

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH

**EFEITOS DO ÁCIDO ALL-TRANS-RETINÓICO NA PROLIFERAÇÃO,
DIFERENCIAÇÃO, INDUÇÃO DE APOPTOSE E EXPRESSÃO GÊNICA EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS**

CAMPO GRANDE
2017

LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH

**EFEITOS DO ÁCIDO ALL-TRANS-RETINÓICO NA PROLIFERAÇÃO,
DIFERENCIAÇÃO, INDUÇÃO DE APOPTOSE E EXPRESSÃO GÊNICA EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira.

CAMPO GRANDE

2017

LAYNNA DE CARVALHO SCHWEICH

**EFEITOS DO ÁCIDO ALL-TRANS-RETINÓICO NA PROLIFERAÇÃO,
DIFERENCIAÇÃO, INDUÇÃO DE APOPTOSE E EXPRESSÃO GÊNICA EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do título de mestre sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

A banca examinadora, após avaliação do trabalho, atribuiu à aluna o conceito

_____.

Campo Grande, 06 de fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira – UFMS

Prof.^a Dr.^a Paula Felipe Martinez – UFMS

Prof.^a Dr.^a Renata Perdomo – UFMS

Prof.^a Dr.^a Karine Freitas – UFMS

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a Nossa Senhora por me acompanharem sempre. Por terem me propiciado a resiliência que tantos vos roguei nesses dois últimos anos, para que eu conseguisse compreender esse novo universo ao qual eu me inseri. Obrigada por terem me dado à força necessária para superar as dificuldades e por terem me iluminado em todos os momentos para que tudo desse certo.

À minha família obrigada por sempre apoiarem minhas escolhas e me darem suporte para seguir meus sonhos. Eu só estou onde estou hoje, devido à criação que vocês me deram, devido aos seus conselhos e acolhimento que sempre estiveram disponíveis, vocês nunca deixaram me faltar nada. A minha evolução como ser humano e como profissional eu devo a vocês!

Ao meu namorado Leandro, obrigada por todo amor e compreensão durante todos esses anos. Poder compartilhar contigo meus sentimentos é o que mais me dá forças para continuar minha caminhada. Obrigada por ser meu porto seguro e por tentar sempre compreender minhas dúvidas, mesmo que não seja do seu entendimento. Você sempre se fez presente, mesmo com os quilômetros que insistem em nos separar. Obrigada por tudo meu amor.

Às irmãs, Dr^a. Themis Maria Milan Brochado e Dr^a. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva agradeço imensamente pela oportunidade de ingressar nesse incrível mundo da pesquisa científica. Foi a paixão que vocês sempre demonstraram diante de novas descobertas e compreensão fisiológica dos fatos que me fez querer participar deste mundo. Vocês são minha inspiração! Obrigada por serem as primeiras a acreditar em minha capacidade profissional, espero de verdade que algum dia eu chegue à altura das senhoras.

Muito obrigada às minhas colegas Roseana e Ana Cristina obrigada pelo suporte e por partilharem a experiência de vocês comigo. Se não fosse pela paciência das senhoras para me ensinar as técnicas de execução dos experimentos do laboratório eu definitivamente não conseguiria. Suas participações foram de suma importância para a conclusão deste mestrado.

Obrigadas aos meus colegas do laboratório CeTroGen pelo companheirismo, alegria e por sempre me ajudarem. Vocês conseguiram tornar meus dias mais leves diante de toda essa loucura durante esses dois anos.

E ao meu orientador Rodrigo Juliano Oliveira muito obrigado por aceitar me guiar. Mergulhar neste universo novo das células-tronco com a orientação do senhor foi essencial para mim. Foi devido a sua forma de compreensão dos resultados e paciência durante as explicações, que eu consegui desenvolver um perfil científico, foi através do senhor que eu consegui moldar minha forma de pensar e tornei uma profissional melhor.

E por fim, aos profissionais da Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste (PPGSD) pela contribuição intelectual e pela disponibilidade de atender a demanda dos pós-graduandos quando necessário e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro desta pesquisa.

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer e lhe dará confiança na presença divina. Isso é que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

RESUMO

Schweich, L.C. **Efeitos do ácido all-trans-retinóico na proliferação, diferenciação, indução de apoptose e expressão gênica em células tronco mesenquimais humanas.**

[Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2017.

O ácido all-trans-retinóico (ATRA), é conhecido com uma das formas mais ativas da vitamina A, que participa da regulação da proliferação, diferenciação e apoptose de diversos tipos celulares. Este metabólito possui influência direta sobre a biologia dos adipócitos, atuando no processo de emagrecimento por meio da redução dos processos de adipogênese e lipogênese. O propósito desta pesquisa foi avaliar o efeito do ATRA na diferenciação *in vitro* das células-tronco mesenquimais (CTM) humanas em adipócitos bem como a indução de apoptose ao longo desse processo. Para essa avaliação, as células foram submetidas a tratamento com ATRA, nas concentrações de 0,5, 5, 50 e 100 μ M, por 24, 48 e 72 horas. Depois a IC₅₀ (20.75 μ M) foi estabelecida e usada para tratamentos de 7 dias sendo as culturas de CTM, CTM induzida a diferenciação por 7 dias e CTM induzida à diferenciação por 14 dias. Para os ensaios de citometria de fluxo e de expressão gênica foi utilizada a IC₅₀ em tratamentos de 12h. Verificou-se que as concentrações de 20.75, 50 e 100 μ M causam redução significativa da viabilidade celular, tanto em CTM como em células induzidas à diferenciação adipogênica o que sugere efeito citostático/citotóxico. Quando avaliado o ciclo celular observou-se que o ATRA aumentou a frequência de células em Sub-G1 em 4,02x e reduziu a frequência de células em G1 em 2,54x. Observou-se ainda que a perda da integridade da membrana aumentou em 4,66x nas culturas tratadas com a ATRA. Já os eventos de apoptose aumentaram 33,56x. O ensaio de expressão gênica sugere que o tratamento com ATRA leva à permeabilização da membrana mitocondrial e consequente liberação de moléculas pró-apoptóticas BAK e BAX (aumento da expressão de 5,5 e 5,4x, respectivamente), e aumento da expressão de CASP3 (8,8x). Estes eventos podem ativar a expressão de Bcl-2 (aumento de 4,1x), GADD45 (aumento 3,14x) e PPAR- γ (aumento de 16x) bem como reduzir a expressão de P53 (-1,38x). Sugere-se ainda que esses eventos são mediados pelo aumento da expressão do RAR α (3,8x). Diante do exposto infere-se que o ATRA pode ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de terapias para o controle da obesidade visto que ele interfere na diferenciação e morte celular de CTM, pré-adipócitos e adipócitos.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais, vitamina A, ATRA, diferenciação celular.

ABSTRACT

Schweich, L.C. **Effects of all-trans-retinoic acid on proliferation, differentiation, induction of apoptosis and gene expression in human mesenchymal stem cells.** [Dissertation]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2017.

All trans-retinoic acid (ATRA) is the most active form of vitamin A that participates in the regulation of proliferation, differentiation and apoptosis of several cell types, but principally in adipocytes, causing weight loss through the reduction of the processes of adipogenesis and lipogenesis. The objective of this study was to evaluate the effect of ATRA during *in vitro* differentiation of adipose-derived stem cells (ADSCs) in adipocytes as well as the induction of apoptosis throughout this process. For this evaluation, the cells were submitted to treatment with ATRA, at concentrations of 0.5, 5, 50 and 100 μM , for 24, 48 and 72 hours. Then the IC_{50} (20.75 μM) was established and used for 7 days in treatments with ADSCs, ADSCs induced to differentiation for 7 days and 14 days. For flow cytometry and gene expression assay the IC_{50} was used in 12h treatments. In flow cytometry and gene expression assays the cells were treated at a concentration of 20.75 μM for 12h. When evaluated the cell cycle it was observed that ATRA increased the frequency of cells in Sub-G1 at 4.02x and decreased the frequency of cells in G1 in 2.54x. It was also observed that loss of membrane integrity increased 4.66x and in apoptosis increased 33,56x, in ATRA treated cultures. The gene expression assay suggests that the treatment with ATRA leads to the permeabilization of the mitochondrial membrane and consequent release of proapoptotic BAK and BAX molecules (increased expression of 5.5 and 5.4x, respectively), and increased expression of CASP3 (8.8x). These events may activate expression of Bcl-2 (4.1x increase), GADD45 (increase 3.14x) and PPAR- γ (16x increase) as well as reduce p53 (-1.38x) expression. It is further suggested that these events are mediated by increased RAR α expression (3.8x). Considering the results, it is inferred that ATRA may be a good strategy for the development of therapies to control obesity, since it interferes not only in ADSCs differentiation but also in apoptosis of ADSCs, preadipocytes and adipocytes.

KEY WORDS: mesenchymal stem cells, vitamin A, ATRA, cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1- Conversão do retinol (Vitamina A) em ácido all-trans-retinóico.....	15
Figura 2 – Ilustração do nicho de células tronco no tecido adiposo humano.....	18
Figura 3 - Modelo simplificado da adipogênese.....	19
Tabela 1 – Sequência de primers (5'- 3') utilizados nas avaliações de expressão gênica.....	35
Figura 4 - A) Perfil imunofenotípico das CTM derivadas do estroma do tecido adiposo humano. Células expressaram os marcadores para CD105 e CD90 e não expressaram CD31, CD11b, MHC classe II e CD45.....	36
Figura 5 – A) Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais (A, B e C) e de células-tronco mesenquimais em diferenciação adipogênica (D), osteogênica (E) e condrogênica (F) coradas com <i>Oil red</i> , <i>Alizarin Red</i> e <i>Alcian Blue</i> , respectivamente (Aumento de 200x).....	37
Figura 6 – Média ± erro padrão da média da viabilidade celular de célula-tronco mesenquimais tratadas com ATRA.....	38
Figura 7 – Comparação das médias da viabilidade celular dentre os diferentes tempos de tratamento com o controle negativo (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, **p<0,01, ***p<0,001).....	38
Figura 8 – Fotomicrografia da cultura de células-tronco mesenquimais controle (A/C) e tratadas com ATRA (B/D) na concentração de 20.75 µM por 72 horas. Observa-se que após o ensaio com imunofluorescência é possível observar que as células tratadas apresentam aspecto apoptótico, com perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células.....	39
Figura 9 - Média ± erro padrão da média da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos e adipócitos tratadas com ATRA (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, **p<0,01, ***p<0,001).....	40
Figura 10 - Fotomicrografia de acompanhamento do comportamento das CTM em cultivo tratadas com ATRA: característica inicial da cultura de CTM (A), comportamento após 6h (B), 12h (C), 24h (D), 48h (E) e 72h (F) sendo as principais alterações observadas a redução do número de células por campo, perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células. As setas indicam células com aspecto apoptótico (Aumento de 200x).....	41
Figura 11 – Análise de A) - ciclo celular, B) - integridade de membrana e C) - apoptose (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, **p<0,01, ***p<0,001). O ATRA causa aumento de eventos em Sub-G1 e redução em G1, além de causar perda da integridade da membrana plasmática e aumento da frequência de apoptose.....	42

Figura 12 - Expressão relativa dos genes CASP-3, Bcl-2, BAX, BAK, PPAR- γ , p53 e GADD45 demonstram aumento da expressão para todos os genes, exceto P53, quando as culturas foram tratadas com ATRA.....43

Figura 13 - Expressão relativa dos subtipos do RAR (α , β , γ) demonstrou aumento da expressão de todos quando as culturas foram tratadas com ATRA.....43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTE – células-tronco embrionárias

CTM – células-tronco mesenquimais

ATRA – All trans-retinoic acid - ácido all-trans-retinóico

BAK– Bcl-2 homologous antagonist killer – Antagonista assassino homólogo de Bcl-2

BAX – Bcl-2 associated protein X – Proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 – Linfoma de células B 2

CASP-3 – cysteine-aspartic acid protease 3 – caspase 3

RAR – retinoic acid receptor – receptor de ácido retinóico

RXR – retinoic X receptor – receptor de retinóide X

PPAR- γ – Peroxisome proliferator-activated receptor gamma - receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas

C/EBP α – CCAAT/enhancer binding protein alfa – proteínas alfa ligantes ao amplificador CCAAT

GADD45 – Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha - Supressão do crescimento e a alfa 45 induzível por danos ao DNA

IC₅₀ – Growth Inhibitory concentration 50% - Concentração de inibição de crescimento de 50%

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) – Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltretrazólio

PCR em Tempo Real – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

SUMÁRIO

1.Introdução.....	14
2. Revisão de literatura	15
2.1. Vitamina A: seus derivados e sua importância	15
2.2. Ácido all-trans-retinóico: Suas funções e influência sobre o tecido adiposo	16
2.3.Tecido adiposo: Sua origem e desenvolvimento	17
2.4. Obesidade: Seu desenvolvimento e epidemiologia.....	19
2.5. Células-tronco	20
2.6.Células-tronco mesenquimais	21
2.7. Ensaio Biológicos	23
2.7.1. Ensaio de citotoxicidade	23
2.7.2. Ensaio de detecção de apoptose ' <i>in situ</i> '	23
2.7.3. Ensaio de citometria de fluxo.....	24
2.7.4. Ensaio de PCR-Tempo Real	25
3. Objetivos.....	26
3. Objetivo Geral	26
3.1. Objetivos Específicos.....	26
4. Materiais e Métodos	27
4.1. Casuística e obtenção das culturas primárias	27
4.1.1. Procedimentos de obtenção e processamento do lipoaspirado e cultivo das células-tronco mesenquimais	27
4.2. Caracterização e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais	28
4.2.1. Caracterização por imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais	28
4.2.2. Comprovação da pluripotência por ensaio de diferenciação celular.	29
4.2.2.1. Diferenciação adipogênica	29
4.2.2.2. Diferenciação osteogênica	29
4.2.2.3. Diferenciação condrogênica	30
4.3. Substância teste: Ácido all-trans-retinóico (Vitamina A)	31
4.4. Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT	31
4.5. Análise de apoptose <i>in situ</i> : avaliação morfológica.....	32

4.6. Avaliações em Citometria de fluxo.....	32
4.6.1. Avaliação do ciclo celular	33
4.6.2. Avaliação de Apoptose	33
4.6.3. Avaliação de Integridade de Membrana	33
4.7. Avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real	33
4.8. Análise Estatística	35
5. Resultados.....	36
5.1. Caracterização e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais.....	36
5.2. Ensaio de viabilidade celular e comprovação morfológica de morte celular por apoptose.....	37
5.3. Mecanismo de morte celular e comprovação molecular de morte celular por apoptose	41
6. Discussão	44
7. Conclusão.....	49
8. Referências	49

Introdução

Nos dias atuais, a industrialização dos alimentos trouxe o aumento da ingestão excessiva de calorias com má qualidade de micronutrientes. Com a urbanização e a modernização da sociedade houve um aumento do uso de transportes automatizados e diminuição da atividade física diária (FARIAS *et al.*, 2009), essas modificações no comportamento da população tem contribuído para o desenvolvimento da obesidade (MONTEIRO; MONDINI; COSTA, 2000).

Esta enfermidade ocorre pelo aumento de adipócitos no corpo, por uma renovação constante e intensa destas células, sendo o aumento de peso resultante da hiperplasia ou hipertrofia destas células. O fato de que os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo (SPALDING *et al.*, 2008), nos dá a possibilidade de averiguarmos desde o início de seu desenvolvimento, fato este ainda não relatado na literatura.

A prevenção e o diagnóstico precoce da obesidade são importantes para a promoção da saúde, melhora da qualidade de vida, redução da morbimortalidade da população e como consequência, redução dos altos gastos que esta enfermidade tem trazido para o SUS para o tratamento das complicações decorrentes da mesma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Frente ao exposto é de suma importância lançar mão de novos conhecimentos que possam ser mais efetivos em especial para sua prevenção. Esse estudo pode ser fonte de uma nova terapia inovadora para o tratamento/prevenção da obesidade, baseada na terapia com vitamina A. Podendo apresentar importante impacto nessa questão de saúde pública. Assim, é vislumbrado pelos pesquisadores a possibilidade de melhoria da qualidade de vida de pacientes que são acometidos pela obesidade, através da prevenção de seu desenvolvimento.

2. Revisão de literatura

2.1. Vitamina A: seus derivados e sua importância

No ano de 1913, a vitamina A, mais conhecida como retinol, foi a primeira vitamina lipossolúvel reconhecida. É constituída por 20 carbonos em sua estrutura (IOM, 2001). Seus derivados naturais não são sintetizados pelo organismo e necessitam serem ingeridos na alimentação, podendo ser obtidos de fontes animais ou vegetais (ROSS; HARRISON, 2013). O fígado é o principal sítio de depósito da vitamina A, sendo o órgão responsável pelo armazenamento, metabolismo e distribuição da vitamina A para os tecidos periféricos (DAWSON *et al.*, 2000). Inicialmente o retinol serve como precursor passando por duas reações enzimáticas. Primeiramente, o retinol é convertido em retinal ou retinoaldeído e depois, irreversivelmente, a ácido all-trans-retinóico (Figura 1) (QUADRO *et al.*, 2003).

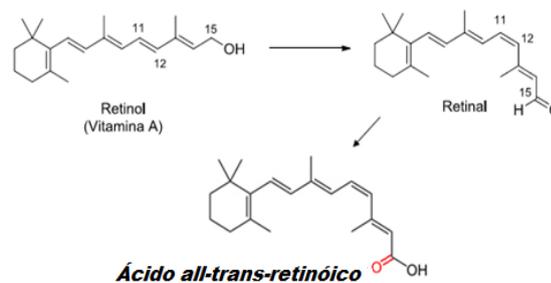


Figura 1 – Conversão do retinol (Vitamina A) em ácido all-trans-retinóico. Fonte: (BRODY, 1994)

Esta vitamina desempenha papéis importantes durante o desenvolvimento dos mamíferos e na idade adulta através da manutenção de várias funções teciduais, incluindo o sistema nervoso central como um todo (OLSON 1993, TANUMIHARDJO 2004, TAFTI; GHYSELINCK, 2007), que agem por meio de diversos mecanismos a partir da ligação e ativação de dois tipos de receptores nucleares, os receptores para ácido retinóico (RAR) (α , β e δ) e os receptores x retinóide (RXR) (α , β e δ). Os receptores RAR podem ser ativados pelo ácido all-trans-retinóico (ATRA) e pelo ácido 9-cis-retinóico, enquanto que os receptores RXR são ativados apenas pelo ácido 9-cis-retinóico. A forma ativa do receptor consiste em um heterodímero formado pela união de um receptor RAR com RXR. Esse complexo reconhece sequências específicas de nucleotídeos na região promotora de genes e interage com co-ativadores ou co-repressores adicionais, que podem, por fim, ativar ou inibir a transcrição dos genes alvo (DAS *et al.*, 2014; DI MASI *et al.*, 2015).

Esta vitamina e seus derivados participam na regulação da proliferação celular, diferenciação, sobrevivência e apoptose, levando à formação da forma normal do embrião, organogênese e fisiologia do tecido, por exemplo (DAS *et al.*, 2014). Além disso, alguns processos biológicos incluindo, por exemplo, visão, estrutura e função da pele e dos ossos, defesas imunitárias e atividade neuronal dependerão do acesso regular à vitamina A durante toda a vida humana (Olson 1993, Napoli 1996, Huang *et al.* 2014).

O conteúdo de vitamina A no fígado de seres humanos adultos é de cerca de 100 µg / g (FURR *et al.*, 1989). Foi sugerido que uma concentração de vitamina A de aproximadamente 300 µg / g no fígado revela intoxicação (OLSON, 1993). Alguns autores afirmam que é raro observar a toxicidade resultante da ingestão excessiva de vitamina A (ALLEN; HASKELL, 2002). Entretanto, os parâmetros mais comuns que são analisados nos casos de intoxicação por vitamina A incluem a observação de sinais e sintomas agudos, entre os quais: náuseas, vômitos, diarreia, cefaléia, abaulamento da fontanela em lactentes (como resultado do aumento da pressão intracraniana) e febre (LAM *et al.*, 2006). Por outro lado, a deficiência de vitamina A tem sido associada há muito tempo com anormalidades histológicas nos tecidos epiteliais (DELUCA, 1991), diminuição da resistência a células tumorais, vírus e outros organismos infecciosos (ROSS, 2003) e aumento da suscetibilidade a agentes cancerígenos ambientais (MOON *et al.*, 2007).

2.2. Ácido all-trans-retinóico: suas funções e influência sobre o tecido adiposo

Dentre os metabólitos da vitamina A, o ATRA é considerado a forma mais ativa no organismo humano (NOY, 2010) e está presente no interior das células, onde desempenha funções relacionadas com a regulação e expressão de genes envolvidos na proliferação, diferenciação e apoptose de vários tipos celulares (FREY; VOGEL, 2011), mas principalmente sobre o tecido adiposo (BONET, 2003). Esta maior afinidade acontece devido ao fato de que este tecido possui alta expressão de receptores RAR., cerca de 15-20%, explicando assim o porque deste tecido ser marcado e responsivo à ação do ATRA (WU, 1999; KAMEI *et al.*, 1993; ALVAREZ *et al.*, 2004).

A concentração fisiológica de ATRA nos adipócitos ainda não foi determinada. Sabe-se que a concentração de ATRA é $\sim 4,3 \times 10^{-9}$ M em sangue periférico

humano normal (PFAHL; CHYTIL, 1996). Os níveis teciduais de ATRA são 2,5 vezes mais elevados no epidídimo e 10 vezes maiores no rim do que no sangue periférico. Dado que os níveis teciduais de ATRA são mais elevados do que os encontrados no sangue, acredita-se que a captação de ATRA do sangue pelos tecidos seja contra um gradiente de concentração, embora os mecanismos subjacentes à captação específica de tecido de ATRA não tenham sido elucidados (MORIKAWA *et al.*, 2013).

Estudos *in vitro*, em linhagens pré adipocitárias, demonstraram que o ATRA controla a proliferação do tecido adiposo (MORIKAWA *et al.*, 2013), sendo também descrito como um importante inibidor da adipogênese e da lipogênese (LOBO *et al.*, 2010; MOON *et al.*, 2007; RIBOT, 2001). Estudos *in vivo* demonstraram que o ATRA causa emagrecimento e melhora a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina (JEYAKUMAR *et al.*, 2008; FELIPE *et al.*, 2005, MERCADER *et al.*, 2006, RIBOT *et al.*, 2001). Sabe-se também que o ATRA modula a expressão gênica de várias adipocinas (adiponectina, leptina, lipoproteína lipase (LPL) e inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1)), que estão envolvidas na modulação energética do tecido adiposo (KAMEI *et al.*, 1992, FELIPE *et al.*, 2005, CORBETTA *et al.*, 2006, LIU *et al.*, 2008). Assim, pode-se inferir que o ATRA possui potencial terapêutico na gênese da obesidade (BERRY; NOY, 2009). No entanto, não há estudos suficientes que tenham explorado o efeito do ATRA na diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais humanas, o que justifica o interesse desse estudo.

2.3. Tecido adiposo: Sua origem e desenvolvimento

Os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo (SPALDING *et al.*, 2008). São consideradas tecido-específicas e estão localizadas em compartimentos denominados nichos (Figura 2). Eles são microambientes fisiológicos, compostos por adipócitos, frações vasculares estromais de fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, pré-adipócitos e células-tronco mesenquimais. A função deste nicho é de controlar a taxa de proliferação das células-tronco, determinando sua diferenciação em células progenitoras, e protegem as células contra a apoptose (ZANNETTINO *et al.*, 2008). As células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e tornam-se comprometidas com a linhagem adipocitária. Este fato deve-se a um

balanço calórico positivo, quando há um aumento de estoque energético e ativação destas células para estoque de energia, iniciando assim a adipogênese (BAYS *et al.*, 2008)

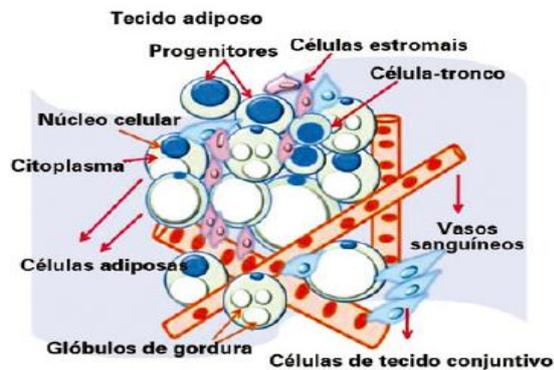


Figura 2 – Ilustração do nicho de células tronco no tecido adiposo humano. Fonte: (ZUTTON *et al.*, 2013)

A adipogênese é um complexo processo caracterizado por mudanças na morfologia da célula, sensibilidade hormonal e expressão gênica que tem sido estudado extensivamente *in vitro*. A fase inicial da diferenciação do adipócito, ainda pouco caracterizada, é conhecida como determinação ou comprometimento. Fatores de transcrição adipogênicos, incluindo o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- γ) e proteínas alfa ligantes ao amplificador CCAAT (C/EBP α) (KONG; LI, 2006), se autorregulam positivamente para se manterem expressos e desempenham um papel-chave na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese. O PPAR- γ é o regulador direto da adipogênese, atua como um ativador transcricional para a estocagem de lipídeos, sendo uma das chaves para a função e regulação da diferenciação adipogênica (FARMER, 2006). Enquanto C/EBP α possui papel central na manutenção da expressão do gene PPAR- γ e na promoção de sensibilidade a insulina (Figura 3) (ROSEN; MAC DOUGALD, 2002). De acordo com Spangenberg *et al.*, (2013), o início dos processos moleculares que desencadeiam a diferenciação adipogênica ocorrem nos primeiros três dias de cultivo, tempo suficiente para induzir a formação de pré-adipócitos. Quando os pré-adipócitos adquirem as características de adipócitos maduros, por volta do 14^o dia, apresentam acúmulo de gotas lipídicas e a habilidade de responder a hormônios, como a insulina (AILHAUD; HAUNER, 2004).

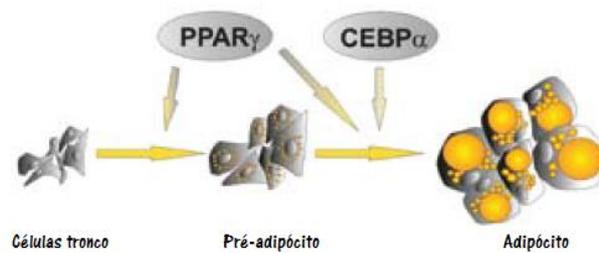


Figura 3 - Modelo simplificado da adipogênese. Fonte: (QUEIROZ, 2009)

Considerando-se então que a renovação do tecido adiposo implica substituição de adipócitos mortos por novas células, o processo da morte celular (apoptose) é muito estudado e demonstrou-se que é controlado por uma ampla gama de moléculas de sinalização celular, com origem extracelular (indutores extrínsecos) ou intracelular (indutores intrínsecos) (MURANO *et al.*, 2008). Logo, estudar esse processo de sinalização e associá-lo ao entendimento da fisiologia do tecido adiposo e das relações entre as taxas de adipogênese e de apoptose das células desse tecido é de fundamental importância para que sejam estabelecidos novos protocolos terapêuticos bem como estudar o componente genético da obesidade.

2.4. Obesidade: seu desenvolvimento e epidemiologia

O desenvolvimento da obesidade resulta não só da hiperplasia, mas também da hipertrofia das células de gordura. O aumento do tamanho dos adipócitos não é um processo ilimitado. Eventualmente, seu crescimento atinge um grau máximo, fazendo com que a sua capacidade de armazenamento de gordura se exaure. Adipócitos muito grandes, além do esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornam-se mais lipolíticos, o que desencadeia um aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma, danificando a função de órgãos não adiposos devido a lipotoxicidade sistêmica gerada (DEFRONZO, 2004). Essas células hipertrofiadas reduzem também o fluxo sanguíneo local, levando em última instância, à hipóxia do tecido e à infiltração de macrófagos. Esses macrófagos ativados liberam uma quantidade excessiva de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator α de necrose tumoral (TNF- α), o inibidor 1 de ativador de plasminogênio (PAI-1), interleucina-6 (IL-6), proteína 4 ligadora de retinol, proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (MPC-1) (TILG; MOSCHEN, 2006). Esses fatores exercem ações parácrinas, que perpetuam a inflamação local no tecido, e endócrinas, que induzem

a resistência à insulina, assim novas células são lentamente recrutadas e emergidas desse tecido (QUEIROZ *et al.*,2009). Todas essas alterações culminam para o desenvolvimento da obesidade, sendo esta doença considerada complexa e de causas multifatoriais e tem disso atribuída a fatores comportamentais – como dieta inadequada e inatividade física – genéticos e ambientais. (SEINBURN, 2004; POPKIN, 2011; KAC, 2013; XIA, 2013; SALLIS, 2012).

Para os adultos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) define o indivíduo ter sobrepeso se possui um IMC maior ou igual a 25 e obeso um IMC maior ou igual a 30 (WHO, 2014). A prevalência de obesidade cresceu nas últimas décadas e é considerada uma epidemia mundial (CONDE; MONTEIRO, 2014), afetando cerca de 600 milhões de adultos no mundo atualmente (WHO, 2014).

Algumas condições coexistem comumente em indivíduos obesos, como hiperglicemia, hiperlipidemia e hipertensão arterial sistêmica (KAPLAN, 1989; KAHN; FLIER, 2000). Cerca de 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano devido ao desenvolvimento dessas doenças (WHO, 2014). Além do alto índice de morte, outra estatística em evidência é a estimativa de que em 2030, quase 57,8% da população adulta do mundo terá sobrepeso sendo esse quadro correlacionado ao aumento de doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, morbidade e mortalidade (KELLY *et al.*, 2008).

A obesidade é um problema de saúde pública que impõem custos significativos aos cuidados à saúde, e o crescente número de casos de obesidade configura uma ameaça à sustentabilidade do tratamento desses indivíduos tanto no âmbito público quanto no privado (BAHIA; ARAUJO, 2014)

2.5. Células-tronco

O desenvolvimento de mamíferos segue um padrão molecular e celular predeterminado, culminando na formação de um organismo multicelular com funções definidas. A formação de órgãos e tecidos ocorre de modo natural durante o desenvolvimento pré-natal do organismo e é mantida durante toda a vida do indivíduo por meio de processos de reparação celular que são iniciados pelo organismo em caso de trauma ou doença. Porém, a capacidade das células de regenerar órgãos e tecidos em adultos é limitada. O desenvolvimento, o crescimento e a reparação de órgãos estão fundamentados na diferenciação celular, que inclui a proliferação e a capacidade de se diferenciar para várias linhagens celulares

específicas. As células que promovem a manutenção contínua e o reparo de órgãos após o nascimento não são diferenciadas, e são denominadas células de reserva ou células-tronco adultas (CAPLAN, 1991).

Estas células possuem duas características primordiais: a capacidade de autorrenovação e a de diferenciação em um ou mais tipos de células especializadas, que, quando reintroduzidas no organismo, adquirem a funcionalidade de qualquer tecido (CAPLAN, 2000), tornando-as extremamente atrativas para a regeneração de tecidos (THOMSON *et al.*, 1998).

As células-tronco são classificadas segundo sua potencialidade como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. As totipotentes são células capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários, como o zigoto e o blastômero (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005). As pluripotentes são originadas das células internas do blastocisto e originam centenas de tecidos que compõem o indivíduo e são chamadas de células tronco embrionárias (CTE) (ZATZ, 2004) e as multipotentes provêm de células tronco adultas e são aquelas capazes de originar apenas um subgrupo de linhagens celulares (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005)

Nas últimas décadas, houve uma explosão no número de células-tronco isoladas a partir de uma variedade de tecidos embrionários fetais e adultos. A capacidade de pluripotência e de diferenciação em derivados de todas as camadas germinais *in vitro* e *in vivo* fizeram das CTE uma das principais candidatas para a engenharia de tecidos e medicina regenerativa. No entanto, apesar deste grande potencial seu isolamento em humanos tornou-se muito problemático no mundo inteiro e no Brasil devido aos entraves éticos na utilização de um blastocisto humano como material biológico, a dificuldade nas técnicas de isolamento e o controle de proliferação e diferenciação, além da preocupação com a formação de teratomas e problemas com imogenicidade dos precursores obtidos a partir de CTE. Em decorrência desses acontecimentos, por segurança, as células-tronco mesenquimais (CTM) tem demonstrado ser uma importante alternativa para a terapia celular (BURASTERO *et al.*, 2010).

2.6. Células tronco mesenquimais

A característica principal das CTM é sua classificação como multipotentes (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1987). Essas células podem ser isoladas de vários tecidos

do corpo humano, como, por exemplo, medula óssea, fígado, polpa de dente, pâncreas, gordura, retina, dentre outros (JIANG *et al.*, 2002; GROVE; BRUSCIA; KRAUSE, 2004; ZHENG; TANIGUCHI, 2003; GRONTHOS *et al.*, 2000; BOUWENS, 1998; ZUK *et al.*, 2001; BOULTON; ALBON, 2004; KLASSEN *et al.*, 2004; ZUK *et al.*, 2002). O tecido adiposo tem visível facilidade de acesso, boa obtenção, simplicidade no processamento e adequada quantidade de células (LABUSCA *et al.*, 2013). Se comparado, por exemplo, com a medula óssea, sua taxa de sucesso para o isolamento é 40 vezes mais elevada (KERN *et al.*, 2006).

Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, para ser considerada uma CTM, as principais características são: (I) capacidade de adesão em cultivo de monocamadas; (II) capacidade de diferenciação em condrócitos, osteócitos e adipócitos *in vitro* e (III) presença dos marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105 e ausência ou negatividade dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45 (DOMINICI *et al.*, 2006, CSAKI *et al.*, 2007, CARRANCIO, 2008).

Sua capacidade de se diferenciar em células de diferentes tecidos, como adipócitos, condrócitos, osteócitos e miócitos (STREM *et al.*, 2005), torna o uso dessas células uma fonte preferencial para aplicações terapêuticas. Assim, é possível a investigação de muitos processos de diferenciação o que permite inferir com acurácia os processos fisiológicos/biológicos (MASSUMOTO *et al.*, 2014). Estudos relatam sobre a capacidade de migração e diferenciação das CTM quando administradas em lesões neurológicas, hepáticas, pancreáticas e cardiovasculares apresentando grande melhora frente aos quadros patológicos iniciais (ZAVAN, 2010;TIMPER,2006; SEKI, 2013; HEYDARKHAN-HAGVAL, 2008).

Estudo recentes averiguaram o processo de diferenciação adipogênica de CTM sob diferentes tipos de influências (MARIANI *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016) e demonstraram que a diminuição da adipogênese acontece devido à melhora da resistência à insulina e inibição do estresse oxidativo do ambiente em que as células se encontram. Segundo Noy *et al.* (2010), o ATRA é capaz de interferir também no processo de adipogênese e desenvolvimento da obesidade. No entanto, o seu efeito em CTM multipotentes, residentes no estroma do tecido adiposo (SPALDING *et al.*, 2008) de humanos, bem como em CTM humanas induzidas à diferenciação adipogênica, em culturas de células primárias, ainda não está descrito na literatura.

2.7. Ensaios Biológicos

2.7.1. Ensaio de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade é essencial para a determinação de concentrações citotóxicas basais, significativas no estabelecimento do parâmetro a ser utilizado nos testes *'in vitro'* (EISENBRAND *et al.*, 2002)

Para muitos testes biológicos é interessante a análise de sobrevivência e proliferação das células, sob a ação de uma substância, como um parâmetro inicial de toxicidade. Existem vários testes que tem como objetivo realizar esta mensuração, mas os métodos mais utilizados são os que determinam a viabilidade celular, através da análise da atividade mitocondrial das células expostas ao material e/ou aos seus componentes isolados (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006; ULUKAYA *et al.*, 2008).

O teste do MTT (Brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2 il)-2,5-difeniltetrazolio) é um ensaio colorimétrico e baseia-se na quantificação do dano induzido por compostos químicos no metabolismo celular. Ao ser acrescentado ao meio analisado durante um período pré-estabelecido, o MTT é reduzido pela atividade metabólica celular (NADH/NAD⁺) com a formação de cristais insolúveis em meio aquoso (sal de formazan) que ao ser diluído por DMSO apresenta uma coloração roxa. A quantidade de formazan produzida é medida em um equipamento espectrofotométrico. O resultado é expresso em absorbância que é diretamente proporcional à viabilidade celular (MOSMANN, 1983)

2.7.2. Ensaio de detecção de apoptose *'in situ'*

A apoptose é um processo de morte celular extremamente regulado e de grande eficiência. As alterações morfológicas observadas, são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007).

Morfologicamente, a célula em apoptose se encolhe e o citoplasma fica mais denso e a cromatina se condensa. Em seguida o núcleo se fragmenta, ao mesmo tempo em que a membrana emite projeções e forma brotamentos com fragmentos do núcleo. Este brotamento termina com a fragmentação da célula em corpos apoptóticos, que são endocitados por células vizinhas (ALBERTS, 2004).

Essa fragmentação característica pode ser identificada pelo ensaio de apoptose *in situ*. É um procedimento padrão pela sua simplicidade, baixo custo e precisão (PLENCHETTE *et al.*, 2004). A técnica faz uso de uma sequência de corantes, que penetram na célula e coram seu DNA (WYLLIE, 2008), tornando evidentes as características das células durante observação em microscópio de fluorescência.

2.7.3. Ensaio de citometria de fluxo

A citometria de fluxo constitui uma tecnologia relativamente recente, porém, suas características especiais como técnica de análise celular, têm feito com que sua utilização tenha se estendido de forma rápida dos laboratórios de investigação básica ao laboratório clínico na última década. Isto se deve em grande parte, ao caráter multidisciplinar desta técnica (BACAL; FAULHABER, 2003).

Do ponto de vista prático, a citometria de fluxo permite a análise e separação de células, assim como de outras estruturas intra-celulares (núcleos, cromossomas, mitocôndrias, grânulos de zimogênio) em suspensão, com grande objetividade, sensibilidade e rapidez, analisando de forma simultânea várias características em um grande número de partículas (BACAL e FAULHABER, 2003). Diferente dos métodos bioquímicos de análise celular, nos quais se obtém um resultado médio para toda a amostra, a citometria de fluxo proporciona uma informação qualitativa e quantitativa sobre cada célula em particular. É possível REALIZAR diferentes tipos de análises, como a identificação de diferentes populações de células e a posição desta população dentro do ciclo celular (MCCOY, 2002). Caso a intenção seja verificar a via de morte ou a integridade da membrana de uma linhagem celular que esteja sob influência de um tratamento, características específicas da morfologia desta linhagem serão aproveitadas para que as mesmas sejam coradas e analisadas através também deste ensaio (LANDI, 2003; WALSH *et al.*, 1998). Sendo assim, é de suma importância para o entendimento e aplicação das técnicas de citometria de fluxo, ter uma firme compreensão do conceito de imunofluorescência, pois a partir desta marcação que será possível a leitura destas células pelo citômetro.

As técnicas de imunofluorescência podem tanto utilizar corantes que se ligam diretamente a estruturas intra-celulares ou sob a membrana celular, ou fluorocromos conjugados à ligantes como anticorpos monoclonais, lecitinas ou

citoquinas. Sua característica em comum é que absorvem a energia luminosa e emitem luz (AOKI, *et al.* 2010). A citometria de fluxo é uma tecnologia que utiliza feixe de laser e detector de luz para contar as células em suspensão, levando em consideração o tamanho e granulosidade. Sempre que uma célula passa pelo feixe de laser, e este corante emite luz, esta marcação emite um sinal que é registrado por um segundo sistema de detecção localizado em um ângulo reto em relação ao feixe de laser do aparelho. (KINDT , GOLDSBY , OSBORNE , 2007)

2.7.4. Ensaio de PCR-Tempo Real

Os perfis de expressão gênica tem sido uma das principais ferramentas da biologia molecular. A reação em cadeia da polimerase e consiste em um método que difere de outros métodos de avaliação da expressão gênica pela sua acurácia, sensibilidade e rapidez na mensuração dos genes. Esta técnica permite a análise das diferenças quantitativas nos diversos níveis de expressão gênica entre diferentes amostras, por meio da quantificação de uma sequência de polinucleotídeos selecionada, amplificando a sua concentração inicial para um nível em que a detecção exata pode ser realizada (DERVEAUX; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010, TAYLOR *et al.*, 2010, TICHOPAD *et al.*, 2010)

O SYBR Green é um fluoróforo em suspensão, agente intercalante que emite sinais de fluorescência verde com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador quando se liga entre a fita dupla do DNA. Esta fluorescência é medida em função da temperatura, reduzindo gradualmente de acordo com o aumento na temperatura do produto amplificado (VALONES *et al.*, 2009)

No início da amplificação, as moléculas não-ligadas do SYBR Green apresentam fluorescência fraca. Após o reconhecimento dos iniciadores, algumas moléculas do SYBR Green podem se ligar a fita dupla previamente formada. Durante a polimerização, as moléculas do SYBR Green vão se ligando ao DNA recém-sintetizado, como registro no aumento da temperatura em pequenos incrementos de 65°C a 95°C. Este aumento de temperatura desnatura gradualmente o DNA, as moléculas do SYBR Green são liberadas, e conseqüentemente induz a uma forte queda na redução da fluorescência quando ambas as fitas separam-se completamente. No final da etapa de extensão de cada ciclo do PCR é possível monitorar a quantidade de DNA amplificado pela detecção da fluorescência (NOVAIS;PIRES-ALVAS, 2004; BENES;CASTOLDI, 2010)

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar efeitos do ácido all-trans-retinóico na proliferação, diferenciação, indução de apoptose e expressão dos genes RAR (α , β , γ), Bcl-2, BAX, BAK, CASP-3, GADD45, PPAR- γ e p53 em células-tronco mesenquimais humanas.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a influência da suplementação do ácido all-trans-retinóico na diferenciação de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano em modelo *in vitro*.

Identificar as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo por meio de citometria de fluxo.

Comprovar a multipotência das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano por meio da diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos *in vitro*.

Avaliar a indução de apoptose, pelo tratamento com o ácido all-trans-retinóico, em células-tronco mesenquimais, pré-adipócito e adipócitos.

Verificar o efeito do tratamento com o ácido all-trans-retinóico na integridade da membrana celular de células-tronco mesenquimais.

Averiguar o efeito do tratamento com o ácido all-trans-retinóico sobre o ciclo celular de células-tronco mesenquimais.

Avaliar a influência do tratamento com o ácido all-trans-retinóico na expressão relativa dos genes, RAR (α , β , γ), Bcl-2, BAX, BAK, CASP-3, GADD45, PPAR- γ e p53, por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real, em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo humano.

4. Material e Métodos

4.1. Casuística e obtenção das culturas primárias

Foram doadoras do material biológico 3 pacientes com indicação para cirurgia de lipoaspiração que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As CTM do estroma do tecido adiposo foram coletadas, isoladas, cultivadas e criopreservadas pelo Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica (CeTroGen), segundo rotina convencional do setor, com aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sob o protocolo nº 37847714.4.0000.0021. Posteriormente, o mesmo comitê, sob o protocolo nº 51351215.9.0000.0021, autorizou a utilização de CTM criopreservadas para o presente estudo.

4.1.1. Procedimentos de obtenção e processamento do lipoaspirado e cultivo das células-tronco mesenquimais

Após anestesia e assepsia, foram feitas incisões cirúrgicas de aproximadamente 1,0 cm na região abdominal do paciente para a obtenção do material biológico. Primeiramente, 200 mL de solução salina, foram injetados via subcutânea para que houvesse desprendimento do estroma adiposo. Em seguida, o tecido adiposo solto foi coletado por meio de lipoaspiração com cânula própria. Esta cânula com calibre médio de 0,5 cm foi acoplada a uma seringa de 50 mL para coleta da gordura. Foram coletados cerca de 300 mL do material biológico em recipiente estéril, contendo 200 mL de solução tampão fosfato (PBS; 8g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,15g de Na₂HPO₄; 0,2g de KH₂PO₄; 1000 mL de água deionizada). Logo em seguida, o procedimento da cirurgia de lipoaspiração transcorreu segundo a técnica mais adequada para o paciente. O lipoaspirado bruto de cada paciente foi armazenado apenas para obtenção dos dados do presente estudo, sendo posteriormente descartado em recipiente próprio para descarte de material biológico, seguido de depósito em lixo hospitalar.

Para o processamento do lipoaspirado utilizou-se colagenase do tipo 1 para digestão da amostra como descrito por Markarian *et al.* (2014), com modificações. Onde 100 mL de gordura foi homogeneizada com 300 mL de Colagenase tipo 1 (Gibco®; CAT N° 17100; 250U/mg) diluída na proporção 1:3 para PBS (1 mL gordura: 1 mL PBS : 1mg Colagenase tipo 1) a 37°C com agitação constante por 30 min. A atividade enzimática foi neutralizada com 300 mL de HDMEM (Meio DMEM

de baixa glicose (Sigma®) suplementado com 10% SBF (Gibco®), 2,5 g de HEPES ácido Livre (Sigma®) e g 3,7 de Bicarbonato de sódio) e, posteriormente, centrifugou-se a 2000 rpm por 10 min. para obtenção de um *pellet* contendo a fração do estroma vascular em alta densidade sendo o sobrenadante descartado.

O *pellet* foi ressuspendido em 5 mL de solução de lise (0,37g de EDTA; 8g de NH₄Cl; 0,84 de NaHCO₃; 100 mL de água deionizada). Em seguida, a solução foi homogeneizada e permaneceu por 10 min. à temperatura ambiente com agitação a cada 5 min. O preparado foi centrifugado a 1600 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado.

O *pellet* foi ressuspendido em 3 ml de HDMEM e semeado em placa de cultivo de 6 poços (9,60 cm²). Nos 4 primeiros dias de cultivo as culturas foram lavadas 3x com 3 mL de PBS para a eliminação de células não aderentes e debris. No quinto dia as culturas foram tripsinizadas com 500 µL de tripsina 0,25% e essa foi inativada com o mesmo volume de HDMEM. Em seguida, a solução foi centrifugada a 1200 rpm e o *pellet* ressuspendido e semeado em frasco de cultivo celular (25 cm²) contendo 5mL de HDMEM. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. A expansão das células se deu até a segunda passagem e então as células foram congeladas em solução de criopreservação (90% SBF (Gibco®) e 10% DMSO a frio) e armazenadas imediatamente em freezer -80°C, completadas 24 horas, foram transferidas para o nitrogênio líquido. Após 3 meses as células foram descongeladas e cultivadas em frasco (25 cm²), com meio HDMEM, em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. A expansão das células foi realizada até a sexta passagem, período no qual os experimentos foram realizados.

4.2. Caracterização e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais

4.2.1. Caracterização por imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais

Foram colatadas por tripsinização 2 x 10⁵ células e posteriormente foram incubadas durante 30 min. a 4°C, com anticorpos para os seguintes marcadores celulares: CD105, CD90, CD31, CD11b, MHC II e CD45(Pharmingen® BD, San DIEGO, CA, EUA). As células foram analisadas em um FACScalibur com laser a 488nm (Becton Dickinson®, San Diego, CA, EUA) e *software* CellQuest. O *Software* in MDI 2,8 foi usado para construir os histogramas. As passagens 4-5 foram

analisadas em 10^4 eventos. Todos os reagentes utilizados aqui foram da Sigma® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma.

4.2.2. Comprovação da pluripotência por ensaio de diferenciação celular

4.2.2.1. Diferenciação adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, 1×10^5 células foram semeadas em 3 poços ($9,60 \text{ cm}^2$) após a adesão celular (24h) o meio HDMEM foi descartado e as células passaram a ser cultivadas em meio indutor de adipogênese segundo Markarian *et al.* (2014) com modificações. Para cada 1 mL HDMEM, suplementado com 20% de SBF, utilizou-se $0,714 \mu\text{L}$ de insulina ($0,35\text{mg/mL}$); $100 \mu\text{M}$ de indometacina ($0,0447\text{g}$ de indometacina Sigma® em 5 mL de DMSO); $3,5 \mu\text{M}$ de rosiglitazona ($0,0089\text{g}$ de rosiglitazona em 5 mL de DMSO); 10^{-5} M de dexametasona (solução estoque - $1,2 \text{ mg}$ de dexametasona em $1223 \mu\text{L}$ de etanol sendo a solução final preparada a partir de $10 \mu\text{L}$ da solução estoque para cada 2,5 mL de HDMEM). Todas as soluções foram estocadas em freezer, exceto a indometacina (temperatura ambiente). O meio diferenciador foi preparado no dia do uso, sendo trocado a cada 3 dias (HERMETO *et al.*, 2015; HERMETO *et al.*, 2016) e o processo de diferenciação se deu por duas semanas (ZUK *et al.* 2001; VIEIRA *et al.*, 2015; URT-FILHO *et al.*, 2016).

Após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares.

Para o controle da diferenciação, as células foram cultivadas durante todo o período experimental em HDMEM suplementado com 10% de SBF. Todos os procedimentos de coloração e análise foram mantidos.

4.2.2.2. Diferenciação osteogênica

Para induzir a diferenciação osteogênica, 1×10^5 células foram cultivadas da mesma maneira que na indução adipogênica. Porém, foi utilizado meio próprio para diferenciação osteogênica como descrito por Markarian *et al.* (2014), com modificações. Para a produção do meio de indução osteogênica foi utilizado 7,9 mL

de HDMEM; 10 µL de solução estoque de ácido ascórbico (50 mg de ácido ascórbico 2-fosfato em 10 mL de HDMEM); 1 mL de solução estoque de β-glicerofosfato (630mg de β-glicerofosfato em 20 mL de HDMEM) e 1 mL de soro bovino fetal. Todas as soluções foram estocadas em freezer, e o meio diferenciador foi preparado a cada semana, sendo que no momento de cada troca, 1µL de dexametasona 1.000x era acrescentado para cada 1 mL de meio osteogênico. O meio de diferenciação foi trocado a cada 3 dias durante quatro semanas (HERMETO *et al.*, 2015; HERMETO *et al.*, 2016).

Após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 10 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Alizarin Red* (Sigma®) por 5 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada (Markarian *et al.*, 2014). A diferenciação osteogênica foi comprovada pela visualização de depósitos de cálcio no 21º dia.

Para o controle da diferenciação, as células foram cultivadas durante todo o período experimental em HDMEM suplementado com 10% de SBF. Todos os procedimentos de coloração e análise foram mantidos.

4.2.2.3. Diferenciação condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, 1×10^5 células foram cultivadas da mesma maneira que na indução adipogênica. As células foram mantidas com o *kit* de diferenciação condrogênica STEMPRO (Gibco® Life Technologies) segundo instruções do fabricante por 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 3 dias.

Após o descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 30 min. à temperatura ambiente com paraformaldeído 4%, depois foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Azul de Alcian* (Neon®) por 5 min. à temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada (CAMASSOLA *et al.*, 2012). A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos no 21º dia.

Para o controle da diferenciação, as células foram cultivadas durante todo o período experimental em HDMEM suplementado com 10% de SBF. Todos os procedimentos de coloração e análise foram mantidos.

4.3. Substância teste: Ácido all-trans-retinóico (Vitamina A)

O ácido all-trans-retinóico (ATRA - Fagron®, CAS:302-79-4, Lote:15073822) foi diluído em DMSO para obtenção de solução estoque (1.000µM). A partir desta solução estoque as concentrações testadas foram preparadas em HDMEM no dia do experimento.

4.4. Ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo ensaio colorimétrico com 3-(4,5-dimatil-2-tiazol)-2,5difenil-brometo de tetrazólio (MTT). Para tanto, baseado no protocolo de Poindessous *et al.* (2003), foram semeadas com 7×10^3 células/poço em placas de 96 poços, mantidas por 24 horas na incubadora com 5% CO₂ e temperatura de 37°C. A Doxorrubicina (Bergamo®, 1 µM) foi utilizada no controle positivo e as células do controle negativo receberam 0,1% de DMSO. Quatro concentrações de ATRA (0,5, 5, 50 e 100 µM) foram avaliadas em 24, 48 e 72h. Ao final desses períodos, as células foram incubadas com MTT (Invitrogen® Life Technologies; 0,005g de MTT; 5 mL de PBS; 10 mL de HDMEM) por 4 horas nas mesmas condições de cultivo. Em seguida, as placas foram secas em temperatura ambiente e 100µL de DMSO foram adicionados em cada poço. A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro com filtro de 540nm (ELISA Plate Analyser ROBONIK®). Para cada experimento foram realizadas três repetições independentes com quintuplicatas. Baseado nos resultados, a IC₅₀ (concentração que inibe 50% do evento biológico estudado – viabilidade celular) foi calculada pelo *Software GraphPad Prism 5* e obteve-se o valor de IC₅₀ = 20,75 µM. Estabelecida a IC₅₀, um novo experimento foi realizado com as CTM e com CTM induzidas à diferenciação adipogênica. Para essa fase experimental as células foram semeadas da mesma forma anteriormente descrita, mas cultivadas em meio adipogênico como descrito no item 4.2.1.2.. Já a placa controle (CTM sem estímulo para diferenciação) foi cultivada durante todo o período experimental em meio HDMEM 20% SFB e foi tratada com a IC₅₀.

O ATRA foi utilizado na concentração de 20,75 µM para tratar a placa controle (CTM não induzidas à diferenciação), placa de pré-adipócitos (CTM induzidas à diferenciação por 7 dias anteriormente ao tratamento com ATRA) e placa de adipócitos (CTM induzidas à diferenciação por 14 dias anteriormente ao tratamento

com ATRA). Os tempos de diferenciação foram baseados em Morikawa *et al.* (2013) e Spangenberg *et al.* (2013), com modificações.

As viabilidades, por MTT, foram avaliadas após 1, 3, 5 e 7 dias de tratamento com ATRA. Para o cálculo da viabilidade celular as culturas em cada uma das situações experimentais sem tratamento com ATRA foram consideradas com viabilidade de 100% e usadas como padrão para estabelecer a viabilidade das culturas correspondentes tratadas com ATRA. Procedeu-se também análise qualitativa visual sistematizada para descrição de mudanças na morfologia e padrão de crescimento.

4.5. Análise de apoptose *in situ*: avaliação morfológica

Para análise morfológica da influência do ATRA nas CTM, 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo uma lamínula em sua base e mantidas em incubadora com 5 % CO₂ a 37°C por 24h com HDMEM. Após confirmação da aderência das células, as mesmas foram tratadas com a concentração 20,75 µM. Após 72 horas de tratamento, as lamínulas foram coletadas e processadas de acordo com o protocolo descrito por Rovozzo (1973) e modificado por Mauro *et al.* (2011). Após três lavagens com PBS, a lamínula foi retirada da placa de cultura e fixada em *Carnoy* por 5 min. A lamínula foi mergulhada rapidamente em cada uma das placas contendo concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com Tampão *McIlvaine* por 5 min., coloração com Acridina Orange (0,01%, 5 min.) e nova lavagem com o tampão. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm.

4.6. Avaliações em Citometria de fluxo

Para os experimentos realizados em citometria de fluxo, 2×10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas em incubadora com 5 % CO₂ a 37°C, por 24h com HDMEM suplementado com 10% SFB. Os tratamentos com ATRA foram realizados com a concentração de 20,75 µM (IC₅₀) por 12 h. O Cloridrato de Irinotecano (Accord® Farmacêutica Ltda., P08965), 1 µM) foi utilizado como controle positivo e o tratamento se deu por 12h. As células do controle negativo receberam a mesma concentração de DMSO que a maior concentração da substância testada. Ao fim do tratamento as células foram coletadas por tripsinização, centrifugadas a

1.200 rpm por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 100µL de PBS e transferidos para um criotubo. A aquisição de 50.000 eventos foi realizada em citômetro BD Accuri® C6 e, em seguida, analisada pelo *Software* BD Accuri® C6. Duas repetições independentes foram realizadas para cada experimento.

4.6.1. Avaliação do ciclo celular

Para verificar a influência da droga sobre o ciclo celular, 5µL de RNase (2mg/mL) foram adicionados ao criotubo contendo 100µL de suspensão celular (em PBS) e incubou-se a 37°C, 5% de CO₂, por 30 min. Em seguida, acrescentou 100uL da solução de lise (20mg de Citrato de Sódio Dihidratado, 20uL de Triton X-100 e 20 ml de PBS) e 5uL de Iodeto de Propídio (50ug/mL). O criotubo foi incubado no gelo por 30 min. protegido da luz antes da aquisição.

4.6.2. Avaliação de Apoptose

Para a detecção de apoptose foi utilizado o Kit de Detecção de Apoptose PE Annexin V (BD Pharmingen™). Para tanto, 100µL de suspensão celular foi homogeneizado com 100µL de solução tampão (1x) e 5µL de Anexina V. O criotubo foi incubado em gelo por 15 min. Em seguida, acrescentou-se 5µL de 7-aminoactinomycin D (7AAD) e procedeu-se a aquisição imediatamente.

4.6.3. Avaliação de Integridade de Membrana

Para verificação do status de integridade de membrana foi utilizado 100uL de suspensão celular e 25 uL Iodeto de Propídeo (50ug/mL). Após 5 min. de incubação à temperatura ambiente procedeu-se a aquisição.

4.7. Avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real

Na Tabela 1 estão listados os oligonucleotídeos utilizados para amplificar genes envolvidos na apoptose, ciclo celular, dano, reparo e receptores relacionados com o ácido retinóico.

Um total de 2×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 4 poços. Os tratamentos com ATRA foram realizados com a concentração de 20,75 µM por 12 h e, em seguida, o RNA total foi extraído usando kit SV Total RNA Isolation System (Cat. No. Z3100, Promega®), conforme descrito, e de acordo com as especificações

dos fabricantes (TM # 048). As células foram homogeneizadas com o tampão de lise, para quebra da membrana e exposição do material genético. Posteriormente, a mistura foi depositada em membrana, onde recebeu tratamento com enzima DNase e lavagens com solução tampão. Ao final das lavagens a membrana recebeu 100µl de água livre de RNase, para remoção do RNA. As amostras foram quantificadas usando um espectrofotômetro NanoVue™ (GE Healthcare - Life Sciences®). A pureza do RNA foi estimada com base na razão de absorbância a 260 nm/280 nm e apenas as amostras com uma razão entre 1,8 e 2,1 foram utilizadas no estudo. A integridade do RNA foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de agarose (1%) (Invitrogen™), utilizando, 0,5 g de agarose (livre de RNase) em 50ml de TBE 1x (Tris/Borato/EDTA; coloque aqui como se prepara igual fizemos no item dos meios diferenciadores) e 1µl de SYBR® Safe (ThermoFisher™). Para a corrida de eletroforese (80V, 60mA, 20 min.) foram utilizados 3ul de RNA e 3ul de Tampão de Carreamento (azul de bromofenol 0,25%). A análise da integridade do RNA, com visualização de bandas íntegras, ocorreu em transluminador L.PIX (Locus Biotecnologia®). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 250 ng de RNA total em um volume de reação final de 20 µl. Em cada reação foram utilizados 0,5µg de *random primer*, 10µL de GoScript™ 5X Reaction Buffer, 3,8 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTPs, 20 unidades de Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (todos componentes foram Promega®) e água livre de ribonuclease (q.s.p. para 20ul). A reação de transcrição foi efetuada em GeneAmp™ 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems ®) de acordo com as especificações dos fabricantes (TM #316). O cDNA foi quantificado e diluído até uma concentração de 150 ng/µL para utilização em PCR Tempo Real. A reação foi realizada no Rotor Gene (Qiagen®). O Kit GoTaq® qPCR Master Mix (Cat. No. A6002, Promega) foi usado em um volume de 10 µL com os iniciadores oligonucleotídicos (5 pmol de cada), cDNA (500 ng) e água livre de ribonuclease (q.s.f.20 uL). A PCR em tempo real foi realizada sob as seguintes condições: 95°C durante 10 min., 40 ciclos de 95°C / 15 segundos e 60°C / 60 segundos. No final da reação, a curva de *Melting* foi utilizada para avaliar a especificidade de cada oligonucleótido e o gene da Beta-actina (ACTB) foi utilizado como normalizador (*housekeeping*).

Tabela 1 – Sequência de primers (5'- 3') utilizados nas avaliações de expressão gênica

	Forward	Reverse
ACTB	GGAAATCGTGCGTGACAT	AGGAAGGAAGGCTGGAAG
BAK	CTGTTTGAGAGTGGCATC	ATGCTGGTAGACGTGTAG
BAX	CCT TCT TTG AGT TCG GTG	TTCAGGTAAGTCAAGTCCAC
Bcl – 2	GGACGAACTGGACAGTAAC	GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC
CASP-3	ATCATACATGGAAGCGAATC	ATACATAAACCCATCTCAGGA
PPAR- γ	TGGATCTCTCCGTAATGGAAG	CACTGGATCTGTTCTTGTG
RAR- α	ATCACGCTGAAGATGGAG	TGTCCGCTCAGAGTGTC
RAR- β	AGGAATGACAGGAACAAG	TGGCAGAGTGAAGGGAAG
RAR- γ	AAGAGGTGAAGGAAGAAG	TGATGGGCTTTGCTGAC
p53	TACCACCATCCACTACAAC	GACAGGCACAAACACGCAC
GADD45	TCAGCGCACGATCACTGTC	CCAGCAGGCACAACACCAC

4.8. Análise Estatística

Os resultados do teste de MTT foram expressos em média \pm erro padrão da média. A determinação da concentração IC₅₀ do ATRA, foi realizada pela análise da curva de regressão não linear a partir dos valores de viabilidade celular obtidos no primeiro MTT por meio do *Software* GraphPad Prism 5. A análise estatística foi realizada por ANOVA/Bonferroni e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$ (*Software* GraphPad InStat 5). Os níveis de expressão gênica observado no ensaio de PCR em Tempo Real foram determinados pelo método de Pfaffl *et al.* (2002), com análise estatística realizada por meio do *Software* REST-384.

5. Resultados

5.1. Caracterização e comprovação da pluripotência das células-tronco mesenquimais

O perfil de imunofenotipagem das CTM derivadas do estroma do tecido adiposo expressaram os marcadores para CD105 e CD90 e não expressaram CD31, CD11b, MHC II e CD45. Esses resultados confirmam que as células estudadas são células-tronco mesenquimais (Figura 4).

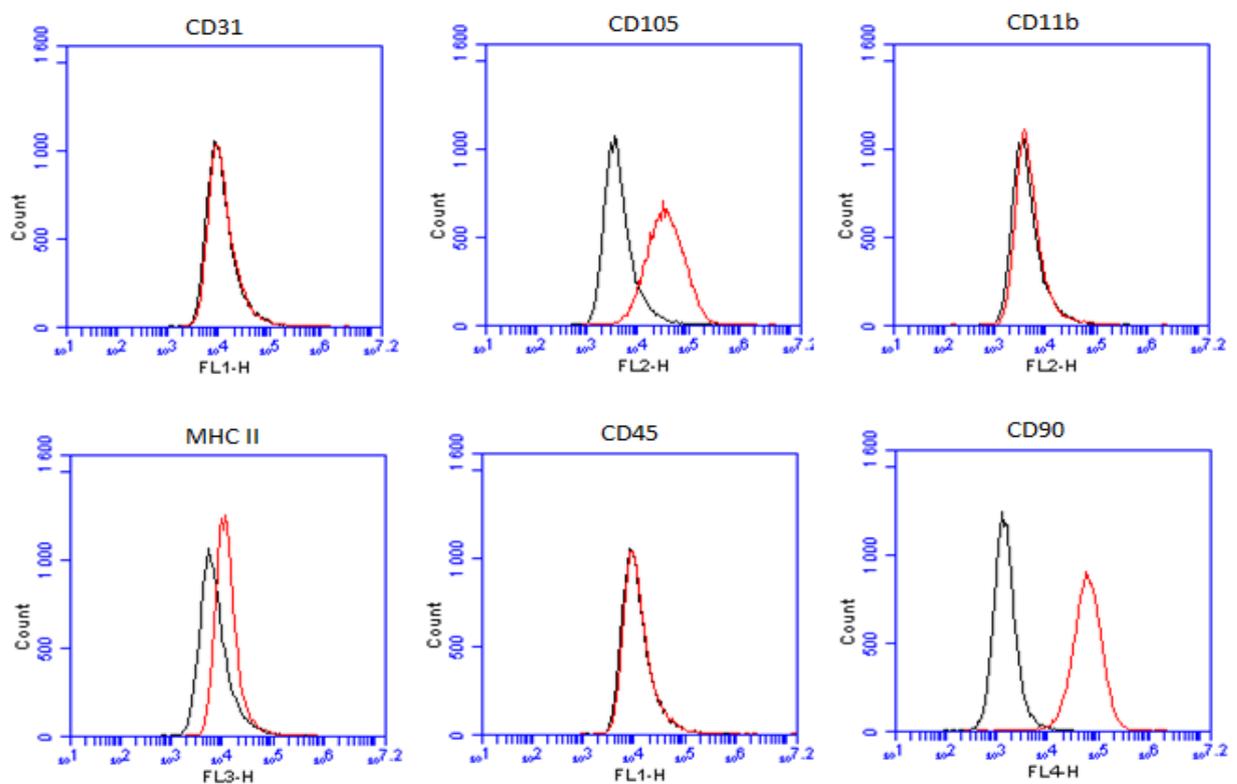


Figura 4 - A) Perfil imunofenotípico das CTM derivadas do estroma do tecido adiposo humano. Células expressaram os marcadores para CD105 e CD90 e não expressaram CD31, CD11b, MHC classe II e CD45

As mesmas induzidas à diferenciação foram capazes de originar tecido adiposo, ósseo e condrogênico comprovando a pluripotência das mesmas. As culturas de células indiferenciadas bem como a confirmação da diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica por *Oil red*, *Alizarin Red* e *Alcian Blue*, respectivamente, estão apresentadas na Figura 5.

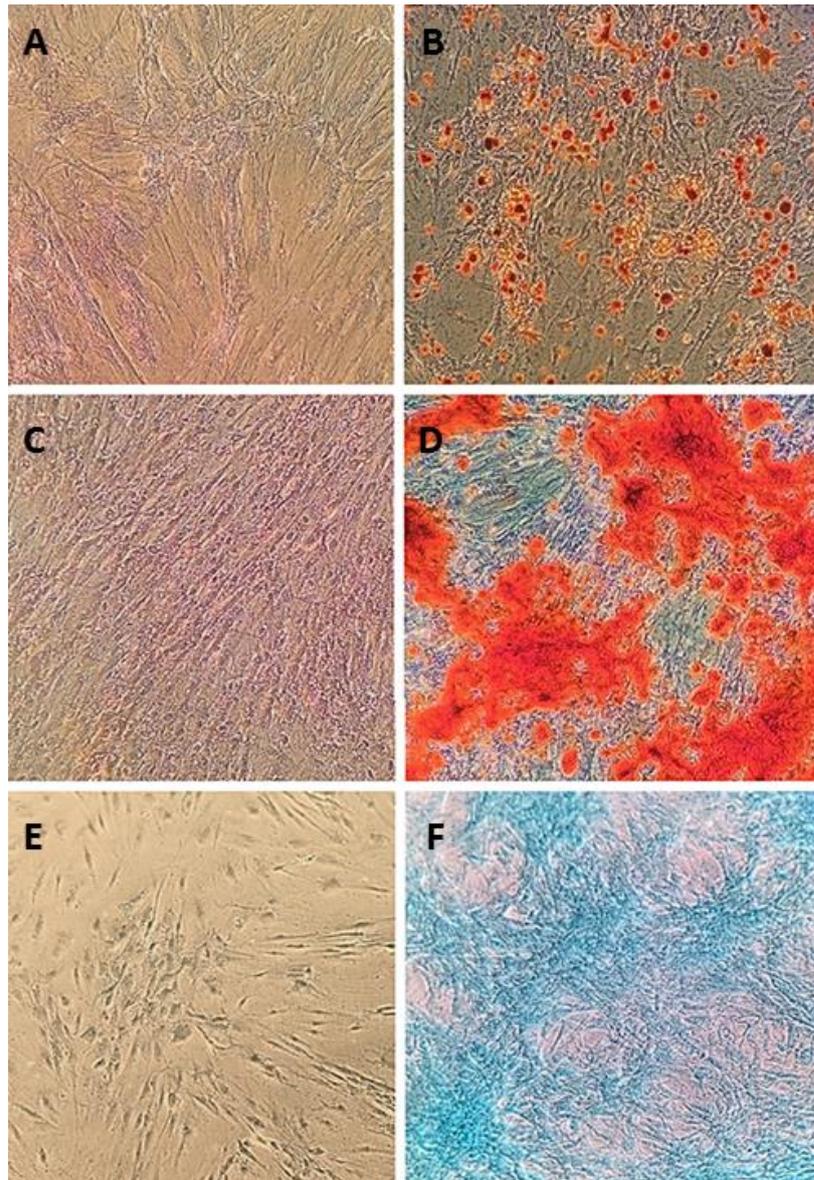


Figura 5 – A) Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais (A, B e C) e de células-tronco mesenquimais em diferenciação adipogênica (D), osteogênica (E) e condrogênica (F) coradas com *Oil red*, *Alizarin Red* e *Alcian Blue*, respectivamente (Aumento de 200x).

5.2. Ensaio de viabilidade celular e comprovação morfológica de morte celular por apoptose

O ensaio do MTT demonstrou que, no período de 12 h, a viabilidade celular das concentrações de 0,5 μM , 5 μM , 50 μM e 100 μM de ATRA foram $86,05 \pm 2,94$, $78,93 \pm 3,80$, $60,24 \pm 2,28$, $37,62 \pm 3,40$; para o período de 24h a viabilidade celular foi de $85,40 \pm 2,48$, $77,84 \pm 2,75$, $41,61 \pm 2,56$, $24,71 \pm 5,43$; para o período de 48h foi de $89,41 \pm 1,46$, $85,18 \pm 0,45$, $25,68 \pm 2,08$, $9,67 \pm 1,00$; e para o período de 72 h foi de $99,93 \pm 2,02$, $105,05 \pm 4,30$, $18,25 \pm 0,58$, $0,53 \pm 0,37$, respectivamente (Figura 6).

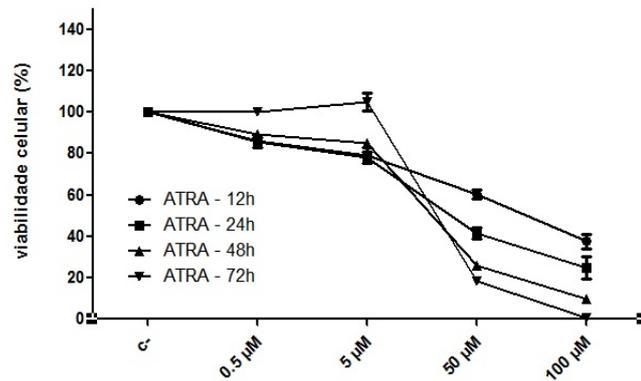


Figura 6 – Média \pm erro padrão da média da viabilidade celular de célula tronco mesenquimais tratadas com ATRA.

A análise estatística demonstrou que a viabilidade celular não se altera para a concentração de 0,5 μM ao longo das 72 horas de análise. Já as concentrações de 50 e 100 μM reduzem ($p > 0,05$) a viabilidade celular ao longo das 72 horas de análise sendo que o efeito citotóxico do ATRA aumenta com o passar do tempo, exceto para a concentração de 5 μM que perde a capacidade citotóxica/citostática em 72h (Figura 7).

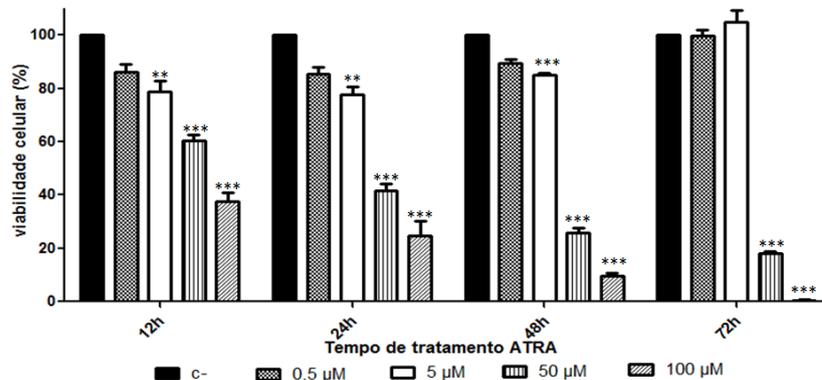


Figura 7 – Comparação das médias da viabilidade celular dentre os diferentes tempos de tratamento com o controle negativo (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

A partir dos resultados de viabilidade celular, para o primeiro momento de análise (24h), foi calculada a $\text{IC}_{50} = 20.75 \mu\text{M}$ e em seguida para comprovação morfológica de morte celular fez o teste de apoptose *in situ* e a análise qualitativa demonstrou que essa concentração é capaz de reduzir a quantidade de células na

placa de cultivo sugerindo efeito citostático bem como muda a morfologia celular. As mudanças morfológicas permitiram observar perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células. Além disso, foi possível observar núcleos com condensação e marginalização da cromatina e formação de grumos grosseiros próximos à membrana nuclear. (Figura 8).

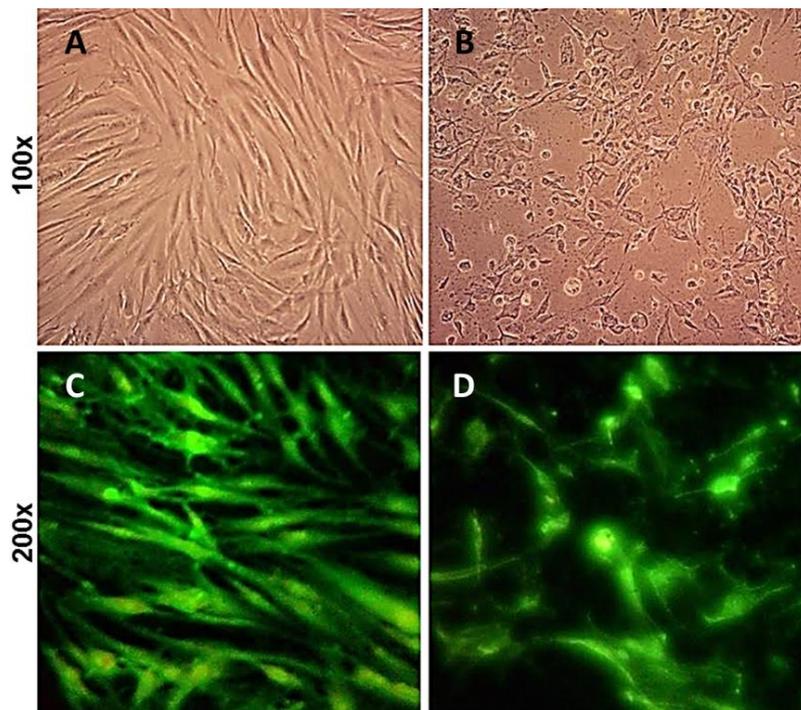


Figura 8 – Fotomicrografia da cultura de células-tronco mesenquimais controle (A/C) e tratadas com ATRA (B/D) na concentração de 20.75 μM por 72 horas. Observa-se que após o ensaio com imunofluorescência é possível observar que as células tratadas apresentam aspecto apoptótico, com perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células.

Ao se avaliar a viabilidade celular das células-tronco mesenquimais, dos pré-adipócitos e dos adipócitos tratados com 20,75 μM de ATRA ao longo de 7 dias pode-se observar que na primeira análise (após um dia de tratamento – 1º dia) as viabilidades foram de $81,09 \pm 0,80$, $96,52 \pm 4,53$, $92,91 \pm 0,65$; no 3º dia as viabilidades foram de $55,83 \pm 1,94$, $73,39 \pm 1,91$, $79,38 \pm 4,94$; no 5º dia as viabilidades foram de $40,8 \pm 1,71$, $52,05 \pm 1,28$, $73,42 \pm 3,90$; e no 7º dia de $29,87 \pm$

2,92, $40,63 \pm 0,28$, $66,86 \pm 1,91$, respectivamente (Figura 9). A análise estatística demonstrou que após 1 dia de tratamento, apenas as CTM tiveram redução ($p < 0,05$) da viabilidade celular. Para as análises após 3, 5 e 7 dias de tratamento o ATRA causou redução ($p < 0,05$) da viabilidade para os 3 tipos celulares demonstrando que a o efeito citostático/citotóxico é tempo dependente, ou seja, quanto maior o tempo de tratamento maior a inibição de proliferação e/ou indução de morte celular. Esses resultados também demonstram que as CTM, depois os pré-adipócitos e, por fim, os adipócitos são, nessa ordem, mais sensíveis ao tratamento com ATRA (Figura 9).

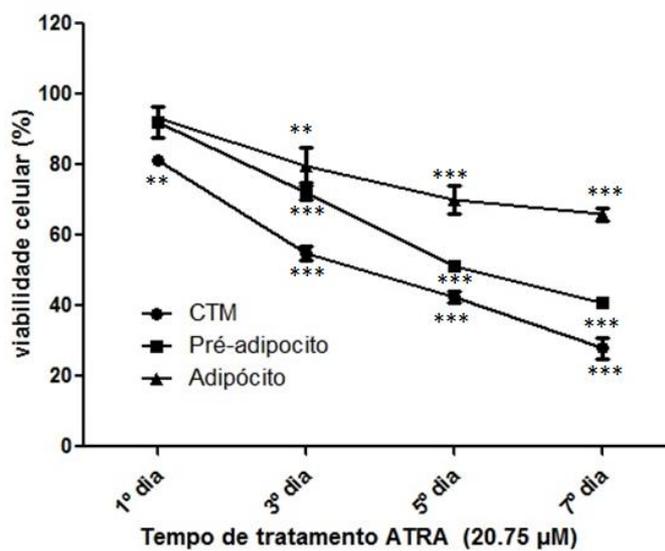


Figura 9 - Média \pm erro padrão da média da viabilidade celular de células-tronco mesenquimais, pré-adipócitos e adipócitos tratadas com ATRA (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

A avaliação qualitativa visual sistematizada demonstrou redução da quantidade de células por campo com o passar dos dias, perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células (Figura 10).

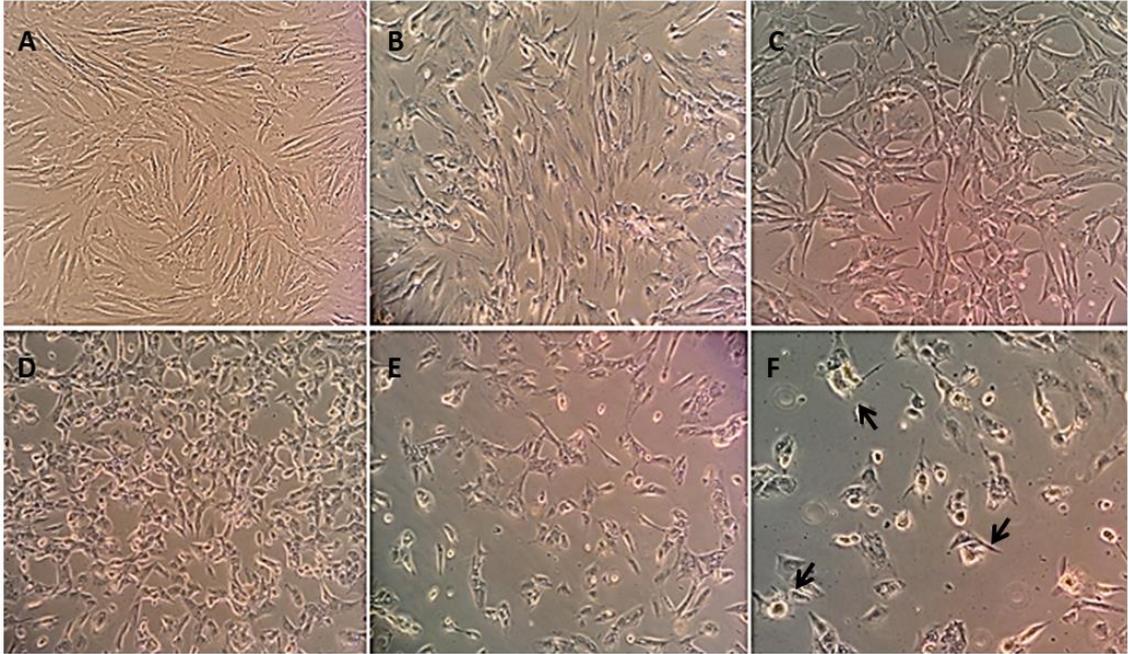


Figura 10 - Fotomicrografia de acompanhamento do comportamento das CTM em cultivo tratadas com ATRA: característica inicial da cultura de CTM (A), comportamento após 6h (B), 12h (C), 24h (D), 48h (E) e 72h (F) sendo as principais alterações observadas a redução do número de células por campo, perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células. As setas indicam células com aspecto apoptótico (Aumento de 200x).

5.3. Mecanismo de morte celular e comprovação molecular de morte celular por apoptose

A análise do ciclo celular demonstrou que o ATRA causou aumento (4,02x) e redução (-2,54x), estatisticamente significativos, do número de eventos em Sub-G1 e G1, respectivamente. Já para o número de células em S e G2 não houve variação significativa (Figura 11A). A análise da integridade de membrana indicou que o ATRA causou aumento de lesão celular (4,66x; $p < 0,05$; Figura 11B) e quando avaliada a indução de apoptose pelo ATRA observou-se que esse aumento ($p < 0,05$) a frequência de apoptose em 33,56x (Figura 11C).

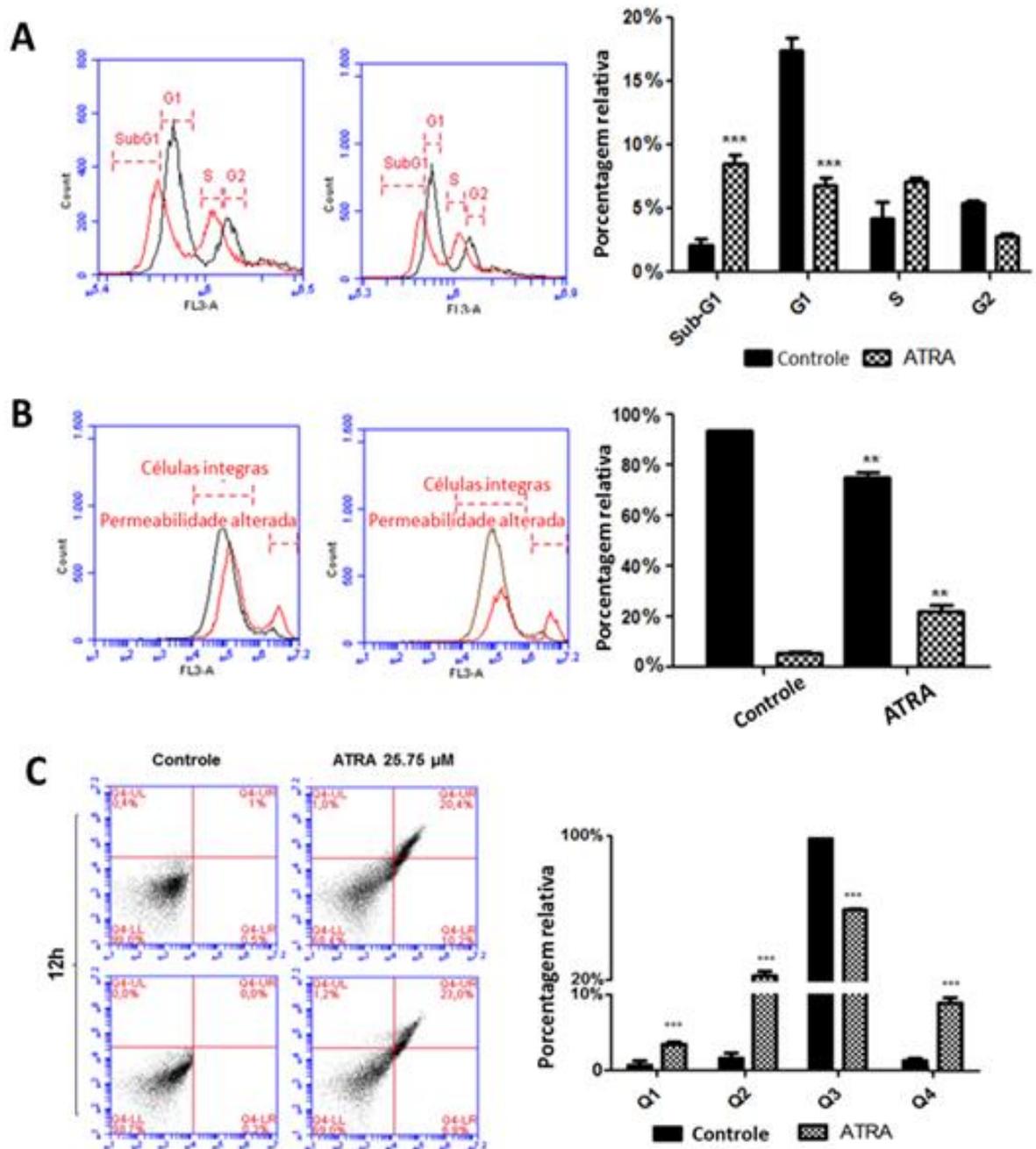


Figura 11 – Análise de A) - ciclo celular, B) - integridade de membrana e C) - apoptose (Teste Estatístico: ANOVA/Bonferroni, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). O ATRA causa aumento de eventos em Sub-G1 e redução em G1, além de causar perda da integridade da membrana plasmática e aumento da frequência de apoptose.

A análise da expressão gênica relativa demonstrou que o tratamento com ATRA aumentou a expressão relativa de CASP-3, Bcl-2, BAX e BAK e, 8,8x, 4,1x, 5,5x e 5,4x, respectivamente (Figura 12). Já a expressão de RAR - α , RAR - β e RAR - γ aumentou em 3,8x, 3,2 e 2,07x, respectivamente (Figura 13). Quanto a

expressão dos genes GADD45 e PPAR- γ , houve um aumento de 3.14x e 16x respectivamente, e P53 sofreu inibição de -1.38x (Figura 12).

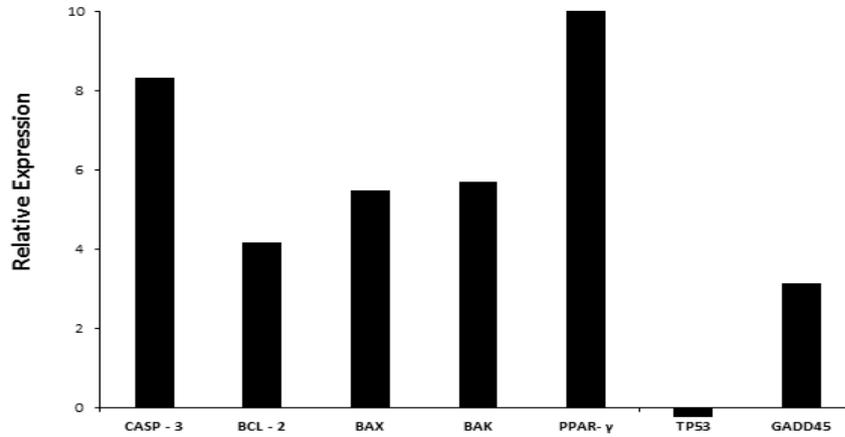


Figura 12 - Expressão relativa dos genes CASP-3, Bcl-2, BAX, BAK, PPAR- γ , P53 e GADD45 demonstram aumento da expressão para todos os genes, exceto P53, quando as culturas foram tratadas com ATRA.

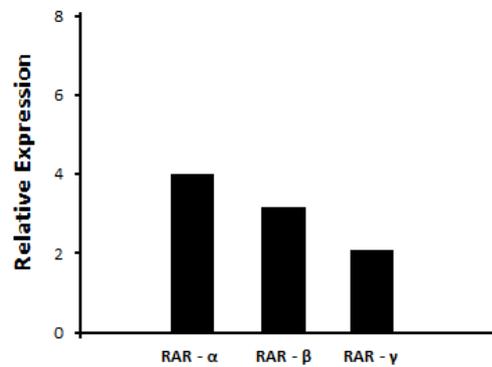


Figura 13 - Expressão relativa dos subtipos do RAR (α , β , γ) demonstraram aumento da expressão de todos quando as culturas foram tratadas com ATRA.

6. Discussão

As funções primárias de células-tronco mesenquimais são substituir as células que morrem devido a lesão ou doença e manter as funções constantes de órgãos (XIN *et al.*, 2016). Assim, as CTM são capazes de auto-renovação de órgãos específicos após serem induzidas à diferenciação por mecanismos fisiológicos e/ou estímulos endógenos (FUCHS *et al.*, 2013).

Os adipócitos provêm de células-tronco mesenquimais multipotentes residentes no estroma do tecido adiposo. Essas células, quando estimuladas, tornam-se pré-adipócitos e perdem a capacidade de se diferenciar em outras linhagens mesenquimais e se comprometem com a linhagem adipocitária (AILHAUD; HAUNER, 2004). Essa diferenciação desequilibrada pode se correlacionar ao desenvolvimento da obesidade (QUEIROZ *et al.*, 2009) visto que, o ideal seria a reposição de células do tecido adiposo e não a hiperplasia do mesmo. Além disso, sabe-se que o potencial de gerar novas células persiste durante toda vida do indivíduo (JIANPING; GIMBLE, 2011) e, portanto, a hiperplasia, associada à hipertrofia dos adipócitos, podem acarretar obesidade em diferentes faixas etárias.

Esses relatos anteriores demonstram a necessidade de conhecimento da biologia da obesidade. Por isso, a fim de, garantir uma maior fidelidade quanto aos resultados da diferenciação adipogênica, escolhemos as células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo para este estudo, A inibição desta diferenciação representa um mecanismo pelo qual a hiperplasia dos adipócitos poderia ser suprimida (MOON *et al.*, 2007) e portanto, se tornar uma possibilidade de terapia no tratamento da obesidade.

A literatura pesquisada não possui estudos com células-tronco mesenquimais em culturas primárias. Isso demonstra o pioneirismo desse estudo. Porém, estudos com linhagens imortalizadas nortearam esse delineamento. De acordo com a literatura da área, nas linhagens de células pré-adipocitárias AML-1 e 3T3-L1, o ATRA tem efeitos dose-dependentes na diminuição da viabilidade e indução de apoptose (MORIKAWA *et al.* 2013; ROSEN, MACDOUGALD, 2006). Nossos resultados corroboram com esses achados, já que nas concentrações de 20.75, 50 e 100 μM , a diminuição da viabilidade das CTM reduziu com o aumento da concentração do ATRA. Para concentrações de 5 μM , observou-se redução da viabilidade celular nas primeiras 48h, Em 72h, não houve indício de morte celular;

Ao contrário, houve aumento do número de células. No entanto, essa variação não foi significativa. Já para a concentração de 0,5 μM , nas primeiras 48h observou-se redução da viabilidade celular, mas não significativa, e em 72h não houve nenhum efeito do tratamento com ATRA sobre a viabilidade. Esses resultados podem indicar que o ATRA em pequenas concentrações estimula a proliferação celular. Relato como esse também foram feitos por Morikawa *et al.*, (2013).

Após estabelecida a IC_{50} avaliou-se o efeito do ATRA sobre as CTM e células induzidas à diferenciação adipogênica. Nossos resultados demonstraram que as CTM são mais sensíveis ao tratamento com ATRA se comparadas às suas equivalentes induzidas à diferenciação por 7 e 14 dias. Esses resultados sugerem que a intervenção no início da diferenciação seja mais eficiente do que em células já diferenciadas, ou seja, quanto mais diferenciada a célula estiver menor será o efeito do ATRA em causar morte celular. Resultados semelhantes foram descritos por Lobo *et al.* (2010). Esse autor relata que o tratamento com ATRA gera diferentes efeitos dependendo dos estágios de maturação da adipogênese, sendo mais efetivo para inibir a diferenciação nas fases inicial e média, ou seja, quanto menos diferenciada, mais suscetível à indução de apoptose pelo ATRA as células serão.

A indução de apoptose por ATRA sugerido por Lobo *et al.* (2010) também foi verificada em nosso estudo. Parâmetros que confirmam esse tipo de morte celular são (I) as variações morfológicas, observadas em microscopia de campo claro e de imunofluorescência, que indicaram perda do aspecto fibroblastóide, redução do tamanho e do volume celular, redução da emissão de prolongamentos citoplasmáticos, aspecto arredondado, perda de contato e adesão com a superfície do frasco de cultivo e com outras células, núcleos com condensação e marginalização da cromatina e formação de grumos grosseiros próximos à membrana nuclear; e (II) o aumento do número de eventos em sub-G1, (III) perda da integridade de membrana e (IV) comprovação de apoptose pelo teste de Anexina V, todos avaliados por citometria de fluxo.

Além das características morfológicas anteriormente descritas para apoptose (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007) destacam-se os eventos de sub-G1. Esses são caracterizados pela presença de células com conteúdo de DNA inferior aos apresentados na fase G1 na distribuição do ciclo celular. Essas células são consideradas hipoplóides ($<2n$), ou seja, representam a fração de células onde ocorreu fragmentação do DNA que é característico de morte celular por apoptose

(AMARANTE-MENDES *et al.*, 2013). O aumento de células que alteraram a integridade de membrana, pelo tratamento com o ATRA, também sugerem eventos apoptóticos uma vez que a perda da integridade de membrana pode correlacionar-se à translocação da fosfatidilserina para a superfície externa da membrana plasmática onde esse componente fosfolipídico sinaliza para que ocorra fagocitose (MEDINA; RAVICHANDRAN, 2016). No presente estudo, a confirmação de apoptose ainda se deu pelo teste de Anexina V. A anexina V tem alta afinidade pela fosfatidilserina na presença de íons cálcio (MIYAGI; CHIPOT; RANGL, 2016). Assim, células em apoptose, mesmo antes de perder a integridade de membrana, ao translocar a fosfatidilserina para superfície externa, se ligam à Anexina V, que quando associada a um composto fluorescente (7-AAD, por exemplo), permite identificar e quantificar as células em apoptose por citometria de fluxo. Em nosso estudo, foi possível observar um aumento do número de células detectadas após o tratamento com o ATRA, indicando o efeito do mesmo sobre as CTM tanto para aumento de eventos em sub-G1, quanto para a perda da integridade de membrana bem como para o número de células em apoptose (marcadas pela Anexina V).

Ainda com o intuito de compreender o mecanismo de morte celular das CTM expostas ao ATRA alguns genes foram estudados e dentre eles destaca-se o CASP-3. O aumento desta caspase efetora demonstrou e confirmou a via de morte celular por apoptose (WANG, *et al.*, 2001). Ainda se analisarmos os resultados do ensaio de MTT, verificamos que houve uma interação do ATRA com a mitocôndria das CTM, pois o poder de absorção e formação do sal de formazan foi alterado. O papel essencial da mitocôndria em aspectos bioenergéticos da célula é suportado pela dinâmica desta organela, que é controlada por eventos de fusão e fissão (DETMER e CHAN, 2007). Além disso, as células eucarióticas têm a capacidade de iniciar respostas adaptativas a diferentes estímulos ambientais, tais como modificações na procura de energia, crescimento celular, morte celular / stress ou a diferenciação das células, alterando o número de mitocôndrias, mudando então sua morfologia, ou remodelando a organização e distribuição de mitocôndrias dentro da célula (LI, ZHU, LU, 2005). O estudo de Desagher; Martinou, (2000) aponta a mitocôndria como o principal mediador da via intrínseca de morte celular. Sabe-se que família das proteínas Bcl-2 regula o processo de morte celular, principalmente BAX e BAK, e a permeabilidade da membrana mitocondrial (MURPHY, 2000). Em sua pesquisa Wang *et al.* (2001), afirma que a expressão de Bcl-2, de acordo com

sua localização celular, pode induzir ou inibir a apoptose. Ele demonstrou que, quando localizado no retículo endoplasmático o Bcl-2 tem efeito protetor de apoptose, enquanto que, quando localizado na membrana da mitocôndria induz apoptose. Isso explicaria o aumento da expressão de Bcl-2, BAX e BAK, indicando a interação desses genes no que tange à integridade mitocondrial, ativando a CASP-3 e culminando com a morte celular programada das CTM.

Em outra via, GADD45 está também relacionado com a morte celular mediada por mitocôndrias. Ele age quando há uma perturbação da estabilidade do citosqueleto celular, fato este já comprovado durante a avaliação da integridade da membrana das CTM, bem como verificado pelas mudanças morfológicas descritas nesse estudo (WINGERT *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm analisado também o papel do GADD45 em CTM e sugere-se que esse gene pode se expressar durante a diferenciação, provavelmente, para eliminar eficientemente as células danificadas/lesionadas (WINGERT *et al.*, 2016). Ainda em nosso estudo observamos que a expressão de PPAR- γ foi muito evidente. Sabe-se que esse gene é o principal regulador do processo de adipogênese em CTM e pelo armazenamento de lipídios (ZHUANG, 2016). Assim, se fizermos uma análise geral dos resultados desse estudo podemos afirmar que quanto maior a diferenciação das CTM menor é a capacidade do ATRA induzir apoptose. Logo, o aumento da expressão de PPAR- γ pode ser uma tentativa da célula se diferenciar e não sofrer apoptose. Contrário a esse mecanismo de proteção teria simultaneamente o aumento da expressão de GADD45 que desencadearia a morte celular, por apoptose. Essa expressão seria favorável à ação do ATRA e, portanto, temos aqui dois diferentes sistemas que se equilibram para eliminar as células que não devem continuar no processo de diferenciação.

Outro fato que torna possível confirmar a ativação da diferenciação adipogênica como tentativa de reduzir os efeitos do ATRA foi a inibição da expressão de p53 já que sua deficiência resulta não somente na regulação positiva dos principais fatores de transcrição adipogênica, mas também aumenta o acúmulo de gordura em células já diferenciadas (MOLCHADSKY *et al.*, 2008).

Os ensaios de expressão gênica também demonstraram que o tratamento com ATRA aumentou a expressão dos receptores retinóides (RAR α , β e γ) sendo o α o mais expresso. Esses resultados sugerem que o ATRA pode ativar os 3 genes para exercer sua ação sobre as CTM. Estudos ainda indicam que o ATRA se liga

aos receptores retinóides formando um complexo hormônio-receptor que entra no núcleo e interage com componentes nucleares interferindo na transcrição de genes que tem relação com a indução de diferenciação, apoptose, controle da proliferação dentre outras atividades (BASHOR; TOFT; CHYTIL, 1973; TANG; GUDAS, 2011; CONNOLLY; NGUYEN; SUKUMAR, 2013; ALIZADEH *et al.*, 2014). Esses fatos corroboram os resultados de apoptose que foram encontrados nesse estudo e reforçam as discussões realizadas anteriormente.

7. Conclusão

Assim, concluímos que por meio da expressão dos receptores retinóides pode-se ocorrer a modulação da expressão dos genes BAX, BAK, Bcl-2 e GADD45 e promover a morte celular por vias mitocondriais. Além disso, pode ocorrer indução de diferenciação adipogênica na tentativa de evitar a apoptose principalmente pela inibição da expressão de p53 e aumento da expressão de PPAR- γ , visto que quanto mais adiantado no processo de diferenciação adipogênica as células estiverem menor é sua susceptibilidade aos efeitos do ATRA. Infere-se então, que o ATRA pode ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de terapias para o controle da obesidade visto que ele interfere na diferenciação e morte celular de CTM, pré-adipócitos e adipócitos.

8. Referências

- AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of white adipose tissue. In: Bray AGB, editor. Handbook of obesity: etiology and pathophysiology. New York, USA: Marcel Dekker; 2004.
- ALBERTS, B. *et al.* The Cell. Garland Science, New York, London, p. 1616, 2002.
- ALLEN, L.H. and HASKELL, M. Estimating the potential for vitamin A toxicity in women and young children. J Nutr v.132, p. 2907-2919, 2002.
- ALVAREZ, R. *et al.* 9-cis- retinoic acid analogues with bulky hydrophobic rings: new rxr-selective agonists. Bioorg Med Chem Letters. v. 14, p.6117-11, 2004.
- AMARANTE-MENDES GP. *et al.* Cell: A Laboratory Manual. U.S.A.: Cold Spring Harbor Laboratory. 2136 p , 1997.
- AOKI, V. *et al.* Imunofluorescência direta e indireta. An Bras Dermatol. v. 85, n. 4, p. 490-500. 2010
- BACAL, N.S. and FAULHABER, M.H.W. Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo: Editora Atheneu p. 90, 2003.
- BAHIA, L.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, v. 13, 2014.
- BASHOR, M.M.; TOFT, D.O.; CHYTIL, F. In vitro binding of retinol to rat-tissue components. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America .v. 70, n. 12, p. 3483–7, 1973.
- BAYS H.E. *et al.* Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. Expert Rev. Cardiovasc. Ther. v. 6, n. 3, p. 343-368, 2008.
- BENES, V. and CASTOLDI, M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. Methods, v.50, p.244-249, 2010.
- BERRY, D.C. and NOY, N. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/ delta and retinoic acid receptor. Mol Cell Biol. v. 29, p. 3286-3296, 2009.
- BONET, M.L. *et al.* Vitamin a and the regulation of fat reserves. Cell Mol Life Sci, v. 60, p. 1311-1321, 2003
- BOULTON, M.; ALBON, J. A. Stem cells in the eye. Internacional Journal of Biochemistry and cell Biology. v. 36, n. 4, p. 643-57, 2004.
- BOUWENS, L. Cytokeratins and cell differentiation in the pâncreas. Pathol. v. 184, p. 234-39, 1998.

- BRODY, T. *Nutricional Biochemistry*. Academic Press. San Diego, cap. 8, p. 400-409, 1994.
- BURASTERO, G. *et al.* The association of human mesenchymal stem cells with BMP-7 improves bone regeneration of critical-size segmental bone defects in athymic rats. *Bone*. Philadelphia, USA, v.47, n.1, p.117-126, 2010.
- CAMASSOLA, M. *et al.* Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells. *Methods Mol. Biol.* v. 879, p. 491-504, 2012.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells and gene therapy. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. v. 379, p.S67-S70, 2000.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J.Orthop Res*. v. 9, p.641-50,199.
- CARRANCIO, S. *et al.* Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Experimental hematology*, Philadelphia, v.36, n.8, p.1014-1021,2008.
- CHEN, C.C. *et al.* DHL-HisZn, a novel antioxidant, enhances adipogenic differentiation and antioxidative response in adipose-derived stem cells. *Biomed Pharmacother*. v. 84, p. 1601-1609, 2016.
- CONDE, W.L.; MONTERIO, C.A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. *Am J Clin Nutr*. v.100. p. 1617S-22,2014.
- CONNOLLY, R.M.; NGUYEN, N.K.; SUKUMAR, S. Molecular Pathways: Current Role and Future Directions of the Retinoic Acid Pathway in Cancer Prevention and Treatment. *Clinical Cancer Research*. v. 19, n. 7, p. 1651–1659, 2013.
- CORBETTA, S. *et al.* Clinical study effects of retinoid therapy on insulin sensitivity, lipid profile and circulating adipocytokines. *Eur J Endocrinol*, v.154, p. 83–6,2006.
- CSAKI, C.; *et al.* Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biomechanical morphological and ultrastructural study. *Histochemistry and Cell Biology*, Germany, v.128, n.6, p. 507-520, 2007.
- DAS, B. C. *et al.* Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorganic and medicinal chemistry*, v. 22, n. 2, p. 673-83, 2014.
- DAWSON, H.D. *et al.* Regulation of hepatic vitamin A storage in a rat model of controlled vitamin A status during aging. *J Nutri*; v.130, n. 5, p.1280-6, 2000.
- DEFRONZO, R.A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*. v.143, n. 9-21, 2004.
- DELUCA, L.M. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia, *FASEB J*. v.5 , p. 2924–2933, 1991.

DERVEAUX, S.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, v. 50, p.227-230,2010.

DESAGHER, S. and MARTINO, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*v.10, p. 369-76,2000.

DETMER, S.A. and CHAN, D.C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* v. 8, p. 870–879, 2007.

DI MAIS, A. *et al.* Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine, J Endocrine.* v. 41, p. 1-115, 2016.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

EISENBRAND, G. *et al.* Methods for in vitro toxicology. *Food and Chem. Toxicol.*, v. 40, p. 93 – 236, 2002.

FARIAS, E.S. *et al.* Efeito da atividade física programada sobre a composição corporal em escolares adolescentes. *J Pediatr.* v. 85, p. 28-34, 2009.

FARMER, S.R. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* v. 4, n. 4, p. 263-73, 2006.

FELIPE, F. *et al.* Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: Lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1740, p.258–265, 2005.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cells lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.*, v. 160, p. 171-177, 2006.

FREY, S.K. and VOGEL, S. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients.* v. 3, p. 27– 39, 2011.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHALAKHYAN, R.K.; GERASIMOV, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics, Massachusetts, USA*, v.20, n.3, p. 263-272,1987.

FURR, H.C. *et al.* Vitamin A concentrations in liver determined by isotope dilution assay with tetradeuterated vitamin A and by biopsy in generally healthy adult humans. *Am J Clin Nutr.* v. 49, p. 713-716, 1989.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GRONTHOS, S. *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) in vitro and vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*.v. 97, p.13625-30. 2000.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem cells.v. 22, p. 487-500 , 2004.

HERMETO, L.C. *et al.* Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*. v. 15 , p. 3, 2016.

HERMETO, L.C. *et al.* Evaluation of pH effects on genomic integrity in adipose-derived mesenchymal stem cells using the comet assay. *Genet Mol Res*. v. 14,n. 1, p . 339-48,2015.

HEYDARKHAN-HAGVALL ,S. *et al.* Three-dimensional electrospun ECM-based hybrid scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *Biomaterials*. v. 29, n. 19, p . 2907-14, 2008.

IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A. Vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, maganese, molybdenum, nickel, silicone, vanadium, and zinc. 2001.

JEYAKUMAR, S.M.; VAJRESWARI, A.; GIRIDHARAN, N.V. Vitamin A regulates obesity in WNIN/Ob obese rat; independent of stearyl-CoA desaturase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 370, p. 243–247, 2008.

JIANG,Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v. 418, p. 41-9, 2002.

JIANPING, Y. and GIMBLE, J. Regulation of Stem Cell Differentiation in Adipose Tissue by Chronic Inflammation, 2011.

KAC, G. and PÉREZ-ESCAMILLA,R. Nutrition transition and obesity prevention through the life-course. *Int J Obes Suppl*. v.3, p. S6-8, 2013.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*.v.106, n. 4, p. 473-81, 2000.

KAMEI,Y. *et al.* Retinoic acid receptor γ 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. J*. v. 293, p. 807-812, 1993.

KAPLAN, N.M. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med*.v.149, n. 7, p. 1514-20. 1989

KELLY, T. *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030 *International Journal of Obesity*. v.32, p. 1431–1437, 2008.

- KERN, S. *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*. v. 24, n. 5, p. 1294-3001, 2006.
- KINDT TJ, OSBORNE, BA, GOLDSBY, RA. *Kuby Immunology*, 6th edn. New York; W.H. Freeman, 574pp. 2007.
- KLASSEN, H.J. *et al.* Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*v. 45, p. 4167-73, 2004.
- KONG, J. and LI, Y.C. Molecular mechanism of 1,25dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, v. 290, p. 916-924, 2006.
- LABUSCA, L.S. *et al.* Stem cells derived from osteoarthritic knee mesenchymal tissues: a pilot study. *Eur J Orthop Surg Traumatol*. v. 23, p.69-176, 2013.
- LAM, H.S. *et al.* Risk of vitamin A toxicity from candy-like chewable vitamin supplements for children. *Pediatrics* 118: 820-824, 2006.
- LANDI, E.P. caracterização da ativação plaquetária nos concentrados de plaquetas por citometria de fluxo. *Ver. Bras. hematol. Hemoter.* v.25, p.39-46, 2003.
- LI, P. *et al.* Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue II: role of peroxisome proliferator-activated receptor α . *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 289, p. 617–626, 2005.
- LIU, X.; TAO, B.B.; ZHU, Y.C. All-trans retinoic acid inhibits the increases in fibronectin and PAI-1 induced by TGF-beta1 and Ang II in rat mesangial cells. *Acta Pharmacol Sin.* v. 29, p. 1035–41, 2008.
- LOBO, G.P. *et al.* Beta-carotene decreases peroxisome proliferator receptor gamma activity and reduces lipid storage capacity of adipocytes in a beta, beta-carotene oxygenase 1-dependent manner. *J. Biol. Chem*, v. 285, p. 27891–27899, 2010.
- MARIANI, S. *et al.* Sirtuins 1-7 expression in human adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots: influence of obesity and hypoxia. *J Endocrine*. P. 1-9, 2016.
- MARKARIAN, C.F. *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol Lett.* v. 36, n. 4, p. 693-702, 2014.
- MASSUMOTO, C. *et al.* Células-tronco - Da coleta aos protocolos terapêuticos. 1ª Edição. Ed. Atheneu, 2014.
- MAURO, M.O. *et al.* Activity of selenium on cell proliferation, cytotoxicity, and apoptosis and on the expression of CASP9, BCL-XL and APC in intestinal adenocarcinoma cells. *Mutat. Res.*, v. 715, p. 7-12, 2011.

- MCCOY JR JP. Basic principles of flow cytometry. *Hematology Oncol Clin N Am.* v. 16, p. 229-243, 2002.
- MEDINA, C.B. and RAVICHANDRAN, K.S. Do not let death do us part: 'find-me' signals in communication between dying cells and the phagocytes. *Cell Death and Differentiation.* v. 23, p. 979–989, 2016.
- MERCADER, J. *et al.* Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *J Endocrinology,* v. 147, p. 5325-5332, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE - BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde/Departamento de Atenção Básica. Caderno de atenção básica - Obesidade. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2006.
- MIYAGI, A. *et al.* High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. *Nature Nanotechnology .* v. 11, p. 783-790. 2016.
- MOLCHADSKY, A. *et al.* P53 Plays a Role in Mesenchymal Differentiation Programs, in a Cell Fate Dependent Manner.v. 3, p. 11-15, 2008.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; COSTA, R.B.L. Mudanças na composição e adequação nutricional da dieta familiar nas áreas metropolitanas do Brasil. (1988-1996). *Ver Saude Pública.* V. 34, n. 3, 2000.
- MOON, R.C *et al.* The Retinoids, Academic Press, Orlando, FL, Vol. 2, p. 327–37 , 1984.
- MORIKAWA, K. *et al.* All-trans retinoic acid displays multiple effects on the growth, lipogenesis and adipokine gene expression of AML-I preadipocyte cell line. *Cell Biology International,* v. 37, p. 36-46, 2013.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods,* v.65, n. 1-2, p.55-63,1983.
- MURANO, I. *et al.* Dead adipocytes, detected as crown-like structures (CLS), are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res.* v. 49, n. 7, p.1562-8, 2008.
- MURPHY, K.M. *et al.* Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* v. 7. p. 102-11, 2000.
- NOVAIS,C,M. and PIRES-ALVES,M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento,* 33º ed., p.10-13, 2004.
- NOY, N. Between Death and Survival: Retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu. Ver. Nutr.* v. 30, p. 201-217, 2010.

- OLSON, J. Vitamin A. Present Knowledge in Nutrition. The Nutrition Foundation, Washington, DC, p. 176-191. 1993.
- OLSON, J. Vitamin A. Present Knowledge in Nutrition. The Nutrition Foundation, Washington, DC, p. 176-191, 1993.
- PFAHL, M. and CHYTIL, F. Regulation of Metabolism by Retinoic Acid and its Nuclear Receptors. Annual Review of Nutrition . v. 16, p. 257-283 ,1996.
- PLENCHETTE, S. *et al.* Analyzing markers of apoptosis in vitro. Methods Mol. Bio., v.281, p. 313- 331, 2004.
- POINDESSOUS, V. *et al.* Marked activity of irifolven toward human carcinoma cells: Comparison with cisplatin and ecteinascidin. Clinical Cancer Research, v.9, n.7, p. 2817-2825, 2003.
- POPKIN, B.M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. Proc Nutr Soc. v.70, p. 82-91,2011.
- QUADRO, L. *et al.* Understanding the physiological role of retinol-binding protein in a vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. Mols Aspects Medicine, v. 24, p. 421-30, 2003.
- QUEIROZ, J.C.F. Controle da adipogênese por ácidos graxos. Arq Bras Endocrinol Metab. v. 53, p582-594, 2009.
- RIBOT, J. *et al.* Changes of adiposity in response to vitamin a status correlate with changes of ppar gamma 2 expression. Obes Res. V. 9, p. 500-509, 2001.
- RIBOT, J.; FELIPE, F.; BONET, M.L., PALOU, A.: Changes of adiposity in response to vitamin a status correlate with changes of ppar gamma 2 expression. Obes Res. V. 9, p. 500-509, 2001.
- ROSEN, E.D.;MAC DOUGALD, O.M. Adipocyte differentiation from the inside out. Nature Reviews, Molecular Cell Biology. v. 7, p. 885-896, 2006.
- ROSS, A.C. Vitamin A e retinóides. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9.ed. São Paulo: Manole, pp.325-50, 2003.
- ROSS, A.C.; HARRISON, E.H. Vitamin A: Nutricional Aspects of retinoids and Carotenoids. In: ZEMPLINI, J. *et al.* (Ed.). Handbook of vitamins. 5. Ed. [s.l.] Crc Pressp. 1-40, 2013.
- ROVOZZO, G.C. and BURKE, C.N. A manual of basic virological techniques. New Jersey: Prentice Hall, 159p, 1973.
- SALLIS, J.F. *et al.* The role of built environments in physical activity, obesity, and CVD. Circulation. v. 125, p. 729-37, 2012.

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

SEINBURN, B.A. *et al.* Diet, nutrition and the prevention of excess weight gain and obesity. *Public Health Nutr.* v. 7, n. 7, p.123-46, 2004.

SEKI, A. *et al.* Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. *Hepatology*. v. 58 n. 3, p. 1133-42, 2013.

SPALDING, K.L. *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, v. 453, p. 783-787, 2008.

SPANGENBERG, L. *et al.* Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Research*. v. 11, p. 902–912, 2013.

STREM, B.M. *et al.* Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.*v. 54, n. 3, p.132-41, 2005.

TAFTI, M. and GHYSELINCK, N.B. Functional implication of the vitamin A signaling pathway in the brain. *Arch Neurol*. V. 64, p. 1706-1711, 2007.

TANG, X.H.; GUDAS, L.J. Retinoids, Retinoic Acid Receptors, and Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*.v. 6, n. 1, p. 345–364, 2011.

TANUMIHARDJO, S.A. Assessing vitamin A status: past, present and future. *J Nutr* . v.134, p. 290S-293S, 2004.

TAYLOR, S. *et al.* A practical approach to RT- qPCR – Publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, v. 50, p. S1-S5, 2010.

THOMSON, J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. v. 282. n. 5391, p.1145-47,1998.

TICHOPAD, A. *et al.* Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. *Methods*, v.50, p. 308-312, 2010.

TILG, H., MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*.v. 6, n.10, p. 772-83. 2006.

TIMPER, K. *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 24, n. 341, p.1135-40, 2006.

ULUKAYA, E. *et al.* The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicol. In vitro*, v.22, p. 232-239, 2008.

- URT-FILHO, A. *et al.* Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model. *Genet. Mol. Biol.* v. 39, p. 290-299, 2016.
- VALONES, M.A.A. *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. *Braz. J. Microbiol.*, v. 40, p. 1-11, 2009.
- VIEIRA, S. *et al.* Importance of a stable topoisomerase IB clamping for an efficient DNA processing: Effect of the Lys(369)Glu mutation. *Int J Biol Macromol.* v. 81, p. 76-82, 2015.
- WALS, G.M. *et al.* A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J. Immunol. Methods.*, v. 217, p. 153-63, 1998.
- WANG, N.S. *et al.* Transient Expression Of Wild-type or Mitochondrially Targeted Bcl-2 Induces Apoptosis, whereas Transient Expression of Endoplasmic Reticulum-Targeted Bcl-2 Is protective Against Bax-induced Cell Death. *V.* 276, n. 47, p. 44117-444128, 2001.
- WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf
- WINGERT, S. *et al.* DNA-damage response gene GADD45A induces differentiation in hematopoietic stem cells without inhibiting cell cycle or survival *Stem Cells.* v. 34, n. 3, p. 699–710, 2016.
- WU, Z.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B.M. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol.* v. 11, p. 689-94, 1999.
- WYLLIE, A. H. Apoptosis, cell death and cell proliferation. 3^o Ed. Roche Applied Science Manual, 2008.
- XIA, Q. and GRANT, S.F. The genetics of human obesity. *Ann NY Acad Sci.* v. 1281, p. 178-90, 2013.
- ZANNETTINO, A.C. *et al.* Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* v. 214, n. 2, p. 413-21, 2008.
- ZATZ, M. Clonagem e células –tronco. *Estudos avançados, São Paulo,* v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004.
- ZAVAN, B. *et al.* Neural potential of adipose stem cells. *Discov Med.* v. 10, n. 50, p. 37-43, 2010.
- ZHENG, Y.W.; TANIGUCHI, H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin, Liver Dis.* v. 23, p. 337-48, 2003.

ZHUANG, H. *et al.* Molecular Mechanisms of PPAR-gamma Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation, *Current Stem Cell Research and Therapy*. V. 11, p. 255-264, 2016.

ZUTTON, M.S.S.R. *et al.* Adipose Tissue-Derived Stem Cells and the Importance of Animal Model Standardization for Pre-Clinical Trials. *Rev Bras Cardiol Invasiva*. v. 21, n. 3, P. 281-7, 2013.

ZUK, P.A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*.v. 13, p. 4279-95, 2002.

ZUK, P.A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*.v. 7, p. 211-28,2001.