

Lauro Thiago Turaça

**TERAPIA CELULAR NA OBESIDADE MONOGÊNICA
UTILIZANDO MICROESFERAS DE ADIPÓCITOS DERIVADOS
DE CÉLULAS-TRONCO**

Tese apresentada à
Universidade Federal de São
Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

São Paulo
2018

Lauro Thiago Turaça

**TERAPIA CELULAR NA OBESIDADE MONOGÊNICA
UTILIZANDO MICROESFERAS DE ADIPÓCITOS DERIVADOS
DE CÉLULAS-TRONCO**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientador:
Prof. Dr. João Bosco Pesquero

São Paulo
2018

Turaca, Lauro Thiago

Terapia celular na obesidade monogênica utilizando microesferas de adipócitos derivados de células-tronco / Lauro Thiago Turaca. - São Paulo, 2018.

XVI, 89f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular.

Titulo em inglês: Cell therapy in monogenic obesity using adipocyte microspheres derived from stem cells.

1. Obesidade. 2. Terapia Celular. 3. Adipócitos. 4. Leptina. 5. Célula-tronco mesenquimal.

Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina
Departamento de Biofísica
Programa de Biologia Molecular

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo

Coordenadora do Curso do programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular: Profa. Dra. Marimélia Aparecida Porcionatto

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica da Universidade Federal de São Paulo sob apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob processo número 2012/00773-7, da CAPES sob processo número 33009015001PO e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) sob processo número 140038/2012-4.

“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”
(Walter S. Landor)

Primeiramente a Deus e a minha querida família pelo amor. Pai, Mãe, Bruno e Bruna pelo apoio durante toda minha formação. Especialmente à minha esposa Daniele pelos 7 anos de companheirismo, apoio e paciência. Aos meus avós pelo exemplo de vida que me proporcionaram.

Ao professor Dr. João Bosco Pesquero por toda ajuda e ensino, que de forma inteligente e amigável, contribuiu grandemente com minha formação.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ronaldo de Carvalho Araújo, pela ajuda, durante minha graduação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen e seu aluno Danilo pelo auxílio na obtenção de células-tronco.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger pelos ensinamentos científicos tecnológicos nessa nova fase da minha vida.

Ao Dr. Alessandro Guimarães pelos ensinamentos em biologia molecular.

Ao Prof. Roger Chammas e especialmente sua técnica Mara de Souza Junqueira pelo auxílio com os animais e todo sistema de tracking *in vivo*.

Aos amigos do INCOR Dra. Élide e Dr. Rafael pelo companheirismo, ajuda técnica e intelectual

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger e a todos os colegas do seu laboratório pelo conhecimento adquirido.

A todos colegas do laboratório do Prof. Dr. João B. Pesquero e Ronaldo C. Araújo pela ajuda nos 12 anos em que estive ali trabalhando

(Ana Camila, Bob, Caio, Camila, Douglas,

Édson, Eduardo, Elton, Fabiana, Felipe, Gabriel, João D., Juliana, Paola, Patrícia, Rafael, Raphael, Regiane, Renan, Rodrigo, Sandro, Valéria).

Aos colegas do laboratório de animais transgênicos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo e à professora Cláudia de Oliveira e Tadeu pela ajuda no fornecimento de animais.

Ao Departamento de Biofísica, seus professores e funcionários, pelo convívio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, seus funcionários e professores, especialmente os do curso de biomedicina, pela excelente formação.

À Bio 40, por 12 anos de amizades que ainda permanece.

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às instituições de fomento FAPESP, CNPq e CAPES, pelo auxílio financeiro durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	A Obesidade e suas implicações na saúde mundial	2
1.2	Genética molecular da obesidade humana.....	3
1.3	Obesidade monogênica e o papel da leptina no balanço energético	4
1.4	Outras doenças monogênicas ligadas ao tecido adiposo	6
1.5	Terapia celular com células-tronco	7
1.6	Células-tronco do tecido adiposo (ASC) e 3T3-L1 como fonte de adipócitos	10
1.7	Camundongos ob/ob como modelo animal.....	12
1.8	Bioengenharia tecidual	14
1.9	Tecido adiposo branco como tecido receptor.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	Objetivo geral.....	18
2.2	Objetivos específicos	18
2.2.1	Obter ASCs do tecido adiposo de camundongos selvagens C57BL/6J	18
2.2.2	Selecionar ASCs por aderência ao plástico.....	18
2.2.3	Caracterizar ASCs por citometria de fluxo e adipogênese.....	18
2.2.4	Construir e padronizar estruturas celulares em formatos esféricos 3D.....	18
2.2.5	Verificar marcadores de adipócitos após diferenciação de ASCs e 3T3-L1.....	18
2.2.6	Injetar AD-ASCs e AD-3T3 isolados ou em microesferas em animais ob/ob	18
2.2.7	Verificar retenção de células e microesferas in vivo.....	18
2.2.8	Avaliar o peso e leptina circulante pós-transplante.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Animais de experimentação	20
3.2	Obtenção de células-tronco do tecido adiposo (ASC)	20
3.3	Caracterização de ASCs por citometria de fluxo	21
3.4	Adipogênese de ASCs e 3T3-L1	22
3.5	Coloração em Oil Red.....	23
3.6	Transdução de 3T3-L1 com lentivirus-luciferase	23
3.7	Construção e padronização de microesferas 3D.....	25
3.8	Verificação molecular de AD-ASC por RT-PCR.....	28
3.9	Injeção e rastreamento de células isoladas.....	29
3.10	Injeção e rastreamento de microesferas	30

3.11	Avaliação do peso dos animais ob/ob pós tratamento	31
3.12	Avaliação de leptina in vivo pós transplante	32
4	RESULTADOS	34
4.1	Caracterização da cultura de ASCs por citometria de fluxo	34
4.2	Capacidade adipogênica de 3T3-L1 e ASC.....	36
4.3	Formação de microesferas de AD-ASC e AD-3T3	39
4.4	Teste de conformação após passagem pelo bisel	41
4.5	Verificação adipogênica em microesferas por Oil Red	42
4.6	Expressão de marcadores moleculares na diferenciação de esferas	43
4.7	Transdução de células 3T3-L1 com lentivirus carreando gene luciferase.....	44
4.8	Rastreamento de células e microesferas de AD-3T3 pós terapia	46
4.9	Retenção de células e microesferas de ASCs em animais ob/ob	48
4.10	Terapia Celular com microesferas de AD-ASC em animais ob/ob	49
4.10.1	Avaliação do peso relativo e bruto após terapia celular	49
4.10.2	Avaliação de Leptina in vivo pós terapia celular.....	52
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	62
7	REFERÊNCIAS.....	64

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem do esquema de cultivo celular para adipogênese de ASCs e 3T3-L1.

Figura 2: Imagem do mapa do vetor viral utilizado na linhagem 3T3-L1 para rastreamento *in vivo*.

Figura 3: Imagens da tecnologia para fabricação de microesferas.

Figura 4: Gráficos de caracterização do pool celular por detecção de anticorpos específicos de ASCs e células hematopoiéticas por citometria de fluxo.

Figura 5: Gráfico de marcadores de superfície celular expresso em ASCs, e células de origem hematopoiética,

Figura 6: Imagem de vacúolos citoplasmáticos presentes na cultura de ASCs visualizados a partir do dia 6 durante os 12 dias analisados. Células ASC em meio de indução adipogênico, Coloração com Oil Red, indica em vermelho vacúolos lipídicos.

Figura 7: Imagens da linhagem 3T3-L1 e ASC durante o processo de adipogênese durante 8 dias após cultivo em meio de indução.

Figura 8: Imagem de teste de correlações de células x tamanho da esfera.

Figura 9: Gráfico de correlação de número de células x tamanho da esfera.

Figura 10: Teste de resistência das microesferas após passagem pelo bisel.

Figura 11: Marcação com Oil Red das microesferas após processo de adipogênese.

Figura 12: marcadores de expressão adipogênica após processo de diferenciação em células ASC

Figura 13: Gráfico do fluxo total de luz capturado pelo equipamento IVIS Sprectrum em amostras transduzidas.

Figura 14: Animais pós injeção com AD-3T3 carreando gene da luciferase.

Imagem 15: Comparativo de retenção de células isoladas e microesferas de ASCs na região inguinal de animais ob/ob.

Figura 16: Comparativo de retenção de células isoladas e microesferas de ASCs no dorso de animais ob/ob após 8 dias.

Figura 17: Gráficos da alterações de peso pós terapia celular com microesferas e células isoladas.

Figura 18: Correlação entre leptina circulante em animais ob/ob e variação de peso relativo ao inicial (A – após 63 dias do transplante. B - após 98 dias do transplante).

Figura 19: Comparativo Resultado de Pelleymounter, et al pós tratamento com leptina exógena com terapia celular de AD-ASC em microesferas e células isoladas.

Figura 20: Comparativo de peso entre terapia celular de AD-ASC (isoladas e microesferas) com leptina exógena (5mg/Kg/dia) de Jeffrey L. Halaas et al.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores fornecidos pelo fabricante do tamanho de esferas por número de células.

Tabela 2: Primers utilizados na verificação de marcadores moleculares de expressão genica no processo de adipogênese de ASCs.

Tabela 3: Quantidades de células ASCs que devem ser semeadas em cada molde (scaffold).

LISTA DE ABREVIATÖES

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico

AD-ASC - Adipócitos derivados de células-tronco do tecido adiposo

AD-3T3 - Adipócitos derivados de células 3T3-L1

AHO - Osteodistrofia Hereditária de Albright

aP2 - adipocyte Protein 2

ASC – *Adipose Stem Cell* (Célula tronco do tecido adiposo)

BMSC – *Bone marrow stem cell*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

C/EBP α - *CCAAT-enhancer-binding proteins*

DAC - doença arterial coronariana

ESC - *Embryonic Stem Cell*

Fabp4 - *fatty acid binding protein 4*

FDA - *Food and Drug Administration*

FTO - Fat mass and obesity associated

GWAS - Genome-wide association

HLA - antígenos leucocitários humanos

IBMX - 3-isobutil-1-metilxantina

IMC - índice de massa corporal

iPSC - *Induced pluripotent stem cells*

MC4R - *Melanocortin 4 receptor*

IRM - Imagem por ressonância magnética

MSC - *Mesenchymal stem cell*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - *Phosphate buffered saline*

PC1 - *Proprotein convertase 1*

PCR – *Polymerase chain reaction* ou Reação em cadeia da polimerase

POMC - *Pró-opiomelanocortin*

PPAR γ - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*

RT-PCR – Transcrição reversa – Reação em cadeia da polimerase

SH2B1 - *Src homology 2 B adaptor protein 1*

SIM1 - *Single-minded homolog 1*

Slc2a4 - *Solute carrier family 2*

SNP - *Single nucleotide polymorphism*

TAB – Tecido adiposo branco

UCSC - *Umbilical cord stem cell*

RESUMO

A obesidade monogênica é definida como a obesidade resultante da mutação ou deficiência de um único gene. Os casos são raros, muito graves, geralmente de início precoce e são encontrados na infância. Estes tipos de obesidade estão ligados geralmente ao excesso de ingestão de alimentos, alteração no gasto energético e adipogênese. Mutações graves no gene da leptina, uma adipocina ligada ao controle da ingestão alimentar, gera um tipo de obesidade mórbida com altas taxas de infecção e mortalidade infantil. Alguns estudos mostraram os efeitos dramáticos e benéficos do uso diário de injeções subcutâneas de leptina para redução do peso corporal. Outros estudos têm-se voltado para estratégias que combinam a utilização de células-tronco com tecnologias de engenharia de tecidos a fim de atuar como um mecanismo de reposição. Neste trabalho foram utilizadas células-tronco do tecido adiposo submetidas à adipogênese (AD-ASC) a fim de verificar a reversão da obesidade em camundongos ob/ob. Esses animais são obesos devido a uma mutação pontual no gene da leptina e foram transplantados com AD-ASC em formato de microesféricas. As microesferas desenvolvidas possuem um diâmetro de 250µm e mostraram uma maior capacidade de retenção no local transplantado quando comparado com células isoladas. Os resultados mostram que uma única dose de 530 microesferas foi capaz de reduzir o peso dos animais após aproximadamente 100 dias. Em aproximadamente dois meses, somente o grupo que recebeu microesferas de AD-ASC possuía leptina circulante (75% dos animais). Após três meses o peso dos animais que receberam microesferas reduziu 14,7% em relação ao peso inicial e 27,5% em relação ao peso do grupo controle. Por outro lado, o grupo células isoladas aumentou o peso em 4,8% em relação ao inicial e diminuição 8,0% em relação ao controle. Os resultados indicam uma proposta de terapia celular, em formato de microesferas, que poderão resultar na reversão da obesidade mórbida ou até mesmo sobre outros tipos de doenças monogênicas.

ABSTRACT

Monogenic obesity is defined as obesity resulting from the mutation or deficiency of a single gene. The cases are rare, very serious, usually of early onset and are found in childhood. These types of obesity are usually linked to excess food intake, altered energy expenditure and adipogenesis. Severe mutations in the leptin gene, an adipokine linked to the control of food intake, generate a type of morbid obesity with high infection rates and infant mortality. Some studies have shown the dramatic and beneficial effects of daily use of subcutaneous injections of leptin to reduce body weight. Other studies have focused on strategies that combine the use of stem cells with tissue engineering technologies in order to act as a mechanism for replacing this molecule. In this study adipose tissue cells submitted to adipogenesis (AD-ASC) were used to verify the reversal of obesity in ob / ob mice. These animals are obese due to a point mutation in the leptin gene and were transplanted with AD-ASC in microspheres format. The developed microspheres have a diameter of 250µm and showed a higher retention capacity at the transplanted site when compared to isolated cells. The results show that a single dose of 530 microspheres was able to reduce the weight of the animals after approximately 100 days. In approximately two months, only the group that received AD-ASC microspheres had circulating leptin (75% of the animals). After three months the weight of the animals receiving microspheres reduced 14.7% in relation to the initial weight and 27.5% in relation to the weight of the control group. On the other hand, the group isolated cells increased the weight by 4.8% in relation to the initial one and decreased 8.0% in relation to the control. The results indicate a proposed microsphere-shaped cell therapy that may result in the reversal of morbid obesity or even other types of monogenic diseases.

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 A Obesidade e suas implicações na saúde mundial

A obesidade é caracterizada por um excesso de gorduras corporais e é considerada uma desordem multifatorial. Estudos recentes demonstram que essa desordem sempre esteve em uma maior prevalência em países desenvolvidos, entretanto um aumento drástico, vem sendo observado em países em desenvolvimento (1). Esse aumento poderá levar a um número de 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 1,12 bilhão de indivíduos obesos, ou 38% e 20% dos adultos do mundo até 2030 (2).

Diversos estudos mostram que pacientes com índice de massa corpórea (IMC) elevado apresentam maior risco de morte e de desenvolvimento de doenças crônicas, como diabetes do tipo II (3), hipertensão (4), doenças cardiovasculares (5, 6), aterosclerose (3) e alguns cânceres (7-9).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico, passou-se a utilizar o termo “síndrome metabólica” para agrupar indivíduos que apresentavam obesidade e dois ou mais desses sintomas associados (10). Informações segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a cada dez pacientes diabéticos 9 são obesos ou apresentam sobrepeso (www.who.int).

1.2 Genética molecular da obesidade humana

Os mecanismos moleculares e celulares que correlacionam as diversas patologias associadas à síndrome metabólica são muito estudados. Aparentemente uma gama de fatores contribui para o desenvolvimento desta síndrome, o que a torna complexa e heterogênea, e dificulta seu estudo, diagnóstico e tratamento.

Nas últimas duas décadas, várias estratégias têm sido empregadas para a identificação de determinantes da obesidade. Dentre eles estão formas severas da obesidade, Genome-wide association (GWAS) e análises de genes candidatos. Dentre os achados podemos numerar cerca de 127 sítios no genoma humano ligados com o desenvolvimento da obesidade (11).

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e modelos animais sugerem variantes únicas que podem estar associadas à obesidade. Nesta perspectiva, diversos SNPs são utilizados como um biomarcador potencial para identificar efeitos deletérios e neutros na função proteica, elucidando dessa forma, interferências bem-sucedidas de tratamento (12).

Um exemplo desses polimorfismos de base única está localizada dentro do gene *Fat mass and obesity associated* (FTO) que demonstrou estar associado a um aumento de 1 a 1,5 kg peso corporal e um aumento de 20-30% no risco de obesidade (13).

Em um outro estudo recente na população chinesa, Wang et al. mostraram uma associação de 56 variantes e seus impactos na distribuição de gorduras (subcutânea e visceral) de indivíduos obesos pela técnica de imagem por ressonância magnética (IRM) (14).

A genética da obesidade tem duas formas, isto é, sindrômica e não-sindrômica. Dentro da forma sindrômica, os aspectos moleculares estão ligados ou a fatores pleiotropicos ou a rearranjos cromossômicos. Nas formas não sindrômicas estão as alterações encontradas em um único gene (monogênico) ou em diversos genes (poligênico). Algumas síndromes como Síndrome de Prader-Willi, síndrome do X frágil, deficiência de Single-minded homolog 1 (SIM1), síndrome de Bardet-Biedl, Síndrome de Cohen e Osteodistrofia Hereditária de Albright (AHO) estão associadas à obesidade com atraso no desenvolvimento. Além disso, a síndrome de Alstrom, deficiência de leptina congênita, deficiência do receptor de leptina, deficiência de Pró-opiomelanocortin (POMC), deficiência de *Proprotein convertase 1* (PC1), deficiência de Melanocortin 4 receptor (MC4R) e a deficiência de Src homology 2 B adaptor protein 1 (SH2B1) estão associados à obesidade sem atraso no desenvolvimento (15). A partir de então, a identificação de uma causa genética da obesidade pode ser útil para aconselhamento e para identificação do tratamento mais ideal.

1.3 Obesidade monogênica e o papel da leptina no balanço energético

A obesidade monogênica é definida como a obesidade resultante da mutação ou deficiência de um único gene. Os casos são raros, muito graves, geralmente de início precoce e são encontrados na infância. Estes tipos de obesidade estão ligados geralmente ao excesso de ingestão de alimentos, alteração no gasto energético e adipogênese. Por exemplo, a mutação no gene POMC gera um tipo de obesidade monogênica. Esse gene expressa uma

proteína capaz de inibir o apetite já que produz alpha-, beta- e gama-MSH e ACTH controlados através de MC3R e MC4R. Defeitos no gene POMC em crianças obesas desde o nascimento pode corresponder a uma deficiência aguda do córtex adrenal. (16).

Um outro exemplo foi mostrado em um estudo onde a adipocina denominada leptina foi associada a dois indivíduos gravemente obesos e consanguíneos de uma família paquistanesa (17). Ambos eram homozigotos com mutação *frameshift* no gene Ob (G133) gerando uma proteína truncada e sem níveis detectáveis de leptina sérica. Uma outra família turca porém com uma mutação missense (18) apresentou obesidade, hipogonadismo e hiperfagia intensa (19, 20).

Altas taxas de infecção e mortalidade infantil também podem ser observadas (20) devido a deficiência de leptina na fase infantil que ocasiona anormalidades em células T (21).

Vale ressaltar as diferenças entre camundongos e humanos quando se trata de leptina. Por exemplo, camundongos ob/ob têm níveis muito elevados de corticosterona (22) e desenvolvem raquitismo (23), efeitos que não são observados em humanos (21, 24).

A contribuição de gasto energético reduzido para a obesidade em camundongos ob/ob é conhecida (25), enquanto em humanos não se observa mudanças detectáveis (21).

Alguns estudos mostraram os efeitos dramáticos e benéficos do uso diário de injeções subcutâneas de leptina para redução do peso corporal e da massa gorda em três crianças com deficiência congênita de leptina (21). Todas as crianças tiveram normalização do apetite, progressão normal da puberdade com

doses iniciais de leptina de somente 0,01 mg/kg, ou seja, 10% dos níveis normais de leptina sérica. No estudo, um menino de 3 anos de idade e 42 kg, após 48 meses de tratamento passou a pesar 32 kg (16).

Vale ressaltar que em humanos existem períodos refratários que ocorrem durante a terapia. Isso ocorre quando o indivíduo produz leptina truncada e nesse caso a leptina exógena age também como um antígeno levando a hipótese que deficiência da leptina é um estado imunodeficiente (26, 27). Isso porque o sistema imunológico reconhece a leptina exógena como um antígeno já que durante o desenvolvimento do organismo a tolerância ao autoantígeno é realizada sobre o peptídeo truncado e não sobre a leptina normal. Assim nesse estudo, o efeito antileptina foi observado após 6 semanas de terapia o que interferiu na interpretação dos níveis séricos (21).

1.4 Outras doenças monogênicas ligadas ao tecido adiposo

Sabe-se que os adipócitos, por sua capacidade secretória, interagem com diversos tecidos através de uma variedade de adipocinas com propriedades importantes. Assim como a leptina, e dentre eles podemos citar também a adiponectina. Esta proteína é específica de adipócitos (28) com propriedades antiaterogênicas e antidiabéticas e seus níveis plasmáticos são diretamente ligados ao desenvolvimento da doença arterial coronariana (DAC) e diabetes tipo 2 (29). Vale ressaltar que a DAC é uma das principais causas de mortalidade nos países industrializados.

Outras doenças também são conhecidas por deficiências de genes expressos no tecido adiposo como por exemplo: baixos níveis de estrógeno

devido a alterações no gene P450arom (aromatase P450) (30), suscetibilidade a diabetes tipo 1 devido a alterações no gene TNF- α (31), IL-6: artrite crônica juvenil de início sistêmico (32), hiperandrogenismo (33), diabetes tipo 1 (34), diabetes tipo 2 (35, 36), obesidade (37), hemorragia intracraniana em pacientes portadores de malformação arteriovenosa cerebral (38, 39). Dessa forma, a proposta de uma terapia celular com adipócitos derivados de células-tronco com ação sobre a reposição da leptina circulante poderá abrir perspectivas para testes como modelos de animais nocautes de tais adipocinas.

1.5 Terapia celular com células-tronco

As células-tronco são células que têm a capacidade de se auto renovar ao se dividirem e se desenvolverem em células especializadas, mais maduras. As células-tronco podem ser unipotentes, multipotentes, pluripotentes ou totipotentes, dependendo do número de tipos de células às quais elas podem dar origem. As terapias com essas células são um tipo de terapia celular na qual as células utilizadas são células-tronco (como no caso do transplante de medula óssea) ou derivadas delas.

As células-tronco embrionárias, por exemplo, são chamadas de pluripotentes, pois têm a capacidade de se transformar em qualquer tipo de célula adulta. Já as células-tronco adultas, chamadas de multipotentes, são menos versáteis, mas têm capacidade de se dividir e gerar tanto uma nova célula idêntica e com o mesmo potencial, como outra diferenciada. Essas células são as responsáveis pela renovação das nossas células ao longo da vida e podem

ser obtidas de diversas fontes como medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical, entre outros tecidos.

As células utilizadas principalmente para terapias avançadas são as células-tronco conhecidas na literatura científica principalmente como: célula-tronco embrionária (*Embryonic Stem Cell - ESC*), célula-tronco mesenquimal (*mesenchymal stem cell - MSC*), célula-tronco do cordão umbilical (*umbilical cord stem cell - UCSC*), célula-tronco da medula óssea (*bone marrow stem cell - BMSC*), célula-tronco do tecido adiposo (*adipose stem cell - ACS*) e célula-tronco pluripotente induzida (*Induced pluripotent stem cells - iPSC*) (40) devido a sua capacidade em se diferenciarem em células específicas necessárias para a reparação de tecidos ou células (danificadas ou defeituosas)(41). As células mesenquimais por sua vez, obtidas tanto do tecido adiposo como da medula óssea, apresentam um grande potencial em terapias, já que possui baixa imunogenicidade além de propriedades imunomodulatórias. Tais características se dão pela ausência de moléculas de MHC de classe II e inibição da proliferação de células T (42-44).

As atuais abordagens das terapias celulares com células-tronco são fundamentadas em tecnologias de engenharia de tecidos que combinam os princípios de transplante de células, ciência de materiais e microengenharia para o desenvolvimento de organoides. Tais tecnologias podem ser usadas para restauração fisiológica de organismos ou órgãos danificados.

Diversos grupos têm se voltado para a obtenção de células capazes de reverter condições patológicas, dentre elas as ocasionadas por problemas genéticos. (45, 46). Um exemplo bem conhecido são os protocolos de terapia celular em modelos de diabetes tipo I (47).

A terapia celular para diabetes baseia-se no transplante de ilhotas na veia porta do fígado e resulta em uma homeostase melhorada da glicose, mas a função do enxerto é gradualmente perdida em poucos anos após o transplante (48, 49). Doenças hepáticas (congenitas, agudas ou crônicas) podem ser tratadas pelo transplante de hepatócitos, uma técnica em desenvolvimento e com significativas desvantagens derivadas de dificuldades na cultura e manutenção de hepatócitos. Pesquisas mostram que o futuro aqui parece estar no implante de células-tronco hepáticas, ou no implante de células hepáticas obtidas pela diferenciação de um tipo diferente de célula-tronco, como as células-tronco mesenquimais (50).

Outras aplicações incluem o tratamento de doenças monogênicas hereditárias, como a hemofilia, utilizando células endoteliais sinusoidais hepáticas (51) ou iPSCs murinas obtidas por diferenciação de fibroblastos em células endoteliais ou seus precursores (52). A hemofilia é um bom modelo para estes testes por ser uma doença monogênica e necessitar de níveis de expressão baixos a moderados do fator de coagulação para atingir um fenótipo moderado da doença. Grandes progressos estão sendo feitos tanto na terapia gênica quanto na terapia celular usando vetores virais e não-virais. Liras et al. por exemplo, relataram resultados preliminares encorajadores usando vetores e células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ASC) humano adulto.(53, 54)

Em uma linha de raciocínio semelhante, neste trabalho foram utilizadas ASCs submetidas à adipogênese (AD-ASC) a fim de verificar a reversão da obesidade em camundongos ob/ob. Esses animais que são obesos devido a

uma mutação pontual no gene da leptina, foram transplantados com AD-ASCs isoladas ou em microestruturas esféricas.

1.6 Células-tronco do tecido adiposo (ASC) e 3T3-L1 como fonte de adipócitos

A medula óssea é a principal fonte de células-tronco mesenquimais (CTM) utilizadas nos estudos atualmente, entretanto, sua coleta é por perfuração óssea causando intenso desconforto para o paciente e riscos de complicações como infecções, por exemplo. Por outro lado, o tecido adiposo tem como principais vantagens o fácil acesso via lipoaspiração e necessidade somente de anestesia local (55).

Para a engenharia de tecidos, o tecido adiposo também é uma boa opção em relação ao rendimento na obtenção da linhagem mesenquimal (56) já que a partir da mesma quantidade de tecido ele pode proporcionar 500 vezes mais CTM do que a medula óssea (57). Em uma medula adulta há um rendimento de 1:50.000 a 1:100.000 células, o que corresponde a um rendimento de algumas centenas de CMTs por mililitro de medula. Já o tecido adiposo produz uma população de células na frequência da ordem de 1 em 100 - cerca de 500 vezes mais do que o encontrado na medula óssea (58).

O tecido adiposo é bem vascularizado com ASCs aderidas em vasos sanguíneos (59). Sua composição principal são adipócitos maduros envoltos por estroma, composto de vasos sanguíneos, fibroblastos, leucócitos, macrófagos e pré-adipócitos (60).

Devido a sua fácil manipulação *in vitro*, fácil obtenção, baixo risco cirúrgico, grande quantidade, segurança, fácil cultivo e baixo custo operacional, a utilização de ASCs é uma estratégia com grande potencial para aplicações clínicas.

Uma opção de cultura direta de adipócitos neste trabalho foi descartada por questões como: expansão, formação de microesferas, cultura em suspensão e dificuldade de cultivo. Além disso, em estratégias de transdução viral ou transfecção a utilização de adipócitos é limitante. Isso porque em ambas estratégias são necessárias diversas passagens e expansão para seleção dos clones que incorporaram o DNA exógeno. Essas estratégias têm sido amplamente utilizadas em estudos de terapias celulares *ex vivo* (61-63). Os protocolos de diversos estudos já têm demonstrado certa eficácia e bons perfis de segurança em estudos de áreas como: doença de Parkinson, diabetes, infarto do miocárdio, lesão da medula espinal, entre outros (64-66).

ASCs podem servir como agentes terapêuticos, por si só, ou como fontes de células especializadas. Além disso, podem carrear genes como veículos de terapia gênica (67, 68) e sob estímulos adequados, podem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e miócitos (69-74).

Vale ressaltar que ASC de roedores iniciam algumas alterações em suas propriedades de senescência e apresentam algumas aberrações nucleares após algumas passagens (75). Por outro lado, ASC humanas podem ser cultivadas *in vitro* por longos períodos de tempo (76). Devido a essa característica das ASCs de roedores somado ao fato da dificuldade de transdução dessas células, utilizamos as células 3T3-L1 para o rastreamento celular *in vivo*. Essas células são imortalizadas e adquiridas comercialmente. Elas têm a capacidade de se

diferenciar em adipócitos e são facilmente transduzidas e selecionadas com antibióticos. Após a transdução com lentivírus carregando gene da luciferase é possível rastreá-las nos animais receptores através da quebra da luciferina injetadas nesses animais. As luciferases são enzimas que catalisam reações biológicas transformando energia química em energia luminosa, e dessa forma captado pelo equipamento. Vale lembrar que tal reação só ocorre se a célula transduzida estiver viva, já que a reação necessita de adenosina trifosfato para que ocorra.

1.7 Camundongos ob/ob como modelo animal

Com o intuito de esclarecer as mais diversas vias metabólicas relacionadas ao balanço energético e a homeostase glicêmica e assim buscar compostos que tenham como função combater a obesidade e suas patologias associadas, os pesquisadores lançam mão de inúmeras estratégias. A utilização de modelos de animais transgênicos ou com alguma alteração molecular espontânea é uma das estratégias mais usadas para a avaliação da função de uma via ou de um de seus componentes. Esses modelos fornecem aos pesquisadores informações relevantes sobre as consequências biológicas de alterações moleculares em um organismo próximo ao humano.

Desse modo, a utilização do camundongo ob/ob (77), que possui uma mutação espontânea no gene da leptina (77, 78), nos permite estudar animais que não produzem essa adipocina e, portanto, são obesos. A leptina tem a estrutura de uma citocina helicoidal de cadeia longa (79) e é expresso no tecido adiposo em proporção ao tamanho dos adipócitos (80, 81). Muitos

investigadores mostraram que a administração diária de leptina a camundongos ob/ob reduz a ingestão de alimentos e o peso corporal (82-84). A supressão da ingestão de alimentos pela leptina é mediada por uma variante de um receptor hipotalâmico, que possui um domínio intracelular longo (85). A leptina tem uma meia-vida circulante de aproximadamente 30 min, é liberada de maneira pulsátil do tecido adiposo e demonstra um ritmo circadiano em níveis circulantes com uma elevação na concentração no período noturno (86, 87).

Esses camundongos chegam a pesar até três vezes mais que o normal, são hiperfágicos, particularmente em idades jovens, desenvolvem grave resistência à insulina, são hipometabólicos, hipotérmicos e subférteis (88-90).

Em termos de frequência de terapia estudos mostram que são necessários de 10 a 80 µg por dia de leptina exógena para se observar o efeito de reversão da obesidade. Em estudos, feitos de 1 a 2 semanas, foram observados uma redução de até 11% do peso corporal, sendo que os animais voltaram a ganhar peso assim que o tratamento foi interrompido (91, 92).

Em termos de aplicações em humanos a diminuição da frequência que um indivíduo teria que se submeter a infusão de moléculas ao substituir a terapia celular também é um ponto positivo que deve ser levantado. Assim as perspectivas são que as técnicas propostas possam ser adaptadas em tratamentos com ação terapêutica na ausência de determinadas moléculas.

Pelo fato de a administração de leptina exógena reverter a obesidade em animais ob/ob, a ideia de implantar células contendo o gene dessa adipocina poderá fornecer resultados visíveis e de fácil mensuração sobre a eficiência da terapia na reversão de fenótipo de uma doença monogênica. Assim, é possível explorar as propriedades das estratégias de terapia celular combinada com a

engenharia de tecidos no âmbito de expressar o gene da leptina por tempo suficiente até que se reverta ou não haja progressão do quadro clínico da obesidade.

1.8 Bioengenharia tecidual

No âmbito da bioengenharia tecidual, a necessidade de estratégias terapêuticas com eficácia clínica, tem envolvido o estudo de células com potencial terapêutico em sinergia com por exemplo moléculas, matrizes coadjuvantes ou até estruturas que favoreçam a retenção dessas células, aumentando assim o período terapêutico.

Diante das diversas ferramentas disponíveis utilizamos moldes da empresa Sigma que permitem o cultivo de células em formatos de microesferas sem o contato com o plástico. Nessas superfícies não aderentes dispostas em formatos esféricos, ASCs possuem propriedades de inicialmente se agregarem e depois se compactarem em esferas (93, 94). A montagem de ASC em estruturas tridimensionais altera suas propriedades, incluindo a secreção aumentada de fatores que medeiam respostas inflamatórias e imunológicas (95). Diversos outros efeitos importantes têm sido verificados neste tipo de cultura 3D (96-99). Outros estudos indicam até a possibilidade da cultura dessas microesferas serem feitas de forma monoclonal e sem a necessidade de soro, trazendo um grande passo para a aplicação clínica (100).

Para verificação de uma melhor retenção das microesferas utilizamos um gene repórter presente em um sistema lentiviral. O sistema foi utilizado em uma linhagem imortalizada denominada 3T3-L1 capaz de sofrer diversas passagens

durante o processo de seleção pós transdução. Tais células foram selecionadas pelo seu fácil cultivo, mesmo *background* dos animais ob/ob (*mus musculus*) e capacidade adipogênica. Além disso, assim como as ASCs, também formaram microesferas nos tamanhos desejados. 3T3-L1 é uma linhagem celular imortalizada derivada de células 3T3 (de camundongo), utilizada em pesquisas com tecido adiposo. As células 3T3-L1 têm uma morfologia semelhante à de fibroblastos, mas quando submetidas a um meio de diferenciação adipogênico, essas células acumulam triglicerídeos e se convertem em células adiposas (101).

Para que as microesferas de 3T3-L1 e ASC passassem a expressar leptina, ambas linhagens foram previamente cultivadas em monocamada para que recebessem um *start* adipogênico (AD-3T3 e AD-ASC, respectivamente). Depois de 6 dias sob estímulos adipogênicos foram formadas as microesferas e injetadas após 2 dias de sua formação.

1.9 Tecido adiposo branco como tecido receptor

Um ponto importante é a escolha do local receptor das células transplantadas. O efeito esperado é que nesse ambiente ocorra pouca migração celular para que o sistema de *delivery* realize a reposição enzimática pelo maior tempo possível. Dessa forma, foi excluída a opção intravenosa, já que uma proporção considerável das células injetadas são retidas nos pulmões (102-105), fígado e baço (102) e tecidos lesados (106). Dessa forma, optamos pelo próprio tecido adiposo branco, já que por sua consistência acreditamos que este tecido poderia fornecer maior aderência, além de já atuar como órgão

produtor leptina. Assim foram estabelecidos dois locais ricos em tecido adiposo branco em animais ob/ob: regiões subcutâneas inguinal e dorsal.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Validar uma terapia celular para o tratamento da obesidade mórbida dependente de leptina, utilizando AD-ASC e AD-3T3 isoladas ou em microesferas.

2.2 *Objetivos específicos*

2.2.1 *Obter ASCs do tecido adiposo de camundongos selvagens C57BL/6J*

2.2.2 *Selecionar ASCs por aderência ao plástico*

2.2.3 *Caracterizar ASCs por citometria de fluxo e adipogênese*

2.2.4 *Construir e padronizar estruturas celulares em formatos esféricos 3D*

2.2.5 *Verificar marcadores de adipócitos após diferenciação de ASCs e 3T3-L1*

2.2.6 *Injetar AD-ASCs e AD-3T3 isolados ou em microesferas em animais ob/ob*

2.2.7 *Verificar retenção de células e microesferas in vivo*

2.2.8 *Avaliar o peso e leptina circulante pós-transplante*

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Animais de experimentação*

Os camundongos usados neste estudo foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para a Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo e foram mantidos a 22 ± 2 °C, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais utilizados foram da linhagem C57bl/6J e ob/ob, machos de 12 a 20 semanas (peso de 23-30 g para C57BL/6J e 35-65 g para ob/ob). A linhagem C57bl/6J foi utilizada como doadora de tecido adiposo branco para extração de ASCs. A linhagem ob/ob foi receptora dos transplantes celulares.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do National Institute of Health (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington DC, 1996) e aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de São Paulo (CEP 2165/08).

3.2 *Obtenção de células-tronco do tecido adiposo (ASC)*

Para seleção de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC - *Adipose derived stem cells*), foi utilizado tecido adiposo branco (TAB) da região epididimal de camundongos C57BL/6J, do qual foram retirados de 0,8 a 2g de tecido. O tecido foi triturado com tesoura e auxílio de uma pinça. Em seguida, foram adicionados 15 mL de solução collagenase tipo IA (C989 - Sigma) a 20mg/ml e

(Bovine Serum Albumine) BSA. A amostra foi colocada no agitador a 37° C por exatamente 45 minutos, seguida de centrifugação a 300g por 5 minutos à 20°C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspendido em 20 mL de meio de cultura D-MEM low glucose (Gibco®) com 10% de soro bovino fetal (Gibco®) e 1% de penicilina/streptomicina. O *pellet* foi desfeito por pipetagem com pipeta sorológica, as células foram plaqueadas na quantidade de 2g de tecido inicial para cada placa P100, incubadas em estufa à 37°C, 5% CO₂ e umidade de 95%. Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi trocado e a partir daí as trocas passaram a ser feitas a cada 2 ou 3 dias.

3.3 Caracterização de ASCs por citometria de fluxo

Para caracterização das ASCs foi verificada a expressão de determinados marcadores de superfície celular. Para isso as células foram lavadas com Tampão fosfato-salino (PBS) 1x e submetidas a uma solução de tripsina (Gibco) durante 5 minutos a 37°C. O tratamento com a solução de tripsina foi interrompido adicionando-se 2x meio de cultura suplementado com 10% de FBS. As células foram coletadas desta solução por centrifugação a 400g por 5 minutos. O sedimentado de células foi ressuspendido em 1 mL de PBS em uma concentração de $0,5 \times 10^5$ células/mL e coradas com concentrações saturantes de anticorpos específicos conjugados com PE, PerCP e FITC. Após 30 minutos de incubação, protegidas da luz e à temperatura ambiente, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em 200µL de PBS à temperatura ambiente e o volume foi ajustado de maneira a ser usado para a citometria.

A expressão de determinadas proteínas de superfície celular de ASCs foram avaliadas com os seguintes anticorpos: CD34-FITC (BD Pharmingen™ - 560238), CD44-PE (BD Pharmingen™ - 561860), CD45-PerCP (BD Pharmingen™ - 561047), CD73-PE (BD Pharmingen™ - 550741) e CD90-PE (BD Pharmingen™ - 555596). Um mínimo de 100,000 células foi caracterizado quanto à presença de marcadores na contagem de cada amostra.

3.4 Adipogênese de ASCs e 3T3-L1

O teste de adipogênese foi realizado tanto em células ASCs como em 3T3-L1. As células 3T3-L1 é uma linhagem imortalizada, foram obtidas comercialmente na empresa ATCC (ATCC® CL-173™) e foram utilizadas entre as passagens 10 e 15. A plasticidade celular das ASCs e 3T3-L1 foi verificada por diferenciação dessas células em adipócitos de ASC (AD-ASC) e adipócitos de 3T3-L1 (AD-3T3). A capacidade adipogênica foi determinada com a utilização de meio de indução de adipócitos que consiste em meio de cultura DMEM-low (10% FBS), contendo 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5mM, dexametasona 1μM e insulina 1μg/mL. Em ASCs também foi adicionado 2μM de rosiglitasona já que agonistas de PPARγ (tiazolidinedionas ou glitazonas) trabalham para acelerar a diferenciação de pré-adipócitos *in vitro*. (protocolos adaptados de Zebisch, K. et al. e Ninomiya Y. et al) (107, 108). O meio foi adicionado em placas de cultura de 6 wells após as células atingirem 95-100% (D0) de confluência e novamente após 48 horas (D2). Nos dias 4, 6, 8 e 10 foi adicionado novamente somente o meio DMEM -low (10% FBS).



Figura 1: Esquema de cultivo celular para adipogênese de ASCs e 3T3-L1. As trocas de meio são feitas no mesmo horário nos dias indicados. D0 indica o início da diferenciação com células em 95-100% de confluência.

3.5 Coloração em *Oil Red*

Nos dias 0, 6, 8 e 12 as gotículas de lipídeos foram analisadas através da coloração com solução *Oil Red*. Para isso as células em monocamadas ou em microesferas foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 15 minutos a 25°C. Em seguida, as células foram novamente lavadas e submetidas a coloração com 1 mL de Solução 2% *Oil Red* em isopropanol em cada poço (placa de 6 poços) ou em cada *scaffold* durante 30 minutos a 25°C. O *Oil Red* foi removido e água foi mantida para análise em microscópio invertido.

3.6 Transdução de 3T3-L1 com lentivirus-luciferase

Células 3T3-L1 foram cultivadas em placas de 12 poços 24 horas antes da infecção viral. As células foram mantidas com 1mL de meio DMEM-low (10%FBS) até atingirem aproximadamente 50%. No dia seguinte, o meio foi retirado e foi adicionado 1 mL de meio DMEM-low contendo partículas virais (MOI 0,5, 1 e 2) e Polybrene® (sc-134220) na concentração final de 8 µg/mL. Após 12 horas o meio de cultura foi removido e foram adicionados 1 mL do meio de cultura DMEM-low (10% FBS). No dia 4, as células foram repicadas em 1:3, 1:5 e 1:10 e selecionadas com 2µg/mL de puomicina (sc-108071) por 20 dias.

O meio foi trocado com puromicina diariamente, até que as colônias resistentes fossem identificadas. Como controle foi verificado a morte celular de células não transduzidas submetidas a mesma concentração de antibiótico.

O lentivírus utilizado foi o pLenti PGK V5-LUC Puro (w543-1) com os detalhes apresentado pelo mapa a seguir:

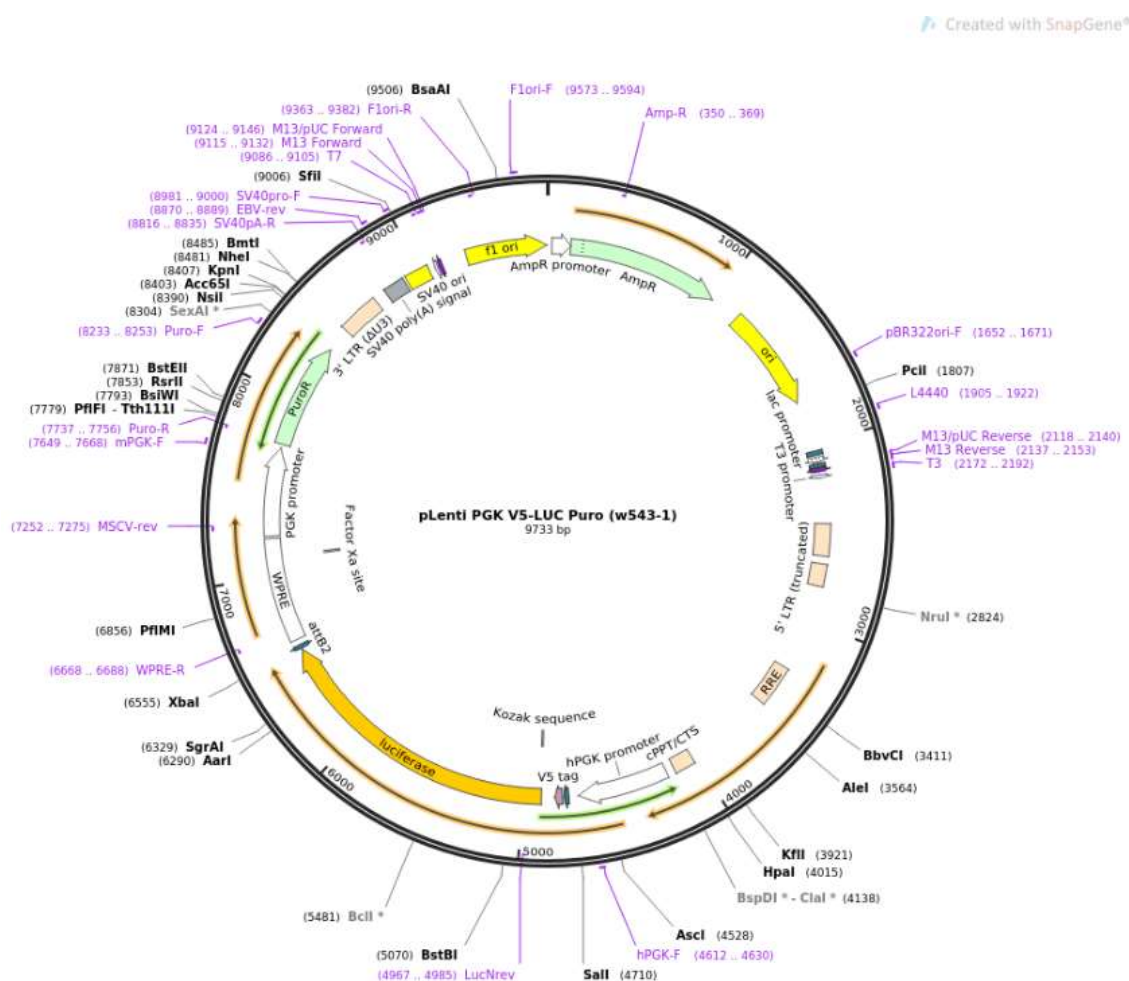


Figura 2: Mapa do vetor viral utilizado na linhagem 3T3-L1 para rastreamento *in vivo*. O vírus utilizado possui resistência a puromicina e carrega o gene da luciferase sob ação do promotor hPGK. Células que recebem o vírus são resistentes ao antibiótico e passam emitir luminescência quando na presença da luciferina.

3.7 Construção e padronização de microesferas 3D

Para a produção de microesferas compostas de AD-ASC e AD-3T3 foi utilizada a técnica de moldes não aderentes com 2% de agarose. Este molde foi preparado através de um *scaffold* negativo de 256 poços com 350µm de diâmetro cada (microtissues - 3D Petri Dish®, Sigma – cat Z764000-6EA - Figura 3). Os *scaffolds* negativos foram adquiridos comercialmente e as recomendações do fabricante foram seguidas com adaptações. O preparo do molde foi realizado da seguinte forma: a agarose em pó foi pesada e diluída em tampão fosfato (2%) e então levada ao micro-ondas por aproximadamente 2 minutos. Ainda quente, 550µL de agarose foram adicionados por *scaffolds*. Aproximadamente em 5 minutos o gel foi polimerizado e então transferido para uma placa de cultura de 12 poços. Imediatamente após a transferência os géis foram cobertos com 2mL de meio de cultura para troca (maturação do gel) de PBS com o meio de cultura DMEM-low. A maturação dos géis foi considerada completa após 24 horas quando o gel se apresentou de cor roseada.

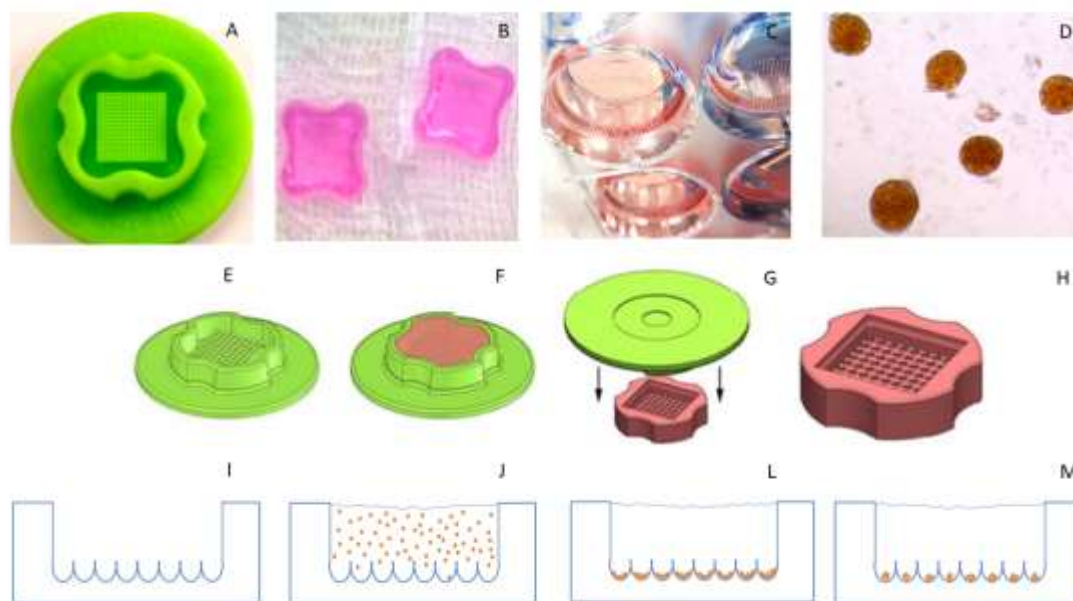


Figura 3: Tecnologia para fabricação de microesferas – A) Molde negativo de 256 poços (*Sigma Scaffold spheroids* - micro-well diâmetro ~400 μm profundidade ~800 μm). B) Molde de 2% agarose após troca de PBS com meio de cultura (maturação do gel). C) Visão inferior dos poços com esferas de 250 μm de diâmetro de esferas após 2 dias de formação. D) Microesferas de 250 μm de diâmetro 2 dias após a formação. E) Scaffold sem agarose. F) Scaffold com agarose. G) Separação do gel do scaffold. H) Gel pronto para formação de esferas. I) Imagem dos *microwells* sem esferas. J) Imagem do momento da dispersão das células sobre os *microwells*. L) Imagem ilustrativa das células após algumas horas da dispersão. M) Imagem ilustrativa da formação das esferas após 24 horas. Imagens do fabricante: A e E-M.

Para a formação de 256 microesferas de tamanho definido, o fabricante fornece uma tabela de concentração de células inicial a ser plaqueada em cada gel (tabela 1). O plaqueamento foi realizado em um volume inicial de 190 μL (meio + células) e após 3 horas o volume de meio de cultura foi aumentado para 2mL final por poços de uma placa de 12 poços.

Tabela 1: Valores fornecidos pelo fabricante do tamanho de esferas por número de células.

Os valores são referências e devem ser recalculados para cada tipo celular.

Table 2. Estimates of cell seeding numbers for smaller spheroids in the 3D Petri Dish®.		# 12-256	# 24-96
		12 well plate Small spheroids: 256	24 well plate Small spheroids: 96
*Nominal spheroid diameter (µm)	~Cells/spheroid	Total cells seeded (cells/190 µl)	Total cells seeded (cells/75 µl)
50	15	3,840/190 µl	1,440/75 µl
100	125	32,000/190 µl	12,000/75 µl
150	421	107,000/190 µl	40,000/75 µl
200	1,000	256,000/190 µl	96,000/75 µl
250	1,953	500,000/190 µl	187,000/75 µl
300	3,375	860,000/190 µl	324,000/75 µl

Entretanto, conforme indica o fabricante as referências presentes na tabela são apenas estimadas e novos testes devem ser feitos para cada linhagem celular. Se estabelecermos um diâmetro de 20µm para uma única célula seu volume seria de aproximadamente 4,18µm³. Assim, teoricamente o volume da esfera se dá pelo número de células vezes seu volume. Portanto, para cada diâmetro de microesferas a se construir é necessário um número de células a ser dispersado por *scaffold*.

Baseando-se em quantidades aproximadas da tabela do fabricante, foram utilizadas diversas quantidades de células para formação de esferas de diferentes tamanhos. Após 6 dias da diferenciação as esferas foram montadas e após 2 dias da fabricação das microesferas os géis de agarose foram fotografados em microscópio óptico (40X de magnificação) e as imagens foram utilizadas para validar o diâmetro das microesferas obtidas.

A quantificação das microesferas foi realizada utilizando-se o software ImageJ e de 4 a 6 fotos foram utilizadas. Cada esferoide foi medido com a

ferramenta de escalas. O valor médio de diâmetro foi utilizado como padrão para cada condição testada.

Para escolha do tamanho de microesfera a ser utilizado na terapia foi realizado o teste da agulha. Para isso, aproximadamente 200 microesferas foram passadas 2 vezes pela agulha utilizada na terapia (26G) com velocidade similar da aplicação *in vivo*.

3.8 Verificação molecular de AD-ASC por RT-PCR

Para quantificação de marcadores adipogênicos de ASC pós diferenciação foram extraídos 2 poços para cada condição na extração de RNA. A extração foi realizada com TRIZOL, seguindo o protocolo conforme o fabricante. Em seguida, o RNA foi dosado em nanodrop e normalizado a 500ng por amostra. Em seguida, a cada amostra foi adicionado: dNTP 0,2mM, MgCl 5mM, DTT 1mM e RNAout 1U. Todas as amostras foram levadas a 65°C por 5 minutos. Adicionou-se M-MLV (2,5U/uL), 5µM de oligo dT e água para um volume final foi de 40uL. As amostras foram submetidas a 22°C por 10 minutos, 37°C por 30 minutos e 95° por 5 minutos. Posteriormente foram utilizados 1µL de cDNA na Reação em cadeia da polimerase (PCR). Os marcadores moleculares de adipócitos utilizados foram CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPα), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARγ), Fabp4 - *fatty acid binding protein 4* (Fabp4 ou aP2) e leptina (Lep). A PCR foi realizada em um volume final da reação de 20µL. Foram utilizados 2 U/reação de Platinum TAQ platinum polimerase, 0,2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 0,5µL de cada primer 05µM, 1µL

de cDNA e água para 20µL de volume final. O programa de ciclos térmicos de PCR foram: 2 min a 95 °C, 35 ciclos por 30s a 95 °C, 30s a 60 °C e 12s a 72°C. Os primers utilizados na reação de RT-PCR estão mostrados na tabela a seguir.

Tabela 2: Primers utilizados na verificação de marcadores moleculares de expressão genica no processo de adipogênese de ASCs. Na terceira coluna é descrito o tamanho de cada fragmento esperado.

Gene	Sequencia	Tamanho (pb)
cC/EBPα F	TTACAACAGGCCAGGTTTCC	232
cC/EBPα R	CTCTGGGATGGATCGATTGT	
cPPARγ F	TTTCAAGGGTGCCAGTTTC	198
cPPARγ R	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT	
cFabp4 (aP2) F	TCACCTGGAAGACAGCTCCT	181
cFabp4 (aP2) R	AATCCCCATTTACGCTGATG	
cGapdh F	AATGTGTCCGTCGTGGATCT	250
cGapdh R	CCCTGTTGCTGTAGCCGTAT	
cLep F	GTGCCTATCCAGAAAGTCCA	192
cLep R	GACCTGTTGATAGACTGCCA	

3.9 Injeção e rastreamento de células isoladas

As células isoladas para terapia foram cultivadas em placas de 12 poços e diferenciadas até o dia 8 conforme descrito anteriormente. As células foram tripsinizadas, sedimentadas e ressuspensas em 5×10^6 células a cada mL de PBS. Os camundongos ob/ob receptores foram anestesiados com isoflurano, e o lado dorsal de cada camundongo foi raspado e limpo com álcool a 70%. Uma única injeção de 200µL de células (equivalente a 1×10^6) foi realizada no lado direito do ventre do animal no dia 0 (D0).

Para visualização de ASCs isoladas, as células foram tripsinizadas e marcadas com 0,25mg/ml de indocianina no dia da injeção. Para isso as células

foram centrifugadas a 400g por 5 minutos. Indocianina foi preparada primeiramente em água ultrapura na concentração de 10mg/mL e posteriormente diluída em PBS a 0,25mg/mL. Foi adicionado uma solução de 30mL (0,25mg/mL) por 45 minutos a 37°C em ASCs isoladas. As células foram lavadas 2 vezes a 400g por 5 minutos e ressuspensas em PBS.

Para visualização das células AD-3T3 luciferase *in vivo* os animais receberam 200µL de luciferina (15mg/µL) (cat. E1605 - Promega) via intraperitoneal.

Em ambos os casos os animais foram anestesiados com isoflurano e em seguida as células foram injetadas. Cinco minutos após a injeção, os animais foram analisados no equipamento *IVIS Spectrum*. As análises para rastreamento celular foram feitas nos dias D0, D14, D21, D28.

3.10 Injeção e rastreamento de microesferas

A formação das microesferas foi realizada no dia 6 da diferenciação e injetadas no dia 8. As microesferas foram sedimentadas por 5 minutos em repouso e ressuspensas em 4×10^3 esferas a cada mL de PBS. Os camundongos ob/ob receptores foram anestesiados com isoflurano, e o lado dorsal de cada camundongo foi raspado e limpo com álcool a 70%. Uma única injeção de 200µL contendo aproximadamente 530 microesferas (equivalente a 1×10^6 células – 1250 células por esfera) localizada no lado direito foi realizada no dia 0 (D0).

Para visualização das células *in vivo* os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam 200µL de luciferina (15mg/µL) (cat. E1605 - Promega)

via intraperitoneal. Para ASCs as microesferas foram marcadas com 0,25mg/ml de indocianina conforme descrito em 3.9 no dia da injeção. As análises para rastreamento celular foram feitas nos dias D0, D14, D21, D28.

O teste *in vivo* foi realizado com células isoladas e microesferas de AD-ASC nas seguintes condições:

- Fabricação de microesferas de 250 µm com 1250 células cada
- Injeção de 530 microesferas - contendo um total de 1×10^6 células
- Injeção de 1×10^6 células isoladas
- Injeção de 200µL de PBS como controle negativo
- Utilização de agulha 26G para administração no tecido adiposo subcutâneo da região inguinal e dorsal

3.11 Avaliação do peso dos animais ob/ob pós tratamento

Após o tratamento os animais foram pesados toda semana durante 112 dias. As análises dos pesos foram realizadas utilizando software *Graphpad Prism*. Os dados obtidos foram plotados e submetidos ao teste estatístico two Way ANOVA, verificando os pesos relativos entre os animais em todas os períodos. Foi considerado significativamente estatístico $p < 0,05$, sendo cada grupo composto por 5 animais.

A normalização dos pesos brutos foi realizada através da média do peso de todos os animais. Os valores calculados em cada período foram obtidos pelo peso médio inicial vezes a variação do peso.

3.12 Avaliação de leptina *in vivo* pós transplante

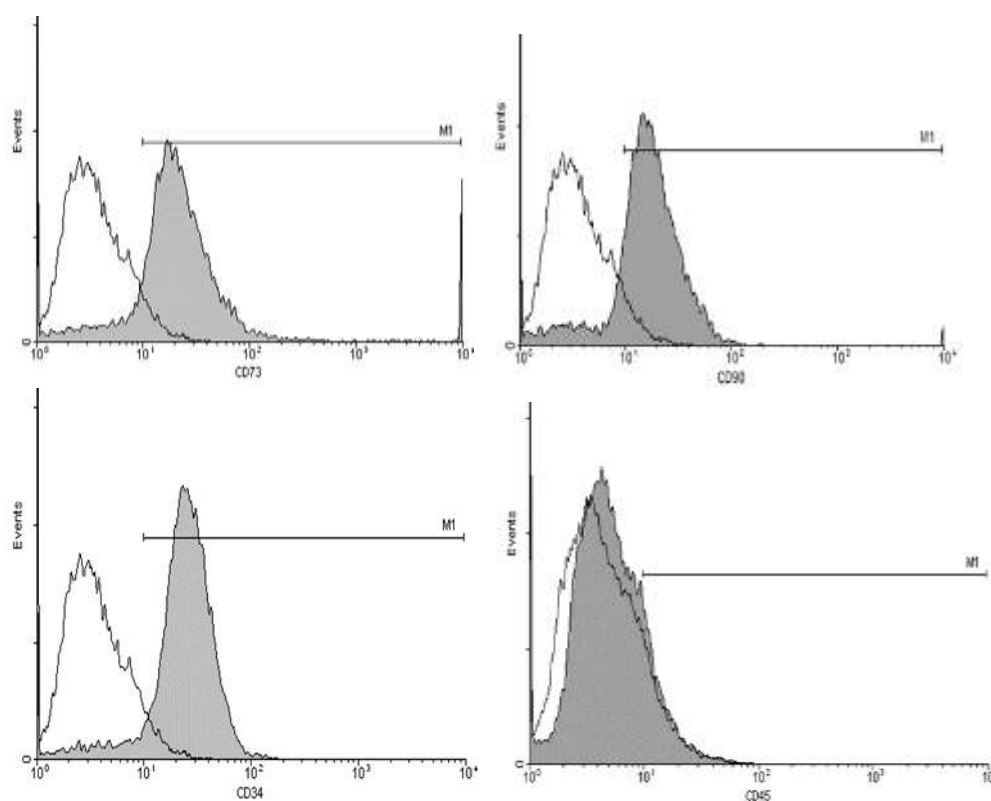
Após o transplante das células foram recolhidos aproximadamente 250 µL de sangue total de quatro animais de cada grupo. As coletas foram realizadas em 63 e 98 dias após o transplante. Após coleta o sangue foi mantido em temperatura ambiente por uma hora e centrifugado a 3000 g por 10 minutos a temperatura ambiente e o soro foi separado. As amostras foram analisadas utilizando o kit de Elisa para Leptina (RAB0334 - Sigma Aldrich), conforme instruções do fabricante. As análises foram realizadas em duplicata. Foram adicionados 100 µL de cada amostra por poço e incubados *overnight* a 4 °C com agitação suave. No dia seguinte, o sobrenadante foi descartado e lavado quatro vezes com 300 µL de solução de lavagem (1x). Foram adicionados 100 µL de solução de detecção biotinilada seguido de incubação por 1 hora, à temperatura ambiente com agitação leve. A solução foi descartada e lavada novamente. Foram adicionados 100 µL de solução HRP-Estreptavidina e incubadas por 45 minutos à temperatura ambiente com agitação leve. A solução foi descartada e as amostras foram lavadas quatro vezes novamente. Foram adicionados 100 µL de reagente colorimétrico de TMB e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz e com agitação suave. Em seguida, foram adicionados 50 µL de *stop solution* e a leitura a 450 nm foi realizada imediatamente. A curva de leptina e os resultados de absorbância foram plotados no software GraphPad Prism 7.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da cultura de ASCs por citometria de fluxo

Para caracterização das células extraídas do tecido adiposo branco foram utilizados dois marcadores de superfície celular específicos de ASCs (cd34, CD44, CD73 e CD90) e um específico de linhagem hematopoiética (CD45), sendo todos conjugados com o marcador PE. As células foram avaliadas em um total de 100 mil eventos por leitura. Os gráficos abaixo mostram as leituras em citometria de fluxo das células extraídas nessas condições na passagem 4.



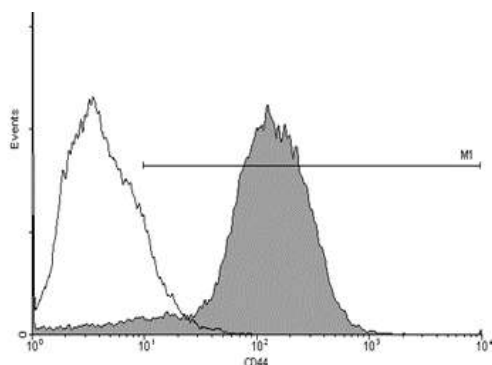


Figura 4: Os gráficos indicam a quantidade de células por detecção de anticorpos específicos de ASCs e células hematopoiéticas conjugados com os marcadores FITC, PE e PerCP. Os anticorpos utilizados foram CD34, CD44, CD73, CD90 e CD45. As células analisadas foram ASCs de animais C57BL/6J por citometria de fluxo. Com o deslocamento do gráfico foram determinadas as concentrações de marcação de cada marcador.

As médias das marcações em ASC foram 89,0%, 93,0%, 82,3%, 81,5% e 14,5% em P0 e 90%, 96,0%, 94,1%, 95,4% e 4,6% em P4 para os marcadores CD34, CD44, CD73, CD90 e CD45, respectivamente. O gráfico abaixo mostra as médias das porcentagens obtidas de células marcadas em relação aos respectivos marcadores.

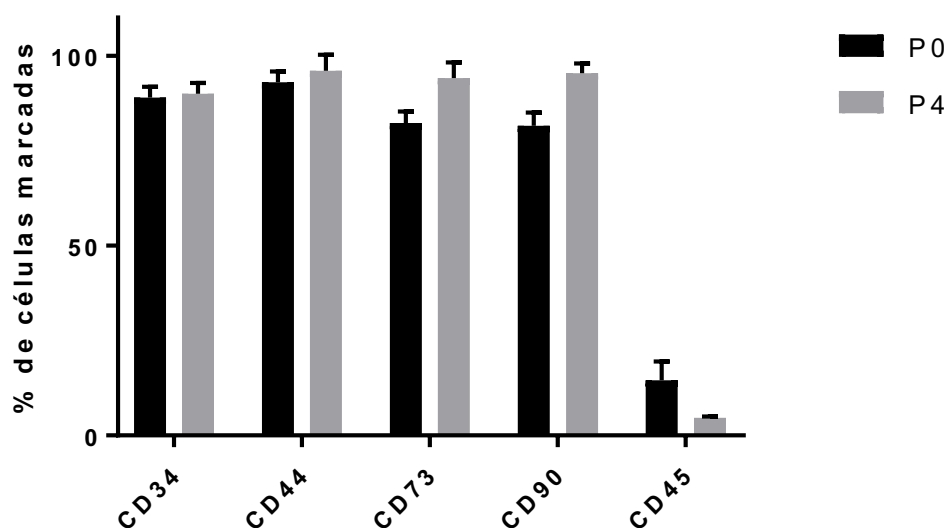


Figura 5: Gráfico de marcadores de superfície celular expresso em ASC e células de origem hematopoiética, indicando a porcentagem de células marcadas por citometria de fluxo nas passagens 0 e 4. Os marcadores apresentaram positividade acima de 81,5% em P0 e acima de 90% em P4 para os marcadores positivos de ASC. O marcador negativo para ASC (CD45) apresentou positividade de 14,5% em P0 e 4,6% em P4.

Há um consenso geral que ASCs não expressam os marcadores CD45, um marcador de todas as células hematopoéticas. Por outro lado, CD34, um marcador de célula-tronco hematopoética primitiva, raramente expressa em MSCs humanas, tem se observado em diversos trabalhos certa positividade em camundongos, além de CD73 (ecto-5'-nucleotidase), um marcador positivo para ASCs. Estes são alguns dos marcadores expressos ou não, descritos por diferentes grupos e testados em ASCs.

4.2 Capacidade adipogênica de 3T3-L1 e ASC

Para verificar a capacidade de diferenciação em adipócitos de ASCs e 3T3-L1 foi realizado um tratamento com meio de indução adipogênica. Alterações morfológicas foram observadas, conforme mostra a imagem a seguir a partir do dia 6, com a presença e o aumento gradual de vacúolos de lipídeos intracelulares. A coloração dos vacúolos presentes em adipócitos foi visualizada através da coloração de lipídios com o reagente *Oil Red*.

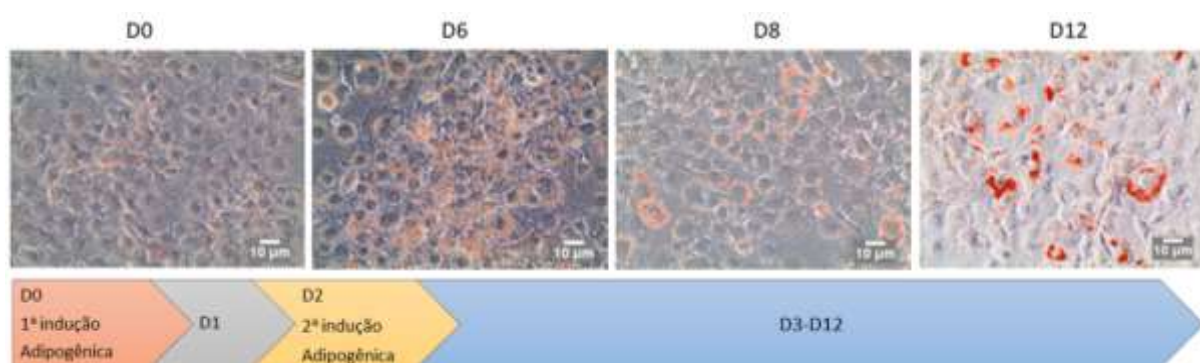


Figura 6: ASCs em meio de indução adipogênico. Vacúolos citoplasmáticos presentes na cultura de ASCs visualizados a partir do dia 6 durante os 12 dias analisados. Coloração com *Oil Red*, indica em vermelho vacúolos lipídicos.

A seguir, são apresentadas ambas linhagens durante o processo de diferenciação. É possível notar gotículas de lipídeos em ambas linhagens após 8 dias de indução.

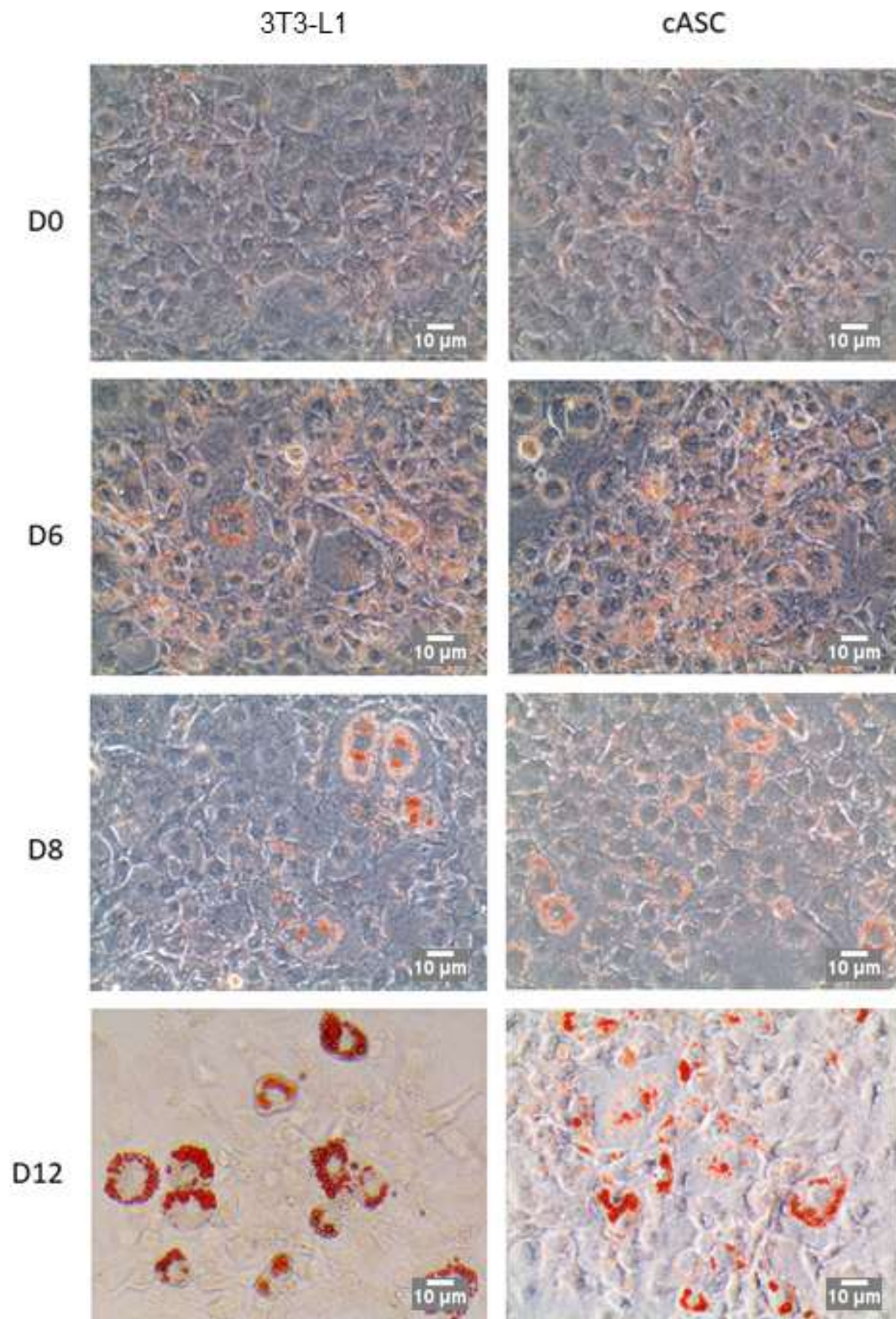


Figura 7: linhagem 3T3-L1 e ASC durante o processo de adipogênese - 12 dias após cultivo em meio de indução. As gotículas de lipídeos são coradas em vermelho com o corante *oil red* indicando o início da diferenciação das células em adipócitos.

4.3 Formação de microesferas de AD-ASC e AD-3T3

Na figura 8 a seguir na primeira linha de imagens estão dispostas microesferas de AD-ASC e na segunda linha AD-3T3. Cada coluna representa uma quantidade de células utilizadas por *scaffold*. Ambas as linhagens apresentaram semelhança nas correlações de quantidade de célula semeada x tamanho da esfera.

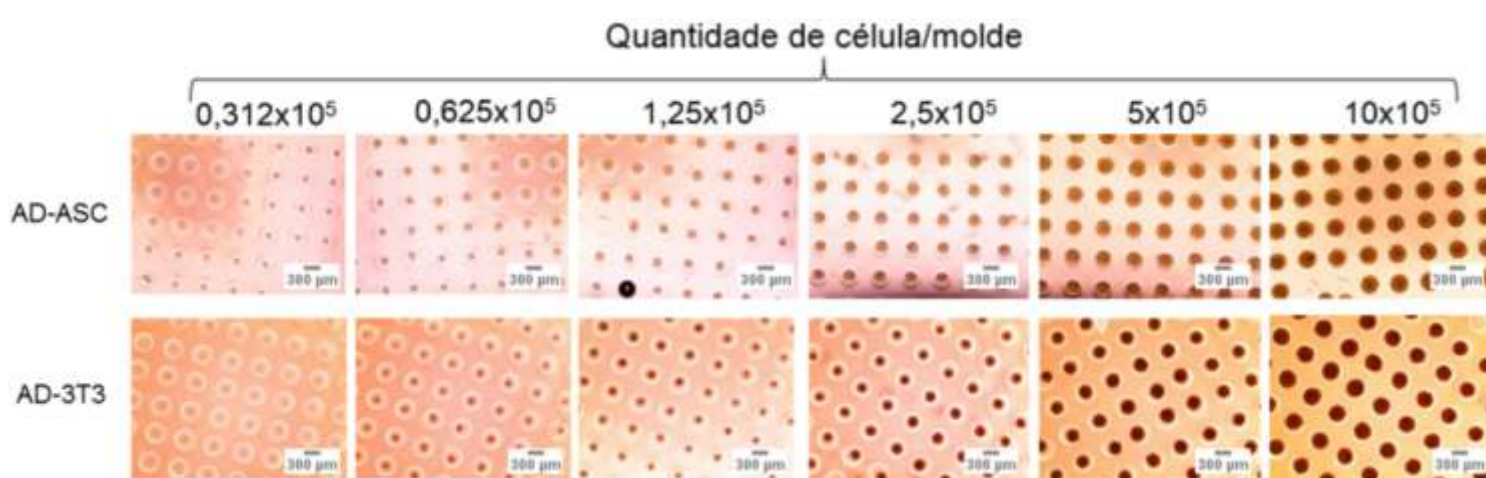


Figura 8: imagens para teste de correlações de quantidade de células semeadas pelo tamanho da microesfera. As imagens foram coletadas após 2 dias da formação das esferas e medidas no software ImageJ.

Após a mensurações das microesferas os valores foram plotados nos gráficos a seguir (figura 9) a fim de obtermos a correlação de células semeadas pelo tamanho da esfera.

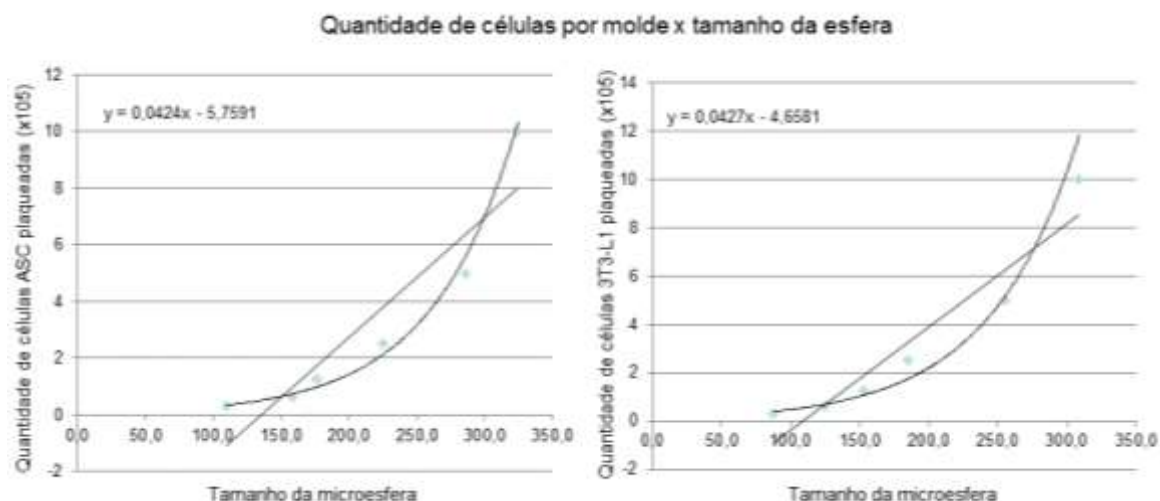


Figura 9: Gráfico de correlação de número de células semeadas x tamanho da esfera. No eixo Y o número de células ($\times 10^5$) utilizadas por *scaffold*. No eixo x, o tamanho da esfera expresso em μm .

Dessa forma, a correlação de tamanho de microesfera por quantidade de células ASC utilizadas por *scaffold* se dá pelos valores apresentados na tabela a seguir. Além disso, como é sabido que cada *scaffold* possui 256 micromoldes podemos concluir que a quantidade de células AD-3T3 e AD-ASC por microesfera se dá respectivamente pela terceira e quinta colunas da tabela a seguir:

Tabela 3: Quantidades de células AD-ASC e AD-3T3 que devem ser semeadas em cada molde (*scaffold*) para obter o diâmetro esperado de cada uma das 256 microesferas. Resultados baseados nas medidas realizadas após 2 dias da formação das microesferas.

Padronização da produção de microesferas AD-ASCs e AD-3T3

Diâmetro das microesferas (µm)	AD-3T3/molde de 256 esferas*	AD-3T3/esfera	AD-ASC/molde de 256 esferas*	AD-ASC/esfera
150	17000	682	60000	234
200	390000	1516	270000	1062
250	600000	2350	480000	1890
300	820000	3184	690000	2719
350	1030000	4018	900000	3547

4.4 Teste de conformação após passagem pelo bisel

Considerando que o principal objetivo da formação de microesferas é a aplicação de um método terapêutico a longo prazo, vale ressaltar o fato de que durante as injeções elas terão que passar sem serem destruídas através de uma agulha fina. As microesferas de 250µm foram sugadas e despejadas através de agulhas de 26G duas vezes e não foram danificadas durante a passagem pela agulha, conforme apresentado pela imagem a seguir. Por outro lado, o mesmo procedimento realizado com aproximadamente 200 microesferas de 300µm apresentou morte celular em algumas microesferas. Dessa forma, optamos, para utilização em testes *in vivo*, a maior microesfera produzida e que não sofreu alterações no teste da agulha.

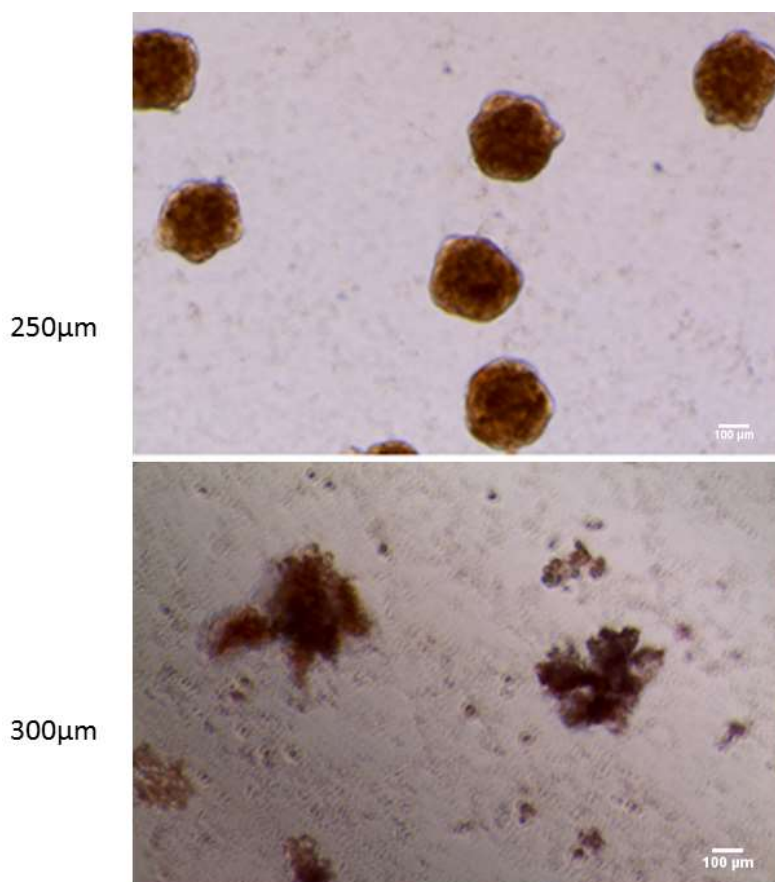


Figura 10: Teste de resistência das microesferas após passagem pelo bisel da agulha. As esferas de 250 µm ficaram intactas mostrando que não foram danificadas após 2 passagens por agulha 26G em velocidade similar à realizada durante a terapia.

4.5 Verificação adipogênica em microesferas por Oil Red

Assim como as células em monocamada, as microesferas de AD-ASCs e AD-3T3 também foram avaliadas para verificação da presença de células adiposas. A marcação de *oil red* realizada no dia 8 mostra as marcações em vermelho de células com gotículas de lipídeos, indicando a presença de células em processo adipogênico nas microesferas.

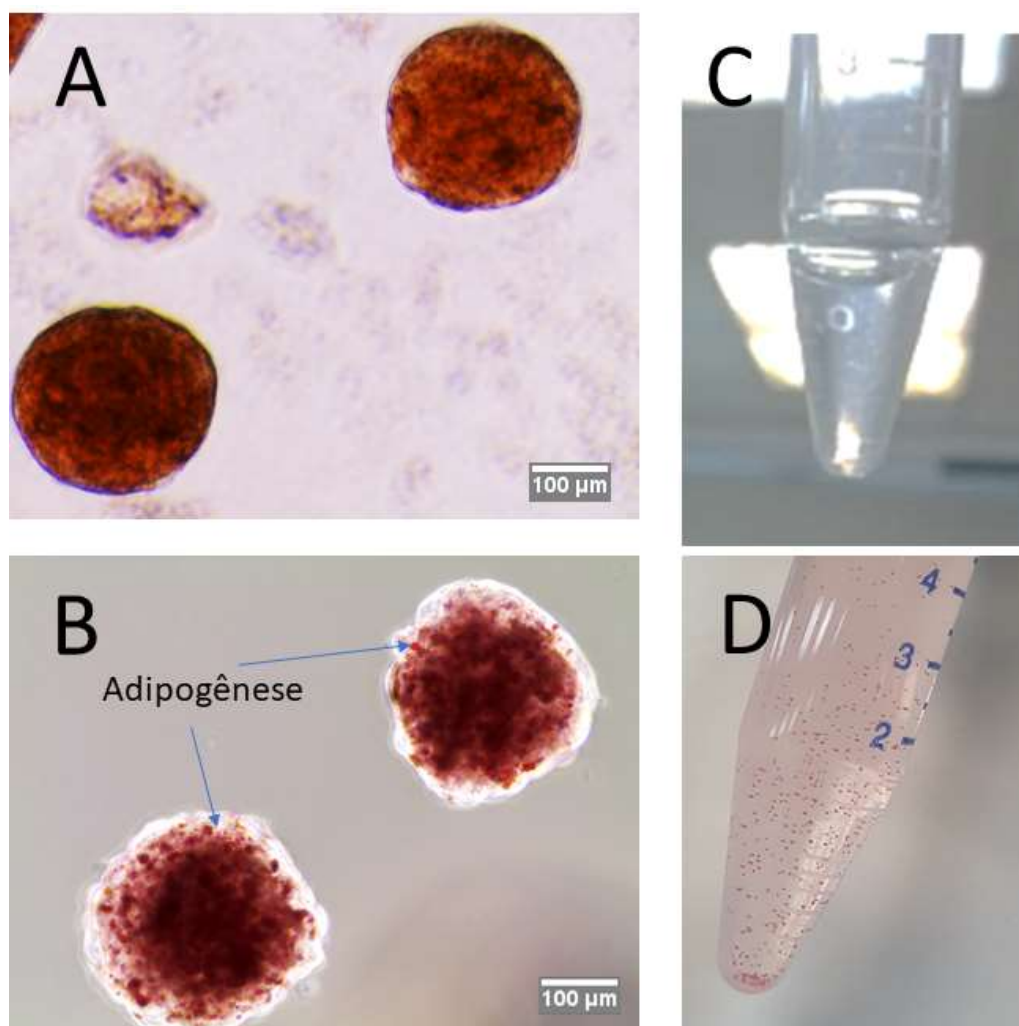


Figura 11: A e B: Microesferas de AD-ASC de 250μm coradas com *oil red* após 8 dias de diferenciação, sem e com meio de indução, respectivamente. Pode-se observar em B as marcações em vermelho nas regiões da borda das microesferas, onde as células estão mais isoladas e permite uma melhor difração da luz do microscópio. A marcação do *oil red* não é visível no centro da esfera devido ao bloqueio da luz pela massa celular que possui cor acastanhada ao microscópio. Nota-se também que as microesferas perdem a regularidade de suas bordas com células submetidas à adipogênese. C e D: visualização da marcação de *oil red* a olho nu do controle negativo (não diferenciado) e positivo (diferenciado), respectivamente.

4.6 Expressão de marcadores moleculares na diferenciação de esferas

Após 20 dias do processo de adipogênese células AD-ASC foram submetidas a análise qualitativa da expressão de marcadores moleculares específicos de adipócitos. A seguir são apresentadas as bandas referentes à

expressão gênica dos marcadores adipogênicos que tendem a aumentar com o amadurecimento dos adipócitos. Dessa forma, um aumento dessa expressão é esperado em períodos mais longos, o que pode ocorrer até após o transplante. Os marcadores analisados estão mostrados na figura 12.

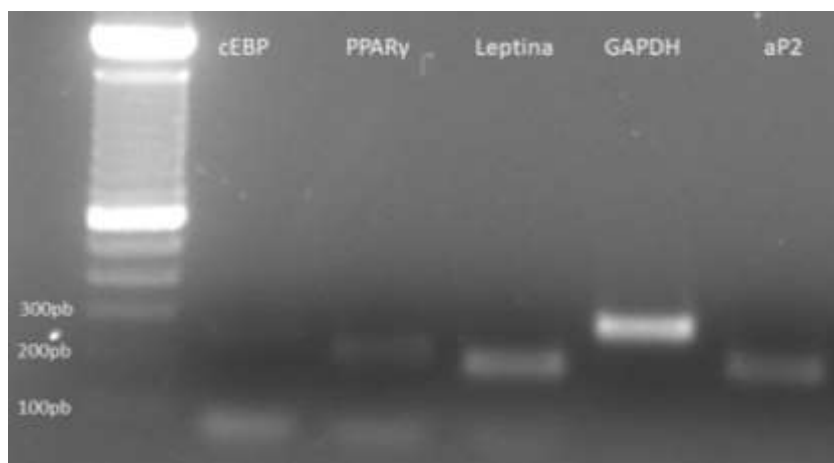


Figura 12: Análise qualitativa dos marcadores de expressão adipogênicos após 20 dias do processo de diferenciação de ASC. Os marcadores utilizados foram cEBP, PPAR-gama, Leptina e aP2. Como controle positivo da reação foi utilizado o gene GAPDH. A análise do gel de agarose mostra que, com exceção do gene cEBP, com uma expressão baixa, os RNAs mensageiros desses marcadores já são expressos nesse período de diferenciação. Todos os marcadores apresentaram bandas na altura esperada.

4.7 Transdução de células 3T3-L1 com lentivirus carregando gene *luciferase*

As células imortalizadas da linhagem 3T3-L1 utilizadas no rastreamento celular *in vivo* pós terapia foram infectadas com lentivirus superexpressando o gene da luciferase como repórter. Vale lembrar que esse procedimento não foi realizado em células ASCs por sua limitação do número de passagens indicado na literatura a fim de manter suas características pluripotentes.

Após a transdução de células 3T3-L1 com o lentivirus pLenti PGK VS-LUC Puro (w543-1), algumas células permaneceram vivas, enquanto no controle sem

transdução todas as células morreram após 3 dias de tratamento com o antibiótico puromicina na concentração 1 µg/mL. A partir desse momento, as células transduzidas foram selecionadas por 20 dias. No dia 21 o antibiótico foi retirado e adicionado 1,5µL de luciferina na concentração de 100mg/mL por poço em placa de 24 wells. As células em seguida foram analisadas no equipamento *IVIS-spectrum* e a leitura foi realizada para verificação da reação enzimática da enzima luciferase.

A verificação de eficiência para detecção do efeito da luciferase em célula pós transplante *in vivo* se dá por um mínimo de um fluxo total por célula de 800 p/s por célula. O limite mínimo foi atingido nas amostras de MOI 1 e 2. Os 3 poços foram expandidos separadamente e armazenados, porém somente a amostra de MOI 2 foi expandida para realização da terapia *in vivo*.

Os resultados obtidos estão apresentados na imagem abaixo. A eficiência da transdução foi verificada em todos os três poços transduzidos.

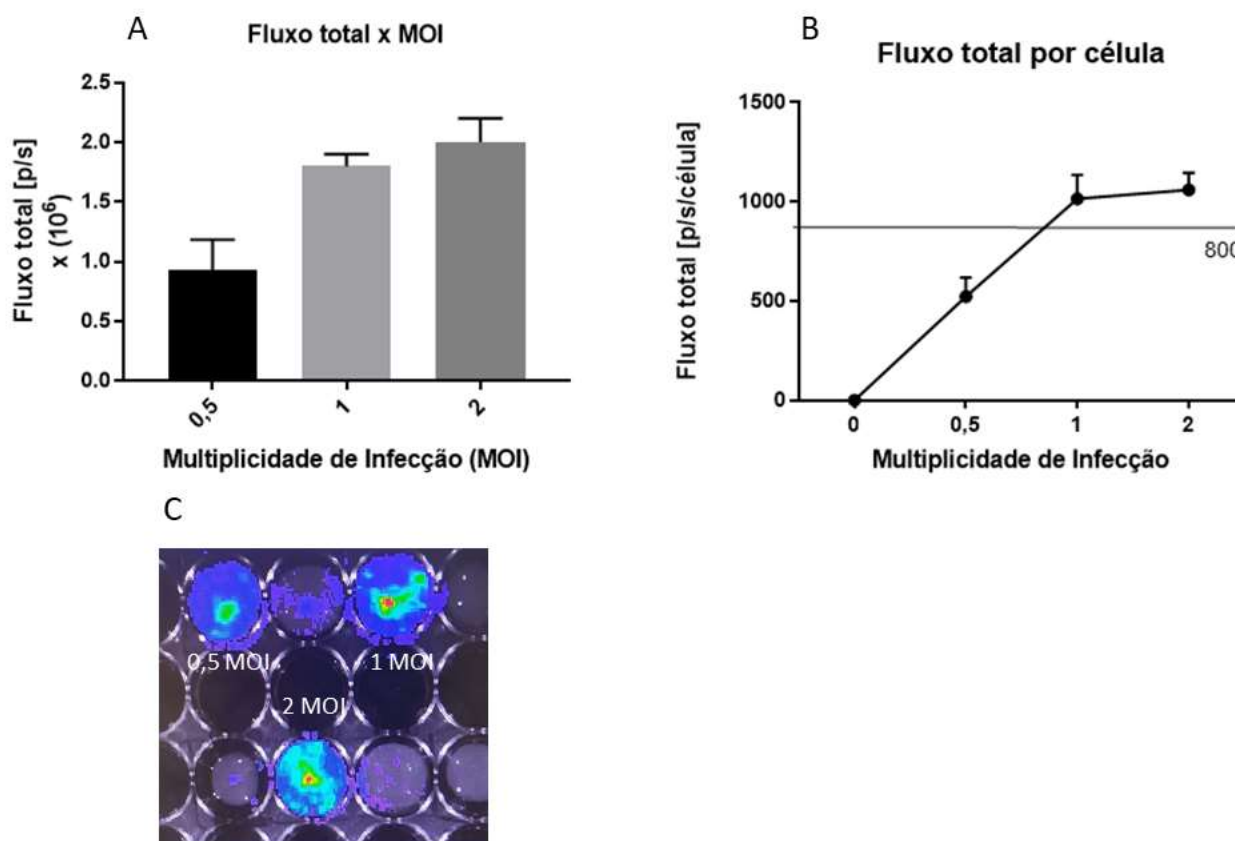


Figura 13: Gráfico A: fluxo total de luz capturado pelo equipamento IVIS (p/s) em 3 amostras transduzidas com quantidades diferentes de vírus. Gráfico B: as amostras com multiplicidade de infecção (MOI*) 1 e 2 apresentaram fluxo total (p/s) acima do requerido pelo equipamento IVIS Spectrum para captura *in vivo* (800p/s/célula). Figura C: imagem apresentando 3 poços transduzidos com clones que receberam diferentes quantidades de vírus e positividade na reação enzimática da luciferase em todas as amostras. O clone selecionado para testes *in vivo* foi a MOI 2.

4.8 Rastreamento de células e microesferas de AD-3T3 pós terapia

Após o transplante de AD-3T3 (células e microesferas) no dia 8 da diferenciação e carreando o gene da luciferina, foi analisada a presença das células em tempos específicos pós injeção. As imagens abaixo mostram a presença das células isoladas no dia 14 somente em um animal enquanto as microesferas estavam presentes em todos os animais analisados. No dia 21 os

animais que receberam células isoladas não apresentaram mais sinal enquanto no grupo de microesferas dois animais ainda possuíam sinal. Até o dia 28 ainda foi possível verificar as microesferas presentes nos animais que receberam microesferas. Já no dia 35 nenhum animal possuía marcação das células.

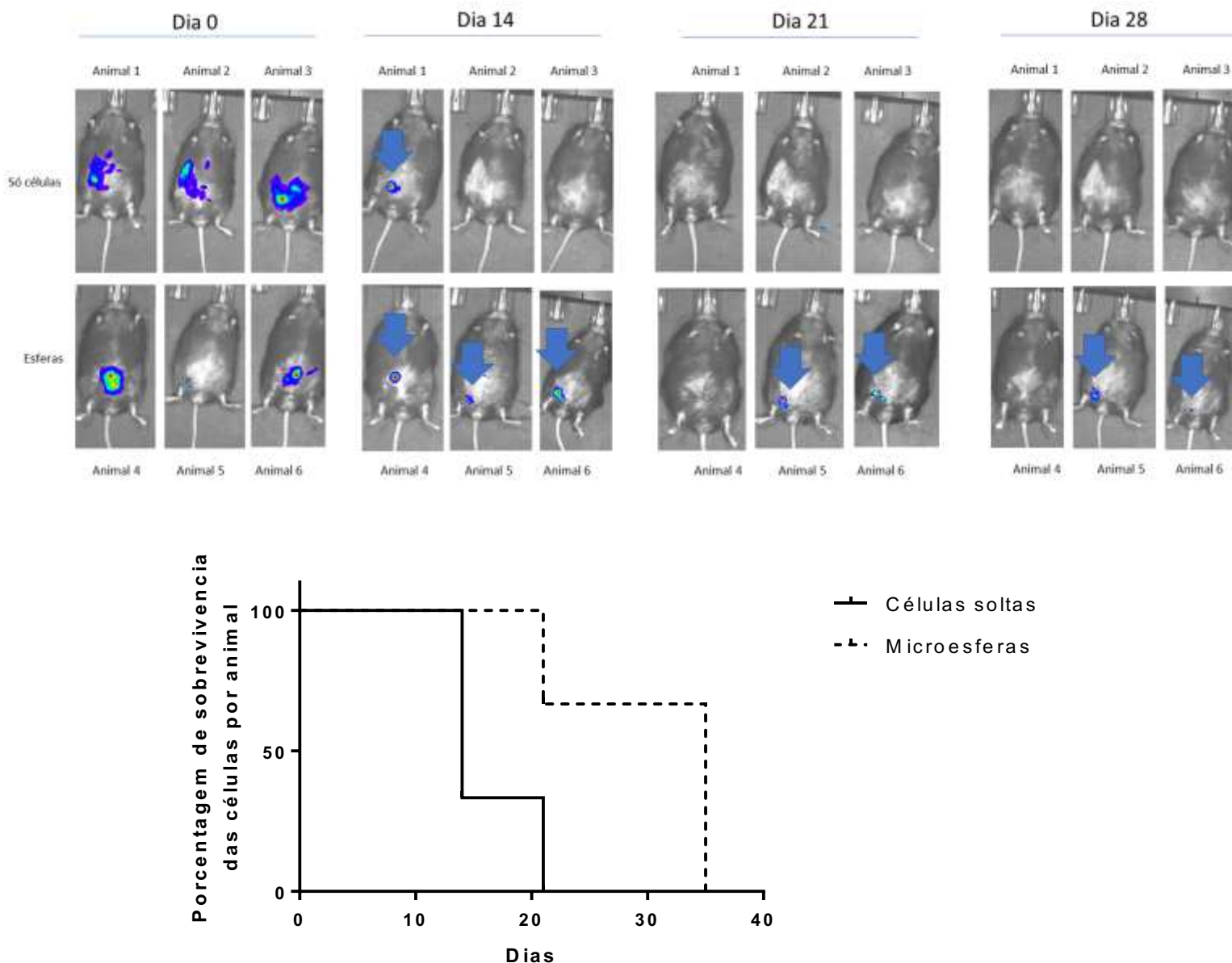


Figura 14: Análise dos animais pós-injeção com AD-3T3 carreando gene da luciferase para comparativo de retenção de células isoladas e microesferas. As microesferas permaneceram nos animais até 14 dias a mais que as células isoladas. No gráfico é apresentado de forma qualitativa a presença das microesferas e células isoladas, onde 67% dos animais do grupo de microesferas permaneceram retidas no animal até no mínimo 28 dias e no máximo 35 dias. Por outro lado, os

animais do grupo de células isoladas somente 33% dos animais possuíam células retidas após 14 dias da terapia.

4.9 Retenção de células e microesferas de ASCs em animais ob/ob

Como não foi possível realizar a transdução viral em células mesenquimais, um teste piloto foi realizado somente para verificação da retenção das células AD-ASCs em formato de microesferas.

As imagens abaixo mostraram a diferença de retenção das células injetadas de forma isolada ou em microesferas. Na figura 15, a imagem à esquerda apresenta um animal controle negativo e outro injetado com microesferas de AD-ASC. A imagem à direita apresenta um animal controle negativo e um animal que recebeu células isoladas. Foi possível observar a retenção das células através das imagens após 24 horas do transplante.

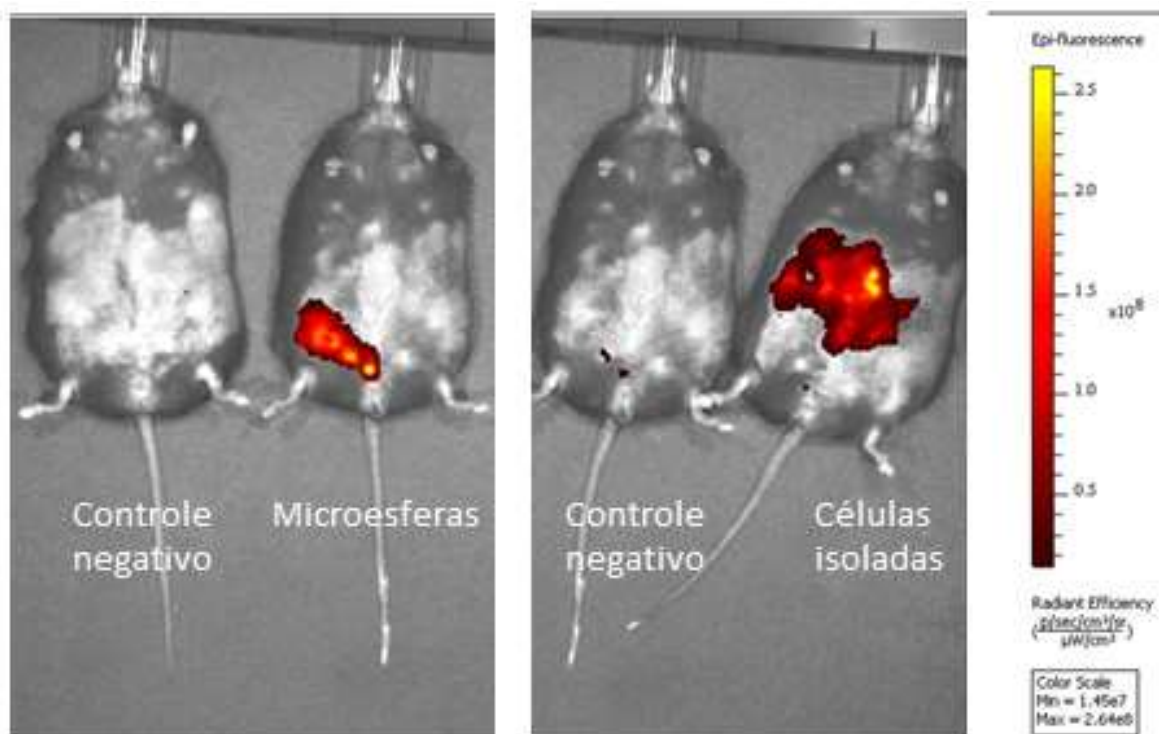


Figura 15: Comparativo de retenção de células isoladas e microesferas de AD-ASC na região inguinal de animais ob/ob. Marcação com 0,25mg/ml de indocianina e visualizados após 24 horas no equipamento *IVIS Spectrum*.

Na figura 16 é apresentado um comparativo de retenção de células isoladas e microesferas de AD-ASCs no dorso de animais ob/ob após 1 e 8 dias da injeção. Da esquerda para direita: controle, microesferas e células isoladas. Durante esse período a diminuição da fluorescência se dá pela perda do marcador indocianina e pela morte celular (conforme demonstrado pelo resultado de bioluminescência em AD-3T3).

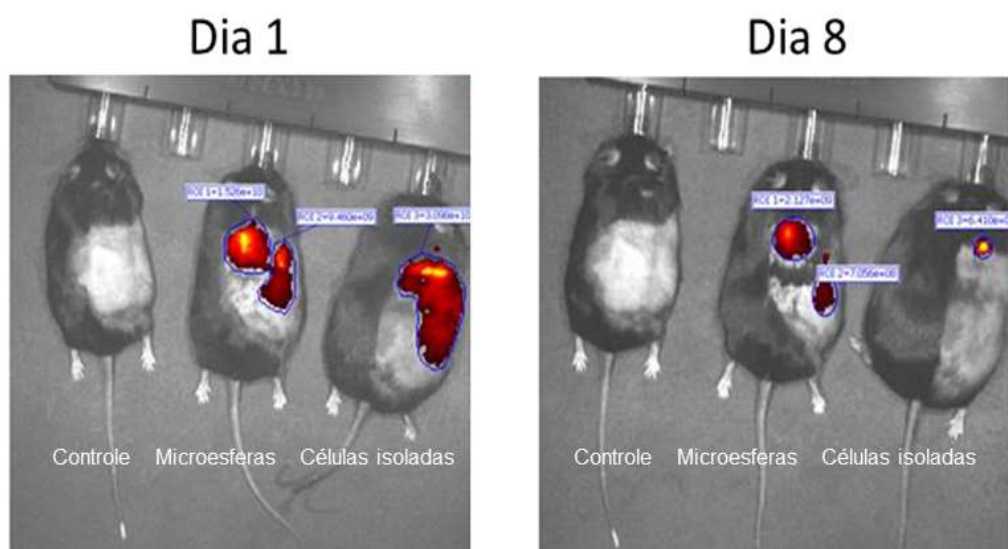


Figura 16: Comparativo de retenção de células isoladas e microesferas de AD-ASC no dorso de animais ob/ob após 1 e 8 dias da injeção. Da esquerda para direita: controle, microesferas e células isoladas.

4.10 Terapia Celular com microesferas de AD-ASC em animais ob/ob

4.10.1 Avaliação do peso relativo e bruto após terapia celular

Alterações no peso foi observada nos animais que receberam AD-ASC isoladas ou microesferas quando comparadas ao controle. Os gráficos a seguir (figura 17) mostram em porcentagem o peso relativo ao inicial (A) e valores normalizados (B) pela média de peso em diferentes semanas pós terapia. Foi possível notar que os animais que receberam AD-ASC (células isoladas ou microesferas) não engordaram durante os primeiros 21 dias, enquanto os animais controles engordaram em torno de 5%. No dia 35, o grupo microesferas apresentou diferença de 8,6% em relação ao grupo controle ($p=0,019$ – $n=5$). Após esse período, o grupo células isoladas praticamente manteve o peso até 77 dias, quando apresentou uma diferença no peso relativo de 7,5% em relação ao grupo controle ($p=0,049$ – $n=5$). Nesse mesmo período a diferença de peso entre grupo microesferas e controle foi de 16,6% ($p<0,0001$ – $n=5$) e entre o grupo microesferas e células isoladas foi de 9,1% ($p=0,028$ – $n=5$). No dia 98 o grupo microesfera apresentou o valor mais baixo na diferença relativa de peso (27,5%) em relação ao grupo controle ($p<0,0001$ – $n=5$), enquanto o grupo células isoladas apresentou diferença de 8,0% em relação ao controle ($p=0,032$ – $n=5$). A partir desse momento o grupo células isoladas não apresentou mais diferença estatística em relação ao grupo controle e o grupo microesferas voltou a ganhar peso até atingir no dia 112 uma diferença de peso relativa de 22,5% em relação ao grupo controle ($p<0,0001$ – $n=5$). No gráfico C, podemos notar que os animais que receberam microesferas pesavam após três meses, 14,7% a menos do peso inicial. O grupo microesferas obteve uma redução relação ao grupo células isoladas de 19,6% ($p=0,0001$ – $n=5$). Um fato surpreendente foi que somente após 98 dias o grupo de microesferas voltou a ganhar peso novamente.

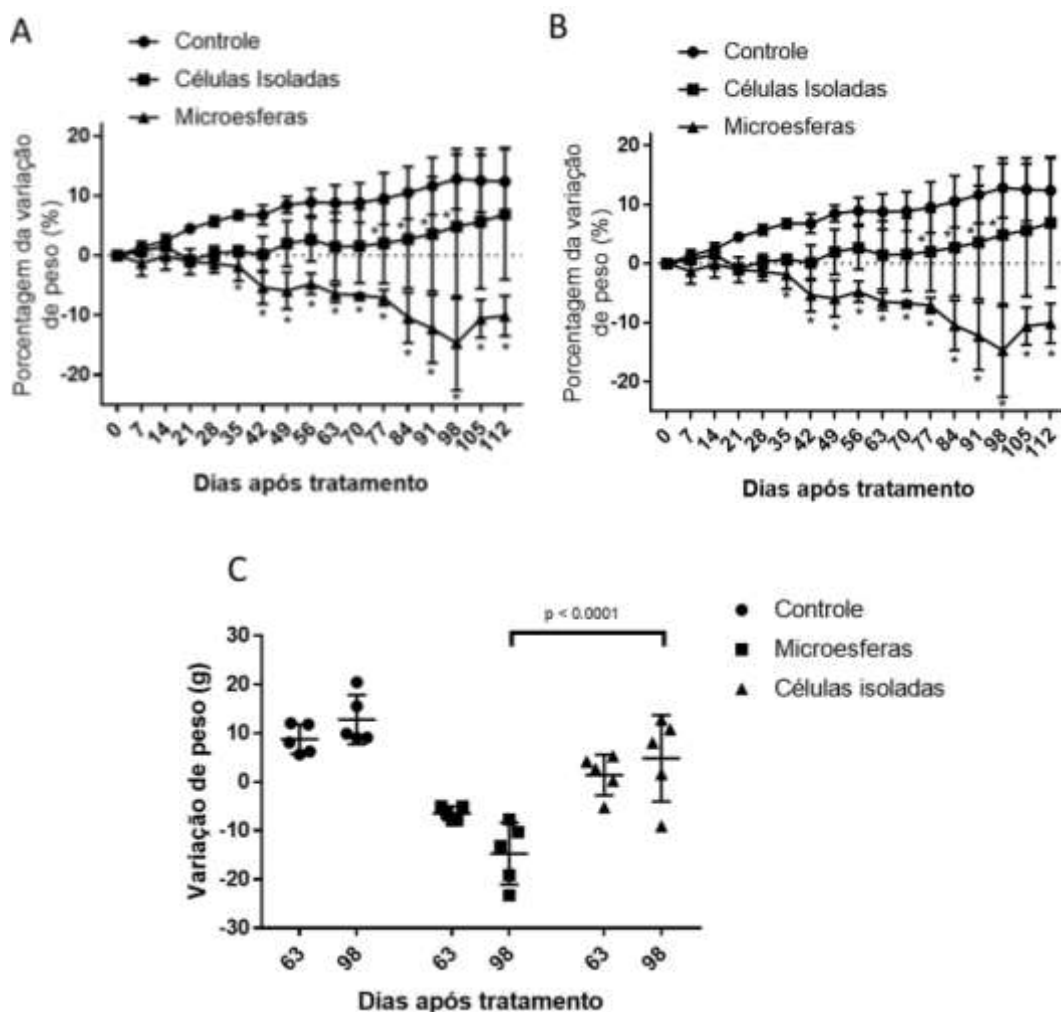


Figura 17: A – Valores de peso relativo ao inicial durante 112 dias após a terapia celular. B – Valores de peso normalizados pela média dos pesos iniciais de cada animal. Gráfico C – Variação de peso relativo entre os grupos em 63 e 98 dias pós terapia. As células isoladas e em microesferas foram injetadas no dia 0. No dia 35, o grupo microesferas apresentou diferença de 8,6% em relação ao grupo controle ($p=0,019$ – $n=5$). Após esse período, o grupo células isoladas praticamente manteve o peso até 77 dias, quando apresentou uma diferença no peso relativo de 7,5% em relação ao grupo controle ($p=0,049$ – $n=5$). Nesse mesmo período a diferença de peso entre microesferas e grupo controle foi de 16,6% ($p<0,0001$ – $n=5$) e entre o grupo microesferas e células isoladas foi de 9,1% ($p=0,028$ – $n=5$). No dia 98 o grupo microesfera apresentou o valor mais baixo na diferença relativa de peso (27,5%) em relação ao grupo controle ($p<0,0001$ – $n=5$), enquanto o grupo células isoladas apresentou diferença de 8,0% em relação ao controle ($p=0,032$ – $n=5$). No gráfico C, podemos notar que os animais que receberam microesferas pesavam após três meses, 14,7% a menos do peso inicial. Em relação ao grupo controle, o grupo microesferas obteve uma redução de 27,5% do peso, o equivalente a 15g e em relação ao grupo células isoladas uma diferença de 19,6% ($p=0,0001$ – $n=5$). Os animais que receberam microesferas pesavam após três meses, 14,7% a menos do peso inicial. Em relação ao grupo

controle, o grupo microesferas obteve uma redução de 27,5% do peso, o equivalente a 15g e em relação ao grupo células isoladas uma diferença de 19,6% ($p=0,0001$ – $n=5$).

4.10.2 Avaliação de Leptina *in vivo* pós terapia celular

Após o transplante de AD-ASC, a leptina circulante foi dosada em soro de animais ob/ob nos dias 63 (gráfico 18-A) e 98 (gráfico 18-B). Ao todo foram analisados quatro animais de cada grupo, sendo que um animal do grupo células isoladas no dia 98 não foi possível realizar por problemas técnicos. Cada animal foi plotado de forma independente indicando uma correlação entre a leptina circulante e a perda de peso relativa observada no dia correspondente. No dia 68, somente 3 dos animais que receberam microesferas apresentaram valores superiores ao limite de detecção (50 pg/mL) pelo kit Elisa: 120,0 pg/mL; 108,7 pg/mL; 84,8 pg/mL.

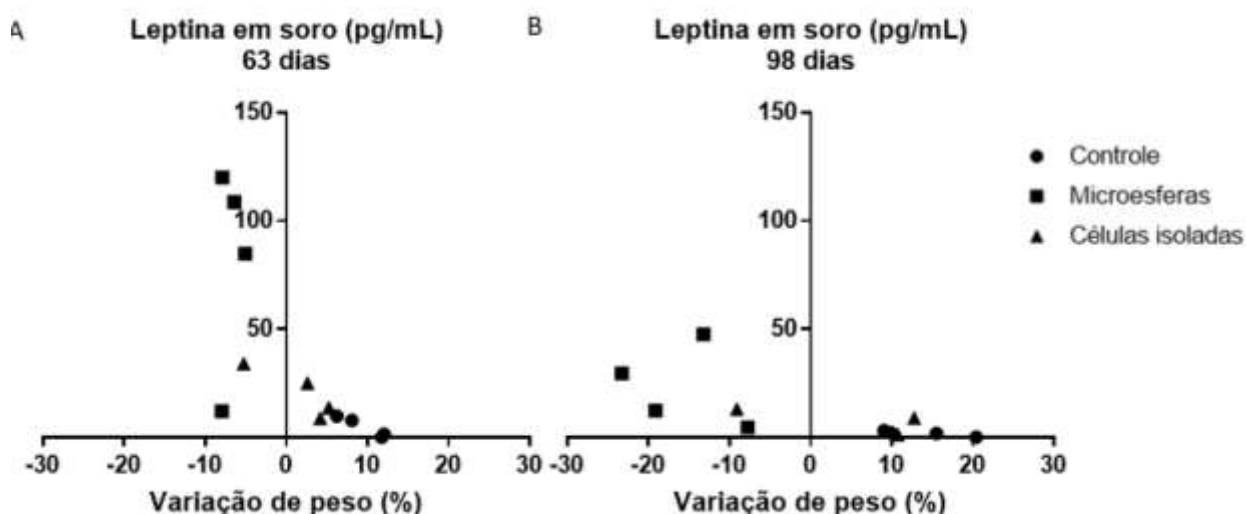


Figura 18: Verificação entre leptina circulante em animais ob/ob pós terapia celular e variação de peso relativo ao inicial plotados de forma independentes. A – após 63 dias e B - após 98 dias. Após 63 dias, 3 animais do grupo microesfera ainda apresentavam leptina circulante. Após 98 dias, nenhum animal apresentou leptina circulante acima dos níveis de detecção.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Uma grande parte dos procedimentos de reparo de tecidos moles resultantes de lesão traumática, ressecção de tumores, defeitos congênitos ou processo de envelhecimento são realizados com tecido adiposo. Apesar dos esforços para melhorar este procedimento, problemas como a absorção progressiva de enxertos de gordura ainda são estudados (109). Acredita-se que a redução do volume adiposo esteja relacionada com a vascularização insuficiente do tecido adiposo enxertado (110). Por outro lado, o tecido adiposo em um organismo é altamente vascularizado com propriedades de angiogênese extensas e redes capilares ao redor de cada adipócito (111, 112).

Diante dessas propriedades, neste trabalho foi realizada uma terapia utilizando microesferas de adipócitos para atuar não na regeneração tecidual, mas como um agente terapêutico. Além disso, foi testado se microesferas por serem maiores que células, poderiam aumentar a taxa de retenção observada nas terapias atuais.

Dentre as possíveis estratégias, utilizamos a que as células após isoladas, são cultivadas e semeadas com agentes adipogênicos para posterior aplicação (113-117). As células ou estruturas teciduais são então levadas para um local do corpo onde a formação de tecido adiposo é esperada (118).

Conforme observado por coloração de gotículas de lipídeos e marcadores moleculares foi possível demonstrar que o start adipogênico foi capaz de comprometer ASCs a se diferenciar em adipócitos e expressar leptina após 20 dias da diferenciação.

A simples injeção dessas células isoladas e diferenciadas até o dia 8 foi suficiente para se verificar a estabilidade do peso dos animais, enquanto o grupo controle manteve o ganho de peso. Além disso, as células em formatos de microestruturas esféricas proporcionaram uma retenção celular mais prolongada e um efeito terapêutico mais potente.

Neste modelo, padronizamos a terapia utilizando as maiores microesferas produzidas *in vitro* e que não sofreram alterações na morfologia após o teste da agulha, isto é, microesferas com diâmetro de 250µm. Além disso, as microesferas puderam ser cultivadas sem contato com o plástico; e estudos recentes mostram também a capacidade de as manter em cultura sem a utilização de soro quando estão neste formato (100). Essas características ampliam a capacidade de um protocolo mais translacional já que contornam pontos críticos para utilização clínica.

Outro ponto importante é que, ao compararmos essa terapia com outros trabalhos que utilizaram leptina exógena, verifica-se que curiosamente os efeitos observados podem ser comparados com doses específicas. Pode-se verificar que uma única dose de células isoladas foi eficiente para manter o peso dos animais, equivalente ao efeito da leptina exógena na concentração de 1 mg/Kg/dia (Figura 19).

Curiosamente, as microesferas passaram a apresentar uma resposta mais eficiente após 35 dias. A partir desse momento o efeito foi intermediário às doses diárias de 1 e 10 mg/Kg/dia de leptina (Figura 19), entretanto em um período mais longo (1 mês x 3 meses). Novos estudos deverão ser feitos para entender esse período refratário e explicar se tais efeitos são devido a uma necessidade

de as células se tornarem-se mais maduras *in vivo* ou até mesmo se nesse tipo de terapia há um efeito tardio da leptina.

Em um outro estudo realizado por Jeffrey L. Halaas et al. (83) também são mostrados os efeitos da leptina exógena durante 30 dias de tratamento. Neste estudo foram utilizados 5 mg/kg/dia de leptina exógena e os dados foram apresentados em peso corporal absoluto. Dessa forma, quando normalizamos nossos dados pelo peso médio dos animais (53 g), para estabelecermos um novo comparativo com este trabalho, notamos que a dose de células utilizada não ocasionou a perda de peso até o dia 30. Por outro lado a dose de 5 mg/Kg/dia de leptina exógena reduziu em torno de 20 g cada animal após 30 dias (figura 20). Esses dados sugerem que a terapia celular na dose de 1×10^6 células por camundongo deve ser realizado para manutenção do peso corporal e possui efeitos menos bruscos quando comparados com 5 mg/Kg/dia leptina exógena.

Outro ponto importante está no fato dos animais que receberam microesferas atingirem uma média de redução de peso de aproximadamente 14,7% após aproximadamente 100 dias, enquanto a leptina exógena na concentração de 10mg/kg/dia levou 30 dias para reduzir 20% do peso. Isso pode nos levantar questões como se outras doses de microesferas podem resultar em ações mais potentes do que a leptina exógena nessa concentração. Além disso, a presença de leptina em 75% dos animais analisados após aproximadamente 2 meses mostra que a retenção e/ou sobrevivência das microesferas está maior nesse grupo quando comparado às células isoladas. Diante dessas observações, mais estudos poderão abrir perspectivas para terapias de reposição enzimática com doses mais frequentes de microesferas.

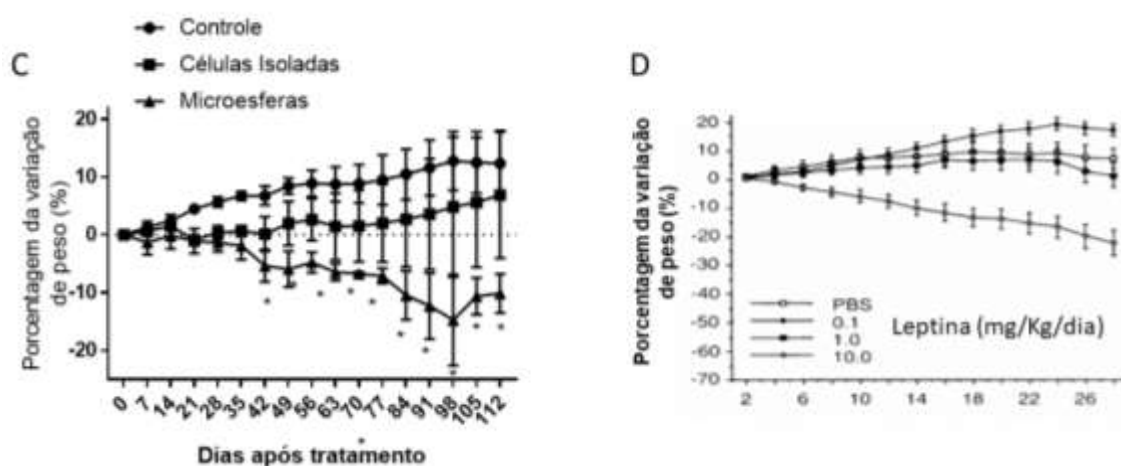


Figura 19: Análise comparativa dos resultados da terapia celular com AD-ASC em microesferas e células isoladas em relação ao trabalho de Pelleymounter, M.A et al. (84) pós tratamento com leptina exógena. Nota-se que, após aproximadamente 1 mês de tratamento com microesferas, houve uma redução do peso dos animais similar ao tratamento com leptina exógena.

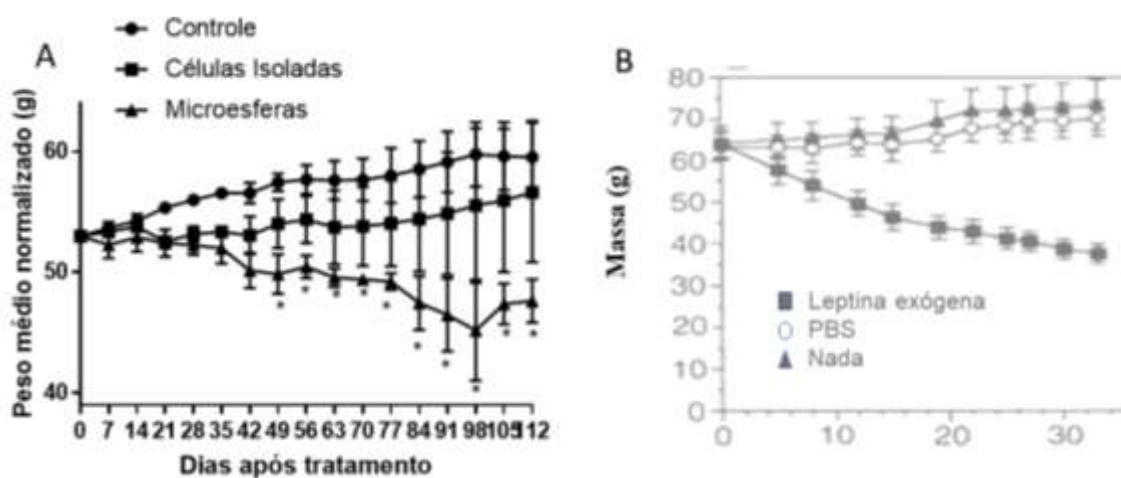


Figura 20: Comparativo de peso entre terapia celular de AD-ASC (isoladas e microesferas) com leptina exógena (5mg/Kg/dia) de Jeffrey L. Halaas et al. O peso foi normalizado pela média e submetido as variações relativas de cada animal.

Diversos protocolos de terapia celular têm sido realizados pelo mundo utilizando células isoladas. Dentre elas podemos citar por exemplo, os testes na deficiência de lipoproteína lipase (LPL) com a utilização de três linhagens

diferentes de células: muscular (C2C12), células renais (HEK293T) e pré-adipócitos (3T3-L1). Curiosamente os resultados em animais que receberam a linhagem 3T3-L1 foi cinco vezes superior na expressão da atividade da LPL (119). Protocolos de microesferas nesse tipo de estudo podem trazer resultados ainda melhores já que ambos foram bem-sucedidos em células de linhagem adiposa.

Nos últimos anos alguns trabalhos começaram a surgir e demonstrar que a terapia com microestruturas é mais eficiente quando comparada com células isoladas. Em um trabalho recente realizado o transplante em camundongos diabéticos com ilhotas micro encapsuladas em conjunto com células-tronco mostrou normoglicemia significativamente prolongada quando comparadas com ilhotas isoladas (120).

Um outro estudo em animais também conseguiu contornar a incapacidade de manter rotineiramente a sobrevivência e a localização de células terapêuticas injetadas. Nesse trabalho foram encapsuladas células formadoras de colônias endoteliais (ECFCs) em microesferas de hidrogel de polietilenoglicol-fibrinogênio usando um dispositivo microfluídico customizado. Uma semana após a injeção das microesferas próximas à ferida de patas de cavalos as análises demonstraram uma melhor retenção e sobrevivência das ECFCs (121).

Microesferas também tem sido utilizados em estruturas 3D constituídas de alginato, o que tem demonstrado resultados bem promissores no campo da terapia celular de reparo cardíaco (122) e em sistema de *drug delivery* com liberação lenta de drogas (123). Diante desses dados, é possível que a combinação das microesferas aqui produzidas com alginato poderá produzir

resultados mais refinados em terapias que exigem doses terapêuticas controladas.

Vale ressaltar que o transplante de tecido adiposo branco em animais ob/ob já foi demonstrado reverter as alterações metabólicas, imunológicas e inflamatórias da síndrome metabólica e redução do peso corporal em até 50% (124, 125). Entretanto, o transplante de tecido é limitado às técnicas *in vitro* que envolvem manipulações genéticas além de exigir a própria etapa do transplante. O transplante de tecido adiposo promove uma quantidade de leptina circulante de aproximadamente 15-25% dos níveis normais circulantes. Neste trabalho, 75% dos animais que receberam microesferas e emagreceram durante 3 meses possuíam aproximadamente de 5-10% dos níveis normais de leptina circulante após 2 meses da terapia.

O transplante de células em geral pode ser autólogo, alogênico e singênico e para evitar as consequências de rejeições do hospedeiro versus enxerto, recomenda-se a tipagem tecidual de antígenos leucocitários humanos (HLA) para transplante de tecidos e órgãos, bem como o uso de imunossuppressores (126). Dessa forma, a utilização dessa terapia poderá ser realizada de forma alogênica em casos de compatibilidade na tipagem de HLA ou autóloga, seguida de manipulação genética das células *in vitro*, envolvendo as técnicas mais modernas de edição de genoma, como o sistema CRISPR/Cas9.

Em nosso grupo de pesquisa, trabalhamos no diagnóstico de pacientes com doenças monogênicas (127, 128), mecanismos da obesidade (129-131) e o desenvolvimento de tratamentos mais eficientes para essas condições. Os pacientes acometidos com tais doenças sofrem não só com a própria patologia,

mas com a terapia de reposição enzimática diária ou semanal além dos altos custos terapêuticos. Uma parte desses pacientes realizam seus tratamentos na UNIFESP no Instituto de Genética e Erros Inatos do Metabolismo, com o qual realizamos parceria. Os custos para doença de Fabry, por exemplo, variam em torno de 13-14,5 milhões de dólares durante a vida de um paciente sintomático (132). Dessa forma, visamos testar o protocolo desenvolvido nesse trabalho na reversão das patologias desenvolvidas pelas alterações genéticas encontradas nesses pacientes, tornando o processo mais fácil, barato e com aumento significativo na qualidade de vida. Para isso, modelos de roedores transgênicos para essas patologias tais como doença de Fabry, Pompe, mucopolissacaridoses, dentre outras, poderão ser utilizados a fim de verificarmos se o sistema de *delivery* de células fará o papel de reposição das moléculas ausentes ou defeituosas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Com base nesses resultados podemos concluir que os dados apresentados aqui foram realizados utilizando um modelo de rápida observação sobre a eficiência terapêutica de injeção de células AD-ASCs em formato de microesferas, objetivando-se alcançar um protocolo eficiente e promissor. Como isso surgem novas perspectivas de tratamento para a obesidade e outras doenças monogênicas.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766-81.
2. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)*. 2008;32(9):1431-7.
3. Power C, Pinto Pereira SM, Law C, Ki M. Obesity and risk factors for cardiovascular disease and type 2 diabetes: investigating the role of physical activity and sedentary behaviour in mid-life in the 1958 British cohort. *Atherosclerosis*. 2014;233(2):363-9.
4. Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertens Res*. 2010;33(5):386-93.
5. van der Leeuw J, van der Graaf Y, Nathoe HM, de Borst GJ, Kappelle LJ, Visseren FL, et al. The separate and combined effects of adiposity and cardiometabolic dysfunction on the risk of recurrent cardiovascular events and mortality in patients with manifest vascular disease. *Heart*. 2014;100(18):1421-9.
6. McCrindle BW. Cardiovascular consequences of childhood obesity. *Can J Cardiol*. 2015;31(2):124-30.
7. Benedetto C, Salvagno F, Canuto EM, Gennarelli G. Obesity and female malignancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015;29(4):528-40.
8. Agalliu I, Williams S, Adler B, Androga L, Siev M, Lin J, et al. The impact of obesity on prostate cancer recurrence observed after exclusion of diabetics. *Cancer Causes Control*. 2015;26(6):821-30.
9. Wasserman L, Flatt SW, Natarajan L, Laughlin G, Matusalem M, Faerber S, et al. Correlates of obesity in postmenopausal women with breast cancer: comparison of genetic, demographic, disease-related, life history and dietary factors. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2004;28(1):49-56.
10. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J, Group IDFETFC. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
11. Rodrigo Alonso MF, Veronica Alvarez, Ada Cuevas. Translational Cardiometabolic Genomic Medicine - Chapter 7 - The Genetics of Obesity, In *Translational Cardiometabolic Genomic Medicine*. Academic Press. 2016:161-77.
12. Lyon HN, Hirschhorn JN. Genetics of common forms of obesity: a brief overview. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(1 Suppl):215S-7S.
13. Scuteri A SS, Chen W-M, Uda M, Albai G, Strait J, . Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet*. 2007.
14. Wang T, Ma X, Peng D, Zhang R, Sun X, Chen M, et al. Effects of Obesity Related Genetic Variations on Visceral and Subcutaneous Fat Distribution in a Chinese Population. *Sci Rep*. 2016;6:20691.
15. Sadaf Farooqi SOR. Genetic Syndromes Associated with Obesity. *Endocrinology: Adult and Pediatric (Seventh Edition)*. 2016:491-7.
16. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic human obesity syndromes. *Recent Prog Horm Res*. 2004;59:409-24.
17. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387(6636):903-8.
18. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 1998;18(3):213-5.

19. Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, Jones S, Gibson WT, Trussell R, et al. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature*. 2001;414(6859):34-5.
20. Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J. Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(10):3686-95.
21. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1093-103.
22. Dubuc PU. Basal corticosterone levels of young ob/ob mice. *Horm Metab Res*. 1977;9(1):95-7.
23. Dubuc PU, Carlisle HJ. Food restriction normalizes somatic growth and diabetes in adrenalectomized ob/ob mice. *Am J Physiol*. 1988;255(5 Pt 2):R787-93.
24. Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, et al. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med*. 1999;341(12):879-84.
25. Trayhurn P, Thurlby PL, James WP. Thermogenic defect in pre-obese ob/ob mice. *Nature*. 1977;266(5597):60-2.
26. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394(6696):897-901.
27. Matarese G. Leptin and the immune system: how nutritional status influences the immune response. *Eur Cytokine Netw*. 2000;11(1):7-14.
28. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;221(2):286-9.
29. Ohashi K, Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Sumitsuji S, et al. Adiponectin I164T mutation is associated with the metabolic syndrome and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(7):1195-200.
30. Mullis PE, Yoshimura N, Kuhlmann B, Lippuner K, Jaeger P, Harada H. Aromatase deficiency in a female who is compound heterozygote for two new point mutations in the P450arom gene: impact of estrogens on hypergonadotrophic hypogonadism, multicystic ovaries, and bone densitometry in childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(6):1739-45.
31. Obayashi H, Hasegawa G, Fukui M, Kamiuchi K, Kitamura A, Ogata M, et al. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(9):3348-51.
32. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*. 1998;102(7):1369-76.
33. Villuendas G, San Millan JL, Sancho J, Escobar-Morreale HF. The -597 G-->A and -174 G->C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1134-41.
34. Kristiansen OP, Nolsoe RL, Larsen L, Gjesing AM, Johannesen J, Larsen ZM, et al. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet*. 2003;12(10):1101-10.
35. Matthias Möhlig HB, Joachim Spranger, Martin Osterhoff, Anja Kroke, Eva Fisher Manuela M. Bergmann, Michael Ristow, Kurt Hoffmann, Andreas F. H. Pfeiffer. Body Mass Index and C-174G Interleukin-6 Promoter Polymorphism Interact in Predicting Type 2 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(4).

36. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, Muller-Scholze S, Rathmann W, Koenig W, et al. Significant association of the interleukin-6 gene polymorphisms C-174G and A-598G with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(10):5053-8.
37. Berthier MT, Paradis AM, Tchernof A, Bergeron J, Prud'homme D, Despres JP, et al. The interleukin 6-174G/C polymorphism is associated with indices of obesity in men. *J Hum Genet.* 2003;48(1):14-9.
38. Pawlikowska L, Tran MN, Achrol AS, McCulloch CE, Ha C, Lind DL, et al. Polymorphisms in genes involved in inflammatory and angiogenic pathways and the risk of hemorrhagic presentation of brain arteriovenous malformations. *Stroke.* 2004;35(10):2294-300.
39. Chen Y, Pawlikowska L, Yao JS, Shen F, Zhai W, Achrol AS, et al. Interleukin-6 involvement in brain arteriovenous malformations. *Ann Neurol.* 2006;59(1):72-80.
40. Chagastelles PC, Nardi NB, Camassola M. Biology and applications of mesenchymal stem cells. *Sci Prog.* 2010;93(Pt 2):113-27.
41. Ahrlund-Richter L, De Luca M, Marshak DR, Munsie M, Veiga A, Rao M. Isolation and production of cells suitable for human therapy: challenges ahead. *Cell Stem Cell.* 2009;4(1):20-6.
42. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* 2003;101(9):3722-9.
43. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation.* 2003;75(3):389-97.
44. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99(10):3838-43.
45. Ye L, Robertson MA, Mastracci TL, Anderson RM. An insulin signaling feedback loop regulates pancreas progenitor cell differentiation during islet development and regeneration. *Dev Biol.* 2016;409(2):354-69.
46. Salguero-Aranda C, Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Hitos AB, Diaz I, Hmadcha A, et al. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells toward Functional Pancreatic beta-Cell Surrogates through Epigenetic Regulation of Pdx1 by Nitric Oxide. *Cell Transplant.* 2016;25(10):1879-92.
47. Bruin JE, Saber N, Braun N, Fox JK, Mojibian M, Asadi A, et al. Treating diet-induced diabetes and obesity with human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitor cells and antidiabetic drugs. *Stem Cell Reports.* 2015;4(4):605-20.
48. Agarwal A, Brayman KL. Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. *Semin Intervent Radiol.* 2012;29(2):90-8.
49. Schuetz C, Markmann JF. Islet cell transplant: Update on current clinical trials. *Curr Transplant Rep.* 2016;3(3):254-63.
50. Yu Y, Fisher JE, Lillegard JB, Rodysill B, Amiot B, Nyberg SL. Cell therapies for liver diseases. *Liver Transpl.* 2012;18(1):9-21.
51. Follenzi A, Benten D, Novikoff P, Faulkner L, Raut S, Gupta S. Transplanted endothelial cells repopulate the liver endothelium and correct the phenotype of hemophilia A mice. *J Clin Invest.* 2008;118(3):935-45.
52. Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(3):808-13.
53. Liras A. Gene therapy for haemophilia: the end of a 'royal pathology' in the third millennium? *Haemophilia.* 2001;7(5):441-5.
54. Liras A, Olmedillas S. Gene therapy for haemophilia...yes, but...with non-viral vectors? *Haemophilia.* 2009;15(3):811-6.

55. Mizuno H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(2):56-66.
56. da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(2):221-9.
57. Hassan WU, Greiser U, Wang W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. *Wound Repair Regen.* 2014;22(3):313-25.
58. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):150-4.
59. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology.* 2015;71(2):181-97.
60. Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):807-15.
61. Bhukhai K, de Dreuz E, Giorgi M, Colomb C, Negre O, Denaro M, et al. Ex Vivo Selection of Transduced Hematopoietic Stem Cells for Gene Therapy of beta-Hemoglobinopathies. *Mol Ther.* 2018;26(2):480-95.
62. Bakondi B. In vivo versus ex vivo CRISPR therapies for retinal dystrophy. *Expert Rev Ophthalmol.* 2016;11(6):397-400.
63. Naldini L. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet.* 2011;12(5):301-15.
64. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11-22.
65. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* 2011;9:52.
66. Ratcliffe E, Glen KE, Naing MW, Williams DJ. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Br Med Bull.* 2013;108:73-94.
67. Mavroudi M, Zarogoulidis P, Porpodis K, Kioumis I, Lampaki S, Yarmus L, et al. Stem cells' guided gene therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy. *J Cancer Res Ther (Manch).* 2014;2(1):22-33.
68. Calne RY, Gan SU, Lee KO. Stem cell and gene therapies for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2010;6(3):173-7.
69. Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1987;64(4):832-5.
70. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988;106(6):2139-51.
71. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995;18(12):1417-26.
72. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science.* 1998;279(5356):1528-30.
73. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998;238(1):265-72.
74. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-7.
75. Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, dos Santos-Junior GR, Saint-Clair D, Bajgelman MC, et al. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. *Stem Cells Dev.* 2011;20(4):661-70.
76. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.

77. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *Obes Res*. 1996;4(1):101.
78. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
79. Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, et al. Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature*. 1997;387(6629):206-9.
80. Hamilton BS, Paglia D, Kwan AY, Deitel M. Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans. *Nat Med*. 1995;1(9):953-6.
81. Harris RB, Ramsay TG, Smith SR, Bruch RC. Early and late stimulation of ob mRNA expression in meal-fed and overfed rats. *J Clin Invest*. 1996;97(9):2020-6.
82. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995;269(5223):546-9.
83. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, et al. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science*. 1995;269(5223):543-6.
84. Pellemounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995;269(5223):540-3.
85. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996;84(3):491-5.
86. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes*. 1996;45(11):1455-62.
87. Licinio J, Mantzoros C, Negrao AB, Cizza G, Wong ML, Bongiorno PB, et al. Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med*. 1997;3(5):575-9.
88. Knebel B, Goeddeke S, Poschmann G, Markgraf DF, Jacob S, Nitzgen U, et al. Novel Insights into the Adipokine of Obese and Obese/Diabetic Mouse Models. *Int J Mol Sci*. 2017;18(9).
89. Houseknecht KL, Portocarrero CP. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol*. 1998;15(6):457-75.
90. Bray GA, York DA. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*. 1979;59(3):719-809.
91. Harris RB, Zhou J, Redmann SM, Jr., Smagin GN, Smith SR, Rodgers E, et al. A leptin dose-response study in obese (ob/ob) and lean (+/?) mice. *Endocrinology*. 1998;139(1):8-19.
92. Weigle DS, Bukowski TR, Foster DC, Holderman S, Kramer JM, Lasser G, et al. Recombinant ob protein reduces feeding and body weight in the ob/ob mouse. *J Clin Invest*. 1995;96(4):2065-70.
93. Baraniak PR, McDevitt TC. Scaffold-free culture of mesenchymal stem cell spheroids in suspension preserves multilineage potential. *Cell Tissue Res*. 2012;347(3):701-11.
94. Cha HM, Kim SM, Choi YS, Kim DI. Scaffold-free three-dimensional culture systems for mass production of periosteum-derived progenitor cells. *J Biosci Bioeng*. 2015;120(2):218-22.
95. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Bazhanov N, Kuhlman J, Prockop DJ. Dynamic compaction of human mesenchymal stem/precursor cells into spheres self-activates caspase-dependent IL1 signaling to enhance secretion of modulators of inflammation and immunity (PGE2, TSG6, and STC1). *Stem Cells*. 2013;31(11):2443-56.
96. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):486-98.
97. Suzuki S, Muneta T, Tsuji K, Ichinose S, Makino H, Umezawa A, et al. Properties and usefulness of aggregates of synovial mesenchymal stem cells as a source for cartilage regeneration. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(3):R136.

98. Ylostalo JH, Bartosh TJ, Coble K, Prockop DJ. Human mesenchymal stem/stromal cells cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype. *Stem Cells*. 2012;30(10):2283-96.
99. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, et al. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(31):13724-9.
100. Dromard C, Bourin P, Andre M, De Barros S, Casteilla L, Planat-Benard V. Human adipose derived stroma/stem cells grow in serum-free medium as floating spheres. *Exp Cell Res*. 2011;317(6):770-80.
101. Green H, Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*. 1975;5(1):19-27.
102. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297.
103. Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, et al. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009;18(5):683-92.
104. Assis AC, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RL, Castanheira P, Diniz SO, et al. Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant*. 2010;19(2):219-30.
105. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003;108(7):863-8.
106. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation*. 2005;112(10):1451-61.
107. Ninomiya Y, Sugahara-Yamashita Y, Nakachi Y, Tokuzawa Y, Okazaki Y, Nishiyama M. Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(2):303-8.
108. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*. 2012;425(1):88-90.
109. Katz AJ, Lull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg*. 1999;26(4):587-603, viii.
110. Nguyen A, Pasyk KA, Bouvier TN, Hassett CA, Argenta LC. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. *Plast Reconstr Surg*. 1990;85(3):378-86; discussion 87-9.
111. Sierra-Honigsmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998;281(5383):1683-6.
112. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*. 1997;4(2):211-32.
113. Walton RL, Beahm EK, Wu L. De novo adipose formation in a vascularized engineered construct. *Microsurgery*. 2004;24(5):378-84.
114. Vashi AV, Abberton KM, Thomas GP, Morrison WA, O'Connor AJ, Cooper-White JJ, et al. Adipose tissue engineering based on the controlled release of fibroblast growth factor-2 in a collagen matrix. *Tissue Eng*. 2006;12(11):3035-43.
115. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2003;24(14):2513-21.
116. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. Time course of de novo adipogenesis in matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. 2002;8(4):603-13.

117. Hiraoka Y, Yamashiro H, Yasuda K, Kimura Y, Inamoto T, Tabata Y. In situ regeneration of adipose tissue in rat fat pad by combining a collagen scaffold with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1475-87.
118. Patrick CW, Jr., Chauvin PB, Hobley J, Reece GP. Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng.* 1999;5(2):139-51.
119. Wu W, Yin Y, Zhong J, Peng Y, Li S, Zheng L, et al. Cell therapy could be a potential way to improve lipoprotein lipase deficiency. *Lipids Health Dis.* 2017;16(1):189.
120. Montanari E, Meier RPH, Mahou R, Seebach JD, Wandrey C, Gerber-Lemaire S, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells enhance insulin secretion from human islets via N-cadherin interaction and prolong function of transplanted encapsulated islets in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):199.
121. Seeto WJ, Tian Y, Winter RL, Caldwell FJ, Wooldridge AA, Lipke EA. Encapsulation of Equine Endothelial Colony Forming Cells in Highly Uniform, Injectable Hydrogel Microspheres for Local Cell Delivery. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(11):815-25.
122. Leor J, Aboulafia-Etzion S, Dar A, Shapiro L, Barbash IM, Battler A, et al. Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium? *Circulation.* 2000;102(19 Suppl 3):III56-61.
123. Wang F, He S, Chen B. Retinoic acid-loaded alginate microspheres as a slow release drug delivery carrier for intravitreal treatment. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:722-8.
124. Klebanov S, Astle CM, DeSimone O, Ablamunits V, Harrison DE. Adipose tissue transplantation protects ob/ob mice from obesity, normalizes insulin sensitivity and restores fertility. *J Endocrinol.* 2005;186(1):203-11.
125. Sennello JA, Fayad R, Pini M, Gove ME, Fantuzzi G. Transplantation of wild-type white adipose tissue normalizes metabolic, immune and inflammatory alterations in leptin-deficient ob/ob mice. *Cytokine.* 2006;36(5-6):261-6.
126. Petersdorf EW, Malkki M, Gooley TA, Martin PJ, Guo Z. MHC haplotype matching for unrelated hematopoietic cell transplantation. *PLoS Med.* 2007;4(1):e8.
127. Turaca LT, de Faria DO, Kyosen SO, Teixeira VD, Motta FL, Pessoa JG, et al. Novel GAA mutations in patients with Pompe disease. *Gene.* 2015;561(1):124-31.
128. Turaca LT, Pessoa JG, Motta FL, Munoz Rojas MV, Muller KB, Lourenco CM, et al. New mutations in the GLA gene in Brazilian families with Fabry disease. *J Hum Genet.* 2012;57(6):347-51.
129. de Picoli Souza K, da Silva ED, Batista EC, Reis FC, Silva SM, Castro CH, et al. Early pharmacological inhibition of angiotensin-I converting enzyme activity induces obesity in adulthood. *Front Pharmacol.* 2015;6:75.
130. Morais RL, Silva ED, Sales VM, Filippelli-Silva R, Mori MA, Bader M, et al. Kinin B1 and B2 receptor deficiency protects against obesity induced by a high-fat diet and improves glucose tolerance in mice. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2015;8:399-407.
131. Mori MA, Sales VM, Motta FL, Fonseca RG, Alenina N, Guadagnini D, et al. Kinin B1 receptor in adipocytes regulates glucose tolerance and predisposition to obesity. *PLoS One.* 2012;7(9):e44782.
132. Rombach SM, Hollak CE, Linthorst GE, Dijkgraaf MG. Cost-effectiveness of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:29.