD90) ou hematopoiéticos (anti-CD45, anti-CD34) (todos BD, Bioscience) por 30 min à 6 °C no escuro (1:200). Frações de leucócitos foram utilizadas como controle positivo para CD34 e CD45. Nos controles negativos os anticorpos primários foram substituídos pelos anticorpos de isotipos IgG conjugados à fluoróforos (1:200). As células foram lavadas em PBS e analisadas em citometro de fluxo FACSCanto (BD Bioscience) e 10.000 eventos foram constatados. Os dados foram analisados pelo software FLOWJO (Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland).

3.3 Avaliação da capacidade de diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica foi induzida como descrito previamente por Coura e col. (2008), com algumas modificações. Brevemente, monocamadas de CEMs em 70% de confluência e em P4 foram cultivadas em meio indutor para osteogênese: DMEM suplementado com dexametasona (10^{-9} M; Sigma-Aldrich), ascorbato-2-fosfato (50 µg/mL; Sigma-Aldrich), b-glicerol fosfato (3.15 mg/mL; Sigma-Aldrich), 10% SBF e antibióticos. As células foram mantidas à 37°C e 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias. As células controle foram cultivadas em meio completo. Após 30 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich) e coradas com solução de 2% Alizarin Red (Sigma-Aldrich) por 5 min. A diferenciação é confirmada ao ser observadas acúmulo de colágeno por microscopia eletrônica.

3.4 Avaliação da capacidade de diferenciação condrogênica

A diferenciação condrogênica foi induzida com o kit StemXVivo Human/Mouse kit (R&D Systems) de acordo com as instruções do fabricante com modificações. Resumidamente, CEMs das três origens (face, abdômen e prepúcio) em P4 foram tripsinizadas e então 2.5×10^5 células foram centrifugadas à 300 g e o precipitado obtido foi cultivado em tubos de 15 mL com meio especial à 37°C, 5% CO₂ e 95% de umidade, tendo o meio sido trocado a cada 2 dias. Após 30 dias, agregados condrogênicos

foram fixados em paraformaldeído 4% por 1h, desidratados em solução seriada de etanol (100% à 70%) e então em parafina. Os blocos foram seccionados a uma espessura de 5 µm em micrótomo e então desparafinados e corados com Mallory (Sigma) por 30 min e fotografadas em microscópio invertido (Olympus IX83).

3.5 Análise de crescimento e expansão celular

Afim de comparar a capacidade de crescimento das CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA, 5×10^3 células em P4 foram aderidas em placas (24 poços) contendo meio completo. A cada 24 horas, o número de células por poço era contado em câmera de Neubauer e, em seguida, incubadas com solução enzimática de tripsina-EDTA 0.05%. CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA em P4 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço em placas de 6 poços e cultivadas por 2 dias, quando atingiram confluência de aproximadamente 80%. As células foram, então, tripsinizadas e contadas em câmera de Neubauer, centrifugadas e plaqueadas novamente na densidade inicial. O procedimento foi repetido a cada 2 dias até P10. As análises e gráficos foram obtidos a partir do GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3.6 Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia

A capacidade clonogênica de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA foram analisadas como previamente descrito com pequenas modificações (Alt *et al.*, 2011). Resumidamente, células em P4 foram tripsinizadas e plaqueadas em baixa densidade (5×10^2 células/cm²) cultivado em meio completo. Depois de 5 dias, as culturas foram fixadas com paraformaldeído 4% (VETEC, Brazil) e coradas com 0.5% Giemsa por 10 min. Colônias contendo 10 ou mais células e o número de células por colônia foram quantificados. A eficiência de formação de unidade de colônias foi expressa em proporção das células plaqueadas que foram capazes de formar colônias. Os dados foram mostrados em gráficos e analisados pelo Graph Pad Prism Software.

3.7 Ensaio de *scratch*

A capacidade *in vitro* de fechamento de ferida das CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA foi avaliada pelo ensaio *scratch*, como descrito previamente por Zhang e col. (2013). Resumidamente, monocamadas de células em 80% de confluência foram riscadas formando uma área sem células no centro. Os poços foram em seguida lavados duas vezes com PBS a fim de remover resíduos e foram então mantidas em DMEM 10% mais SBF. As feridas foram fotografadas e mensuradas pelo software FLOWJO a cada 24 horas para determinar a porcentagem de fechamento nos tempos avaliados. A porcentagem do fechamento foi calculado subtraindo valores da área aberta em um tempo zero até os obtidos 24 horas após

3.8 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram analisadas por ANOVA uma via e Teste-T de Student quando necessário, utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (Graphpad Software, Inc.). O nível de significância foi estabelecido em $P < 0.05$ e $P < 0.001$. Todas as análises foram realizadas com 3 triplicatas biológicas (3 doadores). Resultados são expressos em média dos três experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1 Cultura e caracterização morfológica das CEMd

As análises microscópicas das CEMd-PR revelaram que após 24h do procedimento de isolamento e plaqueamento da cultura primária, estas células aderiram à placa de cultura e apresentaram morfologia alongada, enquanto as CEMd-AB e CEMd-FA permaneceram menos aderentes e com morfologia arredondada (Fig. 1A). No quinto dia de cultura primária, CEMd-PR proliferaram e exibiram morfologia fibroblastóide, atingindo confluência de 100% no dia 9 (dados não apresentados), quando foram tripsinizadas e replaqueadas formando a passagem 1 (P1), atingindo novamente confluência após 4 dias quando foram replaqueadas em P2 (Fig. 1B). A morfologia alongada e aderente das CEMd-AB e CEMd-FA foram inicialmente observadas no dia 5 da cultura primária (Fig. 1B). Essas células levaram 28 e 29 dias, respectivamente, para atingir confluência e serem replaqueadas em P1. Nesse período, CEMd-PR foram replaqueadas em P3 e haviam atingido 4 vezes mais a quantidade de células em P1.

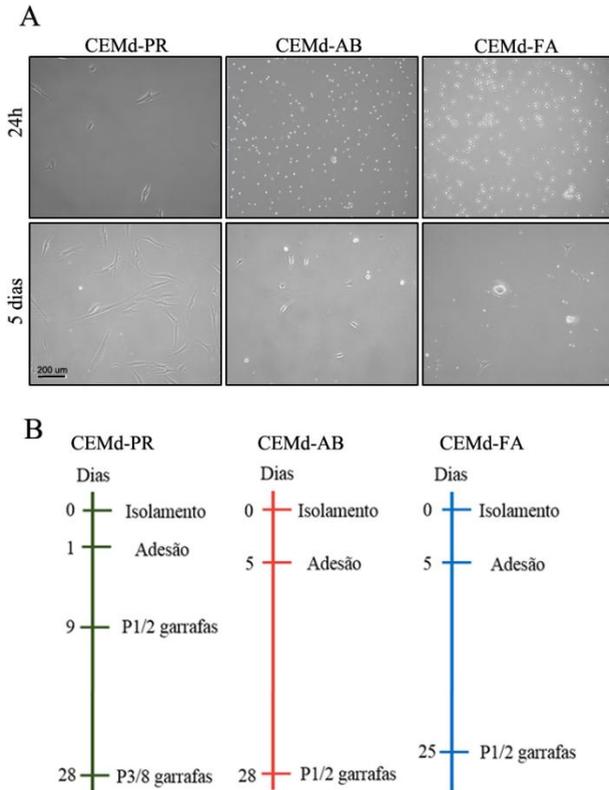


Fig. 1 Isolamento de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA. **a** Imagens representativas por contraste de fase de cultura de células 24 horas e 5 dias após o isolamento. **b** Linha do tempo (em dias) do isolamento e crescimento celular durante os primeiros 28 dias de cultivo. N = 3. Scale bar = 200 μ m.

4.2 Diferenciação mesenquimal e caracterização imunofenotípica

A fim de aprofundar a caracterização das CEMd, em seguida foi investigada a capacidade das CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA de se diferenciar em derivados da mesoderme (Fig. 2). Todas as CEMd foram capazes de se diferenciar em osteócitos (Fig 2A, C e E) e condrócitos (Fig. 2B, D e F), identificados através de uma matriz extracelular calcificada, corada por Alizarin Red e fibras colágenas coradas por Mallory, respectivamente.

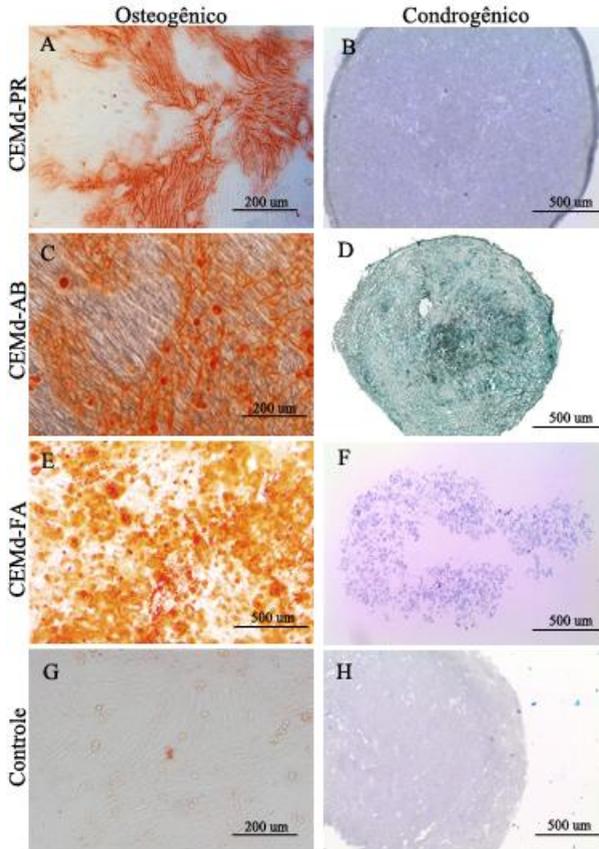


Fig. 2 Diferenciação mesenquimal. Imagens representativas de CEMd-PR (A, B), CEMd-AB (C, D) e CEMd-FA (E-F). Matriz extracelular corada por Alizarin Red (A, C e E) e matriz extracelular cartilaginosa (colágeno) corada por Mallory (B, D e F) demonstrando potencial de diferenciação osteogênico e condrogênico, respectivamente. Controles osteogênico e condrogênico (G e H). Barra de escala = 200 µm (A, C, E e G) e 500 µm (B, D, F e H).

Seguindo a caracterização das CEMd, a expressão de marcadores mesenquimais (CD73 e CD90) e hematopoiéticos (CD34 e CD45) foram analisados por citometria de fluxo (Tabela 1). Todos os CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA se mostraram positivos para CD73 e CD90 e negativos para CD34 e CD45.

Estes resultados da capacidade de diferenciação mesenquimal e expressão de marcadores imunofenotípicos, em conjunto com o resultado anterior de adesão e morfologia, demonstram que todos as CEMd, isoladas e expandidas sob condições de cultura estão de acordo com o critério do *International Society for Cellular Therapy for the MSC characterization* (Dominici et al., 2006).

Tabela 1 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA para marcadores mesenquimais (CD73, CD90) e hematopoiéticos (CD34, CD45).

	Marcadores Mesenquimais		Marcadores Hematopoiéticos	
	CD73	CD90	CD34	CD45
CEMd-PR	99.21% ± 0.641	97.56% ± 0.949	0.170% ± 0.075	0.125% ± 0.170
CEMd-AB	99.58% ± 0.350	97.15% ± 3.786	0.2% ± 0.068	0.4% ± 0.057
CEMd-FA	99.19% ± 1.004	99.1% ± 0.283	1.89% ± 1.245	0.505% ± 0.474

Resultados demonstrados como porcentagem da media de três experimentos independentes ± SD.

4.3 Análise de crescimento e expansão celular

Então, a capacidade proliferativa de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA foram analisadas por ensaios de expansão e crescimento celular (Fig. 3). A contagem diária das células em P4 revelaram um aumento progressivo no número de todas as CEMd

até atingirem confluência em 96 horas (Fig. 3A). Nesse momento, o número de CEMd-PR aumentou 10 vezes e o das CEMd-AB e CEMd-FA, 9 vezes cada. Apesar disso, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos de CEMd.

A capacidade de expansão das CEMd foi avaliada entre as passagens 4 e 10 (Fig. 3B). O número de CEMd-FA aumentou até P7 (1.8 vezes) diminuindo depois disso e, em P10 quando seu número era 1.3 vezes maior do que em P4. No entanto, as CEMd-AB, expandiram 2 vezes em P6 e 2.1 vezes em P9 comparado a passage inicial – P4, decaindo após P9. A maior capacidade de expansão foi observada pelas CEMd-PR em todas as passagens, tendo aumentado progressivamente até P9, com valores de 1,4 e 1,8 vezes mais altos do que CEMd-AB e CEM-FA, respectivamente. É importante mencionar que em P10, todas as CEMd tiveram sua capacidade de proliferação diminuída, sugerindo que nesse estágio elas poderiam estar em expansão descendente em função da senescência. Esses dados sugerem o maior potencial de expansão de CEMd-PR comparado às outras CEMd, considerando as condições de cultivo utilizadas neste estudo.

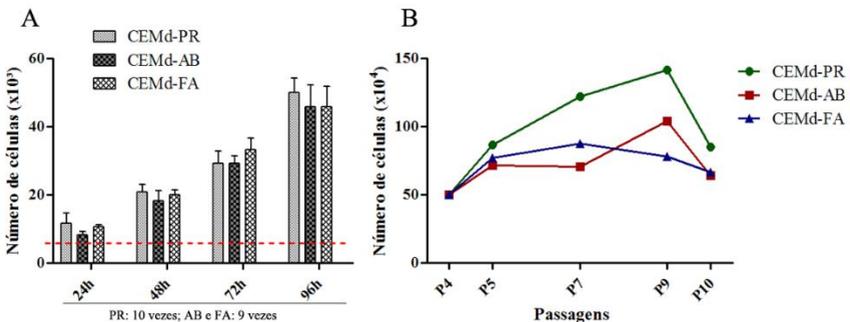


Fig. 3. Crescimento e expansão de CEMd (A) Crescimento de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA em P4. As células foram removidas diariamente pela enzima tripsina e contadas em camera de Neubauer até 96 horas de cultura, quando atingiam confluência.

Resultados demonstrados em média \pm DP de três experimentos realizados em triplicatas. A linha pontilhada vermelha indica o número de células inicialmente plaqueadas (5×10^3). **(B)** Expansão de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA entre P4 e P10. As células (5×10^4) foram tripsinizadas e contadas em camera de Neubauer a cada dois dias quando atingiam confluência e então foram novamente plaqueadas na quantidade inicial para a passage seguinte. Os resultados estão demonstrados como média \pm DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$ por Test T vs. CEMd-AB e CEMd-FA.

4.4 Potencial clonogênico das CEMd

Sabendo que a capacidade clonogênica é um indicativo do número de células-tronco/progenitoras (Friedenstein et al, 1974; Bianco et al, 2012), em seguida foi realizado o ensaio de formação de unidades formadoras de colônias (CFU). A figura 4A mostra imagens representativas de colônias. No 5º dia de cultura as colônias com mais de 10 células foram contabilizadas e a eficiência foi calculada (Fig 4B), bem como o número de células por colônia (Fig. 4C). As CEMd-PR apresentaram eficiência de formação de colônia de aproximadamente 20%, ou seja, cerca de 3x superior às CEMd-AB e CEMd-FA, que tiveram eficiência de 7% e 9%, respectivamente (Fig. 4B).

Colônias de CEMd-PR se mostraram heterogêneas em relação ao número de células, contendo em média 28 células, valor significativamente maior do que os de CEMd-AB, média de 12 células e CEMd-FA, média de 16 células (Fig. 4C).

Em conjunto, esses dados sugerem que CEMd-PR possuem uma maior capacidade clonogênica e potencial proliferativo do que as outras duas CEMd analisadas.

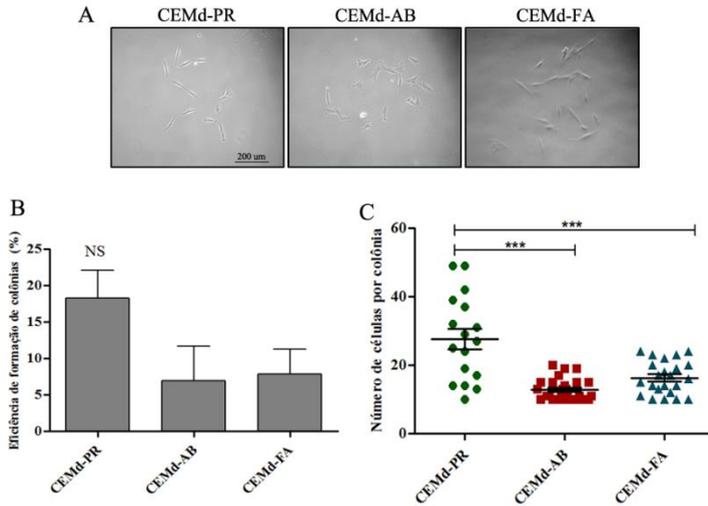


Fig. 4. Análise de unidades formadoras de colônia (CFU). **(A)** Imagens representativas de colônias de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA de CFU no 5º dia de cultura, sendo possível visualizar a morfologia fusiforme e aderência ao plástico. **(B)** Eficiência de formação de colônias. Não foram encontradas diferenças significativas entre as CEMd por ANOVA. Os resultados são expressos em porcentagem (\pm SD) da formação de colônias de 500 células plaqueadas de três experimentos independentes. **(C)** Número de células por colônia. Resultados são expressos com média \pm DP de três experimentos. NS. Não significativo por ANOVA vs. CEMd-AB e CEMd-FA. *** $p < 0.001$ por teste T de Student. Scale bar = 200 um.

4.5 Capacidade de fechamento de ferida (wound healing) das CEMd utilizando o ensaio scratch

Em seguida, foi avaliado comparativamente pelo ensaio de *wound healing*, a capacidade das CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA de fechamento de uma área *in vitro*. O fechamento 24 horas após a lesão das CEMd-PR e CEMd-AB foram similares (aproximadamente 80%) e 2 vezes maior do que o de CEMd-FA

(40%) (Fig.5A-B). sugerindo uma maior capacidade de migração celular e fechamento (Fig.5A-B). As áreas lesionadas estavam completamente fechadas após 48 horas em todas as CEMd avaliadas (Fig. 5A).

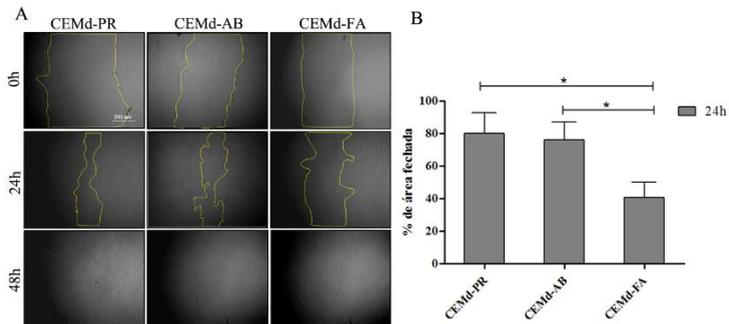


Fig. 5 Ensaio de *scratch* das CEMd. **(A)** Imagens representativas de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA em 0 hora, 24h e 48h após a lesão. **(B)** Gráfico mostrando a porcentagem da área fechada 24h após a lesão. Resultados expressos em media da porcentagem \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0.05$ by ANOVA. Barra de escala= 500 μ m.

5. DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que CEMd-FA representam uma alternativa para regeneração da pele devido às suas propriedades de CEM, abundância e obtenção por procedimentos menos invasivos (JEREMIAS *et al*, 2014). No presente estudo, nos caracterizamos comparativamente CEM derivadas da derme de três regiões anatômicas distintas e de doadores de diferentes idades: CEMd-PR de doadores jovens, CEMd-AB de doadores adultos e CEMd-FA de doadores mais velhos. Todos mostraram características de CEM semelhantes em relação à adesão ao plástico, morfologia alongada, potencial de diferenciação mesenquimal e expressão de marcadores de superfície. Além disso, CEMd-PR mostrou maior capacidade *in vitro* de expansão, proliferação e de formação de colônias comparado às CEMd-AB e CEMd-FA. As CEMd-PR e CEMd-AB demonstraram capacidade de *wound healing* equivalentes, ambas significativamente maiores do que às CEMd-FA. Em conjunto esses resultados sugerem que a idade cronológica dos doadores do tecido e a localização anatômica de origem do tecido podem afetar a funcionalidade das CEMd e que as CEMd-PR são uma fonte alternativa viável e atrativa para uso em terapias celulares.

Inicialmente o isolamento e eficiência de expansão das CEMd em cultura primária foram avaliadas. Um número significativo de CEMd-PR exibindo a morfologia alongada e aderindo à garrafa de cultura 24 horas após o isolamento, enquanto CEMd-AB e CEMd-FA demoraram 5 dias para atingir o mesmo resultado. Além disso, CEMd-PR atingiu confluência em cultura primária 16 e 19 dias antes de CEMd-AB e CEMd-FA. Quando estas atingiram confluência as CEMd-PR haviam expandido 4 vezes, demonstrando sua maior eficiência de isolamento e capacidade de expansão em fase inicial de cultura celular. Esses resultados sugerem que a derme do prepúcio contém uma maior proporção de células-tronco/progenitoras, possivelmente relacionadas à menor idade dos doadores, corroborando com um estudo anterior em que o transplante em camundongos de CEM de origem de indivíduos jovens envelhecidos retarda o

envelhecimento (SHEN *et al*, 2011). Também foi documentado que as diferentes fontes de CEMd exibem diferentes propriedades em relação a sua eficiência biológica (SAKAUCHI *et al*, 2005). Adicionalmente, é sabido que CEM derivadas da medula óssea possuem uma capacidade maior de diferenciação em condrócitos quando comparado com células de placenta e tecidos fetais (BERNARDO *et al*, 2007). Entretanto, foi documentado que CEM derivadas do folículo piloso são menos suscetíveis a senescência replicativa *in vitro* comparado com medula óssea (KOOBATIAN *et al*, 2015). Esses dados sugerem que a funcionalidade das CEM são dependentes da localização anatômica.

Adicionalmente à morfologia alongada e à capacidade de adesão ao plástico, CEM são caracterizadas por um perfil mesenquimal de marcadores de superfície e seu potencial de diferenciação em fenótipos mesenquimais (NARDI & MEIRELLES, 2006). Apesar das CEMd-PR atingirem confluência mais cedo na cultura primária, todas as CEMd exibiram uma morfologia fibroblastóide e alongada e foram capazes de aderir ao plástico de material de cultura. Além disso, CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA apresentaram resultados semelhantes para os marcadores de superfície mesenquimais e na capacidade de diferenciação em condrócitos e osteócitos, apesar do aparente tamanho reduzido do precipitado de condrócitos produzido por CEMd-PR comparado ao das CEMd-FA. Diferenças na origem embrionária das dermes do prepúcio (origem mesodermal) (DE KOCK *et al*, 2012), e da derme facial, que é gerada por células da crista neural, que também são responsáveis por produzir a cartilagem facial (DOUARIN, 1982), podem explicar, em parte, a diferença na capacidade da diferenciação condrogênica destas CEMd. Em conjunto, esses resultados sugerem que todas as CEMd são semelhantes em relação às características de CEM.

Os resultados também demonstram um perfil de crescimento similar entre as populações de CEMd-PR, CEMd-AB e CEMd-FA, as quais aumentaram de 9 a 10 vezes durante as 96 horas de P4. Além disso, de P4 as CEMd mantiveram um perfil proliferativo progressivo até P9, reduzindo em seguida. Isso sugere

um possível processo de senescência replicativa ocorrendo nessas células. Os maiores valores foram obtidos pelas CEMd-PR, seguido de CEMd-AB e então CEMd-FA e isso talvez tenha relação com a região anatômica do tecido e/ou à idade do doador. De fato, CEMs de diferentes fontes (BAKSH *et al*, 2007) ou idades de doadores (HUANG *et al*, 2013) possuem capacidades proliferativas distintas. Ainda assim, o declínio no crescimento avaliado em todas as populações de CEM foi observada na mesma passagem, indicando que a senescência replicativa das CEMd independe desses fatores, é possível que isso seja uma característica em comum com outras CEM, de diferentes tecidos. Esse dado é de grande valia ao se considerar essas células para expansão e armazenamento em bancos celulares.

Apesar de não comparadas com outras CEM, o potencial clonogênico das CEMd-PR foi demonstrado anteriormente (NAJAR *et al*, 2016). Entretanto, no presente estudo mostramos que CEMd-PR exibem uma maior eficiência clonogênica, bem como colônias mais heterogêneas no seu número de células, tendo uma média de 2 vezes mais células do que CEMd-AB e CEMd-FA. Esse resultado sugere que as CEMd-PR apresentam um maior número de células-tronco/progenitoras com maior potencial de auto renovação e proliferação. Junto com o resultado de crescimento populacional das CEMd acima, esse resultado pode ser relacionado com a idade dos doadores e/ou a localização anatômica de origem dos tecidos. Um estudo *in vitro* mostrou que a capacidade de expansão e diferenciação das CEM derivadas do tecido adiposo são prejudicadas conforme a idade é mais avançada (CHOUDHERY *et al*, 2014). Outro estudo sugere que CEM da medula óssea diminuem em número durante o envelhecimento e, em geral, a qualidade das CEM é afetada negativamente (SOLZING *et al*, 2008). Além disso, é sabido que aloenxertos de doadores com 45 anos ou mais, diminuem a taxa de sobrevivência de pacientes transplantados (KOLLMAN *et al*, 2001). É importante que novos estudos *in vivo* sejam realizados para melhor compreender as implicações da idade dos doadores para a eficiência das CEM.

Sabendo que a proliferação e migração celular são essenciais para o reparo e fechamento de feridas (EMING and MARTIN and TOMIC-CANIC, 2014), a capacidade de fechamento de ferida das CEMd foi avaliada *in vitro* pelo ensaio de *scratch assay*. Um estudo analisou a capacidade das CEM derivadas do tecido adiposo *in vivo* e demonstrou que essas CEM aceleravam o fechamento de feridas em ratos diabéticos, apesar de isso não acontecer a partir de angiogênese (MAHARLOEEI *et al*, 2001). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também demonstrou que CEMd-AB possuem um potencial mais alto de fechamento de ferida quando comparado às CEM derivadas do tecido adiposo (ZOMER *et al*, in press). No presente estudo, nossos resultados mostram que CEMd-PR e CEMd-AB exibem valores semelhantes de fechamento de ferida, os quais são significativamente maiores do que os de CEMd-FA, sugerindo uma maior migração celular das duas primeiras populações celulares.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que, apesar de todas as populações serem fontes interessantes de CEMd para terapias regenerativas, fica claro que as CEMd-PR apresentam maior eficiência de isolamento e capacidade e expansão e crescimento *in vitro*, bem como maior potencial clonogênico, proliferativo e de habilidade de fechamento de ferida. Adicionalmente, o fato de os doadores serem mais jovens e do tecido de origem ser considerado descarte biológico durante cirurgias, fazem do prepúcio uma fonte promissora e atrativa de CEMd para futuras aplicações em terapias celulares.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho as CEMd derivadas do prepúcio apresentaram resultados promissores em relação às CEMd do abdômen e da face. CEMd derivadas do prepúcio apresentam maior capacidade de expansão e crescimento celular, maior eficiência em formação de CFU-F em relação às CEMd do abdômen e face e capacidade de fechamento de ferida *in vitro* superior ao de CEMd derivadas da face. Assim, concluímos que a idade cronológica dos doadores afeta a qualidade das CEMd, sendo o prepúcio uma fonte jovem e promissora de células estromais mesenquimais para estudos visando terapias celulares.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, A. et al. Effect of aging on stem cells. **WJEM**, v. 7, n. 1, p. 1 – 10, 2017.

ALISON, M. R. Invited Review: Attributes of adult stem cells. **Journal of Pathology**, v. 217, n. 2, p. 144 – 160, 2009.

ALONSO, L; FUCHS, E. Stem cells of the skin epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100 Suppl, p.11830 – 11835, 2003.

ARDA, O; GÖKSÜGÜR, N; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3 – 13, 2014.

ASHLEY, F. Foreskins as Skin Grafts. **Annals of Surgery**, v. 106, n. 2, p. 252 – 256, 1937.

BAKSH, D; YAO, R; TUAN RS. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. **Stem Cells Journal**, v. 25, n. 6, p. 1384–92, 2007.

BEANE, O. S. et al. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115963, 2014.

BERNARDO, ME. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow Display a Better Chondrogenic Differentiation Compared with Other Sources. **Connective Tissue Research**, v. 48, n. 3, p. 132–40, 2007.

BIANCO, P. et al. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180 – 192, 2001.

BONAB, M. et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biology**, v. 7, n. 1, p. 1 – 14, 2006.

- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 1, p. 25-35, 2009.
- CAKOUROS, D; GRONTHOS, S. Epigenetic Regulation of Bone Marrow Stem Cell Aging: Revealing Epigenetic Signatures associated with Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cell Aging. **Aging and Disease**, v. 10, n. 1, p. 174 – 189, 2019.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CAPLAN, A. I. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. **Stem Cells International**, v. 2015, n. 628767, p. 6, 2015.
- CASTRO, C. C. et al. Avaliação Sobre Resultados Tardios em Ritidoplastia. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 20, n. 2, p. 124-126, 2005.
- CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney International Supplements**, v. 1, n. 3, p. 63-67, 2011.
- CHARIF, N. et al. Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. **Biomed Mater Eng**, v. 28, n. s1, p. S57 – S63, 2017.
- CHEN, L. et al. Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008.
- CHEN, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell Death & Differentiation**, v. 23, n. 1, p. 1128 – 139, 2016.
- CHUA, K. et al. DNA Repair, Genome Stability, and Aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 497 – 512, 2005.
- CHUNMENG, S; TIANMIN, C. Skin: a promising reservoir for adult stem cell populations. **Medical Hypothesis**, v. 62, n. 5, p. 683 – 688, 2004.

DE KOCK, J. et al. Mesoderm-Derived Stem Cells: The Link Between the Transcriptome and Their Differentiation Potential. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 18, p. 3309–23, 2012.

DOSS, M. X. et al. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. **Journal of Cellular and Molecular**, v. 8, n. 4, p. 465-473, 2004.

EMING, SA; MARTIN, P; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 6, p. 6:265sr6-265sr6, 2014.

ESPINOZA, N.; PETERSON, M. How to depolarize the ethical debate over human embryonic stem cell research (and other ethical debates too!). **Journal of Medical Ethics**, v. 38, n. 8, p. 496-500, 2012.

FERREIRA, A. D. F; GOMES, D. A. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. **Bioengineering**, v. 6, n. 1, p. E4, 2018.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, v. 445, n. 22, p. 834 – 842, 2007.

GONZALES, K, A; FUCHS, E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. **Developmental Cell**, v. 43, n. 4, p. 187 – 401, 2017.

GRECCO, R. M. 2016. Potencial de reparo cutâneo de células-tronco mesenquimais dérmicas associadas à nanomatriz de celulose bacteriana. Dissertação de mestrado. **Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 139.

JEREMIAS, T. D. S. et al. Dermal substitutes support the growth of human skin-derived mesenchymal stromal cells: Potential tool for skin regeneration. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.

JEONG, Y. et al. Ultraviolet B preconditioning enhances the hair growth-promoting effects of adipose-derived stem cells via generation of reactive oxygen species. **Stem cells and development**, v. 22, n. 1, p. 158 – 168, 2013.

JUNQUEIRA & CARNEIRO. **Histologia básica**, 12^a edição, editora Guanabara Koogan, 2013.

KALUF, R.; AZEVEDO, F. N.; RODRIGUES, L. O. Sistemática Cirúrgica em Pacientes Ex-Obesos. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 21, n. 3, p. 166-174, 2006.

KFOURY, Y; SCADDEN, D. T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 239 – 53, 2015.

KOBOLAK, J. et al. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, v. 15, n. 99, p. 62 – 8, 2016.

KLIMCZAK, A; KOZLOWSKA, U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. **Stem Cells International**, v. 2015, n. 4285215, p. 1 – 11, 2015.

KOLLMAN, C. et al. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. **The American Society of Hematology**, v. 98, n. 7, p. 2043–51, 2001.

KONALA, V. B. R. et al. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. **Cytherapy**, v. 18, n. 1, p. 13 – 24, 2016.

KOBBATIAN, M. et al. Differential Effects of Culture Senescence and Mechanical Stimulation on the Proliferation and Leiomyogenic Differentiation of MSC from Different Sources: Implications for Engineering Vascular Grafts. **Tissue Engineering**, v. 21, n.7-8, p. 1364–75, 2015.

LI, Y. et al. Mesenchymal stem cell-like cells from children foreskin inhibit the growth of SGC-7901 gastric cancer cells. **Exp Mil Pathol** v. 94, n. 3, p. 430 – 437, 2013.

LIU, S. et al. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, p. E982, 2016.

MEIRELLES, L; CAPLAN, A; NARDI, N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287 – 2299, 2008.

MELO, F. et al. Transplantation of Human Skin-Derived Mesenchymal Stromal Cells Improves Locomotor Recovery After Spinal Cord Injury in Rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 37, n. 5, p. 941 – 947, 2017.

MENEZES, M. V. A. et al. Avaliação dos resultados do mini-lifting modificado: estudo prospectivo. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 2, p. 285-290, 2010.

NAJAR, M. et al. Mesenchymal stromal cells from the foreskin: Tissue isolation, cell characterization and immunobiological properties. **Cytotherapy**, v. 18, n. 3, p. 320–35, 2016.

NAKAMURA, Y. et al. Enhanced wound healing by topical administration of mesenchymal stem cells transfected with stromal cell-derived factor-1. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9393–400, dez. 2013.

NARDI, N; MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. **Handb Exp Pharmacol**, v. 174, p. 249 – 282, 2006.

PANEPUCCI, R. A. et al. Comparison of Gene Expression of Umbilical Cord Vein and Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1273-1278, 2004.

PITA, P. C. C. et al. Lifting cervical gravitacional. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 25, n. 2, p. 291-296, 2010.

RAJENDRANNAIR, D. S. et al. Differential response of human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to hypoxia–reoxygenation injury. **Molecular and Cellular Biochemistry**, p. 1 – 15, 2016.

SACCHETTI, B. et al. No Identical “Mesenchymal Stem Cells” at Different Times and Sites: Human Committed Progenitors of Distinct Origin and Differentiation Potential Are Incorporated as

Adventitial Cells in Microvessels. **Cell Press**, v. 6, n. 6, p. 897 – 913, 2016.

SHEN J. et al. Transplantation of mesenchymal stem cells from young donors delays aging in mice. **Scientific Reports**, v. 1, n. 67, p. 1–7, 2011.

SHI, C. et al. Transplantation of Dermal Multipotent Cells Promotes Survival and Wound Healing in Rats with Combined Radiation and Wound Injury. **Radiation Research**, v. 162, n. 1, p. 56 – 63, 2004.

SIDNEY, L. E. et al. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. **Stem Cells**, v. 32, p. 1380–1389, 2014.

SISAKHTNEZHAD, S; ALIMORADI, E; AKRAMI, H. External factors influencing mesenchymal stem cell fate in vitro. **Eur J Cell Biol**, v. 96, n. 1, p. 13 – 33, 2017.

SOBHANI, A. et al. Multipotent Stem Cell and Current Application. **Acta Med Iran**, v. 55, n. 1, p. 6 – 23, 2017.

SOLZING, A. et al. Age-related changes in human bone marrow derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 3, p. 163–173, 2008.

SOMUNCU, ÖS. et al. Characterization and Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Newborn Foreskin Tissue. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 177, n. 5, p. 1040 – 1054, 2015.

STELLHEYER, K; KRAHL, D. Skin mesenchymal stem cells: Prospects for clinical dermatology. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 5, p. 869 – 865, 2010.

SUI, B. et al. Micro environmental Views on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in Aging. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 12, p. 1333 – 1340, 2016.

TAKEO, M; LEE, W; ITO, M. Wound Healing and Skin Regeneration. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 1, p. 1 – 12, 2015.

TSUKAMOTO, S. et al. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. **International Journal of Oncology**, v. 40, p. 163 – 169, 2012.

YANG, Z.; HAO, J.; HU, Z. M. MicroRNA expression profiles in human adipose derived stem cells during chondrogenic differentiation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 35, p. 579-586, 2015.

VISHNUBALAJI, R. et al. Skin-derived multipotent stromal cells - an archrival for mesenchymal stem cells. **Cell and tissue research**, v. 350, n.1, p. 1 – 12, 2012.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

ZAROO, M. et al. Use of preputial skin for coverage of post-burn contractures of fingers in children. **Indian J Plast Surg**, v. 44, n. 1, p. 68 – 74, 2011.

ZHU, W. et al. Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo. **Cancer Letters**, v. 315, p. 28 – 37, 2012.

ZOMER, H. B. et al. In vitro comparative study of human mesenchymal stromal cells from dermis and adipose tissue for application in skin wound healing. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. In press.

ZOUBOULIS, C. et al. Human skin stem cells and the ageing process. **Exp Gerontol**, v. 43, n. 11, p. 986 – 997, 2008.

8. ANEXOS

Anexo 01 – Termo de consentimento livre e esclarecido
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA CENTRO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Análise comparativa da biologia de células-tronco adultas derivadas da pele do prepúcio, da face e do abdômen humanos.”

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereira e Profª. Dra. Andrea Gonçalves Trentin.

Pesquisadores participantes: Adriane Cristina Fagundes, Priscilla Barros Delben, Camila Acordi da Silva, Juliano Tibola, Diana Heck e Gisele Kristina dos Santos Varela.

Telefones para contato: (48) 3721-4582 / (48) 996306462

E-mail: adriane.cristina.fagundes@gmail.com

Endereço: Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), Universidade Federal de Santa Catarina - Campus Universitário - Trindade, Setor F, CEP 88040-900 - Florianópolis - SC

Prezados pais/responsáveis do participante,

Seu filho está sendo convidado para participar como voluntário do trabalho de pesquisa “Análise comparativa das células-tronco adultas derivadas da pele de prepúcio, face e abdômen humanos”,

de responsabilidade dos pesquisadores Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereira e Profa. Dra. Andréa Gonçalves Trentin. A seguir serão apresentados informações e esclarecimentos a respeito da proposta do trabalho. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida entrando em contato com o laboratório responsável (Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual – LACERT) pelos contatos citados acima ou com Comitê de Ética em Pesquisas envolvendo Seres Humanos do Hospital Infantil Joana de Gusmão (CEP-HIJG) (48) 3251-9092 ou pelo e-mail cephijg@saude.sc.gov.br. Declaramos que as normas da Resolução 466/12 de 12/06/2012, CONEP e suas complementares, que tratam dos preceitos éticos e da proteção aos participantes da pesquisa, serão obedecidas em todas as fases da pesquisa.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

As células-tronco adultas são importantes para a manutenção e recuperação dos tecidos do nosso corpo. A pele é uma grande fonte dessas células, podendo elas serem isoladas de diversos locais do corpo, como das regiões do rosto, abdômen e do prepúcio (pele que recobre a glândula do pênis). Este estudo tem como objetivo avaliar o potencial biológico de células-tronco retiradas da pele humana de crianças, adultos e idosos. Sabe-se que a idade do cedente está relacionada ao bom funcionamento destas células cultivadas em laboratório, tendo um funcionamento menor em pessoas mais velhas.

Este trabalho trará mais conhecimento sobre as fontes de células-tronco (ou seja, os locais do corpo de onde elas vem), além de possivelmente demonstrar que células-tronco mais jovens (do prepúcio) possuem maior potencial para tratamentos de doenças. Além disso, este trabalho poderá trazer novas estratégias para prevenir e diminuir os efeitos negativos do envelhecimento humano, podendo ser útil para um maior conhecimento e prevenção de danos que podem levar a doenças como câncer.

Caso seu filho aceite participar da pesquisa, você irá responder a um questionário com perguntas a respeito da idade, altura, peso (para obtenção do índice de massa corporal) e doenças crônicas (síndromes metabólicas, câncer e doenças autoimunes) do seu filho. Durante a cirurgia de circuncisão, pedaços de pele que seriam descartados no lixo serão coletados (um fragmento de cerca de 2x2cm) em condições estéreis e acondicionado em um frasco plástico em uma solução contendo 1 grama de antibiótico (cefazolina). A pele será encaminhada ao LACERT para a obtenção das células-tronco. Após, as células-tronco serão preservadas em nitrogênio líquido para futuros experimentos laboratoriais também no LACERT. Quaisquer restos de pele serão devidamente tratados e descartados em lixo hospitalar.

As células serão guardadas pelo tempo de duração deste projeto (até 2021), formando o que chamamos de biorrepositório. Você pode, a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízo, retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no biorrepositório, sendo que a desistência pode ocorrer após a documentação escrita e assinada. Depois de formalizada a desistência, qualquer material guardado será devolvido. Em qualquer momento você pode também entrar em contato para tirar dúvidas e para saber dos resultados que o material cedido pelo seu filho gerou. Além disso, quaisquer novas pesquisas a serem realizadas com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e o consentimento do paciente será buscado novamente.

Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados, sendo tomadas todas as providências necessárias para manter o sigilo. No entanto, qualquer pesquisa envolvendo seres humanos possui seus riscos e benefícios. Existe o risco de alterações psicológicas (estresse, constrangimento, cansaço ou aborrecimento) ao ser abordado sobre este estudo e responder ao questionário. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, porém, serão

mostrados apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome, instituição ou qualquer informação relacionada à sua privacidade. Não haverá benefícios diretos, entretanto benefícios sociais são esperados pelo conhecimento gerado e possibilidade de avanços científicos futuros. Caso não queira mais fazer parte deste estudo, a qualquer momento você pode entrar em contato através dos telefones ou e-mail citado acima.

Duas vias deste documento estão sendo rubricadas e assinadas por você, por um pesquisador responsável e pelo (a) pesquisador (a) participante. Guarde cuidadosamente a sua via, pois é um documento que traz importantes informações de contato e garante os seus direitos como participante da pesquisa. Você não terá nenhuma despesa com a sua participação na pesquisa. Se por ventura alguma despesa decorrente da sua participação nessa pesquisa vier a ocorrer, o LACERT garante o ressarcimento dessa despesa. Caso você tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada em nosso país.

Como forma de manifestar seu consentimento solicitamos que a Sr. (a) assine esse documento.

Assinatura do pesquisador responsável:

Assinatura do (a) pesquisador (a) participante:

CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu, _____,
RG _____ e meu filho
_____, RG _____,
fomos esclarecidos sobre a pesquisa “Análise comparativa da
biologia de células-tronco adultas derivadas da pele do prepúcio,
da face e do abdômen humanos.” e por livre e espontânea vontade
aceitamos que ele participe da pesquisa.

Assinatura do (a) responsável:
_____.

Assinatura do paciente:
_____.

Florianópolis, ____ de _____ de 2018.

Anexo 02 – Termo de assentimento

TERMO DE ASSENTIMENTO

Título do Trabalho: **Análise comparativa da biologia de células-tronco adultas derivadas da pele do prepúcio, face e abdômen humanos.**

Prezada criança/adolescente e responsável:

Por favor, leia atentamente as instruções abaixo antes de decidir se deseja e concorda em participar do estudo.

Eu, *(nome da criança/adolescente)* confirmo que entendi que:

1. Este estudo faz parte de um trabalho de pesquisa para conclusão do curso de mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento da UFSC da pesquisadora Adriane Cristina Fagundes, que está sendo orientada pelos Professores Andréa Gonçalves Trentin e Maurício José Lopes Pereima. Também participam desse trabalho, os pesquisadores Priscilla Barros Delben, Camila Acordi da Silva, Juliano Tibola, Diana Heck, Gisele Kristina dos Santos Varela.
2. O meu responsável leu este documento para me explicar o que está escrito e tirar minhas dúvidas.
3. Este trabalho vai comparar células-tronco adultas da pele humana de pacientes jovens, de adultos e idosos. Se eu quiser, posso fazer parte dessa pesquisa porque sou jovem (tenho entre 4 e 8 anos) e farei uma cirurgia que pode ajudar nesse trabalho científico.
4. O pedaço de pele que estou cedendo será utilizado para obter as células necessárias para o projeto.
5. Se eu aceitar participar desse trabalho, um pedaço de pele (mais ou menos 2 x 2cm) que seria descartado no lixo após a minha

cirurgia, será enviado ao Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT/UFSC) para a realização da pesquisa.

6. A minha participação nesse trabalho é importante porque assim teremos mais conhecimento científico sobre as células-tronco adultas de pessoas de idades diferentes e vamos saber se elas podem ser melhores para tratar algumas doenças.

7. O Hospital Infantil Joana de Gusmão já deu a permissão por escrito para que esta pesquisa seja realizada.

8. Não vou gastar nenhum dinheiro participando. Se eu escolher participar ou recusar, isso não terá nenhum benefício ou restrição para mim ou para meus pais/responsáveis.

9. Eu não preciso participar dessa pesquisa se eu não quiser e isto não vai prejudicar meu atendimento. Além disto, eu sei que em qualquer momento, ou por qualquer motivo, eu ou minha família podemos desistir de participar da pesquisa.

10. Eu sei que o meu nome e o dos meus pais não serão divulgados e todas as informações serão mantidas em segredo e só serão utilizadas para esta pesquisa. Se os pesquisadores quiserem usar as células para outras pesquisas, eles terão que pedir permissão novamente.

11. As células que eu vou fornecer vão ficar congeladas e guardadas para que a pesquisa possa ser feita, mas eu ou meus responsáveis podemos pedir para que elas não sejam mais usadas.

12. Se eu ou meu responsável quisermos desistir, depois que esse documento estiver escrito e assinado por nós, os pesquisadores vão devolver o que tiverem das amostras que estavam guardadas com eles.

13. Se eu tiver alguma dúvida sobre essa pesquisa, eu posso entrar

em contato com a Pesquisadora Adriane Cristina Fagundes pelos telefones (48) 3721:4582 ou (48) 99630:6462.

14. Eu concordo em participar desse estudo, e meus responsáveis ficarão com uma cópia desse documento.

Eu entendi que fornecerei a pele da região do pênis (prepúcio) que seria descartada no lixo, após a minha, para a pesquisa sobre a comparação de células-tronco obtidas da pele de prepúcio, face e abdômen.

Eu aceito participar dessa pesquisa.

Nome _____ da _____ criança:

Assinatura _____ da _____ criança:

Nome _____ do _____ responsável _____ legal _____ pela _____ criança:

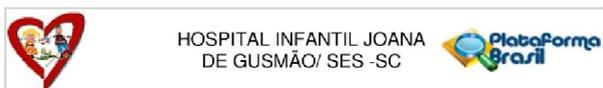
Assinatura do responsável legal pela criança:

Pesquisadora _____ Adriane _____ Cristina _____ Fagundes:

Florianópolis, _____ / _____ / _____

Em caso de dúvidas relacionadas aos procedimentos éticos da pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, do Hospital Infantil Joana de Gusmão, pelo telefone (48) 3251:9092.

Anexo 03 – Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA DA BIOLOGIA DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS DERIVADAS DE PELE DE PREPÚCIO, FACE E ABDOMEN HUMANOS

Pesquisador: Mauricio José Lopes Pereira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 83741618.2.0000.5361

Instituição Proponente: Hospital Infantil Joana de Gusmão/ SES - SC

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.533.925

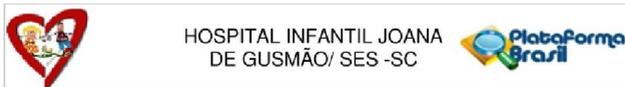
Apresentação do Projeto:

As informações usadas na elaboração desse parecer foram extraídas dos seguintes documentos: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1086751.pdf; Projeto Detalhado e Termo de Assentimento/TCLE.

Resumo:

As células-tronco (CT) são caracterizadas por sua alta taxa de proliferação in vitro, sua capacidade de autorrenovação e diferenciação em tipos celulares especializados. Devido a controvérsias éticas levantadas no uso de CT embrionárias, estudos vem sendo realizados afim de identificar CT em tecidos adultos, visto que há possibilidade de utilizá-las em transplante autólogo, o que diminui o risco de rejeição imunológica e consequentemente a necessidade de imunossupressores. A existência de CT dermais na pele de mamíferos ainda é pouco compreendida, entretanto, sabe-se que as CT obtidas da derme e epiderme possuem diferentes características fenotípicas e potencialidades. As células-tronco adultas (CTA) são células multipotentes, as quais acredita-se que estejam presentes em todos os tecidos do corpo. Há consenso na literatura de que a idade do doador está relacionada a funcionalidade das CT em cultura, sendo menor em pacientes mais velhos. Os pacientes submetidos a ritidoplastias e a abdominoplastias possuem, em média, cinquenta e sete e quarenta e quatro anos, respectivamente. Sendo assim, as características dessas células podem estar comprometidas devido a esses fatores limitantes. Logo, o objetivo desse

Endereço: Rui Barbosa, nº 152
 Bairro: Agronômica CEP: 88.025-301
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251-9092 E-mail: cep@ijg@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.533.825

trabalho é caracterizar as células-tronco humanas derivadas do prepúcio e comparar seu potencial celular, bem como seu meio condicionado, com as células-tronco derivadas da derme humana facial e abdominal, podendo assim, traçar um perfil celular cronológico (células do prepúcio: jovens, células do abdômen: adultos, células da face: idosos). As células serão obtidas a partir de fragmentos de pele e tecido adiposo provenientes de ritidoplastias, abdominoplastias e postectomia realizadas no Hospital Universitário da UFSC e no Hospital Infantil Joana de Gusmão. As linhagens serão caracterizadas quanto ao morfologia fibroblastóide aderente a placa de cultivo; perfil fenotípico para os marcadores CD73+, CD90+, CD45- e CD34- por citometria de fluxo e potencial de diferenciação para osteogênese, adipogênese e condrogênese. A análise de morte celular também será avaliada por citometria de fluxo. As análises de apoptose e senescência celular serão feitas a partir de testes de imunocitoquímica, imunofluorescência e citometria de fluxo. O meio condicionado das células será coletado em culturas isentas de soro fetal bovino, com aproximadamente 80% de confluência e analisado por experimentos de proteômica e PCR. A partir destes estudos, espera-se implementar uma nova fonte, mais jovem, ao laboratório, bem como comparar seu potencial e de seu meio condicionado em relação às células já utilizadas nos trabalhos de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o potencial biológico de células-tronco mesenquimais derivadas da derme humana de pacientes jovens, adultos e idosos.

Objetivo Secundário:

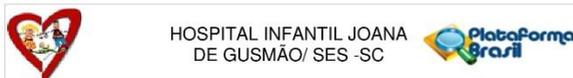
- I. Avaliar a caracterização fenotípica mesenquimal
- II. Avaliar o potencial de diferenciação para fenótipos mesenquimais
- III. Avaliar a viabilidade e proliferação celular
- IV. Avaliar morte celular por necrose e apoptose
- V. Avaliar o perfil de senescência celular
- VI. Avaliar o secretoma de células estromais irradiadas ou não por radiação UVB

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não haverá riscos aos pacientes doadores para a realização desta pesquisa. Haverá riscos para o pesquisador, porém, todo o manuseio de materiais biológicos e realização dos experimentos irão atender as devidas normas de biossegurança. Serão sempre utilizadas luvas, máscaras, tocas, e jalecos. Todo o descarte será separado como lixo hospitalar. As superfícies serão limpas com

Endereço:	Rui Barbosa, nº 152	CEP:	88.025-301
Bairro:	Agronômica		
UF:	SC	Município:	FLORIANÓPOLIS
Telefone:	(48)3251-9092	Fax:	(48)3251-9092
		E-mail:	cephig@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.533.925

álcool 70% e os materiais devidamente esterilizados em autoclave, estufa de esterilização ou luz UV.

Benefícios:

Os doadores voluntários deste trabalho não receberão benefícios. O trabalho irá beneficiar, futuramente, pacientes que se submeterão a terapia celular com células-tronco adultas. Elucidar processos biológicos como envelhecimento, neoplasia e regeneração.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é relevante do ponto de vista social pelo conhecimento a ser gerado. O pesquisador apresentou informações que o credencia tecnicamente a executar o protocolo de pesquisa.

Trata-se de um estudo a ser desenvolvido no Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da Universidade Federal de Santa Catarina.

O Hospital Infantil Joana de Gusmão participará do estudo mediante o recrutamento dos participantes pediátricos para o fornecimento de pele de prepúcio extraída em procedimento cirúrgico de indicação clínica.

Consta do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1066751.pdf que serão, no HJUG, 5 participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:

Vide Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Quanto ao documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1066751.pdf:

1.1 Na página 3 de 6, item "Metodologia Proposta" lê-se: "Serão utilizadas células-tronco mesenquimais provenientes de: I. Pacientes de idades entre 4 e 8 anos derivadas da pele do prepúcio, isoladas a partir de fragmentos de postectomia [...]". Solicita-se esclarecer quais serão os critérios clínicos/cirúrgicos para indicar a cirurgia (postectomia) para as crianças na faixa etária de 4 a 8 anos de idade.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152	CEP: 88.025-301
Bairro: Agronômica	
UF: SC	Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3251-9092	Fax: (48)3251-9092 E-mail: cep@ijg@saude.sc.gov.br



HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 2.533.925

1.2 Em vários momentos do documento consta a palavra "doador" ao referir-se ao participante. Ressalta-se que, segundo a Resolução 441/11 do CNS/MS, "o material biológico humano armazenado em Biobanco ou Biorrepositório é do sujeito da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional". E ainda, segundo o Manual de Pendências/CONEP, página 37 de 78, item d, consta como equivocado "Empregar o termo "material doado": Alguns termos de consentimento utilizam a palavra "doado" para se referir ao material biológico que foi cedido pelo participante para a pesquisa. Cabe esclarecer que a legislação brasileira tem regras bem definidas para a doação de células, tecido e órgãos para a assistência à saúde, mas não para o cenário da pesquisa.

Desta forma, o participante de pesquisa não "doa" o material biológico, mas o cede ou o fornece para a pesquisa".

Assim sendo, solicita-se substituir as palavras "DOADO/DOADOR/DOADORES e afins" por "CEDIDO ou FORNECIDO/Cedente ou fornecedor, em todos os momentos em que estas aparecerem no documento.

1.3 Na página 4 de 6, item: "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?

Sim Justificativa" lê-se: Serão armazenadas as amostras celulares com o objetivo de obter diversidade biológica para a realização dos experimentos de forma a atender os

procedimentos estatísticos. Além disso, é importante a garantia da preservação dessas amostras para futuras replicações experimentais e aplicações terapêuticas".

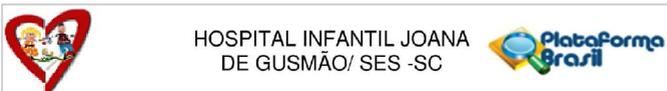
Compreende-se do texto destacado que haverá formação de Biorrepositório vinculado a esse projeto de pesquisa. Dessa forma, solicita-se adequar o projeto de pesquisa ao exigido pela Resolução 441/11 do CNS/MS.

2. Quanto ao documento TermosAssentimento_Consentimento.docx:

2.1 O Termo de Assentimento apresentado está redigido de forma técnica e contém expressões de difícil entendimento para o público leigo, especialmente crianças. Solicita-se reescrever o Termo de Assentimento utilizando linguagem compreensível para crianças na faixa etária a que esse documento se destina.

2.2 Na página 1 do Termo de Assentimento lê-se: "Prezada criança/adolescente:

Endereço: Rui Barbosa, nº 152
 Bairro: Agronômica CEP: 88.025-301
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251.9092 E-mail: cephijg@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.533.025

Por favor, leia atentamente as instruções abaixo antes de decidir se deseja e concorda em participar do estudo". Considerando a faixa etária envolvida nesse estudo (4 a 8 anos), solicita-se:

- a. Delimitar a faixa etária que utilizará esse documento;
- b. Incluir a possibilidade de uma pessoa de confiança da criança poder ler o documento, explicar o conteúdo e esclarecer suas dúvidas.

2.3 Incluir breve explanação do que implicará a participação da criança na pesquisa.

2.4 Atentar ao preconizado na Resolução 441/11 do CNS/MS no que se refere ao conteúdo necessário ao TCLE, especialmente: material a ser cedido, origem desse material e destino dele.

2.5 No final da página 1 lê-se: "Eu entendi que a pesquisa é sobre a comparação de células-tronco obtidas da pele de prepúcio, face e abdômen. Eu aceito participar dessa pesquisa.". Solicita-se reformular a frase visto que as crianças fornecerão somente pele de prepúcio.

2.6 Quanto ao TCLE que consta nas páginas 2 a 5:

- a) Solicita-se esclarecer se esse documento será aplicado aos pais das crianças fornecedoras de pele de prepúcio.

EM CASO NEGATIVO, solicita-se apresentar TCLE para pais de crianças;

EM CASO POSITIVO, solicita-se:

- Adequar toda a redação para o consentimento dos pais para a participação dos filhos;
- O TCLE apresentado está redigido de forma técnica e contém expressões de difícil entendimento para o público leigo. Solicita-se adequação;
- Atentar ao preconizado na Resolução 441/11 do CNS/MS no que se refere ao conteúdo necessário ao TCLE, especialmente: material a ser cedido, quantidade, a forma como o material biológico será coletado, Atentar ao preconizado na Resolução 441/11 do CNS/MS no que se refere ao conteúdo necessário ao TCLE, especialmente: material a ser cedido, origem desse material, forma como será coletado, quantidade, armazenamento, local de análise, tipo de análise (resumidamente), possibilidade de envio para outro laboratório, tempo de armazenamento, possibilidade de análises/estudos futuros (prevendo reconsentimento) e formas de descarte.

Endereço: Rui Barbosa, nº 152	CEP: 88.025-301
Bairro: Agronômica	
UF: SC	Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3251-9092	Fax: (48)3251-8092
	E-mail: oephijg@saude.sc.gov.br



HOSPITAL INFANTIL JOANA
DE GUSMÃO/ SES -SC



Continuação do Parecer: 2.533.925

2.7 Na página 4 lê-se: "Existe a remota possibilidade da quebra do sigilo, mesmo que involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei". O texto destacado está inadequado pois, via de regra, não há necessidade de envolvimento legal. Solicita-se sua exclusão.

2.8 Ainda na página 4 lê-se: "Embora não haja benefício para você em curto prazo, os resultados obtidos serão utilizados para aumentar o conhecimento acerca de novas terapias regenerativas envolvendo as células-tronco adultas. Portanto, a longo prazo poderá trazer benefícios a sociedade bem como ao participante dessa pesquisa". A pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes. A menção dos benefícios sociais em longo prazo poderem beneficiar individualmente o participante pode não corresponder ao que irá acontecer e ainda comprometer a decisão autônoma. Solicita-se adequar, mencionando somente que não haverão benefícios diretos e que benefícios sociais são esperados pelo conhecimento gerado e possibilidade de avanços científicos futuros.

2.9 Quanto ao TCLE que inicia na página 5, solicita-se que sejam consideradas para esse documento as inadequações elencadas para o Termo de Assentimento e o TCLE que inicia na página 2.

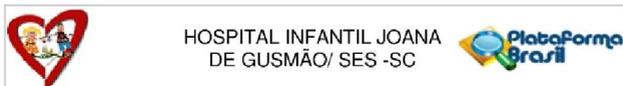
3. Quanto ao documento intitulado ProjetoDetalhado.pdf:

3.1 Na página 11 de 23 lê-se: "Serão utilizadas células mononucleares de sangue periférico como controle positivo para os marcadores CD34 e CD45, já que menos de 2% das CEM são positivas para estes marcadores". Solicita-se esclarecer qual a origem das células mononucleares de sangue periférico citadas.

3.2 Na página 17 de 23 lê-se: "A fim de identificar as proteínas expressas no secretoma, será realizado uma análise proteômica em associação com a Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz), Curitiba, Paraná". Como haverá formação de Biorrepositório (transitório) com envio de material biológico para outra instituição, solicita-se documento comprobatório de acordo interinstitucional.

3.3 O Cronograma, página 20 de 23 não contempla intervalo de tempo para a coleta das amostras biológicas. Solicita-se esclarecer se as amostras serão coletadas simultaneamente em um só

Endereço: Rui Barbosa, nº 152
 Bairro: Agronômica CEP: 88.025-301
 UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
 Telefone: (48)3251-9092 Fax: (48)3251-9092 E-mail: cephij@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.533.925

momento e, em caso negativo, solicita-se inserir no cronograma o período esperado para esta coleta. Ademais, solicita-se acrescentar, no item cronograma, que nenhuma informação / procedimento que envolva seres humanos será coletada antes da aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer contém pendências (questionamentos, solicitações de esclarecimentos e/ou solicitações de modificações em documentos do protocolo de pesquisa).

Solicita-se que seja apresentado ao CEP documento sumário contendo as respostas conforme solicitado nas pendências, elencando-as uma a uma, assim como deve ser apresentados os documentos com as modificações solicitadas.

O prazo de entrega das respostas às pendências é de 30 dias, conforme Norma Operacional CNS 001/2013.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

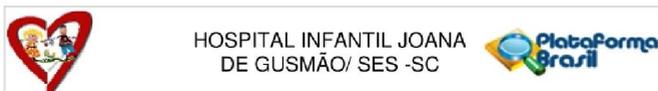
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1066751.pdf	26/02/2018 21:51:11		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	26/02/2018 21:48:43	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	CurriculodosPesquisadoresEnvolvidos.docx	26/02/2018 21:28:06	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	Declaracao02_HU.pdf	26/01/2018 16:07:46	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	Declaracao01_LACERT.pdf	26/01/2018 16:07:24	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	anexo05.pdf	26/01/2018 16:05:48	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	anexo04.pdf	26/01/2018 16:05:24	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	anexo03.pdf	26/01/2018 16:05:07	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	anexo02.pdf	26/01/2018 16:04:54	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
Outros	anexo01.pdf	26/01/2018 16:04:40	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermosAssentimento_TCLE.docx	26/01/2018 15:52:16	Maurício José Lopes Pereima	Aceito

Endereço: Rui Barbosa, nº 152

Bairro: Agronômica **CEP:** 88.025-301

UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-9092 **Fax:** (48)3251-9092 **E-mail:** cep@hij@saude.sc.gov.br



Continuação do Parecer: 2.533.925

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhado.pdf	26/01/2018 15:48:50	Maurício José Lopes Pereima	Aceito
---	----------------------	------------------------	--------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 08 de Março de 2018

Assinado por:
Vanessa Borges Platt
(Coordenador)

Endereço: Rui Barbosa, nº 152
Bairro: Agronômica **CEP:** 88.025-301
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3251-9092 **Fax:** (48)3251-9092 **E-mail:** cophijg@saude.sc.gov.br