



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ISA CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA DISTRIBUIÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IRRADIADAS**

Recife
2022

ISA CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA DISTRIBUIÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS IRRADIADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Coorientador: Jonas Sérgio de Oliveira Filho

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Isa Cordeiro da.

Análise Computadorizada da Distribuição de Células-Tronco Mesenquimais Irradiadas / Isa Cordeiro da Silva. - Recife, 2022.

51 : il., tab.

Orientador(a): Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra

Cooorientador(a): Jonas Sérgio de Oliveira Filho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, anexos.

1. Análise computadorizada. 2. Cultura celular. 3. Células-tronco mesenquimais. 4. Distribuição celular. 5. Radiação Ionizante. I. Bezerra, Mariana Brayner Cavalcanti Freire . (Orientação). II. Oliveira Filho, Jonas Sérgio de . (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

ISA CORDEIRO DA SILVA

**ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA DISTRIBUIÇÃO DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS IRRADIADAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Aprovada em: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Energia Nuclear

Me. Wyndly Daniel Cardoso Gaião
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Fisiologia e Farmacologia

Prof. Dr. Thiago de Salazar e Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

Dedico este trabalho a minha amada família pela sua fé em minha pessoa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora professora Mariana Brayner Cavalcanti pelo acolhimento, apoio, ensino e por disponibilizar diversas oportunidades para meu crescimento pessoal e profissional desde a minha iniciação científica.

Ao meu coorientador Jonas Sérgio de Oliveira por aceitar esse desafio e por me guiar nessa reta final do curso e por toda a atenção e apoio.

Ao professor Thiago Salazar pela dedicação em ensinar, ouvir e discutir pautas que nos enche de interesse e reflexão mesmo nos dias mais ocupados.

Ao doutorando Wyndly Daniel, por estar presente do início ao fim dessa jornada científica como mentor e amigo.

Aos colegas do Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Professor Oleg Krasilnikov pela doação inestimável em conhecimento cedido dentro de um espaço acolhedor e pacífico.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, agradeço a vocês pelo afeto e confiança. Sinto-me acolhida por todos que decidi chamar eternamente de amigos.

Por fim, agradecer a minha família, especialmente aos meus pais Marcos e Aydée, por todo o carinho e cuidado. Graças a vocês eu me tornei tudo o que sou hoje.

I planned each charted course
Each careful step along the byway
And more, much more than this
I did it my way
But through it all
When there was doubt
I ate it up and spit it out
I faced it all and I stood tall
And did it my way.
(FRANK SINATRA, 1969)

SILVA, Isa Cordeiro da. **Análise Computadorizada Da Distribuição De Células-Tronco Mesenquimais Irradiadas**. 2022. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes e por sua imensa capacidade de proliferação e diferenciação, *in vitro*, as CTMs são utilizadas para estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante. A contagem de células e núcleos é um método bastante utilizado na prática laboratorial, visto que as informações quantitativas podem refletir a funcionalidade e arquitetura dos tecidos vivos. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o padrão de distribuição, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais irradiadas e não irradiadas. Foram utilizadas CTMs obtidas de cordões umbilicais humanos e cultivadas sob condições ideais pré-estabelecidas no Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (DBR/UFPE). Após a terceira passagem de cultivo, as CTMs foram divididas em dois grupos: o grupo irradiado e o grupo não irradiado (controle). O grupo irradiado foi exposto a dose de 2,5 Gy de radiação gama oriundas de uma fonte de cobalto-60 (Gammacell 220 Excel), localizada no Departamento de Energia Nuclear (CTG/UFPE). Após 2, 4, 8 e 16 dias de cultura pós-irradiação, as CTMs foram coradas com Giemsa para evidenciar a estrutura celular e nuclear. Para as análises, foram obtidas fotomicrografias das células após coloração. As fotomicrografias foram analisadas com auxílio do programa CODMS, onde foram detectados os núcleos celulares presentes na imagem e determinada a distância internuclear de uma célula para com todas as outras células em campo, obtidas em escala de pixels e usadas para avaliação do padrão de distribuição de cada grupo. Com a contagem das células, dos dados provenientes de 320 imagens apenas o 2º, 4º e 8º dia de cultura celular apresentaram diferença estatística significativa após a aplicação do teste U de Mann Whitney ($p < 0,05$). Em relação as distâncias internucleares, o grupo controle apresentou média de $346,05 \pm 42,4$ no 2º dia, de $357,99 \pm 27,9$ no 4º dia, de $382,04 \pm 15,3$ no 8º dia e $381,28 \pm 21,1$ no 16º dia de cultura. Enquanto que o grupo irradiado apresentou média de $345,84 \pm 37,5$ no 2º dia, de $330,78 \pm 50,1$ no 4º dia, de $368,80 \pm 37,1$ no 8º dia e $374,52 \pm 22,3$ no 16º dia de cultura celular. Dentre os grupos, apenas o correspondente ao 4º dia de cultura celular apresentou diferença significativa com a aplicação do teste U de Mann Whitney ($p < 0,05$). Ou seja, as células irradiadas diminuíram a sua replicação e ficaram mais próximas umas das outras. A capacidade de proliferação das CTMs pode ser afetada pela radiação de forma dose dependente. Em nossas análises observamos que após o 4º dia de cultura, o grupo irradiado apresenta queda brusca no número de células por campo, da mesma forma que se mantém mais próximas umas das outras devido a média das distâncias ser menor em comparação ao grupo controle. Em conclusão, a avaliação computadorizada da distribuição das CTMs em cultura mostrou ser um método simples e eficaz para a avaliação do crescimento e organização celular após irradiação.

Palavras-chave: Análise computadorizada. Cultura celular. Células-tronco mesenquimais. Distribuição celular. Radiação Ionizante.

SILVA, Isa Cordeiro da. **Computerized Analysis of Irradiated Mesenchymal Stem Cells Distribution**. 2022. 51. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent progenitor cells and because of their immense proliferation and differentiation capacity, *In vitro*, MSCs are used to study the biological effects of ionizing radiation. Cell and nucleus counting are a widely used method in laboratory practice, since quantitative information may reflect the functionality and architecture of living tissues. Thus, the objective of this work was to evaluate the distribution pattern, *in vitro*, of irradiated and non-irradiated mesenchymal stem cells. MSCs obtained from human umbilical cords and cultivated under ideal conditions pre-established in the Biophysics Laboratory of Membranes and Stem Cells Dr. Oleg Krasilnikov (DBR/UFPE) were used. After the third passage of cultivation, the MSCs were divided into two groups: the irradiated group and the non-irradiated group (control). The irradiated group was exposed to a dose of 2.5 Gy of gamma radiation from a cobalt-60 source (Gammacell 220 Excel), located in the Department of Nuclear Energy (CTG/UFPE). After 2, 4, 8 and 16 days of post-irradiation culture, the MSCs were cordoned with Giemsa to evidence the cellular and nuclear structure. For the analyses, photomicrographs of the cells after staining were obtained. The photomicrographs were analyzed with the aid of the CODMS program, where the cell nuclei present in the image were detected and the internuclear distance of a cell was determined to all other cells in the field, obtained on a pixel scale and used to evaluate the distribution pattern of each group. With the cell count, the data from 320 images only the 2nd, 4th and 8th day of cell culture showed significant statistical difference after the application of the Mann Whitney U test ($p < 0.05$). Regarding internuclear distances, the control group presented an average of 346.05 ± 42.4 on the 2nd day, of 357.99 ± 27.9 on the 4th day, of 382.04 ± 15.3 on the 8th day and 381.28 ± 21.1 on the 16th day of culture. While the irradiated group presented an average of 345.84 ± 37.5 on the 2nd day, of 330.78 ± 50.1 on the 4th day, of 368.80 ± 37.1 on the 8th day and 374.52 ± 22.3 on the 16th day of cell culture. Among the groups, only the one corresponding to the 4th day of cell culture showed significant difference with the application of the Mann Whitney U test ($p < 0.05$). That is, the irradiated cells decreased their replication and became closer to each other. The proliferation capacity of MSCs can be affected by dose-dependent radiation. In our analyses we observed that after the 4th day of culture, the irradiated group presents a sharp drop in the number of cells per field, in the same way that it remains closer to each other due to the average distances being smaller compared to the control group. In conclusion, the computerized evaluation of the distribution of MSCs in culture proved to be a simple and effective method for the evaluation of growth and cell organization after irradiation.

Key words: Cell culture. Cell distribution. Computerized analysis. Ionizing radiation. Mesenchymal stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células-tronco mesenquimais (100x)	17
Figura 2 – Processamento do cordão umbilical humano para obtenção de CTMs	25
Figura 3 – Interface do programa CODMS	28
Figura 4 – Ilustração do processamento das imagens para análise com auxílio do programa CODMS (100x)	28
Figura 5 – Fluxograma da metodologia empregada	29
Figura 6 – Fotomicrografias das CTMs coradas com Giemsa (100x)	30
Figura 7 – Gráficos relativos a contagem de células no 2º, 4º, 8º e 16º dia de cultura celular	32
Figura 8 – Ilustração da rede de conexões entre as CTMs (100x)	34
Figura 9 – Gráficos relativos a distâncias intercelulares no 2º, 4º, 8º e 16º dia de cultura celular	35
Figura 10 – Gráficos de distribuição das distâncias internucleares entre as CTMs de acordo com o tempo de cultivo celular	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise descritiva da contagem de células por grupo	31
Tabela 2 – Análise descritiva das distâncias intercelulares por grupo	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	16
2.1.1	Características	16
2.1.2	Localização	17
2.1.3	Obtenção	17
2.1.4	Importância Das Células-Tronco Mesenquimais Em Pesquisas	18
2.2	RADIOBIOLOGIA ENVOLVENDO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	18
2.2.1	Radiação Ionizante E Irradiação	19
2.2.2	Efeitos Biológicos Da Radiação Ionizante Nas Células-Tronco Mesenquimais	19
2.2.3	Comissão Internacional De Proteção Radiológica	20
2.3	ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL	20
2.3.1	Distribuição Espacial E Arquitetura Tecidual	21
2.3.2	Contagem De Células E Núcleos	21
2.3.3	Desenvolvimento De Softwares Especializados	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	24
4.2	OBTENÇÃO DOS CORDÕES UMBILICAIS HUMANOS	24
4.2.1	Coleta Dos Cordões Umbilicais Humanos	24
4.2.2	Isolamento Das Células-Tronco Mesenquimais	25
4.2.3	Cultura Celular	25
4.3	IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	26
4.3.1	Caracterização Dos Grupos De Células-Tronco Mesenquimais	26
4.3.2	Processo De Irradiação	26
4.4	COLORAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	26

4.4.1	Fixação	26
4.4.2	Coloração De Giemsa	26
4.5	OBTENÇÃO DAS IMAGENS DA CULTURA CELULAR	27
4.6	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR	27
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5	RESULTADOS	30
5.1	ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR	30
5.2	CONTAGEM DE CÉLULAS	30
5.3	DISTÂNCIAS INTERNUCLEARES	33
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXOS	47
	ANEXO A – Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco	48
	ANEXO B – Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	49

1 INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células progenitoras multipotentes, que se caracterizam pela sua capacidade de diferenciação em linhagens mesenquimais. Essas células são precursoras das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica, dando origem a adipócitos, osteócitos e condrócitos, respectivamente (KESTENDJIEVA et al., 2008).

A fonte mais usada em pesquisas para obtenção de CTMs é a medula óssea, porém pesquisas apontam que as CTMs podem ser obtidas a partir de fontes alternativas (ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIRNOV, 2003). Uma dessas fontes é o cordão umbilical, um anexo embrionário que possui potencial satisfatório como fonte para obtenção de CTMs, tanto quantitativamente quanto qualitativamente. Dele podemos extrair CTMs de toda a extensão da geléia de Wharton, um tecido conectivo que envolve os vasos sanguíneos do cordão (MORETTI et al., 2009; MUSHAHARY et al., 2018).

Por sua imensa capacidade de proliferação e diferenciação, *in vitro*, as CTMs são amplamente utilizadas para estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante, pois há interesse em conhecer como essas células respondem ao dano radioinduzido, uma vez que elas são amplamente empregadas em medicina regenerativa e engenharia tecidual (MORETTI et al., 2009; NICOLAY et al., 2013, 2015).

De acordo com as recomendações da Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) em seu relatório sobre a "Biologia das Células-tronco com Respeito aos Aspectos Carcinogênicos para Proteção Radiológica", preconiza que o conhecimento sobre as células-tronco (CTs) e sua regulação ajuda a fundamentar estimativas de risco, entendendo as suas projeções em diferentes cenários (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 2015).

Sendo assim, a ICRP define recomendações para estudos dos efeitos biológicos ocasionados pela interação das radiações ionizantes com as CTs. Dentre as recomendações destacam-se a revisão da sensibilidade das CTs às radiações ionizantes e os mecanismos mutacionais envolvidos, tanto em exposições com alta taxa de dose quanto em exposições com baixa taxa de dose (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 2015).

A contagem de células e núcleos é um método bastante utilizado na prática laboratorial e investigação clínica, visto que as informações quantitativas podem

refletir a funcionalidade de alguns tecidos. Este método requer contagem celular manual, sendo dependente de profissionais qualificados, grande demanda de tempo e equipamento adequado para os procedimentos com amostras biológicas (LOUKAS et al., 2003; O'BRIEN; HAYDER; PENG, 2016).

O programa desenvolvido tem a função de ler as fotomicrografias obtidas e detectar os núcleos por meio da coloração, desconsiderando o formato da membrana nuclear e a conformação da cromatina. Utilizando apenas um software para análise de imagens, há a formação de uma rede de ligamento entre os núcleos encontrados em cada imagem, dessa forma, o programa calcula a distância de um núcleo para com todos os outros gerando unidades em pixels para cada célula individualmente.

De acordo com Byun (2006, p. 953), um bom detector de núcleos deve ser preciso, simples, computacionalmente eficiente e aplicável. Satisfazendo estes requisitos, o detector proposto terá vantagens sobre a contagem manual atualmente disponível (BYUN et al., 2006).

Diante do exposto, a determinação do padrão de distribuição das células em cultura com esse método automatizado pode refletir as condições biológicas do tecido de origem por análise de imagens em cultura celular.

Este trabalho visa a categorização do padrão de distribuição das células-tronco mesenquimais irradiadas in vitro. Sendo assim, o interesse para o uso do programa CODMS, desenvolvido pela equipe, está diretamente relacionado à contribuição nas pesquisas de identificação de marcadores morfométricos de irradiação celular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células indiferenciadas. Essas células podem se multiplicar mantendo a sua população indiferenciada ou dar origem a células mais especializadas pela diferenciação (GRONTHOS et al., 2003).

O interesse nessas células pode ser explicado pelas aplicações de CTMs para tratamento com medicina regenerativa, a preferência na engenharia tecidual e o uso em testes clínicos e científicos (MORETTI et al., 2009). Ademais, essas células também despertam interesse para a radiobiologia no tocante a sua sensibilidade à radiação ionizante (MIELOCH; SUCHORSKA, 2015).

2.1.1 Características

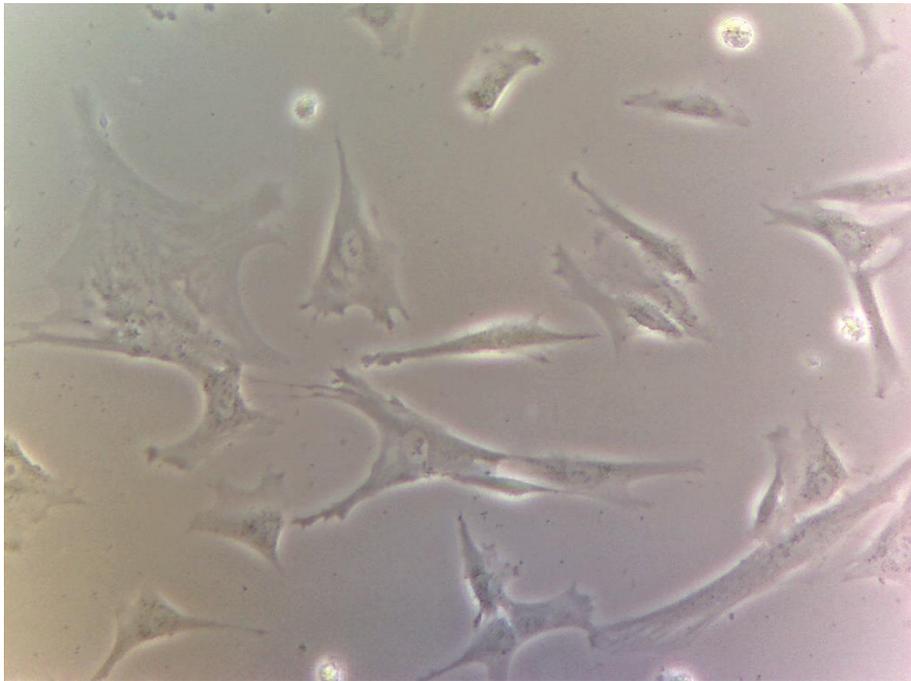
As CTMs são dotadas da capacidade de se diferenciarem e constituírem diferentes tecidos mesodérmicos. Porém, em condições experimentais controladas, essas células podem ser induzidas a transformar-se em células especializadas (BYDLOWSKI et al., 2009).

De todas as células-tronco já descritas, as CTMs são as que apresentam maior plasticidade, pois se diferenciam em linhagens mesodérmicas, caracterizando-se por ser uma população de células progenitoras multipotentes (BEERAVOLU et al., 2017). Essas células são precursoras da linhagem adipogênica, osteogênica e condrogênica, dando origem a células do tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso, respectivamente (PARK et al., 2014; SABEN et al., 2014; ZHANG et al., 2012).

As CTMs foram descritas primeiramente por Friedenstein e colaboradores em 1974, relatando que as CTMs aderem à placa de cultura e assemelham-se aos fibroblastos em morfologia (FRIEDENSTEIN et al., 1974). Após diversas pesquisas científicas, comprovou-se que as CTMs possuem morfologia alongada semelhante a fibroblastos, possuem nucléolo proeminente, citoplasma agranular e são aderentes ao plástico da garrafa de cultura (GRONTHOS et al., 2003; MUSHAHARY et al., 2018).

Na Figura 1 podemos visualizar as CTMs em cultura, apresentando formato alongado semelhante aos fibroblastos, núcleos centrais e aderentes a garrafa de cultura (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Células-tronco mesenquimais (100x)



Fonte: A autora (2022).

2.1.2 Localização

As CTMs podem ser encontradas em pequenas populações nos tecidos adultos humanos, tais quais a medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical e placenta (BEERAVOLU et al., 2017; GRONTHOS et al., 2003; HEO et al., 2016; KESTENDJIEVA et al., 2008; QIAO et al., 2008; WAGNER et al., 2005a). Correspondem a aproximadamente 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares, residindo em percentual semelhante nos outros sítios (BYDLOWSKI et al., 2009; PRECIADO et al., 2018). Entretanto, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência devido a sua imensa capacidade de proliferação in vitro (TROYER; WEISS, 2008).

2.1.3 Obtenção

As CTMs podem ser isoladas de uma ampla variedade de tecidos humanos, incluindo medula óssea, tecido adiposo, líquido sinovial, líquido amniótico, músculo esquelético, fígado, cordão umbilical, placenta, sangue periférico e entre outros (BEN-

AMI; BERRIH-AKNIN; MILLER, 2011; HEO et al., 2016; QIAO et al., 2008; REBELATTO et al., 2008; TROYER; WEISS, 2008; WANG et al., 2004).

A fonte mais usada para obtenção de CTMs é a medula óssea, porém, elas também podem ser obtidas a partir de fontes alternativas. Uma dessas fontes é o cordão umbilical, um anexo embrionário que possui potencial satisfatório como fonte para obtenção de células-tronco, tanto quantitativamente quanto qualitativamente (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007; KESTENDJIEVA et al., 2008; MUSHAHARY et al., 2018).

As CTMs do cordão umbilical podem ser coletadas do sangue, do sub-endotélio, da veia umbilical e de toda a extensão que compreende a geléia de Wharton, um tecido conectivo mucoso que envolve os vasos sanguíneos do cordão (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007; ROMANOV; SVINTSITSKAYA; SMIRNOV, 2003).

O procedimento de coleta do cordão é indolor, não invasivo e de menor custo financeiro, quando comparado à coleta de células a partir do aspirado de medula óssea, ainda considerada a fonte clássica de células-tronco. No entanto, o cordão umbilical é um anexo extraembrionário descartado após o parto, que pode ser coletado durante o processo cirúrgico do parto cesáreo (CAN; KARAHUSEYINOGLU, 2007).

2.1.4 Importância das Células-Tronco Mesenquimais em Pesquisas

Por sua imensa capacidade de proliferação e diferenciação, *in vitro*, as CTMs são amplamente utilizadas para estudo dos efeitos biológicos da radiação ionizante (NICOLAY et al., 2013, 2015).

O interesse nessas células pode ser explicado pelas aplicações de CTMs para tratamento com medicina regenerativa, a preferência na engenharia tecidual e o uso em testes clínicos e científicos (MORETTI et al., 2009). Ademais, essas células também despertam interesse para a radiobiologia no tocante a sua sensibilidade e os mecanismos das CTMs em resposta ao dano radioinduzido (CHEN et al., 2006; CHO et al., 2017; ISLAM et al., 2015).

2.2 RADIOBIOLOGIA ENVOLVENDO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

2.2.1 Radiação Ionizante E Irradiação

A interação da radiação com as células é uma função de probabilidade. A irradiação pode ocorrer devido a passagem de partículas ou deposição de energia no objeto alvo, podendo ocorrer a interação.

Quando as interações ocorrem ao nível celular, todo um órgão ou sistema no qual está inserido pode ser afetado (BOLUS, 2017). Por conseguinte, existe uma variedade de efeitos moleculares que podem desencadear alterações ou adaptações em um tecido saudável.

Após uma exposição, o período latente antes de qualquer resposta observável é variável (BOLUS, 2017). Esse período é determinado pela massa do corpo irradiado, homogeneidade da exposição, pela dose absorvida, taxa de dose e tipo de partícula (MACIÀ I GARAU; LUCAS CALDUCH; LÓPEZ, 2011).

Em relação ao dano, não há dano celular único quando mencionamos radiação, pois há dois tipos de interação possíveis. O dano direto, mais comumente mencionado, se refere a interação direta da radiação com o DNA nuclear que precede a quebra da fita simples ou da fita dupla. Ademais, o dano indireto se refere a interação da radiação com as moléculas de água que conseqüentemente sintetizam espécies reativas de oxigênio causando estresse oxidativo (BOLUS, 2017; MACIÀ I GARAU; LUCAS CALDUCH; LÓPEZ, 2011).

2.2.2 Efeitos Biológicos Da Radiação Ionizante Nas Células-Tronco Mesenquimais

No que se refere a sensibilidade, as CTMs mostram-se relativamente radorresistentes após exposição. As células mantêm a sua aderência à placa, sua morfologia se mantém característica e sua proliferação *in vitro* é afetada de forma dose dependente (LI; KWONG; CHAN, 2007; NICOLAY et al., 2013a; WANG et al., 2016).

Devido a variação da sensibilidade, preconiza-se que os mecanismos de reparo do DNA permaneçam mais eficientes pelo fato das CTMs permanecerem no seu estágio indiferenciado. Por conseguinte, com a diferenciação essas células tenderiam a tornar-se mais sensíveis (MIELOCH; SUCHORSKA, 2015).

A resistência das CTMs já foi apresentada em alguns estudos, mostrando que estas células são capazes de manter suas características fisiológicas e o seu potencial de diferenciação mesmo quando expostas a 4, 8, 10 ou 16 Gy (ISLAM et al., 2015; LI; KWONG; CHAN, 2007; NICOLAY et al., 2013a; WANG et al., 2016).

Como as CTMs permanecem em estado quiescente o seu ciclo celular permanece lento, desse modo conferindo uma maior radiorresistência em termos de viabilidade (LAN et al., 2012). Porém, esse mecanismo não impede a célula de manter a renovação da sua população, apenas reduzindo a sobrevivência das CTMs de forma dose dependente e alterando seu metabolismo como resposta ao estresse genotóxico (LAN et al., 2012).

Após irradiação, as CTMs não perdem sua capacidade de diferenciação, mas essa capacidade pode ser alterada. Devido a isso, a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, pode comprometer a diferenciação para a linhagem adipogênica enquanto aparentemente aumenta a diferenciação para a linhagem osteogênica (PRECIADO et al., 2018; ZHANG et al., 2012).

2.2.3 Comissão Internacional De Proteção Radiológica

De acordo com as recomendações da Comissão Internacional de Proteção Radiológica (ICRP) em seu relatório sobre a "Biologia das Células-tronco com Respeito aos Aspectos Carcinogênicos para Proteção Radiológica", preconiza que o conhecimento sobre as células-tronco e sua regulação ajuda a fundamentar estimativas de risco, entendendo as suas projeções em diferentes cenários (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 2015).

Sendo assim, a ICRP define recomendações para estudos dos efeitos biológicos ocasionados pela interação das radiações ionizantes com as células-tronco. Dentre as recomendações destacam-se a revisão da sensibilidade das células-tronco às radiações ionizantes e os mecanismos mutacionais envolvidos, tanto em exposições com alta taxa de dose quanto em exposições com baixa taxa de dose (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 2015).

2.3 ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL

Existem variadas formas e métodos para a investigação do crescimento de células, as mais comuns refletem a viabilidade, padrões genéticos e metabólicos. Outra forma de observar e comparar o crescimento de células são a avaliação fenotípica e a fractal, utilizando para tal de softwares ou ferramentas automatizadas (VILELA et al., 2003).

Esses experimentos possibilitam a observação do comportamento individual e coletivo de linhagens celulares normais e cancerosas. Segundo Vilela e colaboradores (2003, p. 67), as propriedades conjuntas da transformação e da imortalização de células em cultura proporcionam um modelo para o estudo da formação de tumores (VILELA et al., 2003).

2.3.1 Distribuição Espacial E Arquitetura Tecidual

O número de células nos tecidos precisa ser controlado, por outro lado, quando há desenvolvimento de tumores o controle na divisão das células nos tecidos é desfeito pela perda do equilíbrio no meio (MACIÀ I GARAU; LUCAS CALDUCH; LÓPEZ, 2011).

Sabe-se que, após a exposição à radiação ionizante, ocorrem falhas reprodutivas nas células que mantém uma população dentro de um tecido. Essas falhas podem tender tanto para o aumento descontrolado da divisão celular, quanto para o bloqueio da mesma (BOLUS, 2017). Do mesmo modo, esse é o princípio tanto da formação de um tumor, quanto para o mecanismo utilizado para o seu tratamento, respectivamente (MURRAY; FLUX, 2021).

Em algum momento, quando as células proliferadoras de um tecido são alteradas pela exposição à radiação ionizante, todo o tecido originado por elas não se isenta da possibilidade de sofrer alterações estruturais e espaciais devido à dificuldade de reposição desse compartimento celular (MACIÀ I GARAU; LUCAS CALDUCH; LÓPEZ, 2011).

2.3.2 Contagem De Células E Núcleos

A contagem de células e núcleos é um método bastante utilizado na prática laboratorial e investigação clínica, visto que as informações quantitativas podem refletir a funcionalidade de alguns tecidos. Este método requer contagem celular

manual, sendo dependente de profissionais qualificados, grande demanda de tempo e equipamento adequado para os procedimentos com amostras biológicas (LOUKAS et al., 2003; O'BRIEN; HAYDER; PENG, 2016).

Para esse fim, a contagem normalmente é realizada com o auxílio de uma Câmara de Neubauer, uma lâmina especialmente projetada com uma câmara de contagem (RICARDO; PHELAN, 2008). Na rotina laboratorial, a Câmara de Neubauer necessita de um microscópio, pessoal qualificado e soluções específicas, como o Azul de Trypan (LOUIS; SIEGEL, 2011)

2.3.3 Desenvolvimento De Softwares Especializados

A implantação de máquinas automáticas e semi-automatizadas para a contagem de células surgiu com a finalidade de agilizar o processo, além de torna-lo mais preciso. Com isso, também foram desenvolvidos softwares e programas computadorizados para aprimoramento desse método. Por conseguinte, atualmente é possível utilizar softwares de imagens completos como o ImageJ e Icy Bioimage, que possuem alto poder de processamento e otimização de tempo (GRISHAGIN, 2015).

De acordo com Byun (2006, p. 953), um bom detector de núcleos deve ser preciso, simples, computacionalmente eficiente e aplicável. Satisfazendo estes requisitos, o detector proposto terá vantagens sobre a contagem manual atualmente disponível (BYUN et al., 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de 2,5 Gy de radiação gama sobre o crescimento e distribuição, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais irradiadas e não irradiadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar células-tronco mesenquimais obtidas a partir do cordão umbilical humano em condições ótimas;
- Calcular a distância entre os núcleos celulares de cada célula-tronco mesenquimal *in vitro*;
- Comparar as distâncias internucleares de células-tronco mesenquimais irradiadas com as distâncias internucleares das células-tronco mesenquimais não irradiadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, localizado no Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal de Pernambuco, sob número do parecer: 2.259.272 (CAAE: 67002117.0.0000.5208/ANEXO A).

Para a coleta dos cordões umbilicais utilizados, foi estabelecida uma parceria com o Hospital De Ávila (Recife, Pernambuco). Em termos gerais as parturientes foram devidamente esclarecidas em relação aos riscos, benefícios e sua participação na pesquisa, bem como dos procedimentos a serem adotados.

Única e exclusivamente após a concordância da parturiente ou seu representante legal, foi assinado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B) para doação do material biológico.

Foram incluídas na pesquisa apenas as parturientes maiores de 18 anos, que fizeram pré-natal e estavam saudáveis. Foram excluídas parturientes que apresentaram qualquer condição patológica ou que realizaram tratamentos quimioterápicos e/ou radioterápicos nos últimos 5 anos. A amostra foi, por conveniência, estimada em 2 cordões umbilicais.

4.2 OBTENÇÃO DOS CORDÕES UMBILICAIS HUMANOS

As amostras de cordões umbilicais foram obtidas exclusivamente durante parto cesáreo, e, após a coleta, os cordões foram transportados para o Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov (DBR/UFPE) onde foi realizada a obtenção das células-tronco mesenquimais e o seu cultivo *in vitro*.

4.2.1 Coleta Dos Cordões Umbilicais Humanos

Os cordões foram coletados em um recipiente estéril e adequado para transporte, contendo solução salina PBS 1x em EDTA (2 mM), antibióticos – penicilina (150 U/mL) e estreptomicina (150 µg/mL) e anfotericina (5 mg/mL), sendo

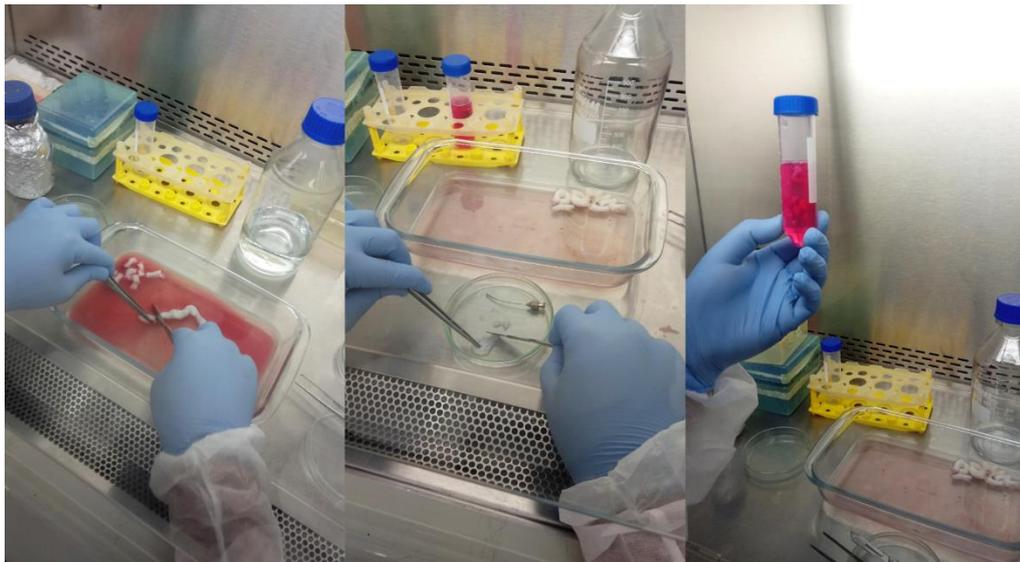
processados em condições ótimas pré-estabelecidas no Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Prof. Oleg Krasilnikov, no período de até 6 h após o parto (ALBERTIM, 2012, 2016; OLIVEIRA, 2010; VIEIRA, 2011).

4.2.2 Isolamento Das Células-Tronco Mesenquimais

Para o isolamento das células-tronco mesenquimais utilizamos a geléia de Wharton, retirando as artérias e veias do cordão umbilical. O tecido contendo a geléia de Wharton foi então cortado em pedaços em torno de 3 cm para o cultivo celular.

Na Figura 2 podemos observar as etapas do processamento do cordão umbilical obtido por parto cesáreo realizadas no Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-Tronco Prof. Oleg Krasilnikov (CCS/UFPE) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – Processamento do cordão umbilical humano para obtenção das CTMs



Fonte: A autora (2020).

4.2.3 Cultura Celular

Os pedaços do tecido correspondente a geléia de Wharton foram cultivados em garrafas plásticas de cultura, contendo meio DMEM baixa glicose (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB, LGC Biotecnologia), fator de crescimento (F12, Gibco) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). Em seguida, foram armazenados na estufa a 37°C, 80% umidade e 5% CO₂, com o objetivo de simular

as condições fisiológicas humanas. As células migraram espontaneamente do tecido sem a adição de substratos enzimáticos, e, devido a linhagem celular necessitar de ancoragem para sobrevivência, as células-tronco mesenquimais aderem-se ao plástico tratado das garrafas e formam uma monocamada celular em aproximadamente 20 dias.

4.3 IRRADIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

4.3.1 Caracterização Dos Grupos De Células-Tronco Mesenquimais

Após o estabelecimento da monocamada celular, as células-tronco mesenquimais foram divididas em dois grupos de estudo: o grupo irradiado (IR) e o grupo não irradiado (NR/ controle).

A quantidade de células em cada grupo foi estabelecida por contagem em câmara de Neubauer, estimando aproximadamente 10^6 células/placa para cada grupo.

4.3.2 Processo De Irradiação

O grupo IR foi exposto a dose de 2,5 Gy de radiação ionizante (raios gama) por meio de uma fonte de cobalto-60 (Gammacell 220 Excel), com taxa de dose de 2,657 kGy/h, localizada no Departamento de Energia Nuclear (CTG/UFPE).

Por outro lado, o grupo NR não foi exposto a nenhum tipo de radiação ionizante e utilizou-se como grupo controle.

4.4 COLORAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

4.4.1 Fixação

Ao término do período de cultura celular as CTMs foram submetidas a fixação com paraformaldeído 4% para a coloração por Giemsa.

4.4.2 Coloração De Giemsa

Para evidenciar o núcleo das células-tronco mesenquimais, os dois grupos de estudo foram corados com corante Giemsa. Dessa forma, a análise foi capaz de localizar os núcleos das células pela coloração violeta proporcionada pelo corante.

Logo após a aplicação do corante, as CTMs foram lavadas novamente com água destilada.

4.5 OBTENÇÃO DAS IMAGENS DA CULTURA CELULAR

Para as análises foram obtidas fotomicrografias das células-tronco mesenquimais em cultura com o auxílio de uma câmera digital MOTICAM 2000 (Motic, Brasil) acoplado ao microscópio óptico invertido em aumento de 100x. As imagens foram obtidas em formato *.JPG* sem serem submetidas a nenhum tratamento.

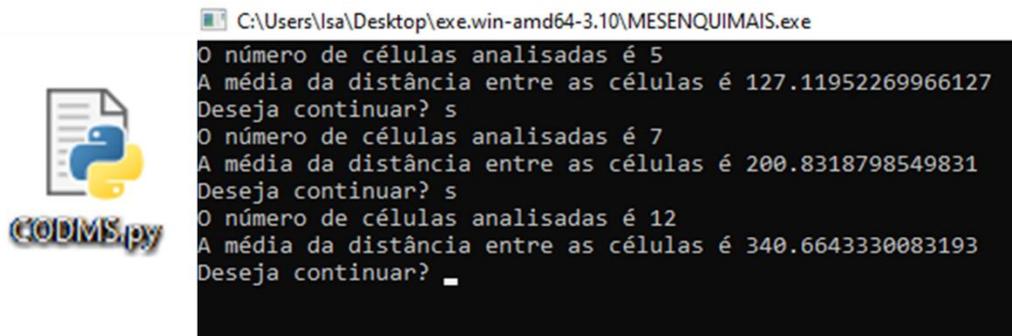
As imagens foram capturadas após 2, 4, 8 e 16 dias de cultura celular, totalizando 320 imagens divididas igualmente entre os grupos irradiado e controle, sendo 80 imagens para cada dia de cultura.

4.6 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO CELULAR

As fotomicrografias foram analisadas com auxílio do programa CODMS, desenvolvido pela equipe. Para isso, as imagens foram selecionadas de acordo com o dia de cultura e o grupo ao qual pertencem, sendo abertas simultaneamente pelo programa.

A análise consiste na detecção dos núcleos celulares presentes na imagem e na determinação da distância internuclear de uma célula para com todas as outras células em campo. As distâncias foram obtidas em escala de pixels e usadas para avaliação do padrão de distribuição de cada grupo.

Dessa forma, mensuramos a quantidade de células por campo e a média da distância internuclear de uma célula para com todas as outras células em campo, como podemos observar na Figura 3 que mostra a interfase do programa CODMS (FIGURA 3).

FIGURA 3 –Interfase do programa CODMS


C:\Users\lsa\Desktop\exe.win-amd64-3.10\MESENQUIMAIIS.exe

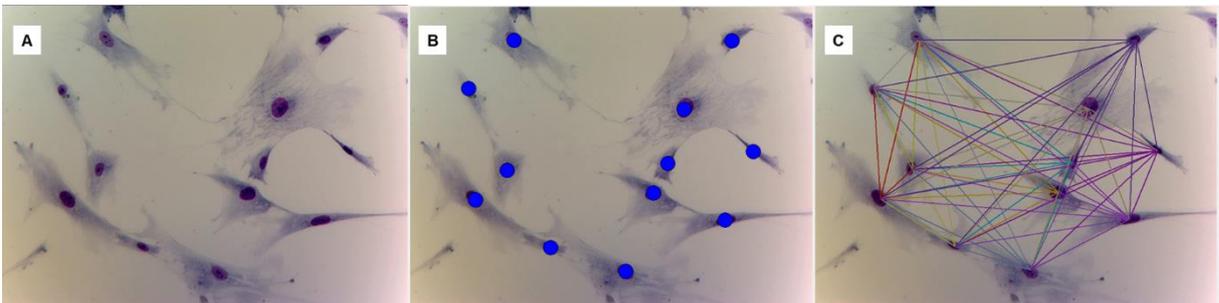
```

O número de células analisadas é 5
A média da distância entre as células é 127.11952269966127
Deseja continuar? s
O número de células analisadas é 7
A média da distância entre as células é 200.8318798549831
Deseja continuar? s
O número de células analisadas é 12
A média da distância entre as células é 340.6643330083193
Deseja continuar? _

```

Fonte: A autora (2022).

Primeiramente, escolhemos a imagem do campo de cultura (A) e com auxílio do programa CODMS, indicamos todas as células nucleadas no campo (B). O programa mapeia a imagem a partir dos pontos selecionados e cria uma rede de conexão entre todas as células (C), mensurando essas distâncias em pixels e calculando a média entre elas de acordo com a quantidade de células selecionadas, ilustrados na Figura 4 (FIGURA 4).

FIGURA 4 – Ilustração do processamento das imagens para análise com auxílio do programa CODMS (100x)

Fonte: A autora (2022).

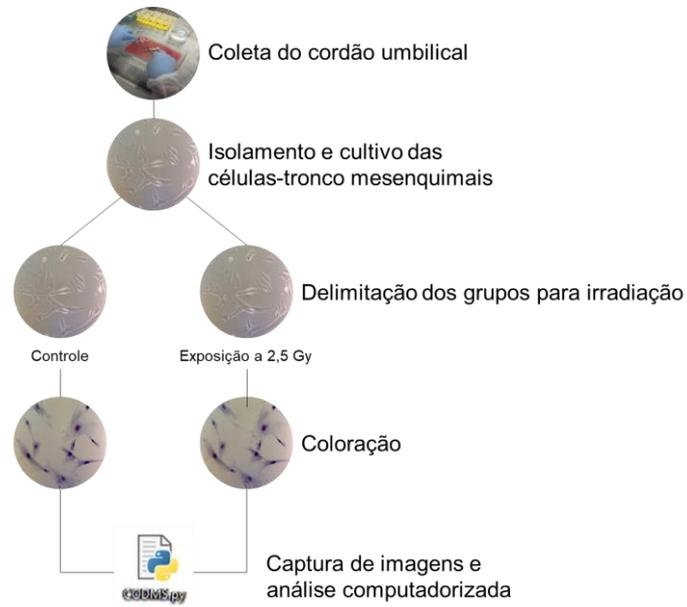
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados com o auxílio do software estatístico BioEstat 5.0 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Amazonas), considerando grupos independentes. Foi realizado teste de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk detectando distribuição anormal, sendo assim aplicado teste U de Mann Whitney (não-

paramétrico), adotando nível de significância de 5%.

A Figura 5 ilustra todas as etapas realizadas na metodologia (FIGURA 5).

FIGURA 5 – Fluxograma da metodologia empregada



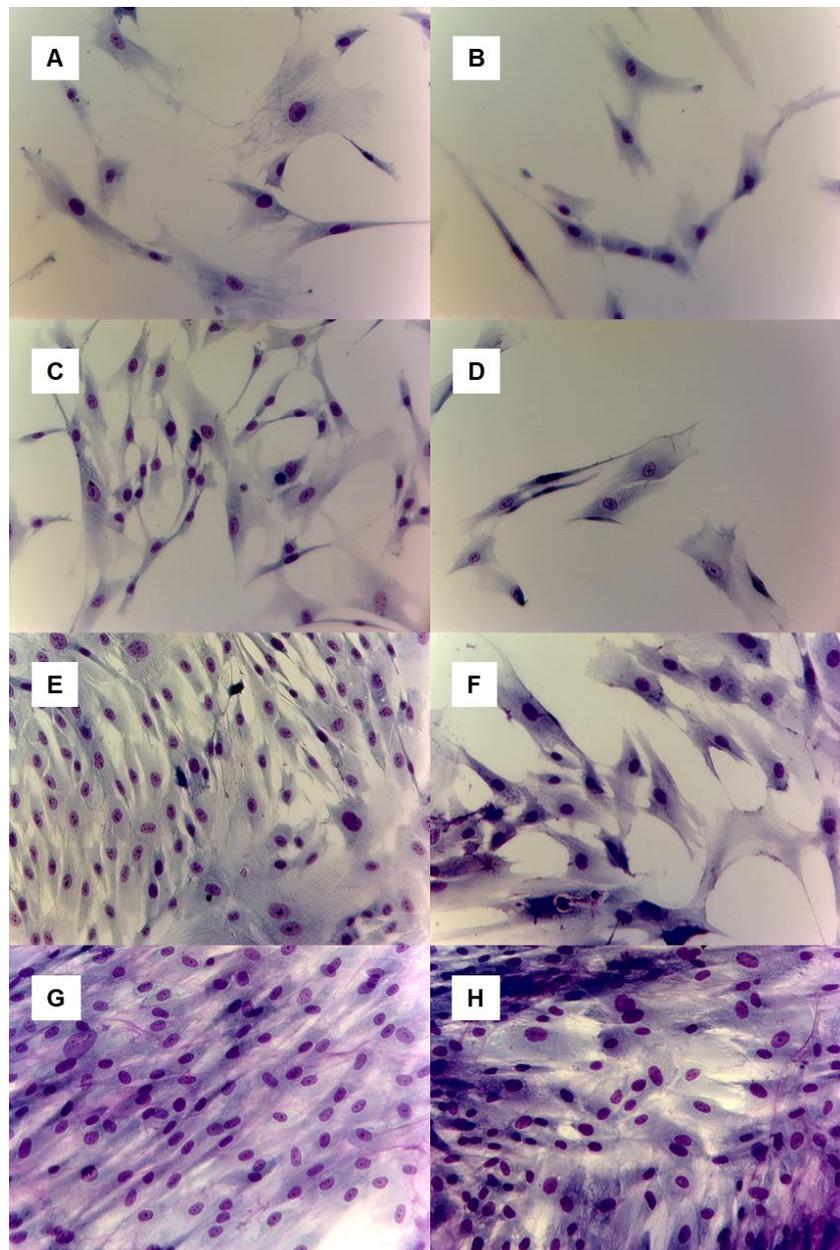
Fonte: A autora (2022).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MORFOLOGIA CELULAR

Durante a cultura celular, foi possível notar que as células mantiveram a sua proliferação e adesão à placa de cultura em todos os tempos de análise. A Figura 6 contém fotomicrografias das CTMs do grupo controle (não irradiado) e do grupo irradiado, nos dias 2, 4, 8 e 16 (FIGURA 6).

FIGURA 6 – Fotomicrografias das CTMs coradas com Giemsa (100x)



Fonte: A autora (2022).

Na Figura 6 podemos observar o crescimento das CTMs controle e irradiadas, ao longo dos dias de cultivo. No 2º dia, o grupo controle (A) apresenta células fusiformes e alongadas com núcleos centrais aderentes ao plástico da garrafa de cultura. Enquanto que, no grupo irradiado (B), notamos que as células são ligeiramente menores que as células do grupo controle, porém mantém o seu formato fusiforme e alongado com núcleos centrais.

No 4º dia, o grupo controle (C) apresentam o aumento no número de células devido a proliferação. Por outro lado, no grupo irradiado (D) é visto que as células se encontram em menor quantidade quando em comparação com as CTMs do grupo controle, indicando uma menor taxa de proliferação após irradiação

No 8º dia, percebemos que no grupo controle (E) as células já ocupam boa parte da garrafa de cultura, mas mantém as suas características morfológicas. E, ainda é possível notar uma menor quantidade de células por campo no grupo irradiado (F), comparada as CTMs do grupo controle.

Já no 16º dia, a células do grupo controle (G) não possuem mais espaços entre si, dificultando a visualização dos limites citoplasmáticos das CTMs. Porém, notamos que as células do grupo irradiado (H) recuperaram a sua proliferação e preencheram todo o espaço disponível na garrafa de cultura.

5.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

A análise descritiva dos grupos controle e irradiado, de acordo com o dia de cultura celular, é demonstrada na Tabela 1 com a média, desvio padrão e mediana de cada grupo (TABELA 1).

Tabela 1 – Análise descritiva da contagem de células por grupo

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
2º DIA	Controle	40	17,15	5,5	16,5
	Irradiado	40	13,95	5,2	13,5
4º DIA	Controle	40	45,45	23,8	9,5
	Irradiado	40	10,25	4,9	9,5

8º DIA	Controle	40	87,85	54,9	80,5
	Irradiado	40	19,57	12,1	20,0
16º DIA	Controle	40	73,97	49,9	45,0
	Irradiado	40	61,82	51,4	39,5

Legenda: N número de fotomicrografias.

Fonte: A autora (2022).

Ao 2º dia pós-irradiação, o grupo controle somou 686 células e o grupo irradiado 558 células, sob a análise de 80 fotomicrografias divididas igualmente entre os grupos. Foi realizada análise estatística pelo teste U de Mann Whitney, e constatou-se que houve diferença significativa entre os grupos em relação a quantidade de células contadas por imagem ($p < 0,05$).

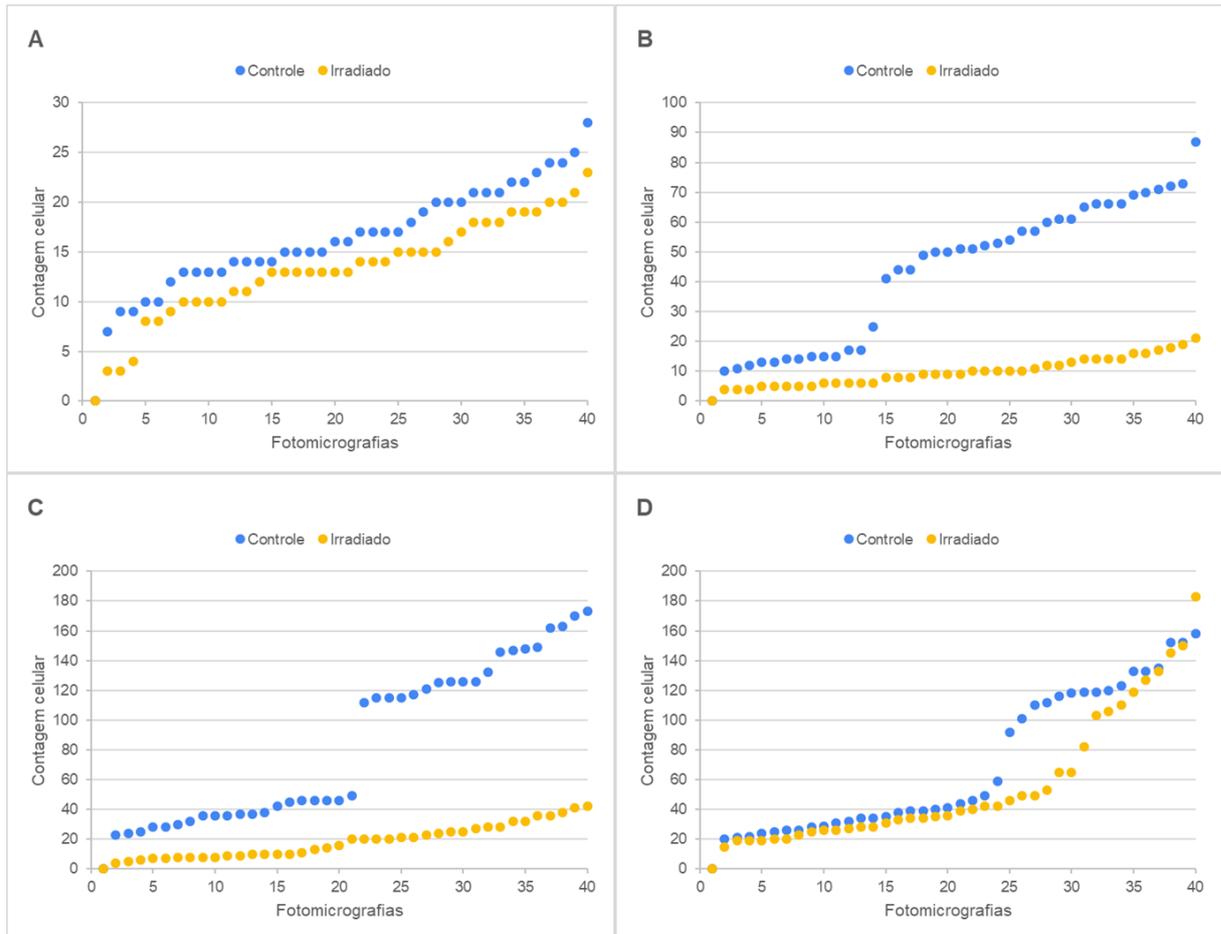
Da mesma forma, ao 4º dia de cultura, o grupo controle somou 1818 células nucleadas e o grupo irradiado 410 células nucleadas. Foi constatado que também houve diferença significativa entre os grupos em relação a quantidade de células contadas por imagem, utilizando o mesmo teste estatístico ($p < 0,05$).

Ao 8º dia de cultura celular, o grupo controle somou 3514 células e o grupo irradiado 783 células, obtendo diferença estatisticamente significativa utilizando o mesmo teste estatístico ($p < 0,05$).

Por outro lado, ao 16º dia de cultura celular, os grupos apresentaram uma sucinta diferença na contagem de células. Com o grupo controle somando 2959 células e o grupo irradiado somando 2473 células, não foi observado diferença estatisticamente significativa em relação a contagem de células por imagem ($p > 0,05$).

Podemos observar na Figura 7, os gráficos relativos a contagem de células nos dias 2, 4, 8 e 16 de cultivo celular, optando-se pela representação da média e da mediana de cada grupo (FIGURA 7).

FIGURA 7 – Gráficos relativos a contagem de células no 2º, 4º, 8º e 16º dia de cultura celular



Fonte: A autora (2022).

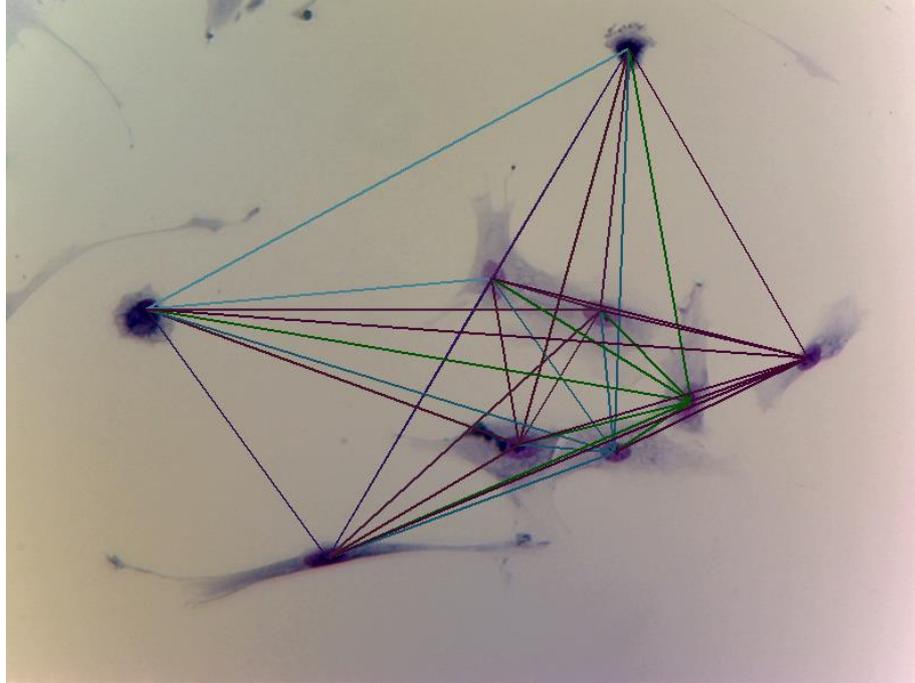
No 2º dia (A), observa-se que os grupos controle (azul) e irradiado (amarelo) possuem pouca diferença na contagem das células em cultura, porém, foi identificado diferença estatística significativa. No 4º dia (B) e 8º dia (C), nota-se uma clara diferença na quantidade de células entre os dois grupos, onde o grupo controle contém a maior quantidade de células por fotomicrografias analisadas. Já no 16º dia (D), os grupos se aproximam um do outro mantendo a quantidade de células equivalentes, além disso, não foi observada diferença estatística significativa nesse dia.

5.3 DISTÂNCIAS INTERNUCLEARES

Após a contagem de células nas fotomicrografias, a partir do ponto médio definido pelo núcleo, foram traçadas retas interligando todas as células presentes. A Figura 8 ilustra o percurso dessas linhas criadas pelo programa CODMS, e medidas

em unidade de pixels (FIGURA 8).

FIGURA 8 – Ilustração da rede de conexões entre as CTMs (100x)



Fonte: A autora (2022).

A análise descritiva das distâncias internucleares dos grupos controle e irradiado, de acordo com o dia de cultura celular é mostrada na Tabela 2 com a média, desvio padrão e mediana de cada grupo (TABELA 2).

Tabela 2 – Análise descritiva das distâncias intercelulares por grupo

	Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
2º DIA	Controle	40	346,05	42,4	351,3
	Irradiado	40	345,84	37,5	350,7
4º DIA	Controle	40	357,99	27,9	358,1
	Irradiado	40	330,78	50,1	329,6
8º DIA	Controle	40	382,04	15,3	381,9
	Irradiado	40	368,80	37,1	339,7
16º DIA	Controle	40	381,28	21,1	380,0
	Irradiado	40	374,52	22,3	368,6

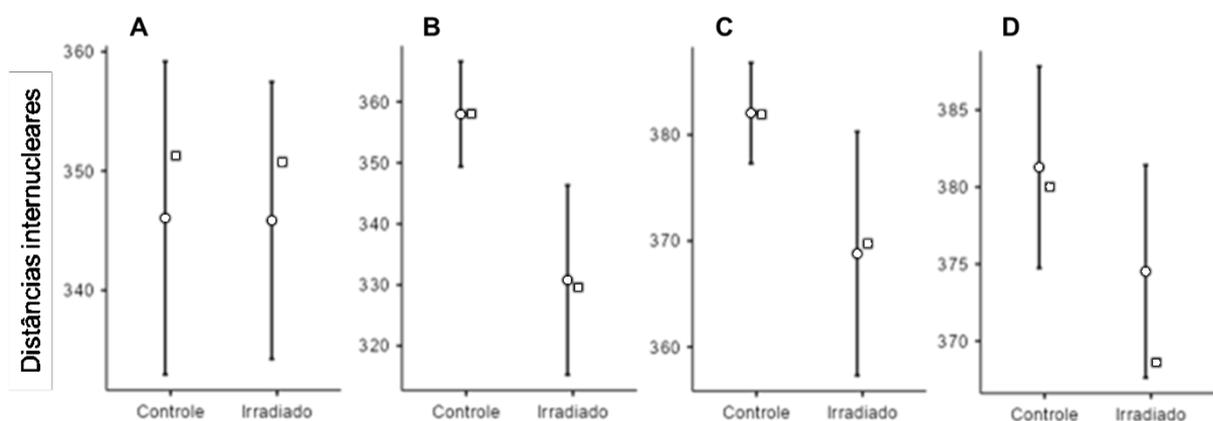
Legenda: N número de fotomicrografias.

Fonte: A autora (2022)

Com esses dados, observa-se uma discreta variação entre as médias dos grupos em todos os dias de cultivo celular. Foi realizada análise estatística pelo teste U de Mann Whitney, e constatou-se que houve diferença significativa entre os grupos apenas no 4º dia de cultura ($p < 0,05$). Enquanto que para o 2º, 8º e 16º dia não foi observada diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Os gráficos relativos as distâncias internucleares dos grupos nos dias 2, 4, 8 e 16 de cultivo celular podem ser observados na Figura 9, optando-se pela representação da média e da mediana de cada grupo (FIGURA 9).

FIGURA 9 – Gráficos relativos a distâncias intercelulares no 2º, 4º, 8º e 16º dia de cultura celular



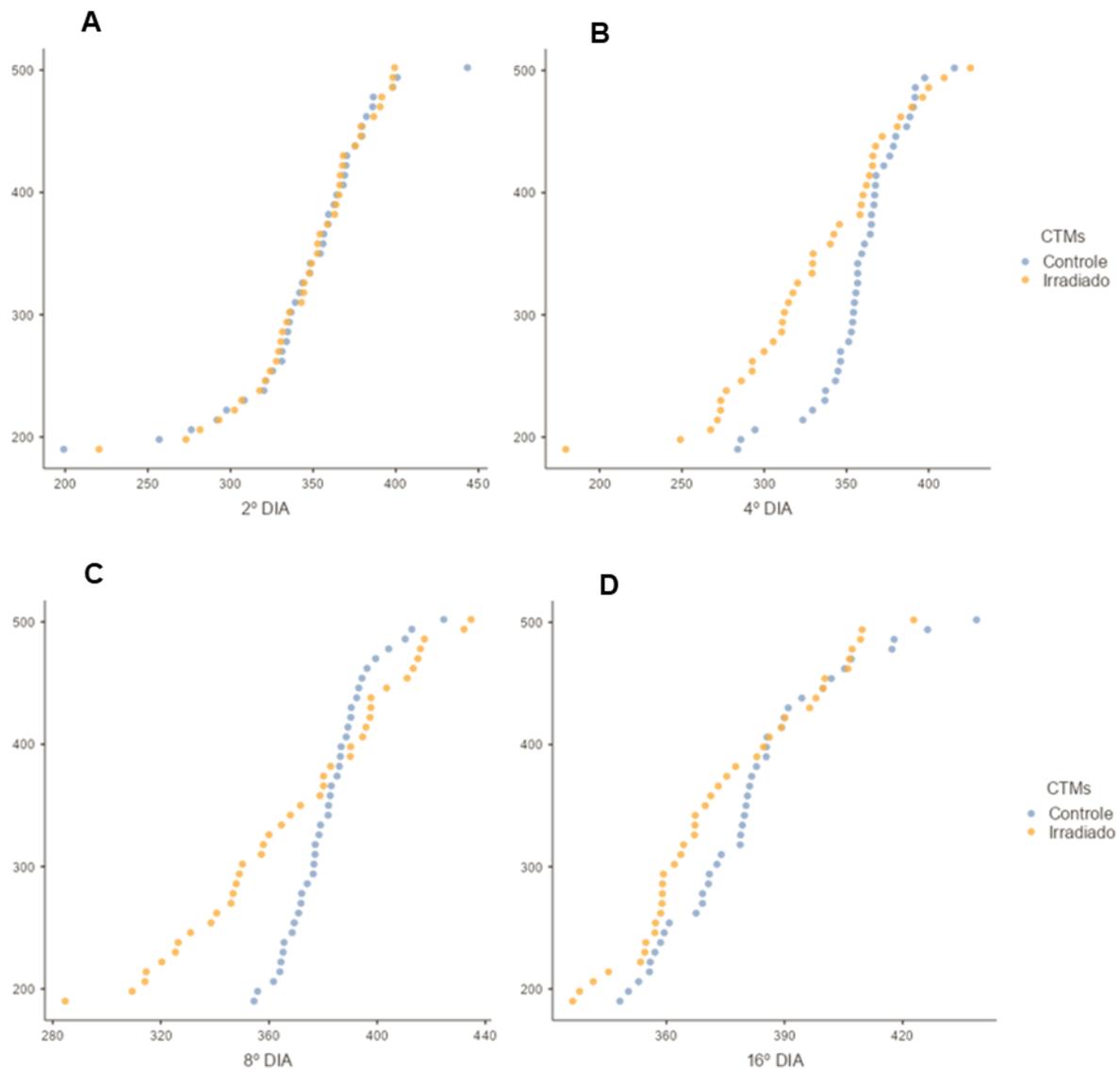
Fonte: A autora (2022).

Na Figura 9 são visualizados os gráficos referentes à distribuição celular de cada tempo de cultura. No 4º dia (B), notamos que o grupo irradiado apresentou menores distribuições entre as células, ou seja, elas permaneceram mais próximas umas das outras em relação ao grupo controle, onde as células se distanciaram. Já nos dias 2 (A), 8 (C) e 16 (D), nota-se que a média dos dados amostrais se sobrepõem entre os grupos, dessa forma não é encontrado diferença significativa entre os mesmos.

Também foi possível identificar, a partir de gráficos de distribuição, que o 4º dia de cultivo apresentou a maior distribuição entre os dados dos grupos controles e irradiados, comparando com os outros dias do cultivo celular (FIGURA 10).

FIGURA 10 – Gráficos de distribuição das distâncias internucleares entre as CTMs

de acordo com o tempo de cultivo celular



Fonte: A autora (2022).

Na Figura 10, visualizamos a distribuição dos dados obtidos pelo programa COMDS. É perceptível, que no 2º dia (A) e no 16º dia (D) os dados referentes aos dois grupos de CTMs são semelhantes, promovendo a aproximação dos grupos. No 4º dia (B), percebemos que os dados são distintos, colaborando com a estatística mencionada. Já no 8º dia (C), os dados também se apresentam como distintos, porém não houve diferença significativa entre eles.

6 DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são conhecidas por exibirem uma relativa radiorresistência independente de seu tecido de origem, preservando algumas propriedades características e potencial para diferenciação *in vitro* (RÜHLE et al., 2018).

Após uma exposição, o período latente antes de qualquer resposta observável é variável (BOLUS, 2017). No entanto, ainda são necessários estudos que interpretem os efeitos biológicos da radiação em baixas doses, visto que poucas são as informações acerca dessa temática. Alguns autores supõem que haja um efeito hormético benéfico, porém pode haver efeitos negativos que não foram detectados (SERGEEVA et al., 2017).

A proposta da pesquisa foi utilizar as distâncias internucleares das CTMs para avaliar o padrão de distribuição das células, *in vitro*, após irradiação. Além de comparar as distâncias internucleares do grupo controle e irradiado no 2º, 4º, 8º e 16º dia de cultura celular, afim de categorizar as células irradiadas.

Foi desenvolvido um programa simples e eficiente para analisar as CTMs obtidas de cordões umbilicais humanos. Essas células foram cultivadas, *in vitro*, e irradiadas com dose de aproximadamente 2,5 Gy (Gammacell 220 Excel taxa de dose 2,657 kGy/h) provindas de uma fonte de cobalto-60. Após a irradiação, as células foram coradas para captura de fotomicrografias das células no 2º, 4º, 8º e 16º dia. As imagens analisadas pelo programa geraram dados referentes a distância de uma célula para com todas em cada imagem.

Só é possível observar diferença significativa no 4º dia de cultura, onde as CTMs do grupo controle apresentaram uma média superior ($357,99 \pm 27,9$) em comparação com o grupo irradiado ($330,78 \pm 50,1$) nas distâncias internucleares ($P=0,005$). Também foi demonstrado que no 4º dia, as CTMs do grupo controle apresentaram um número elevado de células por imagem ($45,45 \pm 23,8$) quando em comparação com o grupo irradiado que apresentou menor contagem de células por imagem ($10,25 \pm 4,9$). Ou seja, as células irradiadas diminuíram a sua replicação e ficaram mais próximas umas das outras.

A capacidade de proliferação das CTMs pode ser afetada pela radiação de forma dose dependente (ISLAM et al., 2015; NICOLAY et al., 2013a). Em nossas análises observamos que após o 4º dia de cultura, o grupo irradiado apresenta queda

brusca no número de células por campo, da mesma forma que se mantém mais próximas umas das outras devido a média das distâncias ser menor em comparação ao grupo controle.

De acordo com Ruhle e colaboradores, o potencial de aderência das CTMs irradiadas com 2 e 8 Gy permaneceu praticamente inalterado após 96h de cultura (RÜHLE et al., 2018). Outros autores demonstram que a distribuição das células em cultura afeta a organização do citoesqueleto, e tem efeito sobre a morfologia e formação de filopódios. Por conseguinte, as características do citoesqueleto e a migração celular dependem da adesão das células a superfície (KANG et al., 2020).

Os filopódios são responsáveis pela adesão celular e a migração das CTMs, podendo aumentar ou diminuir de comprimento a depender das condições de cultura *in vitro* (KANG et al., 2020).

As CTMs se organizam em monocamada, ou seja, elas formam um “tapete” com uma camada celular. Dessa forma, não há sobreposição de células, pois as CTMs regulam a sua divisão celular por inibição de contato (100% de confluência) (CHO et al., 2017; WANG et al., 2016).

Em cultura, observou-se que após 16 dias houve uma superpopulação de CTMs, atingindo confluência aproximada de 80% por poço, mostrando que essas células mantiveram a sua sobrevivência e recuperação da sua população.

Evidencia-se também que o 4º dia após irradiação é o momento ideal para identificar se uma célula foi irradiada ou não por meio da análise de distribuição celular. Após 96h de cultura, identificamos o pico de proliferação, com confluência em torno de 50%.

Referente a migração celular, estudos anteriores mostraram que doses acima de 8 Gy resultam em diminuição da velocidade de migração em células provindas do cordão umbilical humano (RÜHLE et al., 2018).

O potencial migratório dessas células é alvo de grandes pesquisas para tratamento de tumores. Alguns autores demonstraram que as CTMs podem migrar para tumores que foram previamente irradiados e tecidos danificados devido a secreção de quimiocina CCL2 e IL-8 (KIM et al., 2010; THOMAS et al., 2018).

Por outro lado, quando são relatados defeitos na migração das CTMs isso contribui para o envelhecimento celular. O contrário também é interessante, quando há supermigração dessas células pode-se contribuir para uma invasão tumoral (ABNAVE et al., 2017).

As CTMs possuem um mecanorreceptor chamado integrina que responde à rigidez do microambiente, levando a mudanças na expressão gênica de forma adaptativa (HALIM et al., 2020).

Uma análise de expressão gênica após irradiação demonstrou que existe um mecanismo associado à resposta ao estresse ocasionado por radiação em baixas doses. Acredita-se que a célula interrompe os seus processos celulares fundamentais com a parada do ciclo celular, aumentando a adesão celular, apoptose e resposta ao estresse oxidativo (JIN et al., 2008).

Após a primeira resposta, as CTMs iniciam novamente seus processos celulares fundamentais, como reparo, replicação de DNA e mitose, suprimindo a resposta defensiva (JIN et al., 2008).

Com isso, supõe-se que as células do grupo irradiado não demonstraram nenhuma alteração significativamente perceptível nas primeiras 48h (2 dias) com a análise de quantificação e distribuição celular devido aos mecanismos de “proteção” antes mencionados.

Da mesma forma, é possível que após as 96h (4 dias) pós-irradiação, as células retomaram seus processos celulares fundamentais e as alterações causadas pela radiação puderam ser observadas pela análise de quantificação e distribuição celular.

Por outro lado, há evidências de que as CTMs podem entrar em senescência replicativa quando mantidas em cultura celular por longos períodos ou induzida por danos ao DNA e estresse oxidativo (WAGNER et al., 2008b).

Como observamos em nosso estudo, após o 4º dia de cultura, o grupo irradiado demonstrou uma rápida diminuição da quantidade de células por campo em comparação ao grupo controle. Esse evento pode ser explicado pelo mecanismo de senescência replicativa, tanto pela exposição a radiação ionizante quanto pelo longo período de manutenção das CTMs em cultura.

O cultivo de célula-tronco normalmente é realizado usando técnicas de cultura com uma abordagem simplificada, em garrafas plásticas e monocamadas, porém esse modo não apresenta efetivamente as condições do microambiente *in vivo* (SALEH; WHYTE; GENEVER, 2011). É preciso contemplar e considerar a conformação do tecido, avaliando o efeito em modelos *in vivo*.

Dessa forma, podemos inferir que há uma possível alteração da adesão nessas células, que conseqüentemente afeta a morfologia, organização do citoesqueleto, distribuição celular e migração das CTMs.

Supõe-se que com a modificação da adesão dessas células como forma de defesa primária frente a exposição à radiação leve a aproximação das CTMs em cultura, observada nesse estudo. Onde, as células podem ter interrompido o seu ciclo celular para responder efetivamente ao estresse oxidativo, interrompendo também a sua migração celular e se ancorando com maior intensidade a garrafa plástica.

É possível que esse mecanismo de resposta tenha se encerrado após o 8º dia e as CTMs possam ter reiniciado o seu ciclo celular, realizando reparo e replicação e conseqüentemente recuperando a sua população.

Portanto, ainda são necessários estudos acerca da exposição de CTMs a altas doses de radiação ionizante, e como isso podem interferir na migração e no ciclo celular das células, afim de elucidar esses mecanismos de resposta.

7 CONCLUSÃO

A avaliação computadorizada da distribuição das CTMs em cultura mostrou ser um método simples para a avaliação do crescimento e organização celular após irradiação. Dentre os tempos de cultura, o 4º dia foi o mais adequado para a análise, demonstrando que é possível diferenciar as células saudáveis de células irradiadas com 96h de cultura pelo programa CODMS utilizando o cálculo das distâncias internucleares e contagem celular. Vários parâmetros ainda necessitam ser analisados, incluindo adesão e migração celular para determinar as respostas das CTMs à radiação gama em altas doses. Ademais, é interessante visualizar as modificações ocasionadas pela radiação ionizante em outras áreas, como a expressão gênica e sinalização celular.

REFERÊNCIAS

- ABNAVE, P. et al. An X-ray shielded irradiation assay reveals EMT transcription factors control pluripotent adult stem cell migration *in vivo* in planarians. **Development**, 1 jan. 2017.
- ALBERTIM, G. J. B. DE. **Estudo da regulação do volume das células-tronco mesenquimais de geléia de Wharton**. Dissertação (mestrado)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 31 jan. 2012.
- ALBERTIM, G. J. B. **Estudo dos canais iônicos no processo de proliferação e regulação do volume em células-tronco mesenquimais humanas**. Dissertação (doutorado)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 29 jul. 2016.
- BEERAVOLU, N. et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. **Journal of Visualized Experiments**, n. 122, 3 abr. 2017.
- BEN-AMI, E.; BERRIH-AKNIN, S.; MILLER, A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, n. 7, p. 410–415, maio 2011.
- BOLUS, N. E. Basic Review of Radiation Biology and Terminology. **Journal of Nuclear Medicine Technology**, v. 45, n. 4, p. 259–264, 4 dez. 2017.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. SUPPL. 1, p. 25–35, maio 2009.
- BYUN, J. et al. Automated tool for the detection of cell nuclei in digital microscopic images: application to retinal images. **Molecular vision**, v. 12, p. 949–60, 16 ago. 2006.
- CAN, A.; KARAHUSEYINOGLU, S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2886–2895, 1 nov. 2007.
- CHEN, M.-F. et al. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. **International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics**, v. 66, n. 1, p. 244–253, set. 2006.
- CHO, W. et al. Low-Dose Ionizing γ -Radiation Promotes Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells and Maintains Their Stem Cell Characteristics. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 14, n. 4, p. 421–432, 14 ago. 2017.

- FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. **Experimental Hematology**, v. 2, n. 2, p. 83–92, 1974.
- GRISHAGIN, I. V. Automatic cell counting with ImageJ. **Analytical Biochemistry**, v. 473, p. 63–65, 15 mar. 2015.
- GRONTHOS, S. et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 9, p. 1827–1835, 1 maio 2003.
- HALIM, A. et al. Recent Progress in Engineering Mesenchymal Stem Cell Differentiation. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 16, n. 4, p. 661–674, 5 ago. 2020.
- HEO, J. S. et al. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, n. 1, p. 115–125, jan. 2016.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION. **Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection**. ICRP Publication 131. **Anais...**2015. Disponível em: <<http://ani.sagepub.com/>>. Acesso em: 3 jul. 2022
- ISLAM, M. S. et al. Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells. **Journal of Radiation Research**, v. 56, n. 2, p. 269–277, 1 mar. 2015.
- JIN, Y.-W. et al. Comprehensive analysis of time- and dose-dependent patterns of gene expression in a human mesenchymal stem cell line exposed to low-dose ionizing radiation. **Oncology Reports**, 1 jan. 2008.
- KANG, J. et al. Characterization of cell signaling, morphology, and differentiation potential of human mesenchymal stem cells based on cell adhesion mechanism. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 10, p. 6915–6928, 4 out. 2020.
- KESTENDJIEVA, S. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the human umbilical cord. **Cell Biology International**, v. 32, n. 7, p. 724–732, jul. 2008.
- KIM, S. M. et al. Irradiation Enhances the Tumor Tropism and Therapeutic Potential of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Secreting Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells in Glioma Therapy. **Stem Cells**, v. 28, n. 12, p. 2217–2228, 1 dez. 2010.

- LAN, M. L. et al. Characterizing the Radioresponse of Pluripotent and Multipotent Human Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50048, 14 dez. 2012.
- LI, J.; KWONG, D. L. W.; CHAN, G. C.-F. The effects of various irradiation doses on the growth and differentiation of marrow-derived human mesenchymal stromal cells. **Pediatric Transplantation**, v. 11, n. 4, p. 379–387, jun. 2007.
- LOUIS, K. S.; SIEGEL, A. C. Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. Em: [s.l: s.n.]. p. 7–12.
- LOUKAS, C. G. et al. An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections. **Cytometry**, v. 55A, n. 1, p. 30–42, set. 2003.
- MACIÀ I GARAU, M.; LUCAS CALDUCH, A.; LÓPEZ, E. C. Radiobiology of the acute radiation syndrome. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 16, n. 4, p. 123–130, jul. 2011.
- MIELOCH, A. A.; SUCHORSKA, W. M. The concept of radiation-enhanced stem cell differentiation. **Radiology and Oncology**, v. 49, n. 3, p. 209–216, 1 set. 2015.
- MORETTI, P. et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical and Tissue Engineering Applications. Em: **Bioreactor Systems for Tissue Engineering II**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 29–54.
- MURRAY, I.; FLUX, G. Applying radiobiology to clinical molecular radiotherapy. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 100–101, p. 1–3, set. 2021.
- MUSHAHARY, D. et al. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 19–31, jan. 2018.
- MY WAY. [Compositor e intérprete]: Frank Sinatra. [S./]: Frank Sinatra Digital Reprise, 1969.
- NICOLAY, N. H. et al. Mesenchymal Stem Cells Retain Their Defining Stem Cell Characteristics After Exposure to Ionizing Radiation. **International Journal of Radiation Oncology*Biological*Physics**, v. 87, n. 5, p. 1171–1178, dez. 2013a.
- NICOLAY, N. H. et al. Radio-resistant mesenchymal stem cells: mechanisms of resistance and potential implications for the clinic. **Oncotarget**, v. 6, n. 23, p. 19366–19380, 14 ago. 2015b.
- O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; PENG, C. Automated Quantification and Analysis of Cell Counting Procedures Using ImageJ Plugins. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2016, n. 117, 17 nov. 2016.

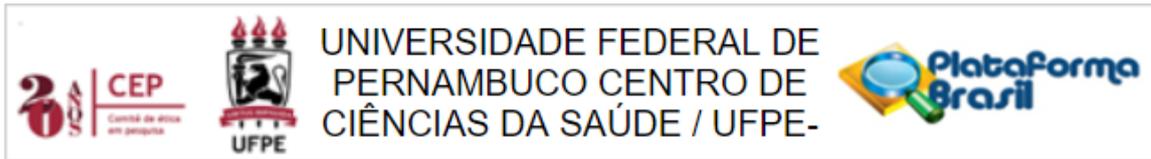
- OLIVEIRA, A. L. DE M. **Isolamento, expansão e diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais obtidas de cordão umbilical humano**. Dissertação (mestrado)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 31 jan. 2010.
- PARK, S. H. et al. Texture analyses show synergetic effects of biomechanical and biochemical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation into early phase osteoblasts. **Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada**, v. 20, n. 1, p. 219–27, 26 fev. 2014.
- PRECIADO, S. et al. Mesenchymal Stromal Cell Irradiation Interferes with the Adipogenic/Osteogenic Differentiation Balance and Improves Their Hematopoietic-Supporting Ability. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 443–451, mar. 2018.
- QIAO, C. et al. Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord. **Cell Biology International**, v. 32, n. 1, p. 8–15, jan. 2008.
- REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901–913, 1 jul. 2008.
- RICARDO, R.; PHELAN, K. Counting and Determining the Viability of Cultured Cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 16, 23 jun. 2008.
- ROMANOV, Y. A.; SVINTSITSKAYA, V. A.; SMIRNOV, V. N. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. **STEM CELLS**, v. 21, n. 1, p. 105–110, 23 jan. 2003.
- RÜHLE, A. et al. The Radiation Resistance of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Independent of Their Tissue of Origin. **International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics**, v. 100, n. 5, p. 1259–1269, abr. 2018.
- SABEN, J. et al. Distinct adipogenic differentiation phenotypes of human umbilical cord mesenchymal cells dependent on adipogenic conditions. **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 10, p. 1340–1351, 20 out. 2014.
- SALEH, F.; WHYTE, M.; GENEVER, P. Effects of endothelial cells on human mesenchymal stem cell activity in a three-dimensional in vitro model. **European Cells and Materials**, v. 22, p. 242–257, 19 out. 2011.
- SERGEEVA, V. A. et al. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander

- Effect and Adaptive Response. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–22, 2017.
- THOMAS, J. G. et al. Ionizing radiation augments glioma tropism of mesenchymal stem cells. **Journal of Neurosurgery**, v. 128, n. 1, p. 287–295, jan. 2018.
- TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. **Stem Cells**, v. 26, n. 3, p. 591–599, 1 mar. 2008.
- VIEIRA, L. L. DE L. M. **Canais iônicos na expansão de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano**. Dissertação (mestrado)—Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 31 fev. 2011.
- VILELA, M. J. et al. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 1, p. 67–72, 2003.
- WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402–1416, nov. 2005a.
- WAGNER, W. et al. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, p. e2213, 21 maio 2008b.
- WANG, H. et al. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. **STEM CELLS**, v. 22, n. 7, p. 1330–1337, 23 dez. 2004.
- WANG, Y. et al. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 1, p. 213–223, jan. 2016.
- ZHANG, Y. et al. Mechanisms Underlying the Osteo- and Adipo-Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da
Universidade Federal de Pernambuco

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da viabilidade e genotoxicidade de células-tronco mesenquimais humanas após irradiação in vitro

Pesquisador: Mariana Brayner Cavalcanti

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67002117.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIENCIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.259.272

ANEXO B

Cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Tecnologia e Geociências
Departamento de Energia Nuclear

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa (Ação, *in vitro*, da Radiação Ionizante na Diferenciação Adipogênica de Células-Tronco Mesenquimais), que está sob a responsabilidade da pesquisadora: Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra. Telefone para contato: (81) 992818446, e-mail: maribrayner@yahoo.com.br, endereço: Departamento de Energia Nuclear DEN/UFPE, localizado na Av. Prof. Luiz Freire N.1000, Várzea, CEP: 50740-545.

Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Isa Cordeiro da Silva. Telefones para contato: (081) 88640749 ou (081) 99702270, e-mail isacordeiroids@gmail.com. Que se encontra sob a orientação da Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra. Telefone para contato: (081) 992818446 ou (081) 21267977, e-mail maribrayner@yahoo.com.br.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando. Apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, e caso concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento. O mesmo se encontra em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Nome da pesquisa: “Ação, *in vitro*, da Radiação Ionizante na Diferenciação Adipogênica de Células-Tronco Mesenquimais”.

Local do estudo: Laboratório de Biofísica das Membranas e células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Avenida das Engenharias, S/N, 1º andar do Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, Recife, PE. 50670-901. Fone: (81)2126 8535.

Pesquisador responsável: Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra, Professora do Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

O que será feito na pesquisa:

1. Somente após seu consentimento pegaremos o cordão umbilical do seu recém-nascido para usá-lo neste estudo;
2. Colocaremos o cordão umbilical em um recipiente com líquido conservante e o levaremos em caixa de transporte de órgão até o Laboratório de Biofísica das Membranas e Células-tronco Dr. Oleg Krasilnikov do Departamento de Biofísica e Radiobiologia da UFPE;
3. No Laboratório vamos retirar as células-tronco do cordão umbilical e as colocaremos em garrafas especiais por no máximo 45 dias. O restante do cordão umbilical será queimado em um equipamento chamado incinerador, que é um procedimento seguro para descarte desse tipo de material;
4. Durante 25 dias as células-tronco serão observadas com microscópio para vermos às mudanças de tamanho e formato, logo após elas serem banhadas por soluções contendo substâncias que atuam na célula.
5. Depois destes 25 dias, as células-tronco serão irradiadas, *in vitro* (fora do corpo). Para este processo iremos utilizar radiação gama, e as células serão irradiadas no Departamento de Energia Nuclear da UFPE.
6. Após a irradiação, as células-tronco serão observadas em microscópio para verificar se a irradiação alterou sua forma, se provocou morte das células ou se provocou danos dentro delas.
7. Depois dos experimentos todas as células-tronco também serão queimadas no incinerador por segurança.

Riscos e benefícios: Essa pesquisa limita-se ao estudo das alterações que podem ocorrer nas células-tronco do cordão umbilical humano, o qual é normalmente descartado após o parto. Os riscos serão aqueles relativos aos procedimentos médicos normais durante uma cirurgia de parto cesáreo. Em nenhum momento será realizado quaisquer tipos de procedimentos diretos ou indiretos no seu corpo, além daqueles que normalmente ocorrem no parto cesáreo. Deste modo você não estará alterando os riscos inerentes da sua cirurgia, caso aceite participar voluntariamente da pesquisa. Mesmo assim para diminuir ainda mais os riscos, a cirurgia cesariana será realizada por profissionais altamente treinados, e em ambiente hospitalar com todos os equipamentos necessários para atendê-la caso ocorra algum imprevisto. Antes do parto, de forma muito confortável, amigável e respeitosa, a pesquisadora conversará com você, para tranquilizá-la com respeito à cirurgia de uma forma geral. No entanto, eventualmente poderá ocorrer algum constrangimento psicológico causado pela presença da pesquisadora na sala de cirurgia durante o parto. Visando diminuir este eventual constrangimento, fique ciente que a pesquisadora agirá com tranquilidade e de maneira amigável, pois, ela é mãe e também já passou por parto cesáreo. Você será beneficiada com esclarecimentos e orientações por parte das pesquisadoras que além de já terem passado por parto cesáreo, também já presenciaram muitos partos cesáreos e poderão, portanto, aconselhá-la. Indiretamente os resultados da pesquisa poderão ajudar futuramente a compreender melhor as aplicações terapêuticas das células-tronco em humanos. Você não receberá nenhuma ajuda financeira por sua participação nesta pesquisa.

Confidencialidade: Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Mariana Brayner Cavalcanti Freire Bezerra no endereço Av. Prof. Luiz Freire, N 1000, CEP 50740545, Várzea, PE, Brasil pelo período de no mínimo 5 anos.

Outras informações: Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou ~~extra-judicial~~. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE, localizado no Centro de Ciências da Saúde no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, portador(a) do CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do “Ação, in vitro, da Radiação Ionizante na Diferenciação Adipogênica de Células-Tronco Mesenquimais” como voluntário (a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, e os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local: _____

Data: ____ de _____ de 20 ____

Assinatura do participante: _____



Impressão digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Assinatura: _____

