UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANTONIO GUSTAVO ZAMPAR

**Análise de células mesenquimais multipotentes
derivadas de diferentes áreas doadoras de tecido
adiposo e sua influência sobre fibroblastos *in vitro***

RIBEIRÃO PRETO
2018

ANTONIO GUSTAVO ZAMPAR

**Análise de células mesenquimais multipotentes
derivadas de diferentes áreas doadoras de tecido
adiposo e sua influência sobre fibroblastos *in vitro***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Jayme Adriano
Farina Junior

RIBEIRÃO PRETO

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Zampar, Antonio Gustavo.

Análise de células mesenquimais multipotentes derivadas de diferentes áreas doadoras de tecido adiposo e sua influência sobre fibroblastos *in vitro* / Antonio Gustavo Zampar; orientador Jayme Adriano Farina Junior. - Ribeirão Preto, 2018.

103f.; 17il.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

1. Células mesenquimais multipotentes; 2. Células tronco; 3. Tecido adiposo; 4. Anemia falciforme; 5. Úlceras falciformes; 6. Fibroblastos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: ZAMPAR, Antonio Gustavo

Título: Análise de células mesenquimais multipotentes derivadas de diferentes áreas doadoras de tecido adiposo e sua influência sobre fibroblastos *in vitro*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Aprovada em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Agradecimentos

À minha esposa Thálita, à minha filha Maria Beatriz, aos meus pais Antonio Carlos e Maria Aparecida e às minhas irmãs Helaine, Regiane e Mariane. Sem o apoio e carinho deles não seria possível a minha dedicação a este projeto.

Ao Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior, pela orientação, oportunidade e confiança em mim depositadas.

À Dra. Maristela Delgado Orellana, por todos os ensinamentos e auxílios nas dificuldades que surgiram ao longo do projeto.

Às colegas do Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial à Sâmia Rigotto e à Taisa Riske pela ajuda fundamental no projeto. Sem essa ajuda e dedicação não teria sido possível a execução do mesmo.

À minha equipe cirúrgica, em especial à cirurgiã plástica Dra Gabriela Schartzmann, à instrumentadora Fátima Vianna e aos amigos anestesistas pela ajuda e apoio nas cirurgias para coleta dos tecidos.

À Patricia e a todas as funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo, pela ajuda com esses experimentos.

Ao Dr Rogério Gomes dos Santos, pela ajuda fundamental com os experimentos com fibroblastos.

A todos os pacientes que permitiram as coletas de tecidos, pela confiança em meu trabalho. Sem os quais não teria sido possível a execução deste estudo.

Ao Prof. Dr. Gil Cunha De Santis e Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pelo apoio na condução do projeto.

Minha gratidão!

Resumo

ZAMPAR, A. G. **Análise de células mesenquimais multipotentes derivadas de diferentes áreas doadoras de tecido adiposo e sua influência sobre fibroblastos *in vitro***. 2018. 103f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

A cicatrização de feridas crônicas e de defeitos complexos representam desafios para a cirurgia plástica reconstrutiva. Novos tratamentos emergiram com a utilização de células tronco mesenquimais, com especial interesse para as derivadas de tecido adiposo (CTMs-TA), por possuir algumas vantagens em relação às derivadas da medula óssea. Algumas doenças poderiam se beneficiar com o uso das CTMs-TA, em particular, as feridas de pacientes portadores de anemia falciforme que ainda representam um desafio terapêutico. Neste estudo, investigou-se a existência de possíveis áreas doadoras preferenciais de CTMs-TA no tecido adiposo (TA) por meio da comparação de aspectos qualitativos e quantitativos das CTMs-TA derivadas de cinco diferentes áreas corporais. Posteriormente, analisou-se a influência do sobrenadante dessas células, rico em citocinas e fatores de crescimento, sobre a migração de fibroblastos de indivíduos normais e de portadores de anemia falciforme *in vitro*. Não foram observadas diferenças qualitativas entre as CTMs-TA das cinco áreas analisadas. A região do dorso apresentou número maior de CTMs, com diferença significativa em relação à região das coxas. A adição de sobrenadante produzido por CTMs-TA demonstrou aumento da velocidade de migração dos fibroblastos de forma similar para os normais e os falciformes. O microambiente desfavorável presente nas feridas falciformes parece exercer importante influência sobre esses fibroblastos, pois uma vez corrigido o microambiente com os meios de cultivo apropriados, as células apresentaram taxa de duplicação e velocidade de migração semelhante à dos fibroblastos normais *in vitro*.

Palavras-Chaves: Células mesenquimais multipotentes. Células tronco. Tecido adiposo. Anemia falciforme. Úlceras falciformes. Fibroblastos.

Abstract

ZAMPAR, A. G. **Analysis of multipotent mesenchymal cells derived from different adipose tissue donor areas and their influence on fibroblasts in vitro.** 2018. 103f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The healing of chronic wounds and complex defects represents challenges for reconstructive plastic surgery. New treatments have emerged with the use of multipotent mesenchymal cells, with special interest for the adipose-derived stem cells (ADSCs) as it has some advantages over the bone marrow-derived. Some diseases could benefit from the use of ADSCs, in particular, the wounds of patients with sickle cell anemia that still represent a therapeutic challenge. In this study, we investigated the existence of possible preferential donor areas of ADSCs in adipose tissue by comparing qualitative and quantitative aspects of ADSCs derived from five different body areas. Later, we analyzed the influence of the supernatant of these cells, rich in cytokines and growth factors, on the migration of fibroblasts from healthy individuals and from patients with sickle cell anemia in vitro. No qualitative differences were observed among the ADSCs of the five areas analyzed. The dorsum presented a higher number of ADSCs, with a significant difference in relation to the thigh. Addition of supernatant produced by ADSCs has been shown to increase the rate of migration of fibroblasts in a similar way to healthy and sickle cells. The unfavorable microenvironment present in sickle wounds seems to exert a significant influence on these fibroblasts because once the microenvironment was corrected with the appropriate culture media, the cells had a doubling rate and migration rate similar to normal fibroblasts in vitro.

Key words: Multipotent mesenchymal cells. Adipose derived stem cells. Stem cells. Adipose tissue. Sickle cell anemia. Fibroblasts.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Áreas doadoras de tecido adiposo: abdome superior (1), abdome inferior (2), coxas (3), dorso (4) e flancos (5)	39
Figura 2 -	Amostras de tecido adiposo coletadas de uma das áreas corporais, em duas seringas de 10 ml cada, totalizando 20 ml por área	40
Figura 3 -	Placa de 24 poços utilizada para diferenciação de osteócitos e adipócitos	45
Figura 4 -	Placa utilizada para diferenciação de condrócitos	46
Figura 5 -	Microscópio com mesa motorizada (LSM 710®, Zeiss), que dispõe de controle de temperatura, utilizado para realização dos experimentos de migração dos fibroblastos	48
Figura 6 -	Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície celular da FVE obtida do dorso de um dos indivíduos. A expressão do marcador CD31 foi de 17,3%, CD73 de 14,1%, Anti-HLA-DR de 19,76%, CD34 de 51,99%, CD45 de 14,03%, CD14 de 2,87%, CD90 de 64,21%, CD 271 de 0,86% e CD105 de 15,54%.	53
Figura 7 -	Perfil imunofenotípico das células presentes nas amostras de tecido adiposo fresco (FVE), das cinco áreas corporais estudadas, demonstrando similaridade na expressão de marcadores de superfície celular entre essas áreas.....	54
Figura 8 -	Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície celular das CTMs-TA após cultivo <i>in vitro</i> na terceira passagem, obtida do dorso de um dos indivíduos. A expressão do marcador CD31 foi de 0,27%, CD73 de 93,76%, Anti-HLA-DR de 0,14%, CD34 de 0,48%, CD45 de 0,15%, CD14 de 0,23%, CD90 de 97,42%, CD105 de 95,95% e Anti-HLA ABC 81,93%	55
Figura 9 -	Perfil imunofenotípico das CTMs-TA presentes nas amostras de tecido adiposo após cultivo, na terceira passagem (P3), das cinco áreas estudadas demonstrando similaridade na expressão de marcadores de superfície celular entre as áreas	56
Figura 10 -	Número de CFU-F entre as cinco áreas corporais em estudo. As análises demonstraram maiores diferenças e foram significativas entre dorso e coxas (**), e entre flancos e coxas (*), com intervalo de credibilidade de 95%	58
Figura 11 -	Número de CFU-F das três regiões corporais: abdome anterior (AT), coxas (C) e flancos com dorso (FD). As análises	

	demonstraram diferença significativa entre as áreas FD e C (*), com intervalo de credibilidade de 95%.....	60
Figura 12 -	Número de CFU-F em dois grupos: idade menor que 40 anos ou maior (ou igual) que 40 anos. O grupo mais jovem apresentou número de CFU-F no tecido adiposo significativamente maior (*).....	63
Figura 13 -	Diferenciação das CTMs-TA em adipócitos (A) , demonstrada pela coloração das vesículas lipídicas em vermelho e seu respectivo controle negativo (B)	64
Figura 14 -	Diferenciação das CTMs-TA em osteócitos (A) , demonstrando a coloração pelo <i>Alizarin red</i> de matriz mineralizada e seu respectivo controle negativo (B)	65
Figura 15 -	Diferenciação das CTMs-TA em condrócitos demonstrada pela coloração em azul de glicosaminoglicanos	65
Figura 16 -	Área sulcada em uma das culturas de fibroblastos normais e o fechamento progressivo ao longo das horas (0,6,12 e 24 horas), a partir da migração de fibroblastos das bordas dessa área.....	66
Figura 17 -	Velocidade de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) dos diferentes grupos de fibroblastos, à esquerda dos fibroblastos normais (FIBN) e à direita dos fibroblastos falciformes (FAF). Para ambos os tipos de fibroblastos, a adição de sobrenadante de CTMs-TA obtidas de abdome (*) e de coxa (**) demonstrou acelerar a velocidade de migração celular de forma significativa em relação aos grupos controles (C)	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Idade (anos) e IMC (kg/m^2) do grupo dos indivíduos doadores de tecido adiposo	52
Tabela 2 -	Número de unidades formadoras de colônias fibroblastoides em cada uma das cinco áreas corporais (abdome superior, abdome inferior, coxas, dorso e flancos). O maior número de CFU-F foi identificado no dorso, seguido pelos flancos. Essas duas áreas apresentaram resultados com diferenças estatísticas em relação à coxa (*), ICr 95%	57
Tabela 3 -	Comparações do número de CFU-F entre as cinco diferentes áreas corporais demonstrando diferenças significativas entre AI-D (*), AS-D (**), C-F (***) e D-C (****). Dentre essas, o dorso e as coxas apresentaram a maior diferença estatística, com intervalos de credibilidade de 95% (ICr 95%)	59
Tabela 4 -	Comparações do número de CFU-F entre três regiões corporais demonstrando diferença significativa entre a região de flancos e dorso (FD) em relação às coxas (*), com intervalo de credibilidade de 95%	60
Tabela 5 -	Taxa de duplicação celular (<i>doubling time</i>), em horas, das cinco áreas em estudo. Não foram demonstradas diferenças estatísticas entre as áreas	61
Tabela 6 -	Análise comparativa da taxa de duplicação celular (<i>doubling time</i>), em horas, entre as cinco áreas em estudo. Não foram identificadas diferenças significativas entre as áreas	62
Tabela 7 -	Comparações da idade com a taxa de duplicação celular, idade com o número de CFU-F, IMC com a taxa de duplicação celular e IMC com o número de CFU-F. Resultados demonstraram correlação apenas em relação à idade e CFU-F (*), com intervalo de credibilidade de 95%	63
Tabela 8 -	Velocidade de migração ($\mu\text{m/hora}$) dos fibroblastos normais expostos aos diferentes meios de cultura. As maiores velocidades de migração foram dos dois grupos expostos aos meios contendo sobrenadantes das CTMs-TA, representados por Abdome (*) e Coxas (**)	67
Tabela 9 -	Comparações das velocidades de migração ($\mu\text{m/hora}$) de fibroblastos normais entre os grupos: controle, sobrenadante de CTMs-TA de abdome (Abdome) e sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Abdome (*) e Coxas (**) em relação aos seus respectivos controles, com intervalos de credibilidade de 95%	67
Tabela 10 -	Velocidade de migração ($\mu\text{m/hora}$) dos fibroblastos de indivíduos	

	com AF expostos aos três diferentes meios de cultura. As maiores velocidades de migração foram dos dois grupos expostos aos meios contendo sobrenadantes das CTMs-TA, representados por Abdome (*) e Coxas (**)68	68
Tabela 11	- Comparações das velocidades de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) de fibroblastos falciformes entre os grupos: controle, sobrenadante de CTMs-TA de abdome (Abdome) e sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Abdome (*) e Coxas (**) em relação aos seus respectivos controles, com intervalos de credibilidade de 95%.....68	68
Tabela 12	- Comparação da velocidade de migração entre os grupos dos dois tipos de fibroblastos: normais (FIBN) e falciformes (FAF). Não foram observadas diferenças significativas, com intervalos de credibilidade de 95%.....69	69
Tabela 13	- A análise da taxa de duplicação celular (em dias), entre os dois tipos de fibroblastos, normais (FIBN) e falciformes (FAF), demonstrou diferença significativa apenas entre a primeira e segunda passagens (P1/P2) do cultivo <i>in vitro</i> (*). A diferença desapareceu ao longo do cultivo, não sendo mais observada entre a terceira e quarta passagens (P3/P4), com intervalos de credibilidade de 95%.....70	70
Tabela 14	- Análise de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo fibroblastos normais (FIBN) em comparação aos com fibroblastos falciformes (FAF), para os três grupos estudados: grupos controles, grupos contendo o sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (sobrenadante abdome) e os grupos contendo sobrenadante de CTMs-TA da coxa (sobrenadante coxa). Exceto para o VEGF nos grupos controles, os demais fatores e citocinas apresentam em média diferenças negativas, sugerindo menores concentrações nos meios com fibroblastos FAF em relação aos FIBN. No entanto, essa diferença foi significativa apenas para alguns fatores: PDGF-BB, GM-CSF, CXCL-IL8, e IL-10 (*)71	71
Tabela 15	- Análise comparativa de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo apenas os fibroblastos falciformes (FAF) entre os três grupos: controle, com sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (Abdome) e com sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Os fatores de crescimento e citocinas apresentaram em média diferenças negativas nos controles em relação aos grupos contendo sobrenadante de CTMs-TA do abdome e da coxa, sugerindo menores concentrações nesses casos. No entanto, não foram identificadas diferenças significativas, com intervalo de credibilidade de 95% (ICr 95%).....72	72

Tabela 16 -	Análise comparativa de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo apenas os fibroblastos de indivíduos normais (FIBN), dentre os três grupos: controle, com sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (Abdome) e com sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). O VEGF apresentou concentração menor com diferença significativa nos grupos controles em relação aos grupos com sobrenadantes de CTMs-TA (*) e não entre os dois grupos com sobrenadantes de CTMs-TA (Abdome x Coxa).....	73
--------------------	--	----

Lista de Siglas e Abreviaturas

AF-	Anemia falciforme
BMP-	Proteína morfogênética óssea
CD-	Grupamento de diferenciação (do inglês, cluster of differentiation, geralmente abreviado como CD) é um conjunto de moléculas marcadoras da superfície celular, usado para diferenciar variados tipos de células.
CFU-F-	Unidades formadoras de colônias fibroblástoides
CTMs-	Células tronco mesenquimais
CTMs-TA-	Células tronco mesenquimais do tecido adiposo
CTMs-MO-	Células tronco mesenquimais da medula óssea
CXCL-IL8-	Interleucina 8
DMEM-	Meio essencial modificado de Dulbecco
DHL-	Desidrogenase láctica
DP-	Desvio padrão
DT-	<i>Doubling time</i>
EDTA-	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF-	Fator de crescimento epidermal
FAF-	Fibroblastos falciformes
FGF-	Fator de crescimento fibroblástico
FVE-	Fração vascular estromal
FIBN-	Fibroblastos normais
g-	Gramas
GM-CSF-	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HbSC-	Hemoglobina S combinada com hemoglobina C
HbSS-	Forma homozigótica hemoglobina SS

HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo
HGF-	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA-ABC-	Antígeno leucocitário humano ABC
HLA-DR-	Antígeno leucocitário humano DR
ISCT-	Sociedade Internacional de Terapia Celular
IL-1-	Interleucina 1
IL-10-	Interleucina 10
IL-1β-	Interleucina 1 β
IL-6-	Interleucina 6
IMC-	Índice de massa corpórea (kg/m ²)
ISAPS-	Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética
MHC Classe II-	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
P0-	Tecido adiposo à fresco antes de ser submetido ao cultivo celular
P3-	Tecido adiposo na terceira passagem de cultivo celular
PBS-	Solução salina tamponada de fosfato
PDGF-AA-	Fator de crescimento derivado das plaquetas, subunidades AA
PDGF-BB-	Fator de crescimento derivado das plaquetas, subunidades BB
RGD-	Sequência peptídica de Arginina-Glicina-Asparagina
RPMI-	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> : meio de cultura celular
SF 0,9%-	Soro fisiológico 0,9%
SFB-	Soro fetal bovino
TA-	Tecido adiposo
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β-	Fator de transformação do crescimento beta

TNF-α-	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF-	Fator de crescimento endotelial vascular
α MEM-	Meio essencial mínimo alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Cicatrização	22
1.2. Células mesenquimais multipotentes	23
1.3. Células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo	24
1.4. Aplicações clínicas das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo	26
1.5. Influência da área doadora de tecido adiposo sobre aspectos quantitativos e qualitativos das CTMs-TA	28
1.6. Anemia falciforme e o tratamento das úlceras cutâneas.....	30
2. OBJETIVOS.....	33
2.1. Objetivo geral	34
2.2. Objetivos específicos.....	34
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	35
3.1. Principais reagentes.....	36
3.2. Considerações éticas.....	37
3.3. Obtenção das amostras de tecido adiposo e dos fibroblastos.....	37
3.4. Aspectos técnicos da coleta do tecido adiposo	37
3.5. Processamento do tecido adiposo	40
3.6. Análise quantitativa das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo	41
3.7. Cultivo e expansão celular	41
3.8. Análise qualitativa das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo.....	42
3.9. Avaliação da cinética celular <i>in vitro</i>	43
3.10. Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos <i>in vitro</i>	43
3.11. Obtenção do sobrenadante derivado das CTMs-TA	46
3.12. Isolamento e cultura dos fibroblastos	47
3.13. Análise da migração dos fibroblastos <i>in vitro</i>	48
3.14. Análise das proteínas secretadas nos sobrenadantes das CTMs-TA e nas culturas de fibroblastos	49
3.15. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Características do grupo de indivíduos doadores de tecido adiposo	52
4.2. Caracterização imunofenotípica do tecido adiposo fresco (P0) e após o cultivo celular na terceira passagem (P3)	52
4.3. Quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F)	56
4.4. Cinética celular das CTMs-TA das cinco áreas corporais.....	61
4.5. Comparação entre a idade e o IMC dos pacientes em relação ao número de CFU-F e cinética celular.....	62
4.6. Diferenciação das CTMs-TA em adipócitos, osteócitos e condrócitos.....	64
4.6. Influência do sobrenadante das CTMs-TA sobre a migração de fibroblastos de pacientes normais e de portadores de anemia falciforme.....	66
5. DISCUSSÃO	74
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
8. ANEXOS	91

1- Introdução

1.1 Cicatrização

A cicatrização de feridas crônicas e de defeitos complexos que envolvem perda tecidual representam desafios para a cirurgia plástica reconstrutiva. O processo de cicatrização se inicia a partir de inúmeras interações celulares, intermediadas por fatores de crescimento e citocinas, e se estende didaticamente ao longo de três fases que se sobrepõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação (LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A primeira fase, inflamatória, se inicia logo após a lesão cutânea com o rompimento da epiderme e liberação pelos queratinócitos de interleucina-1 (IL-1), cuja função é sinalizar aos tecidos adjacentes sobre a lesão ocorrida (BARRIENTOS et al., 2008). O extravasamento de sangue do interior dos vasos dá início aos processos de adesão e agregação plaquetárias, que resultam na formação de um coágulo de fibrina, cuja função, além de hemostática, é promover um estímulo à migração de células pró-inflamatórias, como ao neutrófilos, que irão atuar na prevenção de infecções bacterianas. Essas células apresentam a maior concentração nos primeiros dois dias após o trauma (WALMSLEY et al., 2015).

Por volta do segundo ao terceiro dia, outras células como monócitos chegam ao local da ferida e se transformam em macrófagos com função de eliminar debris e fagocitar neutrófilos apoptóticos. Os macrófagos também irão auxiliar na transição para a segunda fase, chamada proliferativa, de forma que por volta do quinto ao sétimo dia iniciam a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) e de fatores de crescimento como PDGF (Fator de crescimento derivado das plaquetas), TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta), FGF (Fator de crescimento fibroblástico) e EGF (Fator de crescimento epidermal), que irão ativar e estimular a migração de fibroblastos para a ferida e também a neoangiogênese (BARRIENTOS et al., 2008; LI; CHEN; KIRSNER, 2007).

A fase proliferativa se inicia do segundo ao décimo dia após a lesão e é caracterizada pela remoção do coágulo de fibrina e substituição por tecido de granulação, formado por fibroblastos e células endoteliais, que compõem a matriz extracelular rica em glicosaminoglicanas, proteoglicanas e colágeno tipo III em proporção maior que o colágeno tipo I. Esse tecido estabelece um suprimento

sanguíneo adequado e facilita a reepitelização, por favorecer a proliferação e migração de queratinócitos. Paralelamente, fibroblastos são convertidos em miofibroblastos, por ação de TGF- β e PDGF, e promovem a contração aproximando as bordas das feridas (ISAAC et al., 2010).

A terceira fase, conhecida como de remodelação, se inicia após a reepitelização e fechamento da ferida, geralmente entre 14 e 21 dias após a lesão e pode se estender por vários anos. Essa fase é caracterizada por reorganização da matriz extracelular, rearranjo das fibras de colágeno e mudança do padrão inicial de predomínio do colágeno tipo III para maior proporção de colágeno tipo I, mais semelhante à pele normal, e que resulta em aumento da força tênsil da cicatriz, a qual atingirá cerca de 80% da resistência da pele normal por volta do 3° ao 4° mês após a lesão. Paralelamente, ocorre diminuição da celularidade e da vascularização na cicatriz que assim vai perdendo seu aspecto eritematoso (WALMSLEY et al., 2015).

1.2 Células mesenquimais multipotentes

Na última década, novos tratamentos a partir de terapia celular e engenharia tecidual emergiram como alternativas para auxiliar na cicatrização tecidual. Com o avanço do conhecimento sobre a função das células tronco mesenquimais (CTMs) em relação à capacidade de diferenciação em outros tipos celulares e de suas propriedades angiogênicas, imunorregulatórias e antiapoptóticas, houve grande despertar de interesse pela medicina regenerativa.

A presença de células tronco mesenquimais de origem não hematopoiética na medula óssea (CTMs-MO) foi, pela primeira vez, reportada por estudos de Friedenstein et al. (1966), Friedenstein (1968), Friedenstein (1976) e Friedenstein et al (1987); e após essa descoberta estas células foram identificadas em diversos tecidos como cordão umbilical, pulmão, cérebro, rins, placenta, músculo esquelético, sangue periférico, derme, tecido adiposo (TA), dentre outros (CAMPAGNOLI et al., 2001, JIANG et al., 2002, YOUNG et al. 2001).

As CTMs apresentam morfologia fibroblastoide alongadas, fusiformes e pontiagudas, com núcleo eucromático, oval, grande e central e citoplasma

abundante à microscopia de luz ou contraste de fase. Também podem ser observadas à microscopia eletrônica, cisternas do retículo endoplasmático rugoso dilatadas, vacúolos lipídicos cheios ou vazios, corpos lisossomais e grande quantidade de polirribossomos e ribossomos livres citoplasmáticos, além de filamentos de actina bem organizados em suas extremidades (TAGAMI et al., 2003). Quando senescentes, as CTMs são grandes, largas, achatadas, proliferam lentamente e expressam uma β -galactosidade associada à senescência (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005). Células com morfologia intermediária são observadas no decorrer do cultivo (DIGIROLAMO et al., 1999).

Por essas células constituírem *in vitro* uma população heterogênea e em diferentes estágios de diferenciação, além da comprovação de autorenovação e de diferenciação ser conseguida somente em algumas das células, Horwitz et al. (2005) consideraram inapropriada a denominação geral “células tronco”. Assim, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT, International Society for Cellular Therapy) considerou mais apropriado o termo “células estromais mesenquimais multipotentes” enquanto o termo “célula tronco mesenquimal” deveria ser utilizado quando os critérios de definição como a autorenovação e a diferenciação fossem comprovados *in vivo*. No entanto, o uso da sigla CTM ainda foi mantida para essas células *in vitro*.

Ainda nessa ocasião, para auxiliar na identificação das CTMs *in vitro*, Dominici et al. (2006) estabeleceram os seguintes critérios de definição: serem aderentes à superfície de placas em condições padrões de cultivo celular, expressarem CD105, CD90 e CD73 e não expressarem CD45, CD34, CD14 ou CD11b, Cd79 α ou CD19 e HLA-DR (Antígeno leucocitário humano DR). Por fim, possuírem a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.

1.3 Células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo

Nas últimas décadas a incidência de obesidade e sobrepeso nas populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento tem aumentado drasticamente, atingindo níveis acima de 30% em algumas dessas populações (BOURIN et al.,

2013). O TA é composto em mais de 90% por adipócitos maduros, sendo o restante do tecido formado por um conjunto de outros tipos celulares situados em um estroma de suporte, chamado fração vascular estromal (FVE), que é composta por fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos e pré-adipócitos ou células tronco adiposas (OUCHI et al., 2011).

Zuk et al. (2001 e 2002) foram os primeiros a reportar o TA como importante fonte de CTMs (CTMs-TA) e que assim como as derivadas da medula óssea, apresentam potencial de diferenciação em tecidos de várias linhagens mesenquimais como o adiposo, cartilaginoso, muscular e ósseo (BUNNEL et al., 2008; MIZUNO et al., 2002; ZUK et al., 2001, 2002), além de possuírem funções parácrinas e pró-angiogênicas (BIANCO et al., 2001, STEREODIMAS et al., 2010).

O TA possui algumas vantagens em relação à medula óssea e a outros locais como área doadora devido sua ampla disponibilidade e facilidade de coleta que pode ser realizada por meio de uma pequena lipoaspiração, menos invasiva do que uma coleta da medula óssea. Também apresenta como vantagem uma frequência de CTMs estimada em cerca de 100 a 1000 vezes superior à encontrada na medula óssea (AUST et al., 2004). Além disso, quando comparado às técnicas para cultura das CTM-MO, as derivadas do TA são mais facilmente cultivadas e crescem mais rápido (LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009; MITCHEL et al., 2006; ZUK et al., 2001).

O isolamento das CTMs-TA foi também descrito com o mesmo sucesso e até maior rapidez a partir do material lipoaspirado e que ainda poderia ser armazenado sob baixas temperaturas por até 24 horas, o que poderia facilitar o processo e a aplicabilidade clínica em algumas situações (EOM et al., 2011). Diversas técnicas foram descritas para o isolamento das CTMs-TA a partir do material lipoaspirado (JURGENS et al., 2008; LI et al., 2011; VERMETTE et al., 2007; ZUK et al., 2001). Essas técnicas têm como objetivo extrair do TA a FVE que contém as células tronco adiposas. Em geral, a metodologia utilizada requer, inicialmente, a digestão enzimática do TA, mais comumente pela collagenase, seguida pela separação e retirada dos adipócitos maduros; isolando, assim, a FVE, por centrifugação diferencial. As células presentes na FVE são colocadas em cultura e as CTMs-TA se

diferenciam por aderirem à superfície das placas e, dessa forma, predominam sobre as demais células.

As CTMs-TA podem ser isoladas e quantificadas por meio da cultura *in vitro* pelo ensaio de unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F) (BOURIN et al., 2013; JURGENS et al., 2008), descrito originalmente para as CTMs-MO (CASTRO- MASLASPINA et al., 1980). O isolamento das CTMs-TA também pode ser realizado por meio da identificação de glicoproteínas de superfície celular, que são marcadores tipicamente expressos na superfície de determinadas células (CD: *Cluster of Differentiation*), por meio do exame de citometria de fluxo.

As CTMs-TA derivadas do TA fresco representam uma população heterogênea de células, com quatro subtipos distintos identificados, sendo mais prevalentes os pré-adipócitos, seguidos pelos pericitos, pelas células maduras endoteliais e células imaturas endoteliais (ZACHAR; RASMUSSEN; FINK, 2011). Na FVE, as CTMs-TA podem ser identificadas pela combinação dos marcadores CD45- CD235a- CD31- CD34+. Os marcadores CD45 e CD235a estão relacionados à linhagem hematopoiética, enquanto o CD31 à endotelial. Já a expressão da glicoproteína CD34, conhecido marcador de células hematopoiéticas e endoteliais (ASAHARA et al., 1997; CIVIN et al., 1984) é também expressa nas CTMs-TA do TA fresco e vai perdendo a expressão nessas células ao longo das fases do cultivo (BOURIN et al., 2013). Assim, durante o cultivo e a expansão celular *in vitro*, ocorrem mudanças na expressão das moléculas de superfície das CTMs-TA que, na terceira passagem das células (P3), se tornam negativas para o CD34, mas ainda retêm alta a expressão dos marcadores para CD105, CD90 e CD73.

1.4 Aplicações clínicas das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo

As cirurgias plásticas estéticas e reconstrutivas vêm aumentando consideravelmente nos últimos anos. Em 2016, segundo dados da Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS), houve aumento médio de 8% na realização de cirurgias corporais, como lipoaspirações, em relação ao ano anterior. Além disso, cirurgias que realizam transferência de gordura, como lipoenxertias de glúteos, apresentaram aumento significativamente maior, de 17% (ISAPS, 2016).

Considerando-se esse cenário de grande disponibilidade de amostras de TA por meios pouco invasivos, a gordura torna-se importante fonte para estudos das CTMs. Por outro lado, o aumento crescente na utilização do TA como preenchedor para correção de deformidades corporais aumentou o interesse por novas técnicas que promovam melhoria na integração desse tecido à área receptora, com o objetivo de reduzir as taxas de absorção (COLEMAN, 1995, 2001), que podem apresentar grandes variações, estimadas de 20% até 90% (NGUYEN et al., 1990; NIECHAJEV; SEVČUK, 1994)

As CTMs-TA apresentam maior resistência a condições de hipóxia e isquemia do que outras células somáticas, e também demonstraram possuir propriedades angiogênicas (MIZUNO, 2009) e, assim, estão sendo utilizadas em alguns estudos para enriquecimento do enxerto de gordura, com o intuito de aumentar a taxa de integração e também melhorar as condições de tecidos irradiados (WU et al., 2018). Por outro lado, essas mesmas propriedades angiogênicas das CTMs-TA também poderiam auxiliar nos processos envolvidos na cicatrização de feridas, havendo interesse especial para aquelas feridas crônicas e de difícil cicatrização.

Nie et al. (2011) descreveram o uso dessas células em feridas de ratos normais e diabéticos demonstrando aceleração no fechamento das feridas em ambos os grupos. Huang et al. (2013) realizaram estudo com CTMs-TA em feridas de ratos criadas por exposição à radiação, demonstrando aceleração no fechamento por meio da diferenciação em células endoteliais e estímulo a neoangiogênese nas úlceras. Bura et al. (2014) publicaram um ensaio clínico fase I, no qual foram injetadas CTMs-TA autólogas em membros isquêmicos de pacientes sem condições de revascularização, demonstrando segurança clínica e melhoria na cicatrização de feridas nesses membros. Tutihashi (2016) analisou o uso do meio sobrenadante de cultura proveniente das CTMs-TA, rico em fatores de crescimento e citocinas, sobre fibroblastos de pacientes diabéticos portadores de feridas, obtendo melhora na função dessas células *in vitro*.

Uma ferida considerada de difícil cicatrização é a úlcera cutânea, presente em pacientes portadores de anemia falciforme (AF). Essas úlceras acometem mais frequentemente a região ao redor dos maléolos, com menor frequência a região do terço distal da perna, dos pés e mais raramente dos dedos. As feridas costumam

ser dolorosas, altamente recorrentes, de lenta e difícil cicatrização, que pode se estender por meses ou anos (MINNITI; KATO, 2016).

Dentre as fontes de TA no organismo, a região subcutânea é a que contém maior concentração de CTMs-TA quando comparada a outras áreas (JOE et al., 2009). Sabe-se que o tecido subcutâneo apresenta ampla distribuição pelo corpo humano, por diferentes regiões anatômicas, que variam em relação ao suprimento sanguíneo, às forças de compressão e tração a que são submetidas diariamente, além das variações na capacidade de acúmulo ou perda de gordura entre elas.

Assim, nos últimos anos, alguns estudos procuraram identificar possíveis diferenças quantitativas ou qualitativas nas CTMs-TA derivadas de diferentes áreas doadoras de TA subcutâneo. No entanto, mediante resultados divergentes, pode-se considerar até o momento inconclusiva a determinação de uma área doadora preferencial.

1.5 Influência da área doadora de tecido adiposo sobre aspectos quantitativos e qualitativos das CTMs-TA

Rohrich, Sorokin e Brown (2004) analisaram o número de células adiposas viáveis no lipoaspirado coletado das regiões do abdome, coxas, flancos e joelhos, não identificando diferenças nos resultados. Nesse estudo não foram avaliadas ou quantificadas as CTMs-TA. Oedayrajsingh-Varma et al. (2006) avaliaram o rendimento de células nucleadas na FVE de algumas áreas de TA e observaram que era similar nas áreas de abdome, quadril e mamas. No entanto, nesse estudo foram utilizadas três diferentes técnicas para coleta do TA entre essas áreas: ressecção, lipoaspiração e lipoaspiração assistida por ultrassom, e não foram comparadas as diferentes áreas doadoras no mesmo paciente.

Jurgens et al. (2008) compararam o TA coletado por lipoaspiração das regiões do abdome e coxas de pacientes do sexo feminino e concluíram que o número de células nucleadas presentes nas FVEs entre as áreas foi similar, corroborando os resultados já obtidos por Oedayrajsingh-Varma et al. (2006). Contudo, quando analisaram a frequência de CTMs-TA entre cada área, por meio do ensaio CFU-F, demonstraram ser significativamente maior no TA da região do abdome em relação ao da coxa. Do ponto de vista qualitativo, esse estudo não

evidenciou diferenças quanto ao potencial de diferenciação osteogênica, ou às características imunofenotípicas, ou ainda de cinética celular das CTMs-TA.

Padoin et al. (2008) quantificaram as CTMs-TA entre um número maior de áreas doadoras: abdome superior, abdome inferior, culotes, região interna de coxas e joelhos. Como metodologia, as CTMs-TA foram identificadas a partir da FVE obtida dessas áreas, que foi submetida à citometria de fluxo e realizada a quantificação. Os marcadores de superfície utilizados nesse estudo foram CD105, CD117, CD34/CD117, CD 45/CD105, CD34 e CD45, sendo que consideraram para a contagem das CTMs-TA as células positivas para CD105, CD117, CD34/CD117, CD45/CD1-5 e negativas para CD45 e CD34. No entanto, esse último marcador apresenta alta expressão nas CTMs-TA do TA fresco, como o que foi utilizado no estudo. Os autores concluíram que áreas doadoras de abdome inferior e internas de coxas apresentaram maior quantidade de CTMs-TA em relação às demais. No entanto, considerou-se para contagem as células de TA fresco negativas para CD34 e não foi realizado o ensaio CFU-F. Aspectos qualitativos também não foram abordados.

Li et al. (2013) analisaram TA de seis mulheres, das áreas doadoras de flancos, abdome superior, abdome inferior, além de regiões interna e externa de coxas. Foi realizada contagem do número total de células nucleadas na FVE e também submeteram essas células à análise por citometria de fluxo utilizando como marcadores CD34, CD31, CD45, CD90 e CD44. Não reportaram diferenças quanto às áreas doadoras nesses dois aspectos. Também não foi realizado o ensaio CFU-F para contagem das CTMs-TA. Os mesmos autores ainda realizaram lipoenxertia do tecido coletado de cada uma das cinco áreas em estudo, na região subcutânea de ratos atímicos. Após 12 semanas, os animais foram sacrificados e o TA coletado foi submetido à análise histológica de alguns aspectos como viabilidade celular, neovascularização, presença de linfócitos e macrófagos, presença de fibrose e quantificação do volume e do peso, concluindo não haver diferenças nesses aspectos.

Mais recentemente, Tsekouras et al. (2017) realizaram estudo em que o TA coletado da coxa, da região interna e da externa, representada pelos culotes, evidenciou número maior de CTMs-TA em relação ao abdome anterior e flancos,

divergindo de outros estudos. Não houve diferenças em relação ao perfil fenotípico entre as áreas doadoras das CTMS- TA cultivadas *in vitro*. Como metodologia, o autor não utilizou o ensaio CFU-F e a quantificação foi feita pela contagem do número de células, a cada passagem, durante o cultivo *in vitro*.

Em decorrência desses resultados divergentes, este estudo propôs quantificar as CTMs-TA em diferentes áreas do corpo, por meio do ensaio CFU-F para análise da frequência dessas células, e também comparar de forma qualitativa o perfil de expressão dessas células entre as diferentes áreas corporais, no TA fresco e também após o cultivo *in vitro*.

1.6 Anemia falciforme e o tratamento das úlceras cutâneas

A AF é uma doença genética, sendo a mais comum hemoglobinopatia em todo o mundo (BALLAS et al., 2010). O termo AF inclui diferentes combinações genéticas, como a encontrada nos pacientes homozigóticos (HbSS), assim como condições heterozigóticas como hemoglobina S combinada com hemoglobina C (Hb SC), hemoglobina S associada com β -talassemia (S β 0 Thal e S β + Thal), dentre outras menos prevalentes (STEINBERG, 2009).

Os recentes avanços nos últimos anos possibilitaram aos pacientes portadores de AF significativa melhora em termos de morbidade e mortalidade devido a introdução de tratamentos como a hidroxiuréia, profilaxia e tratamento de infecções por meio do uso de antibióticos, uso de hemoderivados, dentre outras medidas de suporte (MINNITI; KATO, 2016).

Com o aumento da expectativa de vida desses pacientes, o surgimento de outras complicações como as úlceras cutâneas, representa novos desafios e vem sendo objeto de estudos que buscam melhor entendimento sobre a etiologia dessas feridas e, assim, possibilitar a descoberta de terapias mais eficazes. A prevalência dessas úlceras entre os pacientes portadores de AF varia na literatura em função de diversos fatores como distribuição geográfica, idade dos pacientes e análises metodológicas. Na Jamaica, por exemplo, até os 30 anos de idade, a incidência cumulativa descrita chega a 70% (SERJEANT et al., 2005). Na Nigéria, a

prevalência variou entre 7,5% para pacientes com genótipo HbSS e de 1,5% para aqueles HbSC.

Mais recentemente, a prevalência de úlceras com duração de seis meses ou mais na população portadora dessa condição foi estimada em 29,5% e a incidência cumulativa chegou a 16,7% (CUMMING et al., 2008). Além disso, os pacientes mais comumente acometidos por úlceras cutâneas são adolescentes ou adultos jovens.

A presença de úlceras cutâneas é considerada por alguns autores como um marcador de gravidade, uma vez que outras complicações podem estar presentes com maior frequência, como hipertensão pulmonar, acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, priapismo, retinopatia, dentre outras condições relacionadas à vasculopatias (CUMMING et al., 2008, HALABI-TAWIL et al., 2008).

Assim como ocorre nos pacientes portadores de hipertensão pulmonar, aqueles com úlceras cutâneas costumam apresentar grau mais severo de anemia hemolítica, caracterizado por níveis mais baixos de hemoglobina e níveis mais elevados de desidrogenase láctica (DHL), um marcador associado à hemólise intravascular (CUMMING et al., 2008; KATO et al., 2006).

A patogênese das úlceras cutâneas na AF é complexa e envolve diferentes fatores como redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (MACK; KATO, 2006, WOOD et al 2006), vasoconstricção postural (MOHAN et al., 1997), insuficiência venosa (CUMMING et al., 2008; MOHAN et al., 2000; SEARJANT et al., 2005), hipercoagulabilidade sanguínea, (CACCIOLA et al., 1990) disfunção do sistema imunológico e infecções bacterianas (MORGAN; VENNER, 1981).

Outros estudos associaram variações genótípicas com a diversidade nas formas de apresentação da doença, incluindo a presença ou não de úlceras cutâneas. Assim, a ocorrência de polimorfismo genético na via TGF- β /BMP (proteína morfogenética óssea), uma superfamília de genes envolvida com cicatrização e angiogênese, dentre outras funções, tem sido associada com a presença de úlceras cutâneas (STEINBERG et al., 2009).

Diversos tratamentos são descritos na literatura e uma revisão sistemática (MARTÍ-CARVAJAL; KNIGHT-MADDEN; MARTINEZ-ZAPATA, em 2014) analisou as intervenções terapêuticas dividindo-as em dois grupos: farmacológicas (sistêmicas e tópicas) e não farmacológicas (cirúrgicas e não cirúrgicas). Dentre os

estudos que alcançaram os critérios para inclusão, apenas a intervenção tópica com a matriz peptídeo RGD (sequência peptídica de Arginina-Glicina-Asparagina) demonstrou redução nas dimensões das úlceras em comparação ao grupo controle, no entanto, os autores recomendaram cautela na análise desse resultado devido ao alto risco de vieses do estudo.

Nas últimas décadas, o óxido nítrico vem adquirindo um papel importante no entendimento da fisiopatogênese das úlceras cutâneas na AF, devido às suas funções na cicatrização de feridas, que envolvem aumento da produção de matriz extracelular, modulação de resposta imunológica, aumento da proliferação de queratinócitos, angiogênese e melhoria da homeostase vascular, por induzir a vasodilatação, além de fatores de crescimento envolvidos na homeostase endotelial (EFRON; MOST; BARBUL, 2000; SONEJA; DREWS; MALINSKI, 2005).

Um estudo fase I foi conduzido com aplicação tópica de nitrito de sódio, um conhecido doador de óxido nítrico, sobre úlceras cutâneas de pacientes portadores de AF, na concentração de 2% em creme. Embora ainda tenha sido um estudo fase I, com o objetivo de demonstrar segurança e tolerabilidade do produto, os resultados foram promissores em relação à cicatrização das feridas e melhora da dor local (MINNITI et al., 2014), de forma que estudos subsequentes serão realizados pelos autores.

Assim, embora haja na literatura esses estudos que buscam fornecer novas opções terapêuticas, o manejo clínico das feridas em pacientes portadores de AF ainda é um grande desafio para os centros de tratamentos dessa patologia.

Meneses et al. (2016) realizaram estudo fase I em que injetaram CTMs-MO no leito de feridas de pacientes portadores de AF demonstrando a segurança do procedimento, além de sugerirem resultados favoráveis em termos de cicatrização local e melhor controle da dor.

Não há até o momento estudos que analisaram possíveis efeitos que as CTMs-TA poderiam exercer *in vitro* sobre os fibroblastos desse tipo de ferida.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar a influência exercida pela área doadora corporal sobre aspectos qualitativos e quantitativos das CTMs-TA e analisar a influência do meio sobrenadante produzido por essas células sobre a migração de fibroblastos normais e os de feridas de pacientes portadores de AF.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar o perfil de expressão de moléculas de superfície das CTMs-TA coletadas de cinco áreas corporais: dorso, flancos, abdome inferior, abdome superior e região interna de coxas por meio de citometria de fluxo, nas células do TA fresco (P0) e após o cultivo celular *in vitro* (P3).
2. Analisar e comparar a cinética celular das CTMs-TA das cinco áreas doadoras e analisar a relação das variáveis idade e IMC (índice de massa corporal) com a cinética celular e com o número de CTMs-TA.
3. Quantificar o número de CTMs-TA no TA dessas cinco áreas em estudo, por meio do ensaio de unidade formadora de colônias fibroblastoides (CFU-F).
4. Comprovar a capacidade de diferenciação das CTMs-TA em adipócitos, osteócitos e condrócitos.
5. Analisar a influência do sobrenadante produzido pelas CTMs-TA sobre a migração de fibroblastos *in vitro* de pacientes normais e de portadores de AF.
6. Analisar citocinas e fatores de crescimento presentes no meio sobrenadante produzido pelas CTMs-TA obtidas de abdome inferior e coxas e também nas culturas de fibroblastos normais e dos obtidos de indivíduos portadores de AF.

3. Casuística e Métodos

3.1 Principais Reagentes

- **Solução Salina tamponada de fosfato (PBS 1x):** para volume de 1 L água MilliQ suplementar com 137 mM NaCl, 10 mM tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) e 2,7 mM KCL, pH 7,2.
- **Solução lise de Eritrócitos:** 500 ml de PBS1x suplementado com 154,9 mM NH_4Cl , 7,24 mM K_2CO_3 e 0,12 mM EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético), pH 7,2.
- **Meio de cultivo das CTMs:** α -MEM (Meio essencial mínimo alfa) com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (Hyclone®)
- **Meio de digestão enzimática do TA:** RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*: meio de cultura celular) 1640 (Gibco®) suplementado com 26 mM Bicarbonato de Sódio (Fischer Scientific®), 25 mM HEPES (Sigma®), 100 U/ml Penicilina (Gibco®), 100 μM Estreptomicina (Gibco®), 0,1% colagenase tipo 1 (Worthington®), pH 7,2.
- **Meio de inativação enzimática:** RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com 5% de SFB (Hyclone®), 26 mM Bicarbonato de Sódio (Fischer Scientific®), 25 mM HEPES (Sigma®), 100 U/ml Penicilina (Gibco®), 100 μM Estreptomicina (Gibco®), pH 7,2.
- **Meio indutor de diferenciação adipogênica:** α -MEM (Gibco®), suplementado com 15% SBF (Hyclone®), 1 ml de dexametasona (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA), 2,5 mg/mL de insulina e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA).
- **Meio indutor de diferenciação osteogênica:** meio α -MEM (Gibco®), suplementado com 7,5% SBF (Hyclone®), 0,1 mM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerolfosfato (Reagem®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)
- **Meio indutor de diferenciação condrogênica:** DMEM sem SFB, com piruvato de sódio (100 μM), albumina humana (0,2%), ácido ascórbico (50 μM), dexametasona (1 μM) e TGF β 3 (20 ng/ml).

3.2 Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), processo HCRP nº 7547/2015 (Anexo A). Os pacientes foram informados sobre o propósito e as consequências da pesquisa, e os que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP.

3.3 Obtenção das amostras de tecido adiposo e dos fibroblastos

Amostras de TA foram obtidas de um grupo de 17 pacientes hígdas, que desejaram melhora do contorno corporal, por meio de uma lipoaspiração, com os seguintes critérios de inclusão: sexo feminino, idade entre 20 a 54 anos, ausência de comorbidades, não tabagistas, IMC máximo de 29.

Para obtenção dos fibroblastos, foram coletadas amostras de pele de três pacientes portadores de AF com úlceras cutâneas em membros inferiores, por meio de biópsias tipo “punch”, de 6 mm, no leito de suas feridas, sob anestesia local. Os critérios de inclusão foram pacientes entre 18 a 45 anos, portadores de AF e defeitos cutâneos crônicos, sem outras comorbidades, não tabagistas. Para obtenção de fibroblastos de pacientes normais, foram coletadas amostras de pele de cinco mulheres hígdas submetidas a cirurgias de mamoplastias redutoras, com os critérios de inclusão: idade entre 18 a 54 anos, sem comorbidades, não tabagistas.

3.4 Aspectos técnicos da coleta do tecido adiposo

Todas as pacientes foram submetidas à lipoaspiração pelo mesmo cirurgião, autor principal deste estudo, em ambiente hospitalar, sob anestesia geral.

As áreas doadoras corporais do TA de cada paciente foram divididas em: abdome superior, abdome inferior, flancos, dorso e região interna das coxas (Figura 1).

A lipoaspiração foi realizada utilizando-se técnica infiltrativa tumescente (proporção entre o volume infiltrado e aspirado de cerca de 1:1), por meio de infiltração com solução composta por soro fisiológico (SF) 0,9% e adrenalina 1:500.000, com 20 ml de ropivacaína 7,5% (Naropin®, AstraZeneca) para cada 1000 ml dessa solução.

Os instrumentais utilizados para a lipoaspiração foram sempre cânulas com calibre de 3 mm acopladas a seringas de 60 ml para padronizar a pressão de aspiração, assim como reduzir o trauma mecânico aos adipócitos. Após a coleta, as seringas de 60 ml foram completadas com SF 0,9% para auxiliar na lavagem e submetidas à decantação gravitacional por cerca de 10 minutos. A porção inferior de cada seringa formou uma fração líquida composta por solução da infiltração misturada a sangue e que foi desprezada. O sobrenadante composto pela gordura macroscopicamente limpa foi transferido para seringas contendo o volume de 10 ml cada (Figura 2).

Para cada área corporal incluída no estudo foram coletadas duas amostras de 10 ml de gordura lipoaspirada, que foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo solução de tampão de cordão umbilical devidamente identificados e mantidos sob condições estéreis. Para o transporte, os tubos foram acondicionados em um recipiente rígido (caixa térmica de 24 L), conforme orientação das normas técnicas vigentes para transporte de material biológico, e transportado com 2 a 3 kg de gelo reciclável. A temperatura do material durante o transporte foi monitorada com o auxílio de um cartão sensor e registrador de temperatura (LogTag™ OnSolution Pty Ltd, Sydney, Austrália).

Figura 1 - Áreas doadoras de tecido adiposo: abdome superior (1), abdome inferior (2), coxas (3), dorso (4) e flancos (5)

Figura 2 - Amostras de tecido adiposo coletadas de uma das áreas corporais, em duas seringas de 10 ml cada, totalizando 20 ml por área

3.5 Processamento do tecido adiposo

O TA foi digerido com collagenase 0,1% (collagenase tipo 1A, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 60 minutos em banho-maria a 37°C (Banho-maria Sieger®, Stern 6), com agitação manual a cada 10 minutos, para quebra da matriz extracelular e liberação das células; em seguida foi submetido à centrifugação (Centrífuga Beckman®, Couter Allegra X-15) à 1500 rpm, 10 minutos, 4°C para separação dos adipócitos no sobrenadante da FVE abaixo, que contém o botão celular (ou “*pellet*”) formado no fundo de cada frasco. O botão celular inclui células estromais misturadas, dentre as quais estão as CTMs-TA. O botão celular foi aspirado, transferido para frascos contendo meio para inativação da enzima collagenase, composto por RPMI enriquecido com 5% de SFB (Characterized Fetal Bovine Serum - HyClone™, Logan, UT, EUA), em volume equivalente a três vezes a quantidade de collagenase utilizada, acrescido de antifúngico e antibiótico.

Foi realizada a contagem das células nucleadas totais de cada área em estudo por meio de um analisador hematológico (Auto Hematology Analyser BC-2800 Mindray®).

3.6 Análise quantitativa das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo

Para a análise da frequência das CTMs-TA de cada área corporal foi realizado o ensaio *in vitro* de quantificação de CFU-F.

As células presentes no botão celular de cada área doadora corporal foram plaqueadas, em triplicata para cada área, em meio composto por α -MEM com 10% de SFB, incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂ e o meio renovado a cada 48 a 72 horas. Como as CTMs-TA se aderem às placas e predominam sobre outras células na cultura, após um período de 14 dias, originaram colônias de células fibroblastoides (considerou-se uma colônia a presença de ao menos 50 células agrupadas). Assim, após 14 dias, as células foram coradas com Leishmann (Dolles) por cinco minutos e realizada contagem das colônias, com auxílio de microscópio de contraste de fase (Olympus IX50, Tóquio, Japão).

Nos primeiros sete casos, optou-se como metodologia o cultivo sob baixa densidade de 10⁴ células para cada placa de 35 mm. No entanto, ocorreu confluência celular nas placas o que impossibilitou a realização da contagem das colônias fibroblastoides de forma precisa. A partir do 8º caso, foi realizada modificação para o cultivo de 10³ células para cada placa de 100 mm, reduzindo-se, assim, para concentração de 18 células/cm². O ensaio CFU com essa metodologia foi realizado com sucesso em 10 pacientes.

3.7 Cultivo e expansão celular

O cultivo celular foi feito em garrafas de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) contendo meio α -MEM com 10% de SFB, as células foram incubadas em estufa úmida à 37°C com 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada cerca de 72 horas, para retirada de células não aderentes. As CTMs-TA se aderiram ao plástico das garrafas e adquiriram conformação semelhante a

fibroblastos, mais alongada. Quanto ocorreu aumento da densidade celular acima de 80%, com confluência das células, o meio foi retirado, realizada lavagem com PBS 1X e adicionado 3 ml de enzima tripsina (0,05% Trypsin 0,53 mM EDTA, Gibco™ Carlsbad, CA, EUA) para lise entre as adesões celulares. Para ativação dessa enzima e consequente lise celular, foram transferidas para incubadora (Thermo Scientific Enviro Scan™) durante cinco minutos, à 37°C. Em seguida, para inativação da tripsina foram adicionados 9 ml de RPMI + 5% SFB + Antifúngico+ Antibiótico. Após determinação do número de células, alíquotas dessas células foram separadas para fins de caracterização do perfil imunofenotípico, avaliação da cinética celular, diferenciação nas três linhagens mesodermas, além de congelamento para possível uso futuro.

3.8 Análise qualitativa das células mesenquimais multipotentes derivadas do tecido adiposo

A análise qualitativa foi realizada por meio da identificação de moléculas marcadoras de superfície celular expressas pelas CTMs-TA (conhecidas como grupo de diferenciação ou do inglês CD: *cluster of differentiation*), por citometria de fluxo.

A caracterização imunofenotípica foi realizada no TA fresco (P0) e após o cultivo celular, na terceira passagem (P3), com auxílio do aparelho FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os dados foram analisados com o *software* CELLQuest™ (Becton Dickinson). Para este ensaio, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (BD-Pharmingen): CD271, CD90, CD14, CD105 e CD200 conjugados com PE (do inglês, *phycoerythrin*), CD31, CD45, CD73, Anti-HL-ABC conjugados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*), CD34 e Anti-HLA-DR conjugados com PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll*). Como controle dessas análises, foram utilizados isótipos de imunoglobulinas G conjugados com FITC, PE, PerCP.

Suspensões contendo 1×10^5 células foram marcadas com 0,1 µg de cada anticorpo e as amostras incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, as células foram lavadas com PBS 1X, centrifugadas a 500 x g por três minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, cada botão celular foi ressuspensão em PBS 1X e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Assim, foram avaliadas a expressão de marcadores de células hematopoiéticas (CD45 e CD14), de células endoteliais (CD31), de células progenitoras hematopoiéticas e também de endoteliais (CD34), dos marcadores presentes em células de defesa como macrófagos e linfócitos (HLA-DR ou MHC classe II [Complexo principal de histocompatibilidade classe II]), além dos marcadores tipicamente expressos nas CTMs-TA (CD105, CD73 e CD90).

3.9 Avaliação da cinética celular *in vitro*

Para avaliação da capacidade proliferativa e da cinética de cultura das CTMs-TA, respectivas à cada área corporal, as células foram plaqueadas em triplicata, com densidades iguais, respectivamente às cinco áreas em estudo. Ao atingirem a confluência celular aproximada em 80%, as células eram tripsinizadas e contadas, com auxílio do analisador hematológico (Auto Hematology Analyser BC- 2800 Mindray ®), para determinação da taxa de duplicação de cada população. A cinética foi avaliada com base no tempo estimado para ocorrer a divisão celular (“doubling time” ou DT), que foi calculado com base na seguinte fórmula $DT = t \cdot \ln(2) / \ln(N/N_0)$, na qual N= número final de células obtidas, N_0 = número inicial de células plaqueadas e t= tempo (em dias), em que as células ficaram em cultura.

3.10 Diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos *in vitro*

Além da determinação do perfil imunofenotípico, a confirmação do potencial de diferenciação constitui um dos critérios para a caracterização funcional e identificação das CTMs, conforme proposto pela Sociedade Internacional para Terapia Celular (DOMINICI et al., 2006).

A diferenciação *in vitro* das CTMs-TA em adipócitos, osteócitos e condrócitos foi realizada após a expansão celular, na terceira passagem por meio do cultivo em meios indutores específicos.

Adipócitos: A diferenciação em adipócitos foi realizada em placas de 24 poços, previamente montadas com pequenas lamínulas estéreis de 13 mm de diâmetro. As CTMs-TA indiferenciadas foram tripsinizadas e replaqueadas na

concentração de 2×10^4 células/mL para a diferenciação e 5×10^3 células/mL para controle negativo. O ensaio de diferenciação foi iniciado no mínimo 24h após o início do cultivo para permitir a adesão das células à lamínula e uma confluência de 50 a 60%.

O meio utilizado para a indução de diferenciação foi o α -MEM, suplementado com 15% SBF (Hyclone®), 1 ml de dexametasona (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA), 2,5 mg/mL de insulina e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Os controles negativos, ou seja, CTMs-TA indiferenciadas, foram mantidas em meio convencional (α -MEM+ 7,5% SFB) sem a presença de indutores de diferenciação e sob as mesmas condições, anteriormente descritas.

Após alcançar a confluência desejada, o meio de cada poço foi removido e em seguida, foram adicionados 500 μ L do meio de indução de diferenciação específico para adipócito e 500 μ L do meio base, α -MEM+15% SFB. Para as amostras do controle negativo foi utilizado o meio α -MEM suplementado somente com 7,5% SFB. As placas da diferenciação foram mantidas em estufa com 80% de umidade, a 37°C com 5% de CO₂. Metade do meio foi trocado duas vezes por semana, sendo que o mesmo continha o dobro da concentração de reagentes indutores da diferenciação. As amostras foram cultivadas e monitorizadas por microscopia de contraste de fase (Olympus®, IX71) até o surgimento de indícios da diferenciação celular ($\pm$ 15 dias).

As culturas diferenciadas e seus controles foram fixados com 500 μ L de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagem com água destilada e incubação com solução de álcool 70% por 2-3 minutos, as células foram coradas por cinco minutos com o corante específico para moléculas lipídicas, Sudam II escarlata (MERCK®, Alemanha). Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com 1 mL de álcool 70%, 1 mL de água destilada e contracoradas com 500 μ L do segundo corante, hematoxilina de Harris por dois minutos à temperatura ambiente.

Osteócitos: A metodologia de preparação das lâminas e cultivo foi semelhante à utilizada na diferenciação adipocítica. Para a diferenciação em células osteocíticas foi usado o meio α -MEM, suplementado com 7,5% SBF (Hyclone®), 0,1 mM de

dexametasona (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerolfosfato (Reagem®, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) +/- 28 dias.

As culturas e seus controles foram lavados uma vez com PBS, fixados por 30 minutos com 500 μ L de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) à temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas duas vezes com água destilada e incubadas com 1 mL de *Alizarin red* por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas diversas vezes com água e, após secas, as lâminas foram montadas em Permount SP 15 (Fisher®, Inglaterra).

Figura 3 - Placa de 24 poços utilizada para diferenciação de osteócitos e adipócitos

Condrócitos: A diferenciação em condrócitos foi realizada em placa de 100mm. Foram separadas 1×10^6 células, centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. Desse botão celular foram feitas gotículas de 5 μ L contendo as células. Após duas horas, foi adicionado o meio indutor composto por DMEM sem SFB, com piruvato de sódio (100 μ M), albumina humana (0,2%), ácido ascórbico (50 μ M), dexametasona (1 μ M) e TGF β 3 (20 ng/ml) e as células foram, então, cultivadas durante 14 dias.

Figura 4 - Placa utilizada para diferenciação de condrócitos

3.11 Obtenção do sobrenadante derivado das CTMs-TA

Foram descongelados frascos contendo CTMs-TA obtidas após o cultivo *in vitro* de amostras de TA do abdome inferior e da coxa, conforme processamento descrito acima (Item 3.7). Cada frasco contendo as CTMs-TA foi dividido e semeado em duas garrafas de 175 cm² contendo α MEM+ 15% de SFB. Posteriormente, foram realizadas tripsinização e contagem celular. A concentração de 1×10^6 CTMs-TA foi plaqueada em placas de 100 mm³. O meio foi, então, trocado, por meio da lavagem das células com PBS 1x e adicionados 5 ml de α MEM+ 1% de SFB e permaneceu por 48 horas em cultura. Após esse período, foram coletados os sobrenadantes, centrifugados, filtrados 0,22 μ M e separados por alíquotas de 2 ml por frasco, as quais foram acondicionadas em tubos criogênicos (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) e congeladas a -80°C por no mínimo 24 horas e em seguida, transferidas para o nitrogênio líquido.

3.12 Isolamento e cultura dos fibroblastos

Amostras de pele de cinco pacientes normais foram obtidas de mulheres submetidas à mamoplastia redutora, sob anestesia geral. Amostras de pele da borda da ferida, presente nos membros inferiores de três pacientes portadores de AF foram obtidas por meio de biópsias, utilizando-se um “punch” de 6 mm. Essas amostras de pele normal e as provenientes das úlceras de pacientes com AF foram colocadas em meio estéril de tampão de cordão umbilical, enviados imediatamente ao Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro do HCFMRP-USP, onde foram lavadas com meio DMEM+Antibióticos e os tecidos fragmentados em pequenas partes de cerca de 1 mm, transferidos para placas de 100 mm, em meio DMEM + 20% de SFB para o cultivo celular. Após o cultivo dos fibroblastos, esses foram coletados e congelados por alíquotas em frascos.

Em outro momento, esses frascos, contendo os fibroblastos foram descongelados e cada um dividido em duas garrafas de 175 cm² em meio DMEM+ 10% SFB. Foram, então, realizadas tripsinização, contagem celular e redistribuição de 2×10^5 células em cada poço das placas de seis poços. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Quando as células atingiram a confluência, cerca de cinco dias depois, foi realizado o *scratch* (arranhão) com a pipeta no fundo dos poços, seguido por lavagem com PBS 1x para remoção do meio e das células não aderentes. As placas foram, então, divididas em dois grupos, controle e experimento. Para o grupo controle, foram adicionados apenas 2 ml do meio constituído por α MEM+1% SFB. Para o grupo experimento foi adicionado 1ml desse mesmo meio α MEM+1% SFB com 1 ml do sobrenadante coletado do cultivo das CTMs-TA (Item 4.1). As placas foram enviadas para os realização dos estudos de migração celular, de forma que cada uma continha dois tipos de fibroblastos, cada tipo ocupando uma fileira de três poços (Figura 5)

3.13 Análise da migração dos fibroblastos *in vitro*

As placas contendo os grupos experimento e controle foram encaminhadas para análise com auxílio de um microscópio confocal com mesa motorizada (LSM 710®, Zeiss), que dispõe de controle de temperatura. Foi utilizada para a visualização apenas a parte de microscopia de campo claro e realizada a programação da aquisição das imagens por meio de fotografias, a cada 20 minutos, por 48 horas. O registro fotográfico foi realizado em cada área sulcada de uma placa em três pontos fixos pré-determinados, com o objetivo de reduzir vieses e permitir o cálculo de uma média a ser utilizada nas análises.

Para fins de análise, foram utilizadas as imagens obtidas a cada três horas pelo microscópio, e um *software*, Image J®, foi utilizado para calcular as áreas presentes na região sulcada ao longo dos experimentos. O tempo necessário, em horas, para que a área sulcada inicial de cada caso apresentasse redução além de 50% ($t_{1/2}$ Gap), foi considerado para realização das análises.

Figura 5 - Microscópio com mesa motorizada (LSM 710®, Zeiss), que dispõe de controle de temperatura, utilizado para realização dos experimentos de migração dos fibroblastos

3.14 Análise das proteínas secretadas nos sobrenadantes das CTMs-TA e nas culturas de fibroblastos

Para análise dos níveis das proteínas secretadas no sobrenadante de cultura de CTMs-TA foi utilizada a tecnologia Luminex®. Essa tecnologia permite a detecção e quantificação simultânea de múltiplos biomarcadores (até 100) em uma mesma amostra. A detecção é realizada em amostras pequenas, de aproximadamente 50 µl.

O princípio do ensaio Luminex® é similar ao ELISA “sanduíche”, associado à citometria de fluxo. Este ensaio utiliza microesferas magnéticas fluorescentes revestidas com anticorpos específicos para cada alvo estudado. Anticorpos biotinilados de detecção são adicionados para criar o complexo “sanduíche”, que é ligado ao conjugado estraptavidina-ficoeritrina. O complexo, então, emite sinal fluorescente captado por dois lasers: um deles identifica e classifica a microesfera, e outro quantifica o biomarcador. Um processador digital captura esses dados e os envia ao *software* de análise da plataforma Luminex®.

As proteínas analisadas foram: IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa), PDGF-AA, PDGF-BB (Fator de crescimento derivado das plaquetas, subunidades BB), VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), HGF (Fator de

crescimento de hepatócitos), GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), CXCL-IL8 (Interleucina 8). O *kit* utilizado foi o *Human Premixed Multi-Analyte®* (R&D Systems, Boston, MA, USA).

Previamente ao ensaio, as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e diluídas com o tampão específico do *kit*. As amostras e os padrões foram pipetados (50 µl) em uma placa com 96 poços. Em seguida, foram adicionadas 50 µl das microesferas revestidas com anticorpos monoclonais. Foram incubadas por duas horas em um agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital - IKA® Werke Staufen, Alemanha), protegidas da luz e mantidas à temperatura ambiente (20-25°C). Após o tempo de incubação, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem para remover os reagentes não aderidos. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex® pro II wash Station), na qual as microesferas permaneceram retidas na placa pela ação de um ímã. A seguir, 50 µl de anticorpos secundários biotinizados foram adicionados em cada poço e incubados por uma hora.

Após a lavagem, 50 µl de estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente ficoeritrina foram adicionados e incubados durante 30 minutos. Após a lavagem, foram adicionados 100 µl de tampão de lavagem para ser analisado na plataforma Luminex® MAGPIX®. As concentrações das amostras analisadas foram calculadas a partir da curva padrão, obtidas por meio do *software* xPONENT® (Merck Millipore CO., Darmstadt, Alemanha). Os níveis das proteínas foram expressos em pg/mL.

3.15 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada por meio de um modelo de regressão linear considerando uma distribuição normal, sob abordagem *bayesiana*, sendo obtidas estimativas das diferenças entre as médias dos grupos, em cada variável, e seus respectivos intervalos de credibilidade (ICr) de 95%.

4. Resultados

4.1 Características do grupo de indivíduos doadores de tecido adiposo

O grupo amostral de doadores de TA das cinco áreas corporais em estudo foi composto por dezessete indivíduos do sexo feminino, com idade média de 39 anos (20-56) e IMC médio de 25,7 kg/m² (22-30) (Tabela 1).

Tabela 1 - Idade (anos) e IMC (kg/m²) do grupo dos indivíduos doadores de tecido adiposo

Doadores	Idade	IMC
1	31	29
2	31	22
3	30	26
4	20	23,2
5	43	29
6	30	28
7	24	25,5
8	37	23
9	41	26
10	26	25,6
11	42	24
12	54	23
13	52	25
14	54	26,9
15	56	30
16	54	26,5
17	39	24,5

4.2 Caracterização imunofenotípica do tecido adiposo fresco (P0) e após o cultivo celular na terceira passagem (P3)

As células obtidas após a digestão enzimática do TA fresco, conhecida por FVE, foram submetidas à análise de marcadores de superfície celular relacionados a CTMs, células hematopoiéticas e endoteliais, por citometria de fluxo (Figura 6).

Figura 6: Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície celular da FVE obtida do dorso de um dos indivíduos. A expressão do marcador CD31 foi de 17,3%, CD73 de 14,1%, Anti-HLA-DR de 19,76%, CD34 de 51,99%, CD45 de 14,03%, CD14 de 2,87%, CD90 de 64,21%, CD 271 de 0,86% e CD105 de 15,54%

Os resultados demonstraram que na FVE a expressão dos marcadores entre as cinco áreas corporais variou do menor ao maior valor, da seguinte forma: CD31 de 20,72% (F) à 23,73% (AS), CD73 de 17,57% (D) à 25,14% (C), Anti-HLA-DR de 25,11% (F) à 26,39% (AS), CD34 de 52,18% (C) à 54,90% (AS), CD45 de 14,88% (D) à 17,84% (C), CD14 de 6,79% (D) à 10,14% (C), CD90 de 68,24% (AI) à 60,34% (C), CD271 de 4,55% (D) à 7,61% (C) e CD105 de 13,19% (F) à 14,08% (D) (Figura 7). Não foram demonstradas diferenças quanto à expressão dos marcadores na FVE do TA fresco entre as cinco áreas corporais. Embora os marcadores CD73, CD14 e CD271 apresentassem pequenas diferenças estatísticas entre algumas áreas, os limites do ICr 95% ficaram muito próximos ao zero.

Figura 7 - Perfil imunofenotípico das células presentes nas amostras de tecido adiposo fresco (FVE), das cinco áreas corporais estudadas, demonstrando similaridade na expressão de marcadores de superfície celular entre essas áreas

Após o cultivo celular *in vitro* das células presentes na FVE, as CTMs-TA predominaram sobre as demais células na cultura e na terceira passagem (P3) foram submetidas à análise desses mesmos marcadores de superfície celular (Figura 8).

Figura 8 - Análise por citometria de fluxo da expressão dos marcadores de superfície celular das CTMs-TA após cultivo *in vitro* na terceira passagem, obtida do dorso de um dos indivíduos. A expressão do marcador CD31 foi de 0,27%, CD73 de 93,76%, Anti-HLA-DR de 0,14%, CD34 de 0,48%, CD45 de 0,15%, CD14 de 0,23%, CD90 de 97,42%, CD105 de 95,95% e Anti-HLA ABC 81,93%

Os resultados demonstraram que as CTMs-TA, na terceira passagem, apresentaram expressão dos marcadores entre as cinco áreas corporais, variando do menor ao maior valor, da seguinte forma: CD31 de 0,20% (AS) à 0,44% (F), CD73 de 88,09% (F) à 91,37% (AS), Anti-HLA-DR de 0,07% (AS) à 0,21% (AI), CD34 de 0,18% (D) à 0,64% (AI), CD45 de 0,07% (D) à 0,33% (AI), CD14 de 0,16% (D) à 0,61% (AI), CD90 de 96,39% (F) à 98,02% (C), CD271 de 4,26% (C) à 12,43% (D), CD105 de 88,2% (F) à 93,84% (AS) e Anti-HLA-ABC (Antígeno leucocitário humano ABC) de 72,68% (D) à 77,7% (C) (Figura 9). Não foram identificadas diferenças quanto à expressão dos marcadores. Embora alguns marcadores, como CD31, CD34, CD90, CD105 demonstrassem pequenas diferenças estatísticas na comparação entre algumas áreas corporais, os limites do ICr ficaram muito próximos a zero.

Figura 9 - Perfil imunofenotípico das CTMs-TA presentes nas amostras de tecido adiposo após cultivo, na terceira passagem (P3), das cinco áreas estudadas demonstrando similaridade na expressão de marcadores de superfície celular entre as áreas

4.3 Quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F)

Para a quantificação da frequência de CTMs-TA em cada uma das cinco áreas corporais, foi realizado o ensaio CFU-F, que determina o potencial de formação de colônias fibroblastoides no tecido. O ensaio foi realizado em dez indivíduos e em triplicata para cada área, sendo posteriormente calculada a média de CFU-F por área. A área corporal que apresentou maior número de CFU-Fs, considerando-se essa média, foi o dorso ($23,20 \pm 26,13$), seguido pelos flancos

(19,27 $\pm$ 18,01), abdome inferior (13,07 $\pm$ 10,05), superior (12,13 $\pm$ 13,85) e por último as coxas (6,87 $\pm$ 5,04) (Tabela 2 e Figura 10).

Tabela 2 - Número de unidades formadoras de colônias fibroblastoides em cada uma das cinco áreas corporais (abdome superior, abdome inferior, coxas, dorso e flancos). O maior número de CFU-F foi identificado no dorso, seguido pelos flancos. Essas duas áreas apresentaram resultados com diferenças estatísticas em relação à coxa (*), ICr 95%

Grupos	n	Média	DP	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
AI	10	13,07	10,05	2,33	5,67	11,00	16,67	32,67
AS	10	12,13	13,85	0,33	4,33	7,17	16,33	48,00
C	10	*6,87	5,04	1,33	2,67	5,50	10,00	17,67
D	10	*23,20	26,13	5,67	8,00	12,17	20,67	77,00
F	10	*19,27	18,01	4,00	6,33	12,34	31,67	56,33

Figura 10 - Número de CFU-F entre as cinco áreas corporais em estudo. As análises demonstraram maiores diferenças e foram significativas entre dorso e coxas (**), e entre flancos e coxas (*), com intervalo de credibilidade de 95%

Na comparação estatística entre as cinco áreas, o dorso apresentou diferença significativa em relação às coxas, ao abdome superior e inferior. Além disso, os flancos também evidenciaram diferença significativa superior em relação às coxas. Dentre as análises, a maior diferença ocorreu entre o dorso e a coxa (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparações do número de CFU-F entre as cinco diferentes áreas corporais demonstrando diferenças significativas entre AI-D (*), AS-D (**), C-F (***) e D-C (****). Dentre essas, o dorso e as coxas apresentaram a maior diferença estatística, com intervalos de credibilidade de 95% (ICr 95%)

	Comparações	Estimativa	ICr 95%	
			LI	LS
CFUF	AI-AS	0.9324	-9.145	11.1
	AI-C	6.176	-3.842	16.3
	*AI-D	-10.12	-20.23	-0.05935
	AI-F	-6.205	-16.24	3.842
	AS-C	5.244	-4.855	15.29
	**AS-D	-11.05	-21.23	-1.003
	AS-F	-7.137	-17.21	3.003
	***C-F	-12.38	-22.41	-2.294
	****D-C	16.3	6.238	26.44
	D-F	3.915	-6.236	14.02

LI= limite inferior; LS= limite superior

Uma análise adicional foi realizada considerando como região doadora todo o abdome anterior; reunindo, assim, em um grupo, o abdome superior e o inferior como abdome total (AT), outra região considerando apenas as coxas (C) e por fim, uma terceira região formada pelos flancos em conjunto com o dorso (FD). Dessa forma, a região formada por flancos e dorso (FD) apresentou diferença significativa superior em relação às coxas (C) mas não em relação ao abdome anterior (Tabela 4 e Figura 11).

Tabela 4 - Comparações do número de CFU-F entre três regiões corporais demonstrando diferença significativa entre a região de flancos e dorso (FD) em relação às coxas (*), com intervalo de credibilidade de 95%

3 Grupos				
Variável	Diferença	Estimativa	ICr95%	
			LI	LS
CFUF	AT - FD	-8,74	-18,8	1,11
	AT - C	5,58	-4,62	15,11
	*FD - C	14,33	4,41	23,83

LI= limite inferior; LS= limite superior

Figura 11: Número de CFU-F das três regiões corporais: abdome anterior (**AT**), coxas (**C**) e flancos com dorso (**FD**). As análises demonstraram diferença significativa entre as áreas FD e C (*), com intervalo de credibilidade de 95%

4.4 Cinética celular das CTMs-TA das cinco áreas corporais

A velocidade de duplicação durante o cultivo *in vitro* das CTMs-TA das cinco áreas corporais também foi analisada pelo cálculo da taxa de duplicação celular, conhecida por *doubling time* (DT); dessas células (item 3.9). Não foram identificadas diferenças significativas entre a cinética celular das cinco áreas (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Taxa de duplicação celular (*doubling time*), em horas, das cinco áreas em estudo. Não foram demonstradas diferenças estatísticas entre as áreas

Local	Média	DP	Min	Q1	Mediana	Q3	Máximo
AI	36,79	14,41	20,16	28,80	34,32	39,60	87,12
AS	35,12	11,04	21,84	27,48	32,64	40,68	68,88
Coxas	33,92	6,27	24,00	29,04	32,16	40,32	43,68
Dorso	39,57	30,86	24,72	27,00	32,16	38,52	157,20
Flanco	35,11	11,77	20,40	27,12	30,72	41,16	70,80

DP= Desvio padrão; **Min=** Mínimo.

Tabela 6 - Análise comparativa da taxa de duplicação celular (*doubling time*), em horas, entre as cinco áreas em estudo. Não foram identificadas diferenças significativas entre as áreas

Diferença	Estimativa	ICr95%	
		LI	LS
AT - DF	-1,38	-7,92	5,23
AT - C	1,96	-4,73	8,73
DF - C	3,34	-3,19	9,81
AI-AS	1.781	-5.983	9.605
AI-C	2.967	-4.729	10,89
AI-D	-2,7	-10,49	5.438
AI-F	1,79	-6.127	9.885
AS-C	1.186	-6.614	9.076
AS-D	-4.481	-12,29	3.448
AS-F	0,009	-7.823	7.932
C-F	-1.177	-9.231	7.018
D-C	5.667	-2.107	13,56
D-F	4,49	-3.191	12,48

LI= Limite inferior; LS= Limite superior

4.5 Comparação entre a idade e o IMC dos pacientes em relação ao número de CFU-F e cinética celular

A amostra de 17 indivíduos doadores de TA foi dividida em dois grupos, conforme a idade e o IMC. Em relação à idade, abaixo de 40 anos foram incluídos nove indivíduos e com 40 anos ou mais, oito indivíduos. Em relação ao IMC, até 26 foram incluídos nove indivíduos e com 26 ou maior, os oito restantes. Esses grupos foram comparados em relação às variáveis CFU-F e DT. A idade não demonstrou influenciar a DT das CTMs-TA, assim como o IMC também não demonstrou influenciar a DT ou a CFU-F. Contudo, houve diferença significativa em relação à

idade e ao número de CFU-F, de forma que o grupo de indivíduos com idades inferiores a 40 anos apresentaram média superior de CFU-F (Tabela 7 e Figura 12).

Tabela 7 - Comparações da idade com a taxa de duplicação celular, idade com o número de CFU-F, IMC com a taxa de duplicação celular e IMC com o número de CFU-F. Resultados demonstraram correlação apenas em relação à idade e CFU-F (*), com intervalo de credibilidade de 95%

Comparação	Variável	Diferença	ICr 95%	
			LI	LS
Idade <40- Idade ≥40	DT	1,19	-13,52	16
	*CFU-F	18,96	2,39	35,1
IMC <26 - IMC ≥26	DT	6,2	-8,13	20,62
	CFU-F	5,87	-14,23	26,3

LI= Limite inferior; **LS**= Limite superior; **DT**= Taxa de duplicação celular, **CFU-F**= Unidades formadoras de colônicas fibroblastoides.

Figura 12 - Número de CFU-F em dois grupos: idade menor que 40 anos ou maior (ou igual) que 40 anos. O grupo mais jovem apresentou número de CFU-F no tecido adiposo significativamente maior (*)

4.6 Diferenciação das CTMs-TA em adipócitos, osteócitos e condrócitos

Para comprovação da identidade e caracterização funcional das CTMs-TA, conforme os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), todas as frações celulares foram avaliadas quanto à capacidade de diferenciação nas três linhagens mesodérmicas (adipócitos, osteócitos e condrócitos), após P3. Em relação à diferenciação em adipócitos, todas as células das frações submetidas aos meios indutores específicos acumularam vesículas lipídicas, coradas pelo corante *Oil red* (Figura 13).

Figura 13 - Diferenciação das CTMs-TA em adipócitos **(A)**, demonstrada pela coloração das vesículas lipídicas em vermelho e seu respectivo controle negativo **(B)**

Em relação à diferenciação em osteócitos, as células submetidas aos meios indutores específicos, foram capazes de depositar matriz calcificada, evidenciada pela coloração com *Alizarin red* (Figura 14).

Figura 14 - Diferenciação das CTMs-TA em osteócitos **(A)**, demonstrando a coloração pelo *Alizarin red* de matriz mineralizada e seu respectivo controle negativo **(B)**

A diferenciação em condrócitos também foi realizada após indução pelos meios específicos e comprovada por meio da coloração em azul de glicosaminoglicanos presentes na matriz cartilaginosa formada pelas células diferenciadas, pelo corante Azul de Alciano (Figura 15).

Figura 15 - Diferenciação das CTMs-TA em condrócitos demonstrada pela coloração em azul de glicosaminoglicanos

4.7 Influência do sobrenadante das CTMs-TA sobre a migração de fibroblastos de pacientes normais e de portadores de anemia falciforme

Os fibroblastos de cinco indivíduos normais e fibroblastos de três portadores de AF, com úlceras cutâneas, foram submetidos aos experimentos para análise da velocidade de migração celular, constituindo dois grupos de fibroblastos diferentes (item 3.2). Foram realizados registros fotográficos de todos os grupos a cada três horas e avaliado o fechamento da área sulcada (Figura 16).

Figura 16 - Área sulcada em uma das culturas de fibroblastos normais e o fechamento progressivo ao longo das horas (0,6,12 e 24 horas), a partir da migração de fibroblastos das bordas dessa área

Para os fibroblastos normais, a adição de sobrenadante das CTMs-TA das coxas e também do abdome demonstrou aumentar de forma significativa a velocidade de migração dos fibroblastos *in vitro* em relação ao grupo controle (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 - Velocidade de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) dos fibroblastos normais expostos aos diferentes meios de cultura. As maiores velocidades de migração foram dos dois grupos expostos aos meios contendo sobrenadantes das CTMs-TA, representados por Abdome (*) e Coxas (**)

Velocidade de migração dos fibroblastos normais								
Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Abdome	5	*54,79	39,84	14,45	25,99	45,29	68,62	171,28
Coxas	5	**57,99	36,18	12,95	32,44	53,54	85,09	139,10
Controle	5	31,67	22,61	4,99	11,94	24,71	47,47	82,45

DP= Desvio padrão.

Tabela 9 - Comparações das velocidades de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) de fibroblastos normais entre os grupos: controle, sobrenadante de CTMs-TA de abdome (Abdome) e sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Abdome (*) e Coxas (**) em relação aos seus respectivos controles, com intervalos de credibilidade de 95%

Comparação	Diferença	ICr 95%	
		LI	LS
Controle-Abdome	*-23,3	-43,23	-3,74
Controle-Coxa	** -26,38	-45,64	-6,88
Abdome-Coxa	-3,07	-22,74	16,84

LI= Limite inferior; LS= Limite superior.

O outro grupo de fibroblastos derivados de indivíduos portadores de AF também foi submetido às mesmas condições de experimento. As amostras de tecido desse grupo foram obtidas de biópsias em dois locais diferentes das feridas desses indivíduos, no centro e na borda, e também em pele íntegra fora dos limites das

feridas. Os fibroblastos desse grupo foram mais difíceis de serem cultivados *in vitro*, necessitaram de tempo mais prolongado em relação aos fibroblastos do grupo de indivíduos normais. Exceto as amostras obtidas da borda das feridas, as derivadas dos outros dois locais foram desprezadas após ausência de crescimento de células *in vitro*. De forma similar ao observado com fibroblastos normais, a adição de sobrenadante das CTMs-TA da coxa e do abdome demonstrou aumentar de forma significativa a velocidade de migração dos fibroblastos de indivíduos portadores de AF em relação ao grupo controle (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 - Velocidade de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) dos fibroblastos de indivíduos com AF expostos aos três diferentes meios de cultura. As maiores velocidades de migração foram dos dois grupos expostos aos meios contendo sobrenadantes das CTMs-TA, representados por Abdome (*) e Coxas (**)

Velocidade de migração dos fibroblastos AF								
Grupos	N	Média	DP	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Abdome	3	*65,24	30,38	25,87	36,90	60,95	79,38	126,72
Coxas	3	**56,3	20,83	26,60	37,61	61,07	72,53	88,58
Controle	3	37,51	13,33	13,95	27,90	32,59	45,62	59,78

Tabela 11 - Comparações das velocidades de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) de fibroblastos falciformes entre os grupos: controle, sobrenadante de CTMs-TA de abdome (Abdome) e sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Foram observadas diferenças significativas entre os grupos Abdome (*) e Coxas (**) em relação aos seus respectivos controles, com intervalos de credibilidade de 95%

ICr 95%			
Comparação	Diferença	LS	LI
Controle-Abdome	*-27,85	-44,39	-11,89
Controle-Coxa	** -18,83	-34,87	-2,21
Abdome-Coxa	9,01	-7,14	25,1

LI= Limite inferior; LS= Limite superior.

Figura 17 - Velocidade de migração ($\mu\text{m}/\text{hora}$) dos diferentes grupos de fibroblastos, à esquerda dos fibroblastos normais (FIBN) e à direita dos fibroblastos falciformes (FAF). Para ambos os tipos de fibroblastos, a adição de sobrenadante de CTMs-TA obtidas de abdome (*) e de coxa (**) demonstrou acelerar a velocidade de migração celular de forma significativa em relação aos grupos controles (C)

Quando comparados os dois tipos de fibroblastos, normais e os de AF, a análise não demonstrou diferenças nas velocidades de migração entre os controles ou entre os fibroblastos submetidos ao meio contendo sobrenadante de CTMs-TA desses grupos (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação da velocidade de migração entre os grupos dos dois tipos de fibroblastos: normais (FIBN) e falciformes (FAF). Não foram observadas diferenças significativas, com intervalos de credibilidade de 95%

Comparações	Diferenças	ICr 95%	
		LS	LI
CON (FIBN)-CON	-5,7	-25,45	22,03
COX (FIBN) - COX	3,8	-18,1	21,46
ABD (FIBN)-ABD	-10,4	-30,29	9,1

ADB= sobrenadante de CTMS-TA de abdome; **COX=** sobrenadante de CTMs-TA de coxa

Por outro lado, antes desses experimentos, ainda no início do cultivo *in vitro* dos fibroblastos, foram observadas diferenças entre esses dois tipos de fibroblastos (FIBN e FAF), em relação à DT nas fases iniciais do cultivo, na primeira e segunda passagens. No entanto, essa diferença desapareceu ao longo do cultivo laboratorial, entre a terceira e quarta passagens (Tabela 13).

Tabela 13 - A análise da taxa de duplicação celular (em dias), entre os dois tipos de fibroblastos, normais (FIBN) e falciformes (FAF), demonstrou diferença significativa apenas entre a primeira e segunda passagens (P1/P2) do cultivo *in vitro* (*). A diferença desapareceu ao longo do cultivo, não sendo mais observada entre a terceira e quarta passagens (P3/P4), com intervalos de credibilidade de 95%

Fases do cultivo	Diferenças (em dias)	ICr 95%	
		LI	LS
*P1/P2	2,6	1,05	4,12
P3/P4	0,12	-1,18	1,42

LI= Limite inferior; LS= Limite superior.

A análise do secretoma envolveu as citocinas e TNF- α , PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, HGF, GM-CSF, IL1-beta, IL-6, CXCL-IL8 e IL-10, que foram mensurados nos diferentes experimentos contendo sobrenadantes de CTMs-TA do abdome e da coxa e com os fibroblastos normais e os FAF. A primeira análise foi realizada apenas entre os respectivos grupos de cada tipo de fibroblasto: normal e FAF. Foi observada significativa maior concentração de PDGF-BB, GM-CSF, CXCL-IL8 e IL-10 nos grupos controles de fibroblastos normais em relação aos FAF. Os demais fatores não demonstraram diferenças significativas entre os dois grupos (Tabela 14).

Tabela 14 - Análise de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo fibroblastos normais (FIBN) em comparação aos com fibroblastos falciformes (FAF), para os três grupos estudados: grupos controles, grupos contendo o sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (sobrenadante abdome) e os grupos contendo sobrenadante de CTMs-TA da coxa (sobrenadante coxa). Exceto para o VEGF nos grupos controles, os demais fatores e citocinas apresentam em média diferenças negativas, sugerindo menores concentrações nos meios com fibroblastos FAF em relação aos FIBN. No entanto, essa diferença foi significativa apenas para alguns fatores: PDGF-BB, GM-CSF, CXCL-IL8, e IL-10 (*)

	Controles			Sobrenadante abdome			Sobrenadante coxa		
	FAF x FIBN			FAF x FIBN			FAF x FIBN		
	ICr95%			ICr95%			ICr95%		
	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS
TNF- α	-11,16	-23,07	0,75	-9,76	-21,57	2,05	-11,8	-23,7	0,02
PDGF-AA	-0,67	-2,99	1,65	-0,57	-2,9	1,76	-0,74	-3,05	1,57
PDGF-BB*	-6,83	-13,3	-0,34	-5,42	-11,95	1,11	-6,4	-12,8	0,05
VEGF	14,27	-64	92,60	-24,31	-103,3	54,74	-36,4	-114	41,8
HGF	-391,65	-1296,3	513	-537	-1668,4	594,4	-440,3	-1565	684,7
GM-CSF*	-19,17	-36,94	-1,40	-13,58	-31,48	4,32	-17,76	-35,46	-0,06
IL1-beta	-4,81	-10,14	0,52	-4,5	-9,87	0,87	-5,19	-10,5	0,12
IL-6	-501,4	-1499,91	497,09	-658,14	-1939,4	623,2	-924,03	-2212,3	364,32
CXCL-IL8*	-2134,55	-3344,8	-924,3	-1924,65	-3539	-310,3	-2343,5	-33963,3	-723,8
IL-10*	-6,39	-11,96	-0,82	-3,01	-8,62	2,60	-4,04	-9,59	1,51

FAF= Fibroblastos de anemia falciforme; **FIBN**= fibroblastos normais; **LI**= limite inferior; **LS**= limite superior; **ICr95%**= Intervalo de credibilidade para 95%.

Outra análise foi realizada comparando apenas os grupos de cada tipo de fibroblasto. Para os FAF não foram demonstradas diferenças significativas nas concentrações de citocinas e fatores de crescimento entre os grupos controle em relação aos grupos com sobrenadante de CTMs-TA de abdome ou em relação ao grupo com sobrenadante de CTMs-TA da coxa. No entanto, as diferenças das médias das concentrações das citocinas e fatores de crescimento entre os grupos foram menores em todos os casos no grupo controle em relação aos com sobrenadantes de CTMs-TA (Tabela 15). Para os fibroblastos normais, a

concentração do VEGF demonstrou diferença estatística, sendo maior nos grupos com sobrenadantes de CTMS-TA em relação ao grupo controle (Tabela 16).

Tabela 15 - Análise comparativa de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo apenas os fibroblastos falciformes (FAF) entre os três grupos: controle, com sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (Abdome) e com sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). Os fatores de crescimento e citocinas apresentaram em média diferenças negativas nos controles em relação aos grupos contendo sobrenadante de CTMs-TA do abdome e da coxa, sugerindo menores concentrações nesses casos. No entanto, não foram identificadas diferenças significativas, com intervalo de credibilidade de 95% (ICr 95%)

	FAF			FAF			FAF		
	Conrole x Abdome			Controle x Coxa			Abdome x Coxa		
	ICr95%			ICr95%			ICr95%		
	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS
TNF- α	-1,27	-14,53	11,99	-1,32	-14,53	11,95	-0,05	-13,28	13,18
PDGF-AA	-0,18	-2,8	2,44	-0,07	-2,48	2,70	-0,08	-2,08	1,92
PDGF-BB	-0,77	-8,11	6,57	-0,94	-8,18	6,3	-0,17	-7,42	7,08
VEGF	-61,6	-150,37	27,17	-42,33	-129,83	45,17	19,27	-68,51	107,05
HGF	-9,19	-1035	1017	-143,5	-1148,7	861,7	-134,3	-1365,3	1096
GM-CSF	-1,27	-21,38	18,84	-1,49	-21,32	18,34	-0,22	-20,09	19,65
IL1-beta	-0,53	-6,56	5,50	-0,65	-6,60	5,30	-0,12	-6,08	5,84
IL-6	-723,6	-1841	393,8	-365,5	-1485,5	754,4	358,1	-1039,8	1756
CXCL-IL8	-82,98	-1413,9	1247	-29,83	-1303	1243	53,15	-1654,8	1761
IL-10	-0,38	-6,68	5,62	-0,6	-6,82	5,62	-0,22	-6,45	6,01

FAF= Fibroblastos de anemia falciforme; **FIBN=** fibroblastos normais; **LI=** limite inferior; **LS=** limite superior; **ICr95%=** Intervalo de credibilidade para 95%

Tabela 16: Análise comparativa de citocinas e fatores de crescimento nos meios contendo apenas os fibroblastos de indivíduos normais (FIBN), dentre os três grupos: controle, com sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior (Abdome) e com sobrenadante de CTMs-TA da coxa (Coxa). O VEGF apresentou concentração menor com diferença significativa nos grupos controles em relação aos grupos com sobrenadantes de CTMs-TA (*) e não entre os dois grupos com sobrenadantes de CTMs-TA (Abdome x Coxa)

	FIBN			FIBN			FIBN		
	Conrole x Abdome			Contorle x Coxa			Abdome x Coxa		
	ICr95%			ICr95%			ICr95%		
	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS	Diferença	LI	LS
TNF- α	0,13	-10,19	10,45	-2,01	-12,28	8,26	-2,14	-12,4	8,12
PDGF-AA	-0,08	-2,08	1,92	-0,14	-2,13	1,85	-0,06	-2,05	1,93
PDGF-BB	0,64	-4,97	6,25	-0,52	-6,10	5,06	-1,16	-6,74	4,42
VEGF*	-100,18	-168	-32,28	-93,02	-160,5	-25,4	7,16	-60,42	74,74
HGF	-154,54	-1147,2	838,2	-192,1	-1190,6	806,3	-37,65	-1030	955
GM-CSF	4,32	-11,05	19,69	-0,08	-15,36	15,20	-4,40	-19,69	10,89
IL1-beta	-0,22	-4,83	4,39	-1,03	-5,62	3,56	-0,81	-5,4	3,78
IL-6	-880,4	-2038	277	-788,15	-1940,9	364,6	92,26	-1057	1241,7
CXCL-IL8	126,9	-1318	1571,9	-238,8	-1684,3	1206,6	-365,7	-1806	1074
IL-10	3	-1,82	7,82	1,75	-3,04	6,54	-1,25	-6,04	3,54

FAF= Fibroblastos de anemia falciforme; **FIBN**= fibroblastos normais; **LI**= limite inferior; **LS**= limite superior; **ICr95%**= Intervalo de credibilidade para 95%

5. Discussão

Tratamentos clínicos baseados em terapia celular poderiam ser otimizados com a utilização das CTMs-TA presentes na FVE em um único tempo cirúrgico, coletando de uma área doadora de TA preferencial e retornando diretamente ao indivíduo, sem a necessidade de cultivos laboratoriais *in vitro*, que são mais dispendiosos e demandam maior tempo (JURGENS et al., 2008). Sob essa perspectiva, o presente estudo analisou se aspectos qualitativos e quantitativos das CTMs-TA seriam influenciados pela área doadora de TA. Foram analisadas cinco regiões corporais representadas por abdome superior, abdome inferior, flancos, dorso e coxas. Essas áreas doadoras foram escolhidas em função de serem locais comuns de acúmulo de TA subcutâneo e, assim, representarem a principal queixa estética de muitos pacientes que buscam melhora de contorno corporal por meio de uma cirurgia de lipoaspiração.

Em relação aos aspectos qualitativos das CTMs-TA, foram analisados o perfil imunofenotípico e aspectos da cinética celular dessas células derivadas das cinco áreas corporais descritas e a concentração de algumas citocinas e fatores de crescimento presentes no meio sobrenadante secretados por CTMs-TA de duas dessas áreas, abdome inferior e coxas, em culturas de fibroblastos. Por fim, também foi analisada a influência dos sobrenadantes coletados das culturas de CTMs-TA de abdome inferior e coxa sobre a velocidade de migração de fibroblastos *in vitro*.

A análise do perfil imunofenotípico foi realizada em duas situações distintas, primeiramente no TA fresco, representado pela FVE, cuja importância estaria relacionada às perspectivas de utilização clínica direta dessa fonte de CTMs-TA e também outra análise foi realizada dos marcadores de superfície celular das CTMs-TA após o cultivo laboratorial *in vitro*, na terceira passagem, que em termos práticos, correspondem às populações celulares preferencialmente utilizadas no momento para os tratamentos baseados em terapia celular.

Os resultados obtidos demonstraram não haver diferenças significativas quanto ao perfil imunofenotípico das células presentes nas FVEs das cinco áreas doadoras corporais para os marcadores de superfície endoteliais, hematopoiéticos e os associados à CTMs, analisados neste estudo.

Por outro lado, uma vez colocadas em cultivo laboratorial *in vitro*, as CTMs-TA demonstraram predominar na cultura e apresentaram mudanças na expressão de

marcadores de superfície celular. Houve, assim, perda de expressão de alguns marcadores como CD34, CD31, CD45, HLA-DR, associados a linhagens hematopoiéticas e endoteliais e aumento na porcentagem de expressão de marcadores tipicamente expressos por CTMs como CD105, CD90, CD73 e HLA-ABC, de forma similar nas cinco áreas doadoras corporais.

Outros estudos corroboram estes resultados, como o de Jurgens et al. (2008), que compararam a expressão de marcadores das CTMs-TA do abdome e da coxa após o cultivo laboratorial *in vitro* e Li et al. (2013) que analisaram os marcadores expressos na FVE entre abdome, flancos e coxas. Ambos os estudos reportaram não haver diferenças imunofenóticas entre as CTMs-TA dessas áreas doadoras.

A DT das CTMs-TA das cinco áreas doadoras foi outro aspecto analisado, não sendo identificadas diferenças. Além disso, variações de idade e IMC dos indivíduos deste estudo não demonstraram influenciar a cinética celular, o que foi corroborado pelo estudo de Schipper et al. (2008), que analisaram a influência de áreas doadoras de TA subcutâneo, idade e IMC sobre a capacidade proliferativa das CTMs-TA, e também não identificaram diferenças estatísticas significativas.

Contudo, no presente estudo, assim como no reportado por Schipper et al. (2008), não foram incluídos indivíduos obesos, com IMC acima de 30. Roncari e Hamilton (1993) reportaram que CTMs-TA obtidas a partir do omento de pacientes obesos apresentavam taxas de duplicação superiores a de indivíduos com peso normal.

Ainda em relação à idade, indivíduos mais jovens, com menos de 40 anos, apresentaram número de CFU-F no TA significativamente superior em comparação aos com idade maior que 40 anos. Embora o processo de envelhecimento humano associe-se ao aparecimento de inúmeras doenças cardiovasculares, neurológicas, endocrinológicas e neoplásicas, sugerindo dificuldades do organismo em controlar adequadamente a homeostase e renovação celular, funções associadas às CTMs, a literatura ainda apresenta resultados conflitantes na correlação da idade com o rendimento de CTMs-TA. Assim, diversos estudos não evidenciaram essa correlação, no entanto não utilizaram como metodologia o ensaio CFU-F (MOJALALL et al., 2011; PADOIN et al., 2008; YOSHIMURA et al., 2006). Mais recentemente, Choudhery et al. (2014) relataram que o aumento da idade está

inversamente relacionado ao número de CFU-F, o que foi corroborado pelos achados do presente estudo.

A ativação de genes específicos e a decorrente secreção de fatores de crescimento e citocinas pelas CTMs-TA é um dos mais importantes aspectos que permitem uma comparação de possíveis diferenças em relação à biologia celular.

Assim, fatores de crescimento e citocinas presentes no meio sobrenadante, chamado secretoma, produzido por CTMs-TA de duas áreas corporais, abdome inferior e das coxas foram comparados em culturas com fibroblastos. A escolha por essas duas áreas como doadoras se deu por serem as regiões doadoras de TA mais comumente comparadas na literatura (JURGENS et al., 2008, PADOIN et al., 2008, LI et al., 2011, TSEKOURAS et al., 2017), por serem áreas comuns de depósito de gordura e também por serem tecnicamente favoráveis à realização de uma pequena lipoaspiração. O sobrenadante utilizado nesses experimentos foi selecionado de um dos indivíduos da amostra por apresentar concentração cerca de três vezes maior de CTMs-TA no abdome inferior em relação à coxa.

Foram analisados a concentração de PDGF-AA, PDGF-BB, VEGF, HGF, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , CXCL-IL8 presentes nesses sobrenadantes e não foram demonstradas diferenças significativas entre abdome inferior e coxa, o que corrobora a similaridade das CTMs-TA entre as áreas corporais. Deve-se observar, no entanto, que a análise do sobrenadante foi realizada após o cultivo *in vitro* das CTMs-TA, na terceira passagem, e que nesse momento apresentavam condições de equidade quantitativa.

Outra análise foi realizada com os sobrenadantes das CTMs-TA do abdome inferior e da coxa por meio de um experimento no qual esses meios foram adicionados às culturas de fibroblastos com objetivo de avaliar a influência sobre a velocidade de migração fibroblástica.

O meio sobrenadante das CTMs-TA obtidas do abdome inferior, assim como o das coxas, demonstraram aumentar a velocidade de migração dos fibroblastos de forma significativa em relação ao grupo controle. No entanto, não houve diferença significativa na velocidade de migração dos fibroblastos entre os dois grupos que continham sobrenadantes de abdome inferior e de coxas, o que também corrobora a semelhança das CTMs-TA de diferentes áreas.

Para a quantificação das CTMs-TA entre essas regiões, foi realizado o ensaio CFU-F em dez indivíduos. Observou-se que a região do dorso e a dos flancos apresentaram maior número de CTMs, com diferença significativa na região das coxas, sendo a maior diferença demonstrada entre o dorso e a coxa. Embora a região do abdome inferior e superior tenha mostrado média de CFU-Fs também superior à da coxa, houve grande variabilidade desses resultados e essa diferença não foi significativa.

A análise da região do dorso como área doadora de CTMs-TA não havia sido reportada até o momento na literatura. O tronco posterior abrange cerca de 13% da superfície corporal, apresenta TA subcutâneo, em geral, mais homogeneamente distribuído do que outras regiões, mas também pode exibir alguns depósitos de adiposidade mais concentrados, representados por dobras dorsais transversais situadas mais inferiormente na região torácica e/ou por abaulamentos circunscritos às regiões axilares posteriores.

Embora essa área necessite de decúbito ventral ou lateral para permitir a coleta do TA por meio de uma pequena lipoaspiração, ela mostra algumas vantagens como a grande extensão, além da segurança do procedimento, em decorrência da presença de uma musculatura subjacente mais forte, associada ao baixo risco de herniações, mais frequentes na região abdominal.

O fato de os flancos serem às áreas por contiguidade situadas mais próximas ao dorso e por terem evidenciado a segunda maior concentração de CTMs-TA entre as demais, reforça a hipótese da região posterior do tronco ser uma área com importante concentração de CTMs-TA, o que ainda não havia sido reportado até o momento. Assim, quando consideradas apenas três regiões corporais, tronco posterior (dorso e flancos), abdome total (superior e inferior) e coxas, a região do tronco posterior continua demonstrando resultado significativamente superior à da coxa, mas não em relação ao abdome.

Os estudos reportados até o momento analisaram regiões como abdome, flancos e coxas e mostraram divergência nos resultados entre eles, o que impossibilitou a determinação de uma área doadora preferencial. Isso pode ter decorrido devido a grande variabilidade individual em relação ao número de CTMs-TA entre essas três áreas, também evidenciada neste estudo.

A utilização clínica das CTMs-TA ainda é considerada experimental no Brasil, de forma que as pesquisas clínicas com células tronco realizadas no âmbito nacional devem ser previamente analisadas e aprovadas por comitês de ética.

Algumas doenças, que ainda são consideradas de difícil tratamento ou mesmo intratáveis poderiam se beneficiar do uso da terapia celular. Assim, foi incluído neste estudo experimentos com dois tipos de fibroblastos obtidos de indivíduos normais e também de portadores de AF, mais especificamente esses últimos foram obtidos a partir de biópsias de úlceras cutâneas crônicas, que são reconhecidamente de difícil tratamento, de forma que os indivíduos afetados em geral possuem, em comum, períodos de longa permanência com as feridas, que podem se estender por meses ou anos sem cicatrizar, além do sofrimento decorrente das múltiplas e variáveis intervenções terapêuticas.

Foram comparadas algumas características funcionais desses dois tipos de fibroblastos, por meio da análise da DT *in vitro* e também da velocidade de migração dessas células após a adição do sobrenadante de CTMs-TA do abdome inferior e da coxa.

Observou-se que nas fases iniciais do cultivo celular *in vitro*, os fibroblastos desses dois grupos evidenciaram diferenças, de forma que os FAF, entre a primeira e segunda passagens, mostraram uma DT menor que o dos fibroblastos normais. Os FAF revelaram, ainda, maior dificuldade de iniciarem o cultivo *in vitro*; ocorrendo, inclusive, ausência de crescimento celular em algumas biópsias, o que levou à necessidade de repetição do procedimento nesses casos. Contudo, ao longo das culturas, mais especificamente entre a terceira e quarta passagens, os dois tipos de fibroblastos passaram a apresentar DTs semelhantes.

Essa diferença, observada inicialmente entre os tipos de fibroblastos, poderia estar relacionada à um microambiente desfavorável em que as células estão expostas nas feridas dos indivíduos portadores de AF, além da existência de alterações na expressão gênica entre essas células. Em relação ao microambiente, diversas alterações locais já foram descritas associadas às úlceras falciformes, como menor oferta de oxigênio, vasoconstrição, insuficiência venosa, hipercoagulabilidade e infecções locais (CACCIOLA et al., 1990; CUMMING et al., 2008; MORGAN; VENNER, 1981; SEARJANT et al., 2005).

Por outro lado, os fibroblastos encaminhados para os experimentos de migração celular foram obtidos após subculturas, na quarta passagem do cultivo *in vitro*. Quando comparados apenas os grupos controles dos dois tipos de fibroblastos, a velocidade de migração não apresentou diferenças significativas demonstrando também uma semelhança desse aspecto funcional neste momento.

A adição dos sobrenadantes das CTMs-TA do abdome e da coxa demonstrou estimular de forma semelhante os dois tipos de fibroblastos, demonstrando que os fibroblastos falciformes respondem *in vitro* positivamente ao estímulo produzido pelo sobrenadante das CTMs-TA, de forma semelhante aos fibroblastos normais.

Assim, uma vez retirados de um microambiente desfavorável e expostos a meios de cultivo apropriados, os fibroblastos falciformes apresentaram aspectos de cinética celular semelhantes aos fibroblastos de pacientes normais.

A análise da concentração de algumas citocinas e fatores de crescimento presentes nos meios de cultivo dos grupos controles dos dois tipos de fibroblastos demonstrou uma diferença significativa de PDGF-BB, GM-CSF, CXCL-IL8, e IL-10 que foi maior nos meios dos fibroblastos normais em relação aos falciformes. Os demais fatores PDGF-AA, VEGF, HGF, IL-1 β , IL-6, TNF- α não apresentaram diferenças significativas, embora, exceto para o VEGF, também apresentaram concentrações médias menores nos grupos de fibroblastos falciformes (tabela 14). Esses resultados sugerem a existência de diferenças na expressão gênica entre essas células, o que pode ser decorrente da própria AF.

A maior concentração dessas citocinas e fatores de crescimento no meio de cultura dos fibroblastos normais não se relacionaram ao aumento da velocidade dessas células uma vez que a velocidade de migração dos fibroblastos dos dois grupos controles não apresentaram diferenças. Isto poderia estar relacionado ao fato da concentração do VEGF, além de alguns outros fatores, terem sido semelhantes entre os grupos. Por outro lado, este estudo não avaliou a presença de outros fatores também considerados importantes na migração fibroblástica, como o FGF e o EGF. A análise ainda demonstrou maiores concentrações médias de todas as citocinas e fatores de crescimento nos grupos de fibroblastos que continham sobrenadantes das CTMs-TA em relação aos seus respectivos controles. No entanto, esse aumento apresentou diferença significativa apenas para o VEGF nos

experimentos com os fibroblastos normais. Para os FAF, embora o aumento do VEGF não tenha sido significativo, a sua concentração média nos grupos contendo sobrenadantes de CTMs-TA foi maior do que nos controles (Tabelas 15 e 16).

Quando comparados apenas os grupos com fibroblastos normais, o de sobrenadante de CTMs-TA da coxa em comparação com o de sobrenadante do abdome não mostrou diferença significativa na concentração do VEGF, assim como a velocidade de migração dos fibroblastos desses dois grupos também não evidenciou diferenças. Dessa forma, dentre os fatores e citocinas avaliados, o VEGF demonstrou maior relação com a migração fibroblástica.

O VEGF é um conhecido fator cuja família apresenta diferentes subtipos, como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e o fator de crescimento placentário (SAARISTO et al., 2006). O VEGF-A é produzido por células endoteliais, queratinócitos, miofibroblastos, plaquetas, neutrófilos e macrófagos (BANKS et al., 1998; GAUDRY et al., 1997; NAMIKI et al., 1995; NISSEN et al., 1998) e é liberado por plaquetas que são ativadas nas fases iniciais do trauma e, posteriormente, são também expressas por outras células, como os macrófagos. Esse fator possui uma importante função na cicatrização tecidual por estar associado ao aumento da angiogênese, migração e proliferação de células relacionadas à cicatrização como as endoteliais, os monócitos e fibroblastos (BARRIENTOS et al., 2008).

Um importante estímulo à produção de VEGF-A é a hipóxia local, assim feridas crônicas que apresentam condições isquêmicas, como a úlceras falciformes, poderiam, potencialmente, se beneficiar de tratamentos com VEGF por meio do estímulo à neoangiogênese. Galiano et al. (2004) apontaram melhora na cicatrização de úlceras diabéticas isquêmicas com o uso tópico desse fator. Em relação à migração celular, outros autores também relataram o efeito do VEGF no aumento da velocidade de migração de fibroblastos (ZHAO et al., 2013).

O microambiente desfavorável observado nas feridas falciformes poderia explicar as diferenças entre os fibroblastos normais e os FAF demonstradas apenas no início das culturas *in vitro* e que desaparecem ao longo do cultivo nos demais experimentos. Os FAF apresentaram características semelhantes aos fibroblastos normais, em relação à DT e também em relação à migração celular, em meios de cultivos apropriados, ricos em citocinas e fatores de crescimento.

6. Conclusões

Não foram observadas diferenças qualitativas entre as CTMs-TA das cinco áreas analisadas. Embora tenha sido observada grande variabilidade individual em relação ao número de CTMs-TA entre as diferentes áreas corporais, notou-se que a região do dorso e, em segundo lugar, a dos flancos, apresentam maior número de CTMs, com diferença significativa em relação à região das coxas, sendo a maior diferença verificada entre o dorso e a coxa. O aumento da idade, acima de 40 anos, demonstrou relação inversa com o número de CFU-F.

Quanto aos fibroblastos, a adição de sobrenadante produzido por CTMs-TA mostrou aumento da velocidade de migração dessas células de forma similar para os fibroblastos normais e os obtidos de indivíduos portadores de AF. Foram observadas diferenças significativas na concentração de citocinas e fatores de crescimento no meio sobrenadante de fibroblastos normais em relação ao meio dos fibroblastos obtidos de indivíduos portadores de AF, indicando a existência de diferenças na expressão gênica entre essas células. No entanto, o microambiente desfavorável presente nas feridas de indivíduos portadores de AF parece exercer importante influência sobre esses fibroblastos e, assim, uma vez corrigido o microambiente com os meios de cultivo apropriados, essas células apresentaram DT e velocidade de migração semelhantes aos fibroblastos normais *in vitro*.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte I (ABNT) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

ASAHARA, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964-966, Feb 14 1997.

AUST, L. et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, v. 6, n. 1, p. 7-14, 2004.

BALLAS, S. K. et al. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am J Hematol**, v. 85, n. 1, p. 6-13, Jan 2010.

BANKS, R. E. et al. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **Br J Cancer**, v. 77, p. 956-964, Mar 1998.

BARRIENTOS, S. et al. Growth factors and cytokines in wound healing. **Wound Repair Regen**, v. 16, n. 5, p. 585-601, Sep-Oct 2008.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential application. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.

BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, v. 15, n. 6, p. 641-648, Jun 2013.

BUNNEL, B. A. et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. **Methods**, v. 45, n. 2, p. 115-120, Jun 2008.

BURA, A. et al. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 245-257, Feb 2014.

CACCIOLA, E. et al. Blood hypercoagulability as a risk factor for leg ulcers in sickle cell disease. **Blood**, v. 75, n. 12, p. 2467-2468, Jun 15 1990.

CAMPAGNOLI, C. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, Oct 15, 2001.

CASTRO-MALASPINA, H. et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. **Blood**, v. 56, n. 2, p. 289-301, Aug 1980.

CHOUDHERY, M. S. et al. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **J Transl Med**, v. 12, p. 8, Jan 7 2014.

CIVIN, C. et al. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a

monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol**, v. 133, n. 1, p. 157-165, Jul 1984.

COLEMAN, S. R. Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations. **Aesthetic Plast Surg**, v. 19, n. 5, p. 421-425, Sep-Oct 1995.

COLEMAN, S. R. Structural fat grafts: the ideal filler? **Clin Plast Surg**, v. 28, n. 1, p. 111-119, Jan 2001.

CUMMING, V. et al. Venous incompetence, poverty and lactate dehydrogenase in Jamaica are important predictors of leg ulceration in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**, v. 142, n. 1, p. 119-125, Jul 2008.

DIGIROLAMO, C. M. et al. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **Br J Haematol**, v. 107, n. 2, p. 275-281, Nov 1999.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

EFRON, D. T.; MOST, D.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound healing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 3, n. 3, p. 197-204, May 2000.

EOM, Y. W. et al: Rapid isolation of adipose-derived stem cells by the storage of lipoaspirates. **Yonsei Med J**, v. 52, n. 6, p. 999-1007, Nov 2011.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Exp Gerontol**, v. 40, n. 12, p. 926-930, Dec 2005.

FRIEDENSTEIN A.J.; PIATETZKY-SHAPIRO,I.I.; PETRAKOVA,K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal os Embriology and Experimental Morphology**, v.16, n.3, p.381-390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v. 6, n. 2, p. 230-247, Mar 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol**, v. 47, p. 327-359, 1976.

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

GALIANO, R. D. et al. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting

bone marrow-derived cells. **Am J Pathol**, v. 164, n. 6, p. 1935-1947, Jun 2004.

GAUDRY, M. et al. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. **Blood**, v. 90, n. 10, p. 4153-4161, Nov 15 1997.

HALABI-TAWIL, M. et al. Sick cell leg ulcers: A frequently disabling complication and a marker of severity. **Br J Dermatol**, v. 158, n. 2, p. 339-344, Feb 2008.

HORWITZ, E.M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p.393-5, 2005.

HUANG, S. P. et al. Promotion of wound healing using adipose-derived stem cells in radiation ulcer of a rat model. **J Biomed Sci**, v. 20, p. 51, Jul 22 2013.

ISAAC, C. et al. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica [Physiological wound healing]. **Rev Med (São Paulo)**, v. 89, n. 3/4, p. 125-31, 2010.

ISAPS (Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética). 2016. Disponível em: <http://www.isaps.org>. Acesso em: 10 fev. 2018.

JIANG, Y. et al. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. **Exp Hematol**, v. 30, n. 8, p. 896-904, Aug 2002.

JOE, A. W. B. et al. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. **Stem Cells**, v. 27, n. 10, p. 2563-2570, Oct 2009.

JURGENS, W. J. et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell Tissue Res**, v. 332, n. 3, p. 415-425, Jun 2008.

KATO, G. J. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, Mar 15 2006.

LI, H. et al: Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. **Plast Reconstr Surg**, v. 128, n. 3, p. 666-672, Sep 2011.

LI, J.; CHEN, J.; KIRSNER, R. Pathophysiology of acute wound healing. **CLin Dermatol**, v. 25, n.1, p. 9-18, Jan-Feb 2007.

LI, K. et al. Selection of donor site for fat grafting and cell isolation. **Aesth Plast Surg**, v. 37, n. 1, p. 153-158, Feb 2013.

LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, P. R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. **ANZ J Surg**, v. 79, n. 4, p. 235-244, Apr 2009;

MACK, A. K.; KATO, G. J. Sick cell disease and nitric oxide: a paradigm shift? **Int J Biochem Cell Biol**, v. 38, n. 8, p. 1237-1243, 2006.

MARTÍ-CARVAJAL, A. J.; KNIGHT-MADDEN, J. M.; MARTINEZ-ZAPATA, M. J. Interventions for treating leg ulcers in people with sickle cell disease. **Cochrane Database Syst Rev**. v. 12, p. CD008394, Dec 8 2014.

MENESES, J. V. et al. Autologous stem cell-based therapy for sickle cell leg ulcer: a pilot study. **Br J Haematol**, v. 175, n. 5, p. 949-955, Dec 2016.

MINNITI, C. P. et al. Topical sodium nitrite for chronic leg ulcers in patients with sickle cell anaemia: A phase 1 dose-finding safety and tolerability trial. **Lancet Haematol**, v. 1, n. 3, p. e95-e103, Dec 1 2014.

MINNITI, C. P.; KATO, G. J. Critical Reviews: How we treat sickle cell patients with leg ulcers. **Am J Hematol**. v. 91, n. 1, p. 22-30, Jan 2016.

MITCHELL, J. B. et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. **Stem Cells**, v. 24, n. 2, p. 376-385, Feb 2006.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. **J Nippon Med Sch**, v. 76, n. 2, p. 56-66, Apr 2009.

MIZUNO, H. et al. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. **Plastic Reconstr Surg**, v. 109, n. 1, p. 199-209, Jan 2002.

MOHAN, J. S. et al. Postural vasoconstriction and leg ulceration in homozygous sickle cell disease. **Clin Sci (Lond)**, v. 92, n. 2, p. 153-158, Feb 1997.

MOHAN, J. S. et al. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. **Clin Sci (Lond)**, v. 98, n. 6, p. 667-672, Jun 2000.

MOJALLAL, A. et al. Influence of age and body mass index on the yield and proliferation capacity of adipose-derived stem cells. **Aesthetic Plast Surg**, v. 35, n. 6, p. 1097-1105, Dec 2011.

MORGAN, A. G.; VENNOR, A. M. Immunity and leg ulcers in homozygous sickle cell disease. **J Clin Lab Immunol**. v. 6, n. 1, p. 51-55, Jul 1981.

NAMIKI A. et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 270, n. 52, p. 31189-31195, Dec 29 1995.

NGUYEN, A. et al. Comparative study of survival of autologous adipose tissue taken and transplanted by different techniques. **Plast Reconstr Surg**, v. 85, n. 3, p. 378-386, Mar 1990.

NIE, C. et al. Locally administered adipose-derived stem cells accelerate wound healing through differentiation and vasculogenesis. **Cell Transplant**, v. 20, n. 2, p. 205-216, 2011.

NIECHAJEV, I.; SEVČUK, O. Long-term results of fat transplantation: clinical and histologic studies. **Plast Reconstr Surg**, v. 94, n. 3, p. 496-506, Sep 1994.

NISSEN, N. N. et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. **Am J Pathol**, v. 152, n. 6, p. 1445-1452, Jun 1998.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M. J. et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v. 8, n. 2, p. 166-177, 2006.

OUCHI, N. et al Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

PADOIN, A. V. et al. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. **Plast Reconstr Surg**, v. 122, n. 2, p. 614-618, Aug 2008.

ROHRICH, R. J.; SOROKIN, E. S.; BROWN, S. A. In search of improved fat transfer viability: a quantitative analysis of the role of centrifugation and harvest site. **Plas Reconstr Surg**, v. 113, n. 1, p. 391-395, Jan 2004; discussion 396-7.

RONCARI, D. A.; HAMILTON, B. S. Cellular and molecular factors in adipose tissue growth and obesity. **Adv Exp Med Biol**, v. 334, p. 269-277, 1993.

SAARISTO, A. et al. Vascular endothelial growth factor-C accelerates diabetic wound healing. **Am J Pathol**, v. 169, n. 3, p. 1080-1087, Sep 2006.

SCHIPPER, B. M. et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. **Ann Plast Surg**, v. 60, n. 5, p. 538-544, May 2008.

SERJEANT, G. R. et al. Leg ulceration in sickle cell disease: medieval medicine in a modern world. **Hemat/Oncol Clin**, v. 19, n. 5, p. 943-956, Oct 2005.

SONEJA, A.; DREWS, M.; MALINSKI, T. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacol Rep**, v. 57, Suppl, p. 108-119, 2005.

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. **Sci World J**, v. 9, p. 46-67, Jan 18 2009.

STERODIMAS, A. et al. Cell-assisted lipotransfer. **Aesthet Surg J**, v. 30, n. 1, p. 78-81, Jan 2010.

TAGAMI, M. et al. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell Tissue Res**, v. 312, n. 1, p. 31-40, Apr 2003.

TSEKOURAS, A. et al. Comparison of the viability and yield of adipose-derived stem cells (ASCs) from different donor areas. **In Vivo**, v. 31, n. 6, p. 1229-1234, Nov-Dec 2017.

TUTIHASHI, R. **Interferência de células-tronco derivadas de tecido adiposo na atividade de produtos finais de glicação avançada em fibroblastos de pacientes diabéticos**. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2016.

VERMETTE, M. et al. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 28, n. 18, p. 2850-2860, Jun 2007.

WALMSLEY, GG. et al. Scarless wound healing: chasing the holy grail. **Plast Reconstr Surg**, v. 135, n. 3, p. 907-917, Mar 2015.

WOOD, K. C. et al. Critical role of endothelial cell-derived nitric oxide synthase in sickle cell disease-induced microvascular dysfunction. **Free Radic Biol Med**, v. 40, n. 8, p. 1443-1453, Apr 15 2006.

WU, S. H. et al. Therapeutic effects of human adipose-derived products on impaired wound healing in irradiated tissue. **Plast Reconstr Surg**. May 16 2018. (Epub ahead of print).

YOSHIMURA, K. et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. **J Cell Physiol**, v. 208, n. 1, p. 64-76, Jul 2006.

YOUNG, H. E. et al. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **Anat Rec**, v. 264, p. 51-62, 2001.

ZACHAR, V.; RASMUSSEN, J. G.; FINK, T. Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells. **Methods Mol Biol**, v. 698, p. 37-49, 2011.

ZHAO, J. et al. The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 578479, 2013.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-228, Apr 2001.

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-4295, Dec 2002.

8. Anexos

ANEXO A

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2015

Ofício nº 2278/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“CÉLULAS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO: ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA EM FUNÇÃO DA ÁREA DOADORA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 410ª Reunião Ordinária realizada em 22/06/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 7547/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

ANTONIO GUSTAVO ZAMPAR

PROF.DR.JAYME ADRIANO FARINA JUNIOR(Orientador)

Depto. de Cirurgia e Anatomia – Cirurgia Plástica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ofício nº 3793/2017
CEP/MGV

Ribeirão Preto, 15 de dezembro de 2017.

Processo HCRP nº 7030/2017

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“ANÁLISE “IN VITRO” DA INFLUÊNCIA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSE SOBRE FIBROBLASTOS DE ÚLCERAS DE PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME” – Projeto de Pesquisa Segunda Versão – 26/08/2017**, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 2 Versão – 16/07/2017.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente,

DRA MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

ANTONIO GUSTAVO ZAMPAR

PROF. DR. JAYME ADRIANO FARINA JUNIOR (ORIENTADOR)

Depto. de Cirurgia e Anatomia

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO B

TERMOS DE CONSENTIMENTOS LIVRES E ESCLARECIDOS

TCLE-1: Nome da pesquisa: Células Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo: Análise Quantitativa e Qualitativa em Função da Área Doadora

Pesquisadores responsáveis: Antonio Gustavo Zampar, Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior, Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, Dra. Maristela Delgado.

Você está sendo convidado a participar deste estudo que tem como objetivo analisar células mesenquimais derivadas da gordura colhida por lipoaspiração, visando quantificá-las e qualificá-las em determinadas áreas do seu corpo.

Estudos indicam que as células mesenquimais poderão ajudar no tratamento de algumas doenças e assim a caracterização dessas células poderá ser útil futuramente para desenvolvimento de protocolos de tratamento.

Sua participação é voluntária e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento.

Este estudo está sendo desenvolvido em uma parceria dos pesquisadores do Centro de Tecnologia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CTC-HRP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para participar, é necessário ler atentamente este documento e, em caso de dúvidas, ouvir as explicações de um dos médicos da equipe responsável.

Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine esse documento.

O que são as células mesenquimais?

As células mesenquimais são uma população rara de células que podem ser encontradas em vários órgãos do corpo, inclusive no cordão umbilical do recém-nascido e no tecido adiposo (gordura). Essas células têm características de células-tronco e exercem um papel importante na regulação do sistema imunológico, no processo de produção de todas as células do sangue (hematopoese), além de contribuírem para a regeneração dos tecidos como gordura, osso, cartilagem, dentre outros.

Qual será a participação dos pacientes envolvidos neste estudo?

Após realizada a lipoaspiração de algumas áreas corporais (abdome, coxas, e flancos), ao invés da gordura ser desprezada, uma pequena parte dela (cerca de 10 ml por área) será encaminhada ao Hemocentro de Ribeirão Preto, onde serão realizados as análises procurando quantificar o número de células mesenquimais e também qualificar essas células segundo as áreas do corpo indicadas.

Qual será a fonte das células mesenquimais?

Conforme já explicado anteriormente, será a partir de uma pequena parte da gordura lipoaspirada.

Quais os riscos?

Não haverá acréscimo de risco além daqueles já inerentes da cirurgia de lipoaspiração, que neste caso o paciente já deverá ter optado em realizá-la previamente à apresentação deste presente estudo, tendo essa cirurgia a finalidade única e exclusiva de melhora da estética corporal.

Assim, uma pequena parte da gordura lipoaspirada do seu corpo, ao invés de ser desprezada como normalmente seria, será agora encaminhada para análise no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Não será realizado nenhum experimento clínico com esse material, sendo somente analisado em laboratório.

Quais os exames a que você será submetido?

Aos exames habituais de pré-operatório aos quais você já seria submetido em função do preparo para a cirurgia de lipoaspiração.

Você terá acesso ao resultado dos exames e da pesquisa?

Sim, você tem direito a esclarecimentos sobre os resultados da pesquisa referentes à sua pessoa e a todos os exames feitos. Entretanto, como se trata de um estudo, esses resultados estarão disponíveis apenas ao final do estudo.

Você pode desistir de participar desse estudo?

Sim, a qualquer momento você poderá desistir de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo financeiro ou da continuidade de seu seguimento médico na Clínica onde você está sendo tratado.

Haverá alguma despesa ou benefício em dinheiro com este estudo?

Não. Você não terá custo nenhum por participar deste estudo. Você também não receberá nenhum ganho em dinheiro.

Como será a divulgação dos resultados desse estudo?

Afirmamos que os resultados dos testes serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, utilizadas com fins científicos e publicadas.

Este projeto de pesquisa foi aprovado e será supervisionado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, que é o órgão responsável por avaliar se a pesquisa é adequada e ética, aprovando ou não a sua realização. Caso haja qualquer dúvida referente aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética pelo endereço: Av. Bandeirantes, 3900. Campus Universitário. Ribeirão Preto - SP. CEP 14048-900. Telefone (16) 36022228. E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br.

Os responsáveis por este estudo, o médico Antonio Gustavo Zampar, o Prof. Dr Jayme Adriano Farina Junior CRM, o Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas CRM-SP 43.363 e a pesquisadora Dra Maristela Delgado, encontram-se disponíveis para qualquer esclarecimento ou dúvidas no consultório do Dr Antonio Gustavo pelo número (16) 32344493, email: aguzza@usp.com.br, ou no Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, no Hemocentro de Ribeirão Preto no telefone (16) 21019311.

Eu,

prontuário _____ portador _____ de
_____, internado no Hospital
_____ sob os
cuidados do(a) Dr(a) _____
_____ CRM _____, declaro que li o protocolo
informativo e o termo de consentimento informado para a análise de células mesenquimais
da gordura. Declaro ainda que:

- 1) Recebi e compreendi as orientações verbais e escritas sobre as células mesenquimais, as suas potenciais aplicações clínicas.
- 2) Compreendi que o tratamento com as células mesenquimais ainda é experimental.
- 4) Autorizo que a equipe médica responsável por este estudo tenha acesso ao meu prontuário médico para a obtenção de dados clínicos e resultados de exames complementares.
- 5) Estou ciente e concordo que todos os dados gerados referentes à história médica, aos exames laboratoriais, ao procedimento de lipoaspiração, incluindo as intercorrências clínicas e técnicas, bem como os dados de controles de qualidade dos produtos sejam registrados e conservados em banco de dados. Após análise, esses dados podem ser objeto de divulgação com interesse científico.
- 6) Sei que todos os meus dados estão protegidos por sigilo médico e que a minha identidade não será divulgada e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Estou ciente de tudo isso, CONCORDO com a realização de todos os procedimentos descritos e AUTORIZO a coleta de minha gordura para os fins aqui descritos:

_____, ____/____/____

Paciente: _____ idade: _____

Responsável legal: _____

RG: _____ UF: _____ Pai () Mãe () Outro () _____

Assinatura do paciente
(necessária se o paciente tiver capacidade
de se manifestar)

Assinatura do responsável legal
(necessária se paciente não
civilmente capaz ou inconsciente)

Médico responsável pela orientação (assinatura e carimbo)

Testemunhas [sempre que possível, mas obrigatório no caso de paciente(a) analfabeto(a)]:

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

TCLE-2: Nome da pesquisa: Células mesenquimais de diferentes áreas doadoras de tecido adiposo e influência em fibroblastos “in vitro” de pacientes com anemia falciforme

Pesquisadores responsáveis: Antonio Gustavo Zampar, Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior, Prof Dr Dimas Tadeu Covas, Dra Maristela Delgado

Você está sendo convidado a participar deste estudo que tem como objetivo analisar possíveis interferências que células mesenquimais derivadas da gordura colhida por lipoaspiração poderiam exercer sobre fibroblastos, que são células envolvidas na cicatrização tecidual.

Estudos indicam que as células mesenquimais poderão ajudar no tratamento de algumas doenças no futuro, como por exemplo, na cicatrização de feridas. Assim, temos como objetivo neste estudo analisar se essas células mesenquimais derivadas da gordura poderiam influenciar algumas funções dos fibroblastos, como a migração e a produção de alguns fatores de crescimento que são substâncias normalmente produzidas pelos fibroblastos e que também estão envolvidas na cicatrização. Esse estudo é experimental e assim será realizado apenas em laboratório.

Sua participação é voluntária e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento.

Este estudo está sendo desenvolvido em uma parceria dos pesquisadores do Centro de Tecnologia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CTC-HRP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para participar, é necessário ler atentamente este documento e, em caso de dúvidas, ouvir as explicações de um dos médicos da equipe responsável.

Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine esse documento.

O que são as células mesenquimais?

As células mesenquimais são uma população rara de células que podem ser encontradas em vários órgãos do corpo, inclusive no cordão umbilical do recém-nascido e no tecido adiposo (gordura). Essas células têm características de células-tronco e exercem um papel importante na regulação do sistema imunológico, no processo de produção de todas as células do sangue (hematopoese), além de contribuírem para a regeneração dos tecidos como gordura, osso, cartilagem, dentre outros.

O que são fibroblastos?

Os fibroblastos são células localizadas nos tecidos do organismo, como por exemplo na pele, e produzem diversas substâncias que auxiliam no processo de cicatrização de feridas.

Qual será a participação dos pacientes envolvidos neste estudo?

Pacientes que desejam melhora estética das mamas e que já seriam submetidas à cirurgias de mamoplastias com objetivo estético de redução de flacidez nas mamas, através da retirada de pele em excesso, serão convidadas, de forma voluntária, a ceder um pequeno fragmento da pele excedente da mama e que normalmente seria desprezada, para ser encaminhada ao Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- USP, onde o fragmento será submetido à análise em laboratório com intuito de se isolar e cultivar essas células chamadas fibroblastos.

Qual será a fonte das células fibroblastos?

Conforme já explicado anteriormente, será a partir de um pequeno fragmento de pele ressecado após a realização da mamoplastia e a partir dessa pele serão isolados em laboratório os fibroblastos.

O que será feito com os fibroblastos obtidos a partir da pele da mama?

Essas células serão cultivadas para crescerem em laboratório e após essa etapa, serão realizados experimentos adicionando-se células mesenquimais derivadas da gordura a esses fibroblastos com o objetivo de se analisar possíveis interferências na função e produção de substâncias dos fibroblastos.

Quais os riscos?

Não haverá acréscimo de risco além daqueles já inerentes da cirurgia de mamoplastia, que neste caso o paciente já deverá ter optado por realizá-la previamente à apresentação deste presente estudo, tendo essa cirurgia a finalidade única e exclusiva de melhora da estética das mamas.

Assim, uma pequena parte da pele retirada das mamas, ao invés de ser desprezada como normalmente seria, será agora encaminhada para análise no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Não será realizado nenhum experimento clínico com esse material, sendo somente analisado em laboratório.

Quais os exames a que você será submetido?

Aos exames habituais de pré-operatório aos quais você já seria submetido em função do preparo para a cirurgia de mamoplastia.

Você terá acesso ao resultado dos exames e da pesquisa?

Sim, você tem direito a esclarecimentos sobre os resultados da pesquisa referentes à sua pessoa e a todos os exames feitos. Entretanto, como se trata de um estudo, esses resultados estarão disponíveis apenas ao final do estudo.

Você pode desistir de participar desse estudo?

Sim, a qualquer momento você poderá desistir de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo financeiro ou da continuidade de seu seguimento médico na Clínica onde você está sendo tratado.

Haverá alguma despesa ou benefício em dinheiro com este estudo?

Não. Você não terá custo nenhum por participar deste estudo. Você também não receberá nenhum ganho em dinheiro.

Como será a divulgação dos resultados desse estudo?

Afirmamos que os resultados dos testes serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, utilizadas com fins científicos e publicadas.

Este projeto de pesquisa foi aprovado e será supervisionado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, que é o órgão responsável por avaliar se a pesquisa é adequada e ética, aprovando ou não a sua realização. Caso haja qualquer dúvida referente aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética pelo endereço: Av. Bandeirantes, 3900. Campus Universitário. Ribeirão Preto – SP. CEP 14048-900. Telefone (16) 36022228. E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br.

Os responsáveis por este estudo, o médico Antonio Gustavo Zampar, o Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior CRM, o Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas CRM-SP 43.363 e a pesquisadora Dra. Maristela Delgado, encontram-se disponíveis para qualquer esclarecimento ou dúvidas no consultório do Dr. Antonio Gustavo pelo número (16) 36219969, email: aguzza@usp.com.br, ou no Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, no Hemocentro de Ribeirão Preto no telefone (16) 21019311.

TCLE-3- Nome da pesquisa: Influência de células mesenquimais de tecido adiposo sobre fibroblastos *in vitro* de pacientes com anemia falciforme

Pesquisadores responsáveis: Dr Antonio Gustavo Zampar, Prof. Dr Jayme Adriano Farina Junior, Prof Dr Dimas Tadeu Covas.

Contato: Telefone: (16) 3621-9969 aguzza@gmail.com

Você está sendo convidado a participar deste estudo que tem como objetivo avaliar uma possível influência de células mesenquimais provenientes de gordura sobre células chamadas fibroblastos que estão presentes nas feridas de pacientes com anemia falciforme. Sabe-se que os fibroblastos estão envolvidos no processo de cicatrização de feridas e assim fatores que favoreçam a função dos fibroblastos poderiam teoricamente ajudar na cicatrização de feridas.

Os medicamentos usados até o momento para tratamentos dessas feridas não são tão eficazes e estudos indicam que as células mesenquimais poderiam ajudar no controle desta doença.

Sua participação é voluntária e a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento o qual está em duas vias.

Este estudo está sendo desenvolvido em uma parceria dos pesquisadores do Centro de Tecnologia Celular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CTC-HRP) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e, em caso de dúvidas, ouvir as explicações de um dos médicos da equipe responsável pelo seu tratamento. Se estiver interessado em participar de forma Voluntária, deste tratamento experimental, solicitaremos que assine esse documento.

Neste estudo, o tratamento é apenas experimental e em laboratório, portanto sem benefício direto a você neste momento.

O que são as células mesenquimais e por que usá-las?

As células mesenquimais são uma população rara de células que podem ser encontradas em vários órgãos do corpo, inclusive no tecido gorduroso adulto. Essas células exercem um papel importante na regulação do sistema imunológico (defesa do corpo contra infecções), além de contribuírem para a regeneração dos tecidos como gordura, osso e cartilagem (presente nas juntas, costelas, orelhas e outros estruturas), dentre outros.

Especificamente no seu caso, você está apresentando ferida (s) crônica (s), uma complicação da anemia falciforme, que não respondeu ao tratamento inicial. Estudos realizados em outros locais indicam que as células mesenquimais podem ajudar no controle dessa doença com possível ajuda na cicatrização de feridas.

Quais os benefícios deste estudo com as células mesenquimais em fibroblastos de feridas crônicas de participante da pesquisa com anemia falciforme?

Participar deste estudo não garante nenhum benefício, mas o estudo poderá produzir informações úteis futuramente para outras pessoas com problemas semelhantes. Estudos realizados em outros locais indicam que as células mesenquimais podem ajudar no controle dessa doença com possível ajuda na cicatrização de feridas.

Quais os métodos terapêuticos alternativos existentes de tratamentos dessas úlceras?

Existem alguns tratamentos alternativos para as úlceras da anemia falciforme como, por exemplo, a transfusão de sangue (hemáceas), até fechar a úlcera e, preferencialmente, por mais alguns meses subsequentes. Esta opção incorre em riscos transfusionais descritos

na literatura médica, especialmente o acúmulo de ferro (hemocromatose) e dificulta, ou mesmo impede transfusões futuras (sensibilização). Lembramos que a hidroxiuréia, medicamento usado na sua doença, piora a úlcera, portanto, não é considerado uma opção para o seu problema.

Como serão coletados os fibroblastos dos pacientes envolvidos no estudo?

Neste estudo, os pacientes voluntários serão submetidos a uma biópsia, que corresponde à retirada de um pequeno fragmento de tecido da úlcera por meio do uso de um instrumento cirúrgico específico chamado “punch” que retira um fragmento bem pequeno de tecido de cerca de 4 mm, do local da ferida. Esse procedimento será realizado com anestesia local, de forma ambulatorial, ou seja, sem a necessidade de internação. É um procedimento rápido, em geral não há necessidade de dar pontos no local também.

O procedimento da biópsia poderá gerar alguma dor no local?

Sim, assim para maior conforto será realizado anestesia local antes da realização da biópsia. O paciente poderá sentir algum desconforto doloroso no momento da anestesia local e eventualmente também após ter passado o efeito da anestesia. Assim, analgésicos serão prescritos para uso nos dias seguintes caso seja necessário.

Poderão ocorrer complicações? Há riscos após a realização dessa biópsia na ferida?

Embora seja um procedimento simples pois o fragmento a ser coletado será bem pequeno (4mm) o que assim tornaria improvável o surgimento de complicações, essas poderão ocorrer, como exemplo: infecção local, sangramentos pequenos e dor local nos dias seguintes. Caso isso aconteça, o seu médico será imediatamente comunicado para que tome as providências necessárias.

Qual será a fonte das células mesenquimais de gordura que serão usadas neste estudo?

As células mesenquimais do tecido adiposo a serem utilizadas nesse estudo serão obtidas a partir de tecido adiposo de outros pacientes que não são portadores de anemia falciforme e que já autorizaram o uso de suas células para esse estudo em questão. Hoje, essas células já estão armazenadas e congeladas no Hemocentro de Ribeirão Preto.

Como será feito o estudo?

O estudo será realizado em laboratório através do cultivo desse fragmento de tecido retirado da úlcera com o objetivo de isolar células chamadas de fibroblastos.

Após terem sido isolados, os fibroblastos serão estudados em laboratório quanto à possível interferência que as células mesenquimais do tecido adiposo poderiam exercer sobre as funções desses fibroblastos.

Você terá acesso ao resultado dos exames e da pesquisa?

Sim, você tem direito a esclarecimentos sobre os resultados da pesquisa. Entretanto, como se trata de um estudo, esses resultados estarão disponíveis apenas ao final do estudo. A equipe médica responsável por este estudo terá acesso ao seu prontuário médico para a obtenção de dados clínicos e resultados de exames complementares.

Você pode desistir de participar desse estudo?

Sim, a qualquer momento você poderá desistir de participar deste estudo, sem qualquer prejuízo financeiro ou da continuidade de seu tratamento médico no hospital onde você está sendo tratado. Nesse caso, você continuará recebendo o melhor tratamento disponível na instituição onde você estiver internado.

O estudo poderá ser interrompido?

O estudo poderá ser interrompido mediante aprovação prévia do Comitê de Ética em Pesquisa -CEP quanto à interrupção; ou quando for necessário, para que seja salvaguardado o participante da pesquisa. Neste caso, o CEP deverá ser comunicado a *posteriori* na primeira oportunidade.

Haverá alguma despesa ou benefício em dinheiro com este estudo?

Não. Você não terá custo nenhum por participar deste estudo. Os gastos com transporte e alimentação para o participante da pesquisa e seu acompanhante serão aqueles inerentes ao deslocamento de rotina ao Hospital nos dias de avaliação ou retorno. No hospital, quando necessário e a critério médico, serão fornecidas refeições aos participantes da pesquisa e acompanhantes como na rotina do atendimento SUS. Não haverá custo adicional. Você também não receberá nenhum ganho em dinheiro, mas terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de sua participação neste estudo.

Será garantido o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios pelo tempo que necessário ao participante da pesquisa. O participante da pesquisa continuará com seu acompanhamento médico no Hospital das Clínicas-HCFMRP-USP, de onde foi recrutado para a pesquisa, com todo o atendimento gratuito.

Como será a divulgação dos resultados desse estudo?

Afirmamos que os resultados dos testes e das avaliações clínicas sobre a sua saúde serão guardados de maneira sigilosa, e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, utilizadas usadas com fins científicos e publicadas.

Este projeto de pesquisa foi aprovado e será supervisionado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, que é o órgão responsável por avaliar se a pesquisa é adequada e ética, aprovando ou não a sua realização. Caso haja qualquer dúvida referente aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética pelo endereço: Av. Bandeirantes, 3900. Campus Universitário. Ribeirão Preto – SP. CEP 14048-900. Telefone (16) 36022228. E-mail: cep@hcrp.fmrp.usp.br.

Os responsáveis por este estudo, Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas CRM-SP 43.363 e Prof. Dr. Jayme Adriano Farina Junior CRM-SP 68.006, Dr Antonio Gustavo Zampar CRM-SP 112522, encontram-se disponíveis para qualquer esclarecimento ou dúvida, no Hemocentro de Ribeirão Preto no telefone (16) 21019311 ou e-mail dimas@fmrp.usp.br (Dr Dimas) ou na Divisão de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo no telefone (16) 36022593 ou 36022961 ou 36021140 ou e-mail jafarinajr@fmrp.usp.br (Dr Jayme) e aguzza@gmail.com ou (16) 3621-9960 (Dr Antonio Gustavo).

Você terá acesso ao resultado dos exames e da pesquisa com as células?

Sim, você terá direito ao conhecimento e acesso aos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico (células) e às orientações quanto as suas implicações, a qualquer tempo.

Os dados desta pesquisa poderão ser utilizados em pesquisa futuras?

Sim, os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados em pesquisas futuras.

Eu, _____, prontuário
nº _____ portador de _____, internado no
Hospital _____ sob os cuidados do(a) Dr(a)
_____ CRM nº _____,

Li o protocolo informativo e o termo de consentimento informado para a infusão de células mesenquimais e declaro que:

- 1) Recebi e compreendi as orientações verbais e escritas sobre o procedimento da biópsia de minha ferida, informações sobre as células mesenquimais, as suas potenciais aplicações clínicas e também sobre possíveis riscos do procedimento ao qual serei submetido (biópsia).
- 2) Compreendi que o estudo com as células mesenquimais ainda é experimental. Fui informado ainda que os tratamentos da minha doença, atualmente em curso, não serão interrompidos.
- 4) Autorizo que a equipe médica responsável por este estudo tenha acesso ao meu prontuário médico para a obtenção de dados clínicos e resultados de exames complementares.
- 5) Autorizo a guardas das células que sobrarem desta pesquisa no Banco de amostras biológicas do laboratório de terapia celular, para análises futuras, com finalidade científica, conforme acima esclarecido. Entretanto, deverei ser avisado e deverei autorizar ou não a utilização em outra pesquisa. No caso de uma nova pesquisa, esta deverá ser submetida à aprovação de comitê de ética.
- 6) Estou ciente e concordo que todos os dados gerados referentes ao estudo em laboratório história, aos exames laboratoriais, incluindo as intercorrências técnicas, bem como os dados de controles de qualidade dos produtos sejam registrados e conservados em banco de dados. Após análise, esses dados podem ser objeto de divulgação com interesse científico.
- 7) Sei que todos os meus dados estão protegidos por sigilo médico e que a minha identidade não será divulgada e tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Estou ciente de tudo isso, CONCORDO com a realização de todos os procedimentos descritos.

Após ter lido esse documento, entendido e discutido as dúvidas, caso concorde em participar, por favor, coloque a data, seu nome completo e sua assinatura. Este documento será elaborado em duas vias, sendo uma retida com o pesquisador responsável e a outra com o participante de pesquisa.

Dados do pesquisador:

Antonio Gustavo Zampar

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante:

Nome legível: _____

Idade: _____

Assinatura: _____

(necessária se o participante da pesquisa tiver capacidade de se manifestar)

Data: _____

Dados do responsável legal (necessária se participante da pesquisa não civilmente capaz ou inconsciente):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

RG: _____ UF: _____ Pai () Mãe () Outro () _____

Dados da testemunha (sempre que possível, mas obrigatório no caso de participante da pesquisa analfabeto(a)):

Nome legível: _____

Assinatura: _ _____

Data: _____