RAFAEL MAMORU CARNEIRO TUTIHASHI

**Interferência de células-tronco derivadas de tecido adiposo na
atividade de produtos finais de glicação avançada em fibroblastos de
pacientes diabéticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Clínica Cirúrgica

Orientador: Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira

São Paulo

2015

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

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Tutihashi, Rafael Mamoru Carneiro

Interferência de células-tronco derivadas de tecido adiposo na atividade de produtos finais de glicação avançada em fibroblastos de pacientes diabéticos / Rafael Mamoru Carneiro Tutihashi. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Marcus Castro Ferreira.

Descritores: 1.Diabetes Mellitus 2.Células-tronco 3.Produtos finais de glicosilação 4.Fibroblasto 5.Técnicas de cultura de células 6.Cicatrização

USP/FM/DBD-297/15

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

Terminologia Anatômica em Português conforme a Terminologia Anatômica Internacional da Federative Committee on Anatomical Terminology - FCAT (Comissão Federativa de Terminologia Anatômica – CFTA) aprovada em 1998 e traduzida pela Comissão de Terminologia Anatômica da Sociedade Brasileira de Anatomia – CTA-SBA. 1ª ed. (Brasileira). São Paulo: Editora Manole Ltda; 2001. 248p.

Utilizaram-se a terminologia e as definições estatísticas conforme o Guia para Expressão da Incerteza de Medição. 2ª ed. (Brasileira) do Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (BIPM, IEC, IFCC, ISSO, IUPAC, IUPAP, OIML, 1983). Edição Revisada (agosto de 1998). Rio de Janeiro: ABNT, INMETRO, SBM; 1998.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem promovido um ambiente de amor, educação e respeito desde a minha infância, e por serem um exemplo de vida e integridade. Obrigado por sempre nos priorizarem.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, meu orientador, pela oportunidade de ser treinado em seu serviço e de desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Cesar Isaac, pela confiança depositada em mim, ensinamentos, paciência e imensurável ajuda neste projeto.

À minha esposa, Alice Yang, pelo suporte incondicional, pela parceria de vida. Obrigado por respeitar o meu tempo.

Ao meu irmão Eduardo Tutihashi por sempre estar ao meu lado, por me estimular a ser médico desde a minha adolescência.

À minha afilhada Beatrice, pela alegria que proporciona em minha vida. Obrigado, Cathe e Henrique.

À minha família, pela união, amor e carinho. Obrigado por sempre estar ao meu lado.

Agradeço também aos professores membros da banca de avaliação pela disposição em dedicar algumas horas para a apreciação deste trabalho.

Aos meus queridos amigos Tiago Fruges, Leandro Ejnisman, Patricia Hiraki, Elton Lúcio e Bia Dias; vocês sempre estiveram presentes na minha vida, nos momentos bons e, também, nos difíceis. Obrigado pelo apoio, parceria, conversas e amizade. Vocês são “família” para mim.

À equipe do laboratório: Silvana Cereijido Altran e Renata da Conceição Oliveira, obrigado pelos ensinamentos e paciência.

Aos Laboratórios de Investigação Médica LIM 10 e LIM 17, nas pessoas das Dras. Marisa Passarelli e Walcy Paganelli Rosolia Teodoro, respectivamente, pela valiosa contribuição nos experimentos deste trabalho.

Aos alunos de graduação Pedro Ladeira e Yeda Nakamura, pela contribuição na rotina do laboratório.

“Não se pode entender nenhuma porção do mundo, a menos que a vejamos
no contexto do universo como um todo.”

Bertrand Russel (1872-1970)

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviações

Resumo

Abstract

1. Introdução.....	1
1.1.Cicatrização.....	2
1.1.1. Fase inflamatória da cicatrização	3
1.1.2. Fase proliferativa da cicatrização	4
1.1.3. Fase de remodelação na cicatrização	6
1.1.4. Resposta neurogênica	7
1.2.Diabetes mellitus	8
1.3.Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)	13
2. Objetivos.....	16
3. Métodos.....	18
3.1.Aspectos éticos	19
3.2.Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)	20
3.2.1. Cultivo, amplificação, congelamento e descongelamento	20
3.2.2. Caracterização das células-tronco por citometria de fluxo.....	25
3.2.3. Expressão de lisozima e colágenos I, II e III pelas células-tronco	26
3.2.4. Preparo do precipitado celular	27

3.3.Obtenção e cultivo de fibroblastos oriundos de feridas de membros inferiores em indivíduos diabéticos e controle.....	28
3.4.Preparo dos meios de cultura contendo AGEs.....	29
3.4.1. Preparo da albumina glicada <i>in vitro</i>	29
3.4.2. Dosagem de endotoxinas	30
3.4.3. Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML).....	30
3.4.4. Determinação da concentração de produtos de glicação avançada (AGEs)/albumina a ser utilizada nas culturas de fibroblastos	31
3.5.Avaliação do efeito modulador do eluato de cultura de células-tronco na migração de fibroblastos	32
4. Resultados.....	33
4.1.Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) 34	
4.1.1. Cultivo, amplificação, congelamento e descongelamento	34
4.1.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) por citometria de fluxo	35
4.1.3. Expressão de lisozima e colágenos I, II e III pelas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) ...	37
4.1.4. Preparo do precipitado celular	39
4.2.Obtenção e cultivo de fibroblastos oriundos de feridas de membros inferiores em indivíduos diabéticos e controle.....	39
4.3.Preparo dos meios de cultura contendo produtos finais de glicação avançada (AGE).....	41
4.3.1. Dosagem de endotoxinas	41

4.3.2. Determinação da concentração de produtos finais de glicação avançada (AGE)/albumina a ser utilizada nas culturas de fibroblastos	41
4.4. Avaliação do efeito modulador do eluato de cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) na migração de fibroblastos	44
5. Discussão	47
6. Conclusão.....	58
7. Referências bibliográficas.....	60

Lista de Figuras

- Figura 1.** Extração e isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: lipoaspirado retirado da sala cirúrgica; B: lipoaspirado após lavagem seriada com soro fisiológico; C: digestão enzimática do lipoaspirado com collagenase tipo IA sob agitação magnética por 45 minutos; D: precipitado celular e sobrenadante obtidos após centrifugação; E: cultura de ADSCs após ressuspensão do precipitado celular em D10. 21
- Figura 2.** Amplificação da cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: cultura de ADSCs em confluência; B: após remoção do meio e lavagem da garrafa com soro fisiológico, adicionou-se tripsina à cultura como apresentado na figura; C: adicionou-se D10 para interromper a ação da tripsina e, depois, centrifugou-se o líquido resultante, obtendo-se um precipitado celular como o da figura, o qual foi ressuspendido e transferido para uma área de cultura maior..... 23

Figura 3. Congelamento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: obteve-se um precipitado celular pelas mesmas etapas da amplificação; B: após contagem celular, ressuspendeu-se o precipitado em meio de congelamento e distribuiu-se o líquido em criotubos; C: os criotubos foram transferidos para um recipiente de congelamento com álcool isopropílico e armazenados a -80 °C; D: após 24 horas, os criotubos foram colocados no nitrogênio líquido..... 24

Figura 4. Resultados da citometria de fluxo das cinco amostras. Quadrante superior esquerdo (UL): células que ativaram o canal de leitura FL2-H, o qual capta fluorescência do fluoróforo FITC dos marcadores para CD49d e CD90. Quadrante inferior direito (LR): células que ativaram o canal de leitura FL1-H, o qual capta fluorescência do fluoróforo PE dos marcadores para CD34 e CD73. Quadrante superior direito (UR): células que ativaram tanto o canal de leitura FL2-H quanto o FL1-H, padrão compatível para expressão positiva de CD73 e CD90. Quadrante inferior esquerdo (LL): células que não ativaram o canal de leitura FL2-H nem o FL1-H, padrão compatível para expressão negativa de CD34 e CD49d..... 36

- Figura 5.** Registros fotográficos das imunofluorências para lisozima e colágenos I, II e III, e do controle com tampão fosfato (aumento de 400 x) 37
- Figura 6.** Imunofluorescência para colágeno I, à direita, e marcação do mesmo campo com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride), à esquerda (aumento de 400 x) 38
- Figura 7.** Imunofluorescência para lisozima no precipitado celular, mostrando sua expressão (aumento de 400 x) 39
- Figura 8.** Cultura de fibroblastos provenientes de tecido de granulação de leito de ferida em membro inferior de indivíduo diabético, visto em microscópio invertido (microscopia ótica, 100 x) 40
- Figura 9.** Curva de proliferação de fibroblastos dérmicos normais expostos a três diferentes concentrações de produtos finais de glicação avançada (AGE; a 1, 2 e 5 mg) e três diferentes concentrações de albumina (1, 2 e 5 mg). Em A, observa-se a proliferação e mortalidade celular sem qualquer interferência; em B, nota-se proliferação celular em meio de cultura suplementado com 1 mg de AGE; em C, observa-se o comportamento celular quando da adição de 1 mg de albumina. Em D e E, nota-se o comportamento celular quando da exposição a 2 mg AGE (D) e

2 mg de albumina (E), observa-se que, apesar da taxa de mortalidade ser maior, existe proliferação celular. Em F e G, a exposição foi, respectivamente, de 5 mg AGE e 5 mg albumina, nota-se que, nessas situações, a morte celular excede a taxa de proliferação..... 42

Figura 10. Fibroblastos dérmicos normais cultivados em meio acrescido de 5 mg/mL produtos finais de glicação avançada (AGE); nota-se cristalização da matriz extracelular e presença de células mortas na cultura. Microscopia ótica, 100 x..... 43

Figura 11. Cultura de fibroblastos dérmicos normais. Na coluna controle (CO), não houve complementação do meio de cultura; na coluna AGE, o meio de cultura recebeu suplementação de albuna bovina gicada (AGE) 2 mg/mL; na coluna AGE + eluato, foi acrescido meio de cultura proveniente das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). Com a ponta de uma pipeta, foram criadas áreas sem células nos poços de cultivo e foi observado o tempo necessário para que os fibroblastos proliferassem e migrassem ocupando a área vazia criada. Microscopia ótica de luz invertida, 100 x 45

Figura 12. Cultura de fibroblastos provenientes de úlceras em pacientes diabéticos. Na coluna controle (CO), não houve complementação do meio de cultura; na coluna AGE, o meio de cultura recebeu suplementação de albuna bovina gicada (AGE) 2 mg/mL; na coluna AGE + eluato, foi acrescido meio de cultura proveniente das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). Na cultura exposta à AGE, após 96 horas, são observados debris, provavelmente decorrentes de cristalização da matriz extracelular. Microscopia ótica de luz invertida, 100 x 46

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Número de células obtidas de cada paciente em P0 e em P3
(antes do congelamento), média e desvio-padrão (DP) 34
- Tabela 2.** Porcentagens de área celular com expressão positiva para
lisozima e colágenos I, II e III, média e desvio-padrão (DP) 38

Lista de Abreviações

ADSC	células-tronco derivadas de tecido adiposo
AGE	produtos finais de glicação avançada
BMSC	células-tronco derivadas de medula óssea
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDC	Centers for Disease Control
CGRP	peptídeo relacionado ao gene calcitonina
CML	carboximetilisina
DAPI	<i>4', 6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride</i>
DM	diabetes mellitus
DMEM	meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DP	desvio-padrão
ECM	matriz extracelular
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FGF	fator de crescimento de fibroblasto
FITC	isotiocianato de fluoresceína
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HGF	fator de crescimento de hepatócitos
HSC	células-tronco hematopoiéticas
IgG	imunoglobulina G
IL-1	interleucina-1
ISCT	International Society for Cellular Therapy
KGF	fator de crescimento de queratinócito
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MMP	metalopectidase de matriz
MSC	células-tronco mesenquimais
NF-κB	fator nuclear-κB

NKA	neuroquinina A
PBS	solução tampão fosfatada
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
RAGE	receptor de AGE
SBF	soro bovino fetal
SP	substância P
TGF- β	fator transformador de crescimento beta
TIMP	inibidores teciduais de metaloproteinases
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

RESUMO

Tutihashi, RMC. *Interferência de células-tronco derivadas de tecido adiposo na atividade de produtos finais de glicação avançada em fibroblastos de pacientes diabéticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Feridas nos membros inferiores são a principal causa de hospitalização e morbidade nos pacientes portadores de diabetes mellitus (DM). Atualmente, atribuem-se as complicações tardias do DM ao acúmulo de produtos finais de glicação avançada (AGE) nos diversos órgãos-alvo, incluindo a pele. Já foi demonstrado que a função deficitária dos fibroblastos de diabéticos está relacionada diretamente ao acúmulo de AGEs. Neste cenário, o uso de células-tronco mesenquimais tem ganhado destaque, tendo sido demonstrado, na literatura, que células-tronco derivadas de medula óssea (BMSC) produzem lisozima, um anti-AGE fisiológico. As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSC) são de fácil captação e apresentam melhor rendimento em cultura celular quando comparadas às BMSC. Neste estudo, investigamos se as ADSC sintetizam lisozima e avaliamos se o produto das ADSC tem a capacidade de diminuir os efeitos deletérios dos AGEs nos fibroblastos. Para esse fim, foram cultivadas ADSC provenientes de lipoaspiração de pacientes hígidos, fibroblastos provenientes de feridas de pacientes diabéticos e fibroblastos provenientes de pacientes hígidos. Os fibroblastos de pacientes diabéticos ou hígidos foram submetidos a três meios de cultura diferentes: normoglicêmico (controle), contendo AGE ou contendo AGE mais o meio de cultura proveniente de ADSC (eluato) e, nesses grupos, foi feito ensaio de migração de fibroblastos. Observamos que, nos meios contendo AGE, não ocorreu migração dos fibroblastos, e na cultura contendo AGE mais eluato, os fibroblastos apresentaram migração semelhante à do grupo controle. Concluímos que as ADSC produzem lisozima e que os produtos sintetizados por essas células têm a capacidade de inibir os efeitos deletérios dos AGEs em fibroblastos *in vitro*.

Descritores: Diabetes Mellitus; Células-Tronco; Produtos Finais de Glicosilação; Fibroblasto; Cultura de Células; Cicatrização.

ABSTRACT

Tutihashi, RMC. Effect of adipose tissue derived stem cells on advanced glycation end products activity in fibroblasts from diabetic patients [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2015.

Lower limb ulcers are one of the major causes of morbidity and hospital admission in diabetic patients. Current researches indicate that diabetes mellitus (DM) complications are related to the accumulation in target organs, including the skin of advanced glycation end products (AGEs). It has been shown that cutaneous fibroblasts dysfunction in DM patients is directly dependent on AGE accumulation. In this context, the use of mesenchymal stem cells has been proposed, since bone marrow stem cells (BMSC) produce lysozyme, a physiological anti-AGE enzyme. Adipose tissue derived stem cells (ADSC) are easier to harvest and proliferate faster in cell cultures compared to BMSC. In this study, we investigated whether ADSC are able to produce lysozyme and also the ability of those stem cells to reduce the deleterious effects of AGEs in fibroblasts. ADSC were isolated and cultured from liposuction samples from non diabetic patients; fibroblasts were also isolated and cultured from wounds of diabetic patients and from non diabetic patients' skin. Fibroblasts were maintained in three different conditions: in normoglycemic culture medium (control), a culture medium containing AGE or a culture medium previously in contact with ADSC for 24 hours (eluate) with addition of AGE. A fibroblast migration assay was performed. There was a lack of fibroblast migration in fibroblast culture with AGE-supplemented medium, whereas fibroblast culture containing ADSC's eluate and AGE showed fibroblast migration similar to the control group. Our study demonstrates that ADSC can synthesize lysozyme and we infer that the products of ADSC are able to inhibit *in vitro* AGE deleterious effects in fibroblasts.

Descriptors: Diabetes Mellitus; Stem Cells; Glycosylation End Products, Advanced; Fibroblast; Cell Culture; Wound Healing.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 16% do peso corporal.¹ Ela é composta por duas camadas: epiderme e derme. A principal célula componente da epiderme é o queratinócito e, da derme, é o fibroblasto.

O processo de cicatrização que se segue a feridas na pele tem a finalidade de cura e restauração da fisiologia normal da pele. Nesse processo, o resultado desejado seria a formação de um tecido idêntico ao original, com as mesmas propriedades e funções; entretanto, o resultado que se obtém é de um tecido estrutural e funcionalmente satisfatório, mas não idêntico ao original. A regeneração do tecido (em que se constrói tecido idêntico ao normal) é pouco comum, e com maior frequência ocorre a cicatrização (em que tecido semelhante ao original é produzido, com menos resistência ao trauma).^{2,3}

A cicatrização de feridas é um processo regulado por uma complexa interação entre citocinas e fatores de crescimento. Qualquer alteração nesse processo pode prolongar o período de cura e até fazer com que não ocorra cicatrização. Esse processo pode ser dividido didaticamente em três fases que se superpõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação.³

1.1.1. Fase inflamatória da cicatrização

A fase inflamatória é a primeira fase de resposta à agressão tecidual. Os principais eventos dessa fase são a hemostasia, desbridamento do tecido e formação de um arcabouço de fibrina para possibilitar a migração celular. Quando ocorre agressão à pele, a epiderme é rompida e os queratinócitos liberam interleucina-1 (IL-1), o qual é o primeiro marcador que sinaliza aos tecidos circunjacentes sobre a lesão ocorrida.⁴ Com o extravasamento de sangue dos vasos lesionados, plaquetas são expostas e ativadas pela matriz extracelular (ECM), tendo início os processos de adesão e agregação plaquetária. Concomitantemente, o fibrinogênio sérico é clivado pela trombina, formando monômeros de fibrina, os quais, juntamente com plaquetas, formam um tampão hemostático para que não ocorra mais perda de sangue. Desta maneira, é formado um arcabouço de fibrina, necessário para a migração de células proinflamatórias.^{2,3} Logo após a injúria tecidual, neutrófilos e monócitos migram para a ferida, atraídos por diversos fatores quimiotáticos liberados durante a hemostasia, principalmente IL-1 e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Os neutrófilos são células fagocíticas, predominantes no início do processo de cicatrização, e, com o passar do tempo, os monócitos se tornam predominantes.²⁻⁴ Monócitos, ao migrarem para a ferida, se transformam em grandes células fagocíticas, chamadas de macrófagos, pela ação do fator transformador de crescimento

beta (TGF- β). Estas células fagocitam, digerem e matam os patógenos contaminantes na ferida.²⁻⁴

Os macrófagos são as principais células reguladoras na reação inflamatória, secretam diversas citocinas proinflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8) e fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblasto [FGF], fator de crescimento epidérmico [EGF], TGF- β e PDGF), mantendo, desta maneira, um estímulo (*feedback*) positivo da resposta inflamatória. Devido à produção de FGF, os macrófagos são responsáveis por atrair fibroblastos para o leito da ferida e dar início à fase proliferativa.²⁻⁴

1.1.2. Fase proliferativa da cicatrização

Na fase proliferativa, os principais eventos que ocorrem são o estabelecimento de suprimento sanguíneo adequado, a criação de uma barreira por meio da reepitelização e o reforço da derme lesada. As plaquetas liberam fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), que, juntamente com FGF e TGF- β , ativam as células endoteliais e iniciam a expressão do ativador de plasminogênio. Este cliva o plasminogênio sérico e a pró-colagenase em, respectivamente, plasmina e collagenase (metalopectidase de matriz 1 [MMP-1]). Deste modo, ocorre degradação local da membrana basal circundante e o endotélio começa a proliferar em uma estrutura tubular. Esse processo é fundamental para a formação de uma nova ECM.²⁻⁴

Moléculas estruturais da ECM inicial, como a fibronectina e o colágeno, contribuem para a formação do tecido de granulação por construírem uma matriz para migração celular e reserva de citocinas e fatores de crescimento.³ FGF, TGF- β e PDGF atraem fibroblastos para a ferida. TGF- β e PDGF induzem a diferenciação dos fibroblastos em miofibroblastos, os quais têm capacidade de contração por possuírem fibras de actina e miosina. Devido a essas características, os miofibroblastos conseguem se movimentar na ECM.² Uma vez que os fibroblastos migraram para a ferida, eles gradualmente mudam seu fenótipo para profibrótico; com isso, sua função principal passa a ser síntese proteica. Inicia-se a deposição de colágeno na ferida, que se ligará à fibronectina. Na ferida, existe maior proporção de colágeno tipo III em relação ao tipo I. Os miofibroblastos alinham-se e ligam-se às fibras de colágeno de maior espessura, puxando-as em direção a eles. Esse fenômeno, estimulado por TGF- β e PDGF, é responsável pela contração da ferida.²

Reepitelização inicia-se nas primeiras horas após o trauma. A liberação de FGF, EGF, fator de crescimento de queratinócito (KGF) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) estimula a migração e proliferação de células epiteliais. Esse evento se inicia com a liberação das adesões entre os queratinócitos e entre o queratinócito e a membrana basal, seguido por migração do queratinócito no ECM provisório, formado por fibronectina, fibrina e colágeno tipo V.²⁻⁴ A migração dos queratinócitos cessa, possivelmente, pelo contato entre eles. Nesse momento, os queratinócitos se fixam à membrana basal e retornam o processo de diferenciação para a formação do epitélio estratificado.³

1.1.3. Fase de remodelação na cicatrização

A fase de remodelação consiste em depósito de ECM e sua subsequente mudança ao longo do tempo. Os principais eventos dessa fase são o rearranjo das fibras de colágeno, a mudança do predomínio de colágeno tipo III para colágeno tipo I e, conseqüentemente, aumento da resistência da cicatriz à força de tração.²

O colágeno tipo III começa a ser secretado na ferida nas primeiras 72 horas e tem sua produção máxima entre 5 e 7 dias. O colágeno tipo III é inicialmente mais abundante que o tipo I, e é degradado mais ativamente com o decorrer do tempo, enquanto o colágeno I tem sua produção aumentada pelos fibroblastos. Esse processo de conversão acontece devido a um controle preciso entre degradação e síntese de colágeno feito pelas MMPs. A ação das MMPs também é controlada pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP). Os TIMPs se ligam especificamente às MMPs e são seus inibidores naturais. Esse processo faz com que a remodelagem e a contração de feridas sejam parcialmente controladas pela relação entre TIMPs e MMPs. Em cerca de um ano ou mais, a relação entre o colágeno I e III atinge proporção semelhante à da pele normal.^{2,3} Juntamente com a substituição do tipo de colágeno, ocorre uma alteração em sua organização, a qual muda, de fibras paralelas e dispostas aleatoriamente, para entrelaçadas e organizadas.^{2,3}

A última fase do processo de cicatrização é responsável pelo aumento da resistência do leito danificado, que ocorre por consequência do rearranjo das fibras de colágeno e pelo aumento de colágeno tipo I. Ao final da primeira semana após o surgimento da ferida, ocorre restauração de 3% da resistência da pele íntegra; da terceira semana, 30%, e de três meses, 80%, entretanto, a ferida nunca atingirá 100% da resistência fisiológica da pele.^{2,3}

1.1.4. Resposta neurogênica

A pele possui diversas terminações nervosas em todas as suas camadas, que são responsáveis por comunicar sensações táteis da periferia com o sistema nervoso central. Outra função desse sistema é iniciar a resposta inflamatória neurogênica após dano tecidual por meio de liberação de peptídeos vasoativos, como substância P (SP), neuroquinina A (NKA) e peptídeo relacionado ao gene calcitonina (CGRP). SP e NKA aumentam a permeabilidade venosa, ao passo que CGRP causa vasodilatação arterial. SP induz expressão de moléculas de adesão no endotélio e promove quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos. A sinalização de SP também estimula neoangiogênese, assim como proliferação de fibroblastos e de células endoteliais.^{2,5}

1.2. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (DM) é uma doença caracterizada por hiperglicemia devido à diminuição da produção de insulina, resistência tecidual periférica à insulina ou a combinação de ambos fatores. Em 2014, foi estimado, pelo Centers for Disease Control (CDC), que 28,9 milhões de pessoas tenham DM na população norte-americana, sendo um total de 9,3% da população. O custo estimado de DM nos Estados Unidos em 2012 é de 245 bilhões de dólares. No Brasil, dados do Ministério da Saúde revelam que DM é a quinta maior causa de hospitalização e está entre as dez principais causas de morte no país.^{6,7} Diabéticos estão sujeitos a comorbidades que são consideradas complicações do DM a longo prazo, como retinopatia, catarata, aterosclerose, neuropatia, nefropatia, alteração na cicatrização de feridas, entre outras, e apresentam expectativa de vida de apenas dois terços do tempo da população geral.⁸

Ferida do membro inferior no diabético é a principal causa de hospitalização e a principal morbidade associada ao DM. Aproximadamente 60% das amputações não traumáticas são realizadas em pacientes com DM. Em 2010, foram realizadas ao redor de 73 mil amputações nos Estados Unidos em pacientes diabéticos.^{6,9} A ferida característica de membro inferior no diabético é o resultado de diversas complicações do DM, como infecção, ulceração associada a neuropatia, vasculopatia periférica e alteração no processo de cicatrização.^{5,10,11}

Neuropatia pode acometer os nervos sensitivos, motores e o sistema autonômico. Até 66% dos pacientes diabéticos apresentam neuropatia periférica dos membros inferiores. Devido à perda da sensibilidade protetora no paciente com neuropatia diabética, ele apresenta risco de ulceração dos membros inferiores sete vezes maior que a população não diabética. O déficit motor do sistema nervoso periférico cria estresse físico indevido no pé insensível, levando a deformidades anatômicas, que contribuem para a formação de feridas em decorrência da mudança da biomecânica do pé. Pacientes com neuropatia diabética apresentam número reduzido de terminações nervosas na pele, causando diminuição da secreção de SP e CGRP. Como resultado final, ocorre uma pobre resposta inflamatória neurogênica ao trauma, contribuindo ainda mais para a cronificação da ferida.^{5,10}

Vasculopatia periférica é uma doença aterosclerótica que acomete principalmente os membros inferiores, é duas vezes mais comum no paciente diabético, comparado à população geral. É um fator importante na formação de feridas no paciente diabético em aproximadamente 50% dos casos.^{5,10}

A hiperglicemia e a baixa pressão de oxigênio local prejudicam a eficiência fagocítica e citotóxica dos neutrófilos e macrófagos. Esses fatores, juntamente com traumas recorrentes não percebidos pelo paciente devido à neuropatia, favorecem a contaminação bacteriana.¹²

A ferida do paciente diabético apresenta-se desordenada, com acúmulo de ECM e excesso de atividade das MMPs. Macrófagos de diabéticos secretam exageradamente MMPs, que, associados a elevação dos níveis de IL-1 e fator

de necrose tumoral alfa (TNF- α), levam ao prolongamento da fase inflamatória da ferida.^{11,13,14} Diversos estudos demonstraram alteração no equilíbrio entre MMPs e TIMPs em feridas crônicas. Foi observada elevação da concentração de MMPs (MMP-2, -8 e -9) e menor concentração de TIMPs em feridas de pacientes diabéticos que sofreram trauma comparadas com controles (população geral com trauma, mas com níveis glicêmicos normais).^{11,12}

Hiperglicemia tem importante papel no desenvolvimento das complicações do paciente diabético, especialmente no paciente com mau controle dos níveis glicêmicos. Tecidos que não dependem de insulina para absorver glicose, como o sistema nervoso, coração, rins e pequenos vasos, são afetados pela hiperglicemia. Como consequência, esses tecidos apresentam níveis elevados de glicose intracelular durante os períodos de hiperglicemia sistêmica. O papel da hiperglicemia no desenvolvimento das complicações do paciente diabético ainda não está completamente elucidado, porém, atualmente, tem recebido grande atenção o papel dos produtos de glicação avançada no desenvolvimento das complicações do DM.⁸

A glicação de proteínas é uma reação espontânea, não enzimática, que ocorre nos períodos de hiperglicemia, com açúcares redutores, como a glicose e frutose. Inicialmente ocorre reação entre o grupo carbonila de açúcares e o grupo amino de proteínas, formando produtos reversíveis, as bases de Schiff. Após um certo período, essas bases de Schiff se rearranjam, formando produtos estáveis, as bases de Amadori. Esse processo é conhecido como reação de Maillard. A formação de produtos finais de glicação avançada (AGE) ocorre durante semanas, por meio de

novas reações dessas proteínas glicadas, portanto, acomete proteínas de meia-vida longa. Componentes estruturais da ECM e membrana basal, como os colágenos, são alguns dos principais alvos da glicação avançada.¹⁵

Nos períodos de hiperglicemia, ocorre aumento significativo de açúcares intracelulares, como frutose. Esses açúcares intracelulares formam AGEs mais rapidamente que a glicose. Quando a glicação é acompanhada de oxidação, o produto final é denominado produto de glicoxidação; um exemplo disso é a carboximetilisina (CML).¹⁵

CML é um dos principais AGEs *in vivo*, com níveis pelo menos duas vezes aumentados nos colágenos de pele de pacientes diabéticos. A ação da CML nas células se dá através do receptor de AGE (RAGE). A interação de AGEs com RAGE nos macrófagos causa estresse oxidativo e ativação de fator nuclear- κ B (NF- κ B), o qual modula a expressão de fatores proinflamatórios, como IL-1 α , IL-6, TNF- α . Nos fibroblastos, a interação entre AGEs e RAGE causa depósito insuficiente de colágenos para uma cicatrização normal.⁸

Na cicatrização fisiológica, FGF-2 (fator de crescimento de fibroblasto) é armazenado em meio intracelular e liberado quando ocorre lesão endotelial. Desta maneira, ele é suscetível à glicação. FGF-2 glicado diminui a proliferação endotelial, formação de tubo capilar e angiogênese.⁸

O acúmulo de AGEs na ECM está fortemente correlacionado à gravidade de feridas diabéticas, por ser um fator crítico na interferência da função celular. A presença de AGEs faz com que ocorra diminuição na proliferação de fibroblastos e aumento de apoptose.¹⁶

Os mecanismos pelos quais AGEs alteram a reparação tecidual no paciente diabético são: 1) alteração na estrutura e nas propriedades físicas do ECM; 2) alteração no reconhecimento e interações entre células e ECM; 3) estresse oxidativo e inflamação no sítio da ferida. Terapias para reduzir os danos dos AGEs, além de controle glicêmico, incluem: 1) inibir a formação de AGEs; 2) clivar AGEs já formados; 3) quelar AGEs já formados; 4) inibir os RAGEs.¹³

Lisozima (14-15 kDa) é uma enzima bacteriolítica de organismos Gram-positivos que degrada mucopeptídeos de paredes celulares. Ela está presente na saliva, urina, lágrimas, leite materno, secreções respiratórias e na pele de humanos, sendo codificada por somente um tipo de gene na espécie humana. Suas fontes celulares incluem: linfócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, células de Paneth, células epiteliais da traqueia, pneumócitos, células secretoras de glândulas apócrinas. Na pele, está presente em concentração três vezes maior na epiderme comparada à derme. A expressão de lisozima é muito maior nas camadas superficiais da epiderme do que na camada basal. Além da propriedade bacteriolítica, essa enzima apresenta diversas outras funções, como inativação de certos vírus, estimulação da fagocitose por polimorfonucleares e macrófagos, estimulação de proliferação de monócitos. Zheng et al. demonstraram a função dessa proteína de se ligar, com grande afinidade, aos AGE, quelando AGEs já formados, que são, então, excretados pela urina.^{17,18}

1.3. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)

Existem dois tipos de células-tronco, as embrionárias e as adultas. As primeiras são obtidas a partir de embriões, são totipotentes, ou seja, têm a capacidade de se diferenciar em qualquer tecido do corpo humano, inclusive após tempo prolongado de cultura celular, e apresentam replicação indiferenciada prolongada. A pesquisa e uso clínico dessas células são dificultados devido à pouca regulamentação legal e a questões éticas.¹⁹

As células-tronco adultas são pluripotentes, conseguem se diferenciar em diversos, mas não em todos os tecidos. Existem atualmente vários relatos de isolamento, características e nomenclatura dessas células, ademais, elas já foram isoladas a partir de diversos tecidos. Visando a unificação da nomenclatura e identificação das células-tronco adultas, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) intitulou essas células de células-tronco mesenquimais (MSC) e definiu critérios mínimos para considerá-las MSC, que incluem aderência ao plástico, positividade e negatividade para certos marcadores de superfície (CD), capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos.²⁰⁻²²

Uma das principais e mais estudadas fontes de obtenção de células-tronco adultas é a medula óssea, que é fonte de células-tronco hematopoiéticas (HSC) e de origem mesenquimal (BMSC). Dentre as MSCs, as BMSCs são as mais bem descritas na literatura, se originam do estroma de sustentação da medula. Elas já foram diferenciadas em adipócitos *in*

vitro, hepatócitos, osteoblastos, células endoteliais, condrócitos, miócitos cardíacos, células neurais, miócitos esqueléticos, miofibroblastos e em células tubulares renais. Seu uso clínico em estado indiferenciado tem sido descrito na literatura, como, por exemplo, em doenças congênitas. Silva e colaboradores descreveram, recentemente, que essas células são fonte de lisozima, sendo a enzima um dos principais produtos extracelulares em uma verificação da expressão gênica.²³⁻²⁶

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) são obtidas a partir do estroma de sustentação do tecido adiposo branco, e também podem se diferenciar em osteoblastos, miócitos cardíacos, condrócitos, células neurais, células de músculo liso, hepatócitos, epitélio e em endotélio. As ADSC apresentam morfologia muito semelhante à de fibroblastos, com aspecto alongado e citoplasma fusiforme. No tecido adiposo, as ADSC são encontradas à razão de 1:100 a 1:1.500 adipócitos. Esse valor é considerado muito superior àquele descrito para as células provenientes da medula óssea. Quando comparadas, histologicamente, a adipócitos, as ADSC não possuem as gotículas gordurosas tão características das células do tecido gorduroso. A análise molecular *in vitro* revela que a expressão nuclear de proteínas de membrana, assim como de citocinas, modifica-se nas ADSC, aproximando seu fenótipo àquele encontrado em células-tronco provenientes de tecido músculo-esquelético, mas também de medula óssea. Uma vez cultivadas, as ADSC apresentam-se em camada única de células, que têm caracteristicamente aspecto achatado e cerca de 25 a 30 micrômetros de diâmetro. Quando a cultura

aproxima-se da confluência, as células assumem formato de fuso, tornando-as ainda mais semelhantes a fibroblastos. Nos recipientes em que se iniciam as culturas, existe uma grande variedade de células que não as mesenquimais (células hematopoiéticas, pericitos, células endoteliais e até mesmo algumas células de músculo liso). À medida que as culturas são amplificadas, o número dessas outras células decai rapidamente, uma vez que o meio de cultura utilizado para nutrir as células é específico para crescimento de ADSC.^{21,27-30}

As utilizações clínicas e laboratoriais de ADSCs mostram aspectos mais vantajosos que o uso de BMSCs, pois as células derivadas de tecido adiposo necessitam de coleta menos invasiva e apresentam maior rendimento celular em cultura. Além disso, há grande disponibilidade de tecido gorduroso para fonte de cultura, inclusive no material descartado de cirurgias, como as lipoaspirações. A produção de certas substâncias biologicamente ativas pelas ADSCs também contribui para seu uso em medicina regenerativa, chamando atenção para a produção de colágeno, fibronectina, FGF e VEGF, proteínas importantes no processo de cicatrização.^{24,27,31}

2. OBJETIVOS

No presente estudo, avaliamos a capacidade *in vitro* das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) de diminuir a atividade de produtos de glicação avançada (AGEs) em culturas de fibroblastos oriundos do tecido de granulação de feridas de membros inferiores de indivíduos diabéticos. Os objetivos foram:

- Investigar a síntese de lisozima e de colágenos I, II e III pelas ADSCs;
- Investigar, *in vitro*, por meio de ensaio de migração de fibroblastos, o efeito do produto secretado pelas ADSCs nos fibroblastos provenientes de pele de pacientes diabéticos e não diabéticos, quando submetidos a meio de cultura contendo AGEs.

3. MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Este estudo obteve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP; número do projeto: 0877/11).

Os pacientes foram informados sobre o propósito e consequências da pesquisa, e posteriormente foi solicitada autorização de participação no estudo mediante preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido.

Os experimentos foram desenvolvidos no LIM 04 (Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica do HCFMUSP), em colaboração com os LIMs 17 (Laboratório de Reumatologia) e 24 (Laboratório em Oncologia Experimental).

3.2. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)

3.2.1. *Cultivo, amplificação, congelamento e descongelamento*

Tecido adiposo utilizado neste experimento para cultura de células foi doado ao laboratório com finalidade de pesquisa, por cinco pacientes de ambos os sexos e dentro da faixa etária de 20 a 45 anos, sem comorbidades, que foram submetidos a lipoaspiração com finalidade estética. Todas as cirurgias foram realizadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP pela equipe de cirurgiões plásticos desse hospital. O excedente de lipoaspiração foi obtido no centro cirúrgico, armazenado em frasco estéril, no total 30 ml de produto de cada paciente e imediatamente transportado ao laboratório em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), acrescido de 10% de soro bovino fetal (SBF) com estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e anfotericina B (0,25 µg/mL), por nós denominado D10. O pesquisador principal obteve o material coletado na sala cirúrgica e foi responsável pela obtenção e cultivo das células, conforme mostra a **Figura 1**. Uma vez no laboratório, esse material foi lavado com soro fisiológico e, em seguida, submetido a digestão enzimática com 30 mg de collagenase tipo IA, diluída em 30 mL de DMEM, durante 45 minutos. Após esse período, a digestão enzimática foi neutralizada, adicionando-se 30 mL de D10. O material foi centrifugado por 5

minutos, a 800 g. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspendidas em 12 mL de D10. O produto foi transferido para garrafas de cultura de células, uma por paciente, de 75 cm² de área, incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até a cultura atingir subconfluência.

Figura 1. Extração e isolamento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: lipoaspirado retirado da sala cirúrgica; B: lipoaspirado após lavagem seriada com soro fisiológico; C: digestão enzimática do lipoaspirado com collagenase tipo IA sob agitação magnética por 45 minutos; D: precipitado celular e sobrenadante obtidos após centrifugação; E: cultura de ADSCs após ressuspensão do precipitado celular em D10.

A cultura celular, ao atingir subconfluência, era amplificada (**Figura 2**). Para esse procedimento, o meio de cultura foi retirado, a garrafa foi lavada com soro fisiológico e, em seguida, foram adicionados 5 mL de solução de tripsina a 0,05% mais ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,02% na garrafa de cultura, que foi mantida por 5 minutos em incubadora a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂, até o destacamento das células do fundo das garrafas. Essa reação enzimática foi interrompida pela adição de 5 mL de D10. O conteúdo foi transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado por 5 minutos a 800 g. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 12 mL de D10. Este produto foi transferido para garrafas de cultura de células de 75 cm² de área e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas. Amplificações similares foram realizadas sempre que as células formavam aspecto de subconfluência. Foram realizadas amplificações de culturas até a terceira passagem (**Figura 2**).

Assim que as culturas em terceira passagem atingiram confluência, as células dissociadas das garrafas de cultura, foram contadas em hemocítômetro de Neubauer, e procedeu-se ao congelamento das células (**Figura 3**). Elas foram ressuspensas rapidamente em meio de congelamento, a saber: 60% DMEM, 10% dimetilsulfóxido (DMSO) e 30% de SBF. Durante esse processo, o meio de congelamento foi mantido no máximo a 4 °C, e as células nele ressuspensas foram transferidas para criotubos acondicionados em caixa de congelamento, contendo álcool isopropílico para promoção de congelamento lento, garantindo a viabilidade das células. Uma

vez colocadas a -80°C , as caixas promoveram congelamento gradual e constante dessas suspensões celulares (a $1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$). Após 24 horas, os tubos foram transferidos para nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados até o momento do uso.

Figura 2. Amplificação da cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: cultura de ADSCs em confluência; B: após remoção do meio e lavagem da garrafa com soro fisiológico, adicionou-se tripsina à cultura como apresentado na figura; C: adicionou-se D10 para interromper a ação da tripsina e, depois, centrifugou-se o líquido resultante, obtendo-se um precipitado celular como o da figura, o qual foi ressuspendido e transferido para uma área de cultura maior.

Figura 3. Congelamento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). A: obteve-se um precipitado celular pelas mesmas etapas da amplificação; B: após contagem celular, ressuspendeu-se o precipitado em meio de congelamento e distribuiu-se o líquido em criotubos; C: os criotubos foram transferidos para um recipiente de congelamento com álcool isopropílico e armazenados a -80°C ; D: após 24 horas, os criotubos foram colocados no nitrogênio líquido.

Quando obtivemos o total de cinco amostras congeladas após P3, as células foram descongeladas e mantidas em condições ideais para seu desenvolvimento. Os criotubos descongelados foram colocados rapidamente em banho-maria a 37 °C, até que seu conteúdo começasse a liquefazer. Nesse momento, o meio de cultura foi diluído em D10.

As células em suspensão foram transferidas para tubos de fundo cônico e submetidas a centrifugação a 800 g durante 5 minutos. Em cada tubo, o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular, ressuspendido em meio D10, quando então as células descongeladas foram novamente semeadas. Todos os experimentos com as ADSCs foram realizados após o descongelamento, ou seja, em P4.

3.2.2. Caracterização das células-tronco por citometria de fluxo

ADSCs foram cultivadas, em meio D10, durante 48 h. Após esse período, as células foram, então, incubadas com conjugados PE de anticorpos monoclonais para CD34 e CD73; ou com anticorpos conjugados FITC (isotiocianato de fluoresceína) para CD49d e CD90 por 30 minutos à temperatura ambiente. As células controle foram marcadas com anticorpo isotipo imunoglobulina G (IgG). Em seguida, as células foram lavadas em solução tampão fosfato (*phosphate buffered solution*, PBS), fixadas em formaldeído a 4% e analisadas em citômetro de fluxo FACSscan, e os

resultados foram expressos em média aritmética dos percentuais de expressão $\pm$ desvio padrão.

3.2.3. Expressão de lisozima e colágenos I, II e III pelas células-tronco

Foram semeadas 2×10^5 ADSCs sobre lamínulas circulares de 13 mm de placas multipoços. As placas multipoços foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas. Passado esse período, o meio de cultura foi retirado, as lamínulas lavadas com PBS e as células, fixadas com paraformaldeído a 4% (1 mL por lamínula). Após sucessivas lavagens, foram realizadas incorporações dos anticorpos primários: antilisoizima policlonal, obtido de coelhos e diluído a 1:3.000; anticolágeno I policlonal, obtido de camundongos e diluído a 1:1.000 em PBS; anticolágeno III monoclonal diluído a 1:50 e anticolágeno II monoclonal diluído a 1:50.

As lamínulas foram mantidas por 24 horas em câmara escura a 4 °C e novamente lavadas sucessivas vezes com 0,05% Tween 20 (diluído em PBS) e incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugada com fluoresceína), diluído em PBS, contendo 0,006% de azul de Evans. As lamínulas foram novamente lavadas em 0,05% Tween 20 e montadas sobre lâminas com glicerina tamponada. Essas lâminas foram avaliadas por dois avaliadores independentes, em microscópio de fluorescência, e foi registrada a média aritmética das duas

avaliações. Foi realizada documentação fotográfica e as diferentes células foram analisadas e contadas utilizando-se um programa de computação analisador de imagens, o ImageJ.

3.2.4. Preparo do precipitado celular

Após o descongelamento, as células foram ressuspensas em garrafa de cultura e, quando atingiram confluência, foram submetidas à etapa de tripsinização. As células foram centrifugadas a 800 g por 5 minutos em tubo cônico (Falcon) de 50 mL e, após a centrifugação, o meio de cultura foi retirado, sobrando apenas o precipitado celular. Este foi incubado a 37 °C sob 5% de CO₂. Após uma semana, o precipitado foi embebido em parafina. Cortes foram feitos e corados com azul de toluidina e Picrosirius e, para imunoistoquímica, as lâminas foram marcadas com anticorpo primário antilisozima policlonal, obtida de coelhos e diluída a 1:3.000.

3.3. Obtenção e cultivo de fibroblastos oriundos de feridas de membros inferiores em indivíduos diabéticos e controle

Fibroblastos oriundos de úlceras cutâneas em membros inferiores de indivíduos portadores de DM foram extraídos a partir de biópsias tipo “*punch*” de aproximadamente 4 mm de diâmetro no leito das feridas de 5 pacientes com faixa etária entre 40 e 60 anos. Todos os pacientes tinham diagnóstico de DM, sem outras comorbidades relevantes, eram acompanhados no Ambulatório de Feridas Crônicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Para controle do método foi, também, utilizado excedente de pele da mastoplastia redutora de cunho estético de pacientes não diabéticas para obtenção de fibroblastos normais. Todas as pacientes do controle tinham exames pré-operatórios normais, não apresentavam comorbidades, a faixa etária era de 40 a 60 anos e todas as cirurgias foram realizadas pela equipe de cirurgia plástica do Hospital das Clínicas da FMUSP.

O material obtido foi submetido a digestão enzimática conforme protocolo descrito por Bullock. As células obtidas foram mantidas em D10 para seu desenvolvimento em ambiente controlado. A cada 72 horas, o meio de cultura foi trocado, permitindo a proliferação dessas células.³²

Sempre que as células apresentaram aspecto de subconfluência nos frascos de cultivo, ampliações das culturas foram realizadas até P3, quando essas células foram congeladas, seguindo o protocolo descrito

anteriormente. A cada amplificação, o número de células foi contado em hemocitômetro de Neubauer, diluindo-se em azul de Trypan, na proporção de 1:1, para fazer o teste de viabilidade celular.

3.4. Preparo dos meios de cultura contendo AGEs

3.4.1. *Preparo da albumina glicada in vitro*

Albumina bovina isenta em ácidos graxos (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha, 40 mg) foi incubada com 10 mM de glicolaldeído (GAD; Sigma-Aldrich, Fluka-Buchs, Alemanha), dissolvidos em PBS (NaCl, 137 mmol/L; Na₂HPO₄, 4 mmol/L; KCl, 2 mmol/L; K₂PO₄, 1 mmol/L) com EDTA (pH = 7,4). Albumina controle (C) foi preparada na presença de PBS apenas.

As incubações foram realizadas sob condições estéreis, em ambiente de nitrogênio, em banho de água a 37 °C, com agitação por quatro dias. Em seguida, as amostras foram dialisadas com PBS e esterilizadas em filtro 0,22 µm. A concentração final de proteína das amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (conforme descrito por Waterborg e Matthews³³).

3.4.2. Dosagem de endotoxinas

A quantidade de endotoxina na albumina bovina modificada por glicação avançada *in vitro* foi determinada por meio do ensaio da Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Cape Cod, Falmouth, MA, EUA). A concentração de endotoxinas nas albuminas foi inferior a 50 pg/mL, abaixo do limite associado ao potencial inflamatório das albuminas AGE.

3.4.3. Determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML)

A determinação do conteúdo de carboximetil-lisina (CML) na albumina foi determinada por ensaio tipo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*, CircuLex N-epsilon Carboxymethyl Lysine ELISA Kit: Cat# CY-8066, CycLex Co, Japão), o qual foi executado de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.4. Determinação da concentração de produtos de glicação avançada (AGEs)/albumina a ser utilizada nas culturas de fibroblastos

Três concentrações de AGE (1 mg, 2 mg e 5 mg) foram testadas. Em placas de 24 poços (área de 1,96 cm²/poço), foram semeados fibroblastos humanos normais, em 1 mL de meio de cultura D10, aproximadamente 1 x 10⁴/poço (0,5 x 10⁴/cm²) recém-tripsinizados. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ por 18 horas, para que houvesse adesão das células à superfície de cada poço. Fibroblastos foram expostos às três concentrações de AGE (1 mg, 2 mg, 5 mg), diluídas em meio de cultura, e à albumina nas mesmas concentrações (1 mg, 2 mg e 5 mg), como controle do experimento. Fibroblastos foram, também, semeados em meio de cultura sem qualquer adição (branco) para controle do método.

Nos momentos 24, 48, 72, 96 e 168 horas após a incubação das células com diferentes meios de cultura, os meios foram removidos e os poços, lavados com PBS. As células foram tripsinizadas, amostras foram colhidas, coradas com corante transmembrana azul de Trypan e células vivas e mortas foram contadas em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.5. Avaliação do efeito modulador do eluato de cultura de células-tronco na migração de fibroblastos

Em placas de seis poços, foram incubados fibroblastos a 2×10^5 por poço, em triplicata, oriundos de pele normal ou de leito de feridas de indivíduos diabéticos, e mantidos até atingir confluência, nutridos por 1 mL de meio de cultura D10, incubados em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Quando as culturas apresentavam aspecto de confluência, uma ponteira com orifício largo foi usada para criar um sulco retilíneo nas culturas.

As culturas celulares foram divididas em três grupos, a saber:

- Grupo Controle: 2 mL de meio de cultura (D10) sem nenhuma complementação;
- Grupo AGE: 2 mL de meio de cultura (D10) acrescido de albumina glicada a 2%;
- Grupo AGE mais Eluato: 2 mL de meio de cultura (D10) que esteve previamente em contato com ADSCs por 24 horas (eluato), acrescido de albumina glicada a 2%.

Fotografias da área sulcada foram tiradas a cada 24 h em microscópio de contraste de fase. Para avaliação do fechamento do sulco, quatro pontos selecionados randomicamente foram marcados, e a proliferação celular foi acompanhada até o fechamento completo dos sulcos no grupo controle. Nesse momento, o experimento foi encerrado.

4. RESULTADOS

4.1. Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)

4.1.1. Cultivo, amplificação, congelamento e descongelamento

Cinco amostras de lipoaspirado foram coletadas e transportadas até o laboratório. Foi realizada a extração e o isolamento de ADSCs. A **Tabela 1** mostra o número de células obtidas de cada paciente antes do congelamento.

Tabela 1. Número de células obtidas de cada paciente em P0 e em P3 (antes do congelamento), média e desvio-padrão (DP)

	P0	P3
Paciente 1	$0,9 \times 10^6$	6×10^6
Paciente 2	$0,7 \times 10^6$	6×10^6
Paciente 3	$0,5 \times 10^6$	4×10^6
Paciente 4	$0,5 \times 10^6$	5×10^6
Paciente 5	$0,4 \times 10^6$	3×10^6
Média $\pm$ DP	$0,6 \times 10^6 \pm 0,30 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6 \pm 2,28 \times 10^6$

4.1.2. Caracterização das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) por citometria de fluxo

Nas amostras testadas, observamos negatividade de expressão para CD34 e CD49d ($80,47\% \pm 1,54\%$) e positividade para CD73 e CD90 ($88,78\% \pm 10,42\%$). Os gráficos obtidos estão expostos na **Figura 4**.

Figura 4. Resultados da citometria de fluxo das cinco amostras. Quadrante superior esquerdo (UL): células que ativaram o canal de leitura FL2-H, o qual capta fluorescência do fluoróforo FITC dos marcadores para CD49d e CD90. Quadrante inferior direito (LR): células que ativaram o canal de leitura FL1-H, o qual capta fluorescência do fluoróforo PE dos marcadores para CD34 e CD73. Quadrante superior direito (UR): células que ativaram tanto o canal de leitura FL2-H quanto o FL1-H, padrão compatível para expressão positiva de CD73 e CD90. Quadrante inferior esquerdo (LL): células que não ativaram o canal de leitura FL2-H nem o FL1-H, padrão compatível para expressão negativa de CD34 e CD49d.

4.1.3. Expressão de lisozima e colágenos I, II e III pelas células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC)

A incorporação de anticorpos específicos para colágeno humano I, II, III e lisozima mostrou a capacidade das ADSCs de sintetizarem essas proteínas (**Figura 5**).

Figura 5. Registros fotográficos das imunofluorências para lisozima e colágenos I, II e III, e do controle com tampão fosfato (aumento de 400 x).

Pela incubação com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, *dihydrochloride*), pôde-se visualizar a quantidade total de células no campo observado e, assim, comparar com o número de células observado nas marcações com anticorpos (**Figura 6**).

Figura 6. Imunofluorescência para colágeno I, à direita, e marcação do mesmo campo com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, *dihydrochloride*), à esquerda (aumento de 400 x).

A quantificação da expressão em porcentagem de área celular está exposta nos dados da **Tabela 2**.

Tabela 2. Porcentagens de área celular com expressão positiva para lisozima e colágenos I, II e III, média e desvio-padrão (DP)

	Colágeno I	Colágeno II	Colágeno III	Lisozima
Paciente 1	39,35%	30,39%	20,47%	41,95%
Paciente 2	50,39%	11,99%	27,92%	22,34%
Paciente 3	43,87%	14,55%	20,27%	39,82%
Paciente 4	44,12%	39,74%	21,22%	51,12%
Paciente 5	33,49%	50,90%	23,31%	50,12%
Média ± DP	42,24% ± 6,27%	29,51% ± 16,53%	22,24% ± 3,19%	41,07% ± 11,57%

4.1.4. Preparo do precipitado celular

Confirmamos a expressão de lisozima na imunofluorescência no precipitado celular, como se pode verificar na **Figura 7**.

Figura 7. Imunofluorescência para lisozima no precipitado celular, mostrando sua expressão (aumento de 400 x).

4.2. Obtenção e cultivo de fibroblastos oriundos de feridas de membros inferiores em indivíduos diabéticos e controle

A partir de biópsias de tecido de granulação de feridas em membros inferiores de indivíduos diabéticos, foram realizados a extração e o cultivo de

fibroblastos presentes nesse material (**Figura 8**). Esses fibroblastos foram mantidos em meio normoglicêmico para seu desenvolvimento e proliferação. À microscopia ótica, notou-se diferença morfológica entre as células oriundas de pacientes diabéticos e de pacientes não diabéticos. Os primeiros apresentavam vacúolos citoplasmáticos, membranas irregulares e dimensões aumentadas.

Figura 8. Cultura de fibroblastos provenientes de tecido de granulação de leito de ferida em membro inferior de indivíduo diabético, visto em microscópio invertido (microscopia ótica, 100 x).

4.3. Preparo dos meios de cultura contendo produtos finais de glicação avançada (AGE)

4.3.1. Dosagem de endotoxinas

A concentração de endotoxinas nas albuminas foi inferior a 50 pg/mL, abaixo do limite associado ao potencial inflamatório das albuminas produtos finais de glicação avançada (AGE).

4.3.2. Determinação da concentração de produtos finais de glicação avançada (AGE)/albumina a ser utilizada nas culturas de fibroblastos

Fibroblastos dérmicos normais expostos a 1 mg de AGE apresentaram proliferação semelhante ao branco; a exposição a 2 mg de AGE mostrou proliferação celular, apesar de maior índice de morte (**Figura 9**). Nas células expostas a 5 mg de AGE, foi notada alta taxa de mortalidade celular, além de cristalização da matriz extracelular (**Figura 10**).

Figura 9. Curva de proliferação de fibroblastos dérmicos normais expostos a três diferentes concentrações de produtos finais de glicação avançada (AGE; a 1, 2 e 5 mg) e três diferentes concentrações de albumina (1, 2 e 5 mg). Em A, observa-se a proliferação e mortalidade celular sem qualquer interferência; em B, nota-se proliferação celular em meio de cultura suplementado com 1 mg de AGE; em C, observa-se o comportamento celular quando da adição de 1 mg de albumina. Em D e E, nota-se o comportamento celular quando da exposição a 2 mg AGE (D) e 2 mg de albumina (E), observa-se que, apesar da taxa de mortalidade ser maior, existe proliferação celular. Em F e G, a exposição foi, respectivamente, de 5 mg AGE e 5 mg albumina, nota-se que, nessas situações, a morte celular excede a taxa de proliferação.

Figura 10. Fibroblastos dérmicos normais cultivados em meio acrescido de 5 mg/mL produtos finais de glicação avançada (AGE); nota-se cristalização da matriz extracelular e presença de células mortas na cultura. Microscopia ótica, 100 x.

A partir dos resultados obtidos nesse ensaio, determinamos a concentração de 2 mg de AGE para realização dos experimentos de migração celular.

4.4. Avaliação do efeito modulador do eluato de cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) na migração de fibroblastos

Nas culturas com fibroblastos normais, o grupo controle apresentou fechamento da área sulcada após 120 horas; o grupo AGE não teve fechamento da área sulcada e observamos células mortas neste grupo; o grupo AGE mais eluato teve fechamento da área sulcada em 120 horas, à semelhança do grupo controle (**Figura 11**).

Nas culturas com fibroblastos de pacientes diabéticos, o grupo controle apresentou fechamento da área sulcada após 120 horas; o grupo AGE não teve fechamento da área sulcada e observamos células mortas neste grupo; o grupo AGE mais eluato apresentou repovoamento da área sulcada, no entanto, as células não chegaram a confluência após 120 horas, como no grupo controle (**Figura 12**).

Figura 11. Cultura de fibroblastos dérmicos normais. Na coluna controle (CO), não houve complementação do meio de cultura; na coluna AGE, o meio de cultura recebeu suplementação de albuna bovina gicada (AGE) 2 mg/mL; na coluna AGE + eluato, foi acrescido meio de cultura proveniente das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). Com a ponta de uma pipeta, foram criadas áreas sem células nos poços de cultivo e foi observado o tempo necessário para que os fibroblastos proliferassem e migrassem ocupando a área vazia criada. Microscopia ótica de luz invertida, 100 x.

Figura 12. Cultura de fibroblastos provenientes de úlceras em pacientes diabéticos. Na coluna controle (CO), não houve complementação do meio de cultura; na coluna AGE, o meio de cultura recebeu suplementação de albuna bovina gicada (AGE) 2 mg/mL; na coluna AGE + eluato, foi acrescido meio de cultura proveniente das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC). Na cultura exposta à AGE, após 96 horas, são observados debrís, provavelmente decorrentes de cristalização da matriz extracelular. Microscopia ótica de luz invertida, 100 x.

5. DISCUSSÃO

As células-tronco de origem mesenquimal foram inicialmente descritas no tecido de medula óssea, sendo os primeiros relatos da década de 1970. Friedenstein et al. descreveram células que aderiam à garrafa de cultura, alongadas, com aparência de fibroblastos, no entanto essas células se diferenciavam em osteoblastos. Mais tarde, nas décadas de 1980 e 1990, novos estudos demonstraram que as células identificadas anteriormente por Friedenstein et al. tinham a capacidade de se diferenciar em adipócitos e condrócitos.^{34,35}

Durante a década de 2000, Zuk et al. descreveram células semelhantes às células-tronco derivadas de medula óssea, isoladas no produto de lipoaspiração. Apesar de semelhantes, essas células não eram idênticas às células-tronco de medula óssea e apresentavam alguns marcadores (CDs) diferentes entre si. Com base nessas informações, os autores concluíram que existiam células-tronco no tecido adiposo, distintas das células-tronco encontradas na medula óssea. Outros estudos demonstraram expressões gênicas diferentes entre essas células.³⁶⁻³⁸

No presente estudo, optamos pelo uso de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) devido à facilidade de sua captação (número elevado de lipoaspirações realizadas diariamente) e por evidências de melhor rendimento da cultura celular comparada às células-tronco derivadas de medula óssea (BMSCs).³⁶

Diversos protocolos para isolamento das ADSCs foram descritos desde a descrição inicial dessas células em 2001. Em 2011, Fadel et al. compararam quatro protocolos para obtenção e isolamento de ADSCs a

partir de tecido adiposo perirrenal de ovelha, envolvendo lavagem com solução tampão fosfatada (PBS) e dissociação química com collagenase a 0,5%. No primeiro protocolo, o tecido foi incubado por 90 minutos a 37 °C e 5% de CO₂; no segundo, o tempo de incubação foi de 45 minutos; no terceiro, a collagenase foi substituída por tripsina e incubada por 45 minutos; o quarto protocolo foi semelhante ao primeiro, porém foram adicionados fragmentos de tecido adiposo. O primeiro protocolo resultou em culturas viáveis de ADSCs; o segundo apresentou células esféricas, mortas ou claramente diferenciadas após 10 dias de cultura; o uso de tripsina, no terceiro protocolo, não permitiu que as células aderissem à garrafa de cultura e resultou em culturas inviáveis após 10 dias; no quarto protocolo, foram obtidas células ADSCs viáveis, no entanto, houve contaminação fúngica após 15 dias. A partir desses dados, podemos inferir que a tripsina não deve ser utilizada, favorecendo o uso da collagenase para extrair ADSCs. O protocolo de obtenção eleito em nosso laboratório considera o uso de collagenase IA com tempo de incubação de 45 minutos, semelhante ao segundo protocolo de Fadel et al. no entanto, obtivemos satisfatoriamente células viáveis em todas as culturas. Zuk et al. utilizam collagenase IA com tempo de incubação de 30 minutos. Essas diferenças nos protocolos e resultados podem ser devidas ao tipo de collagenase utilizada pelos diversos autores. A collagenase IA é uma “collagenase bruta”, a qual, por conter diversas outras enzimas além da collagenase, está entre as mais efetivas para digestões teciduais. Deste modo, talvez não haja necessidade dos 90 minutos de dissociação química.^{38,39}

Nosso método de extração, isolamento e cultura das ADSCs foi desenvolvido a partir do primeiro estudo a cultivar esse tipo celular. Algumas diferenças entre o protocolo padronizado em nosso laboratório diferem da descrição original por Zuk et al. O tempo de incubação com colagenase em nosso laboratório é de 45 minutos, comparado aos 30 minutos pelos autores, como já descrito anteriormente. Em nosso laboratório, não fazemos a lise de eritrócitos como os autores iniciais, pois essas células não aderem à garrafa de cultura e são retiradas durante as trocas de meio de cultura subsequentes; assim, consideramos esse passo desnecessário. Podemos afirmar que houve uma reprodução bem-sucedida dos experimentos e padronizamos o cultivo de ADSCs na rotina de nosso laboratório.³⁷

Visando unificar a nomenclatura e a identificação das células-tronco mesenquimais, formou-se um grupo intitulado International Society for Cellular Therapy (ISCT), que, em 2006, definiu critérios mínimos que células-tronco devem preencher. Esses critérios são: aderência à garrafa de cultura; expressão de certos marcadores de superfície (CD73+, CD90+, CD105+ e CD34-, CD45-, CD14- or CD11b-, CD79α- or CD19- and HLA-DR-); diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos quando cultivados em meio específico de diferenciação. As ADSCs utilizadas neste estudo apresentaram aderência à garrafa de cultura e o seguinte perfil de marcadores de superfície: negatividade de expressão para CD34 e CD49d ($80.47\% \pm 1.54\%$) e positividade para CD73 e CD90 ($88,78\% \pm 10,42\%$), confirmando que nossa amostra era composta por ADSCs e, portanto, validando nosso método de extração e cultivo. Em relação à diferenciação *in*

vitro em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, estudos anteriores de nosso grupo¹ já evidenciaram essa capacidade de diferenciação das ADSCs cultivadas em nosso laboratório.⁴⁰⁻⁴⁵

O congelamento de ADSCs, por sua vez, é uma técnica bastante debatida na literatura, principalmente com a difusão de seu uso clínico na cirurgia plástica. Em nosso estudo, utilizamos um meio de congelamento composto por 60% de DMEM, 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 30% de soro bovino fetal (SBF) em um recipiente com álcool isopropílico. Esse modelo permite o resfriamento em aproximadamente um grau por minuto até -80 °C. A porcentagem de 10% de DMSO é a mais relevante na composição desse meio, dado que esse crioprotetor é citotóxico à temperatura ambiente. Por isso, apesar de essa porcentagem ser a padrão no congelamento de ADSCs, há uma tendência de diminuição e substituição parcial por trealose, um agente crioprotetor sem toxicidade relevante. Seguindo a tendência de retirada de produtos de origem animal das culturas celulares, alguns trabalhos têm usado menores quantidades de SBF ou ausência deste produto no meio de congelação. Optamos por utilizar o meio descrito acima, por ser um meio consagrado para congelamento de células, padronizado em nosso laboratório e, uma vez que neste trabalho não haveria experimentos clínicos com pacientes, o uso de materiais de origem animal não seria um problema.⁴⁶⁻⁴⁹

A expressão de colágenos I e III pelas ADSCs já foi descrita anteriormente. Kim et al. em um estudo de co-cultura presencial e não

¹ Tutihasi RMC. Obtenção e caracterização de células mesenquimais indiferenciadas obtidas a partir de lipoaspiração. Trabalho apresentado no 47^o Congresso Brasileiro de Cirurgia Plástica, realizado entre 11 e 15 de novembro de 2010 em Vitória (ES). Primeiro lugar no Prêmio Roberto Correa Chem de 2010.

presencial de ADSCs com fibroblastos, observaram a produção de diversos fatores de crescimento (derivado de plaquetas, PDGF, de fibroblasto, FGF, de queratinócito, KGF, e transformador de crescimento beta, TGF- β), fibronectina e colágenos I e III pelas ADSCs e demonstraram, com os ensaios de cultura, que as ADSCs não só produzem esses produtos da matriz extracelular (ECM), como também regulam positivamente a expressão de mRNA de fibronectina e colágenos I e III dos fibroblastos e diminuem a expressão de mRNA de MMP-1 nessas células.^{40,50}

Collazo et al., em 2011, demonstraram a expressão de colágenos I e III pelas ADSCs e mostraram que essas células são mais eficientes que as BMSCs para realizar ligação cruzada de colágenos e elastina. Os autores não identificaram a produção de colágeno II pelas ADSCs.⁵¹

O colágeno II é específico de cartilagens, sintetizado por condrócitos. As ADSCs, quando diferenciadas em condrócitos, começam a sintetizar essa proteína, entretanto, não a sintetizam quando são indiferenciadas.^{51,52}

As ADSCs cultivadas neste estudo apresentaram expressão positiva para os colágenos I, II e III por meio de imunofluorescência em lamínula. A expressão de colágenos I e III pelas ADSCs está bem estabelecida, como exposto acima. Desta maneira, nossos dados estão de acordo com a literatura, pois as células cultivadas neste estudo expressaram essas proteínas. No entanto, nossas células também expressaram colágeno tipo II; este dado nos faz acreditar que nossas células já apresentavam algum grau de diferenciação, apesar de não haver produtos que estimulam a diferenciação de ADSCs em condrócitos no meio de cultura utilizado. É

possível que, devido à expansão das células em cultura (utilizamos as ADSCs em P3), tenha ocorrido um certo grau de diferenciação.⁵¹

Lisozima é uma proteína com propriedades antibacterianas e, mais recentemente, foi descrita sua capacidade de se ligar com alta afinidade, de maneira não covalente, aos AGEs, inativando-os. Silva et al. publicaram, em 2003, o perfil de genes de BMSCs. Nesse estudo, os autores descrevem que a lisozima é um dos genes mais expressos tanto por BMSC quanto células-tronco hematopoiéticas (HSC, células CD34+). Até o presente momento, essa proteína não havia sido demonstrada em culturas de ADSC, no entanto, era possível inferir que as ADSCs também sintetizassem a proteína por compartilharem grande semelhança com as BMSCs. Em nosso estudo, identificamos lisozima nas culturas de ADSCs utilizando dois experimentos de imunofluorescência, na lamínula e no precipitado celular. Esta última forma de análise nos permite verificar com mais precisão a expressão, pois observamos um número maior de células com menos espaço entre elas. Adicionalmente, como elas estão com uma área celular menor, somente visualizamos a fluorescência se ela é realmente relevante. Esses dois experimentos nos permitem afirmar que as ADSCs são fontes produtoras de lisozima.^{26,53}

Alguns estudos experimentais, utilizando modelo animal de camundongo diabético (db+/db+), demonstraram que as ADSCs melhoram a cicatrização de diabéticos. Nambu et al. demonstraram que as ADSCs melhoraram a formação de tecido de granulação, epitelização e vascularização em feridas de espessura total nesse modelo animal. Os autores acreditam que essa melhora no processo de cicatrização se deve à melhora da função de

macrófagos, uma vez que essas células estão deficientes em diabéticos. Outro mecanismo proposto pelos autores é de ação parácrina por meio de citocinas angiogênicas como FGF, PDGF, fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Maharlooei et al. também verificaram melhora da cicatrização de feridas em camundongos com diabetes induzido por meio de estreptozocina, quando injetavam ADSCs intradérmica ao redor da feridas, *versus* controle com injeção de PBS. Biópsias das feridas já cicatrizadas não evidenciaram diferença significativa na densidade de colágenos e vasos sanguíneos entre os dois grupos; desta maneira, os autores inferem que as ADSCs melhoram a cicatrização por outro mecanismo que não a angiogênese.^{54,55}

O ambiente hiperglicêmico do diabético causa alterações fenotípicas nos fibroblastos, conforme demonstrou Hosaka em 2010. A autora utilizou técnica de *microarray* para estabelecer as diferenças entre fibroblastos de pacientes não diabéticos e diabéticos. Inicialmente, foram observadas diferenças morfológicas entre essas células, as provenientes de diabéticos tinham “aspecto senescente compatível com fibroblastos envelhecidos, evidenciando alargamento de suas dimensões, irregularidade de membranas e presença de vacúolos citoplasmáticos”. A análise de expressão gênica pelo *microarray* sugeriu que essas células têm “forte indução à senescência e apoptose celular, bem como déficit na síntese e contração de fibras colágenas”. Alikhani et al. demonstraram que AGEs estimulam apoptose de fibroblastos, sendo o fenômeno mediado por ativação de RAGE. Os autores

acreditam que o aumento da apoptose dos fibroblastos é o principal responsável pelo déficit de cicatrização dos diabéticos.^{56,57}

A cicatrização deficitária dos diabéticos é multifatorial e, além do aumento da apoptose dos fibroblastos, ocorre demora para a chegada de células inflamatórias no local da ferida, levando a persistência de inflamação crônica, o que, em última instância, causa menor depósito de ECM, menor remodelação e não fechamento da ferida. A interação entre AGE e RAGE nas células inflamatórias da ferida causa aumento de níveis de TNF- α e MMPs. Nos fibroblastos, esta interação causa menor depósito de colágenos. Neste contexto, Goova et al. estudaram a função de RAGE em feridas de ratos diabéticos (db+/db+). Ao bloquear RAGE, os autores observaram resultado semelhante aos de Nambu et al. com formação de tecido de granulação mais espesso e aumento de PDGF e VEGF quando comparado ao grupo controle. A partir desses resultados, os autores situam os RAGEs e sua interação com AGEs no centro do processo que altera o equilíbrio da cicatrização no diabético. Com base nestes achados, os autores concluem que o bloqueio dos RAGEs causa uma melhora global na cicatrização do diabético por meio da restauração do equilíbrio desse processo.^{8,58}

Em nosso trabalho, utilizamos o ensaio de migração de fibroblastos, experimento amplamente utilizado como um modelo *in vitro* de cicatrização. Quando colocamos fibroblastos de pacientes diabéticos em ambiente normal, não hiperglicêmico, observamos que proliferaram de maneira igual aos fibroblastos de pele normal, e observamos fechamento da área sulcada igual ao controle com fibroblastos normais. A partir desse achado, podemos

inferir que o fibroblasto do diabético é anérgico quando está em ambiente hiperglicêmico contendo AGEs e, quando o colocamos em um ambiente fisiológico, ele volta a se comportar como um fibroblasto normal.⁴⁰

Por outro lado, quando adicionamos AGE ao meio de cultura (tanto nos fibroblastos de diabéticos, quanto de não diabéticos), ocorre diminuição da migração de fibroblastos e aumento de células mortas em ambos os grupos. Isso está de acordo com os achados de outros autores, discutidos anteriormente, que demonstram aumento da apoptose do fibroblasto do paciente diabético. Podemos deduzir, com este ensaio, que AGE induz a apoptose de fibroblastos e diminui a proliferação celular, sendo esses dois fatores os principais responsáveis pela pior cicatrização do diabético. Concluímos que, neste trabalho, pudemos simular a ferida anérgica do diabético com sucesso, não apenas utilizando fibroblastos de pacientes diabéticos, como fibroblastos de pacientes não diabéticos, e acreditamos que os eventos observados no paciente diabético são devidos principalmente à alta concentração de AGEs e não apenas à hiperglicemia e alterações genéticas nessas células.

Na última parte do ensaio de migração de fibroblastos, adicionamos, a essas células, meio de cultura contendo AGE e meio de cultura que esteve em contato com ADSCs por 24 horas (eluato) contendo AGE. Observamos que, com a adição do eluato de ADSCs, as células voltaram a proliferar de maneira fisiológica e apresentaram o fechamento da área sulcada semelhante ao controle, tanto nos fibroblastos de pacientes não diabéticos como nos de

diabéticos. Com esses achados, podemos inferir que as ADSCs interferem diretamente na cicatrização, promovendo melhora desse processo.

Não conhecemos todos os mecanismos pelos quais as ADSCs melhoram a cicatrização; acreditamos que essas células sintetizam produtos que interferem nas ações dos AGEs e na interação AGE-RAGE. Possivelmente a lisozima, por ser um dos principais anti-AGEs, quelando esses produtos, e o fato de essas células produzirem lisozima, conforme demonstrado neste trabalho, sejam os principais fatores de melhora em nosso modelo de cicatrização *in vitro*.

Neste trabalho, demonstramos que não é necessária a presença das ADSCs para que ocorra melhora da cicatrização de fibroblastos de pacientes diabéticos e não diabéticos. Este achado está de acordo com a literatura, conforme trabalho publicado por Kim et al. Acreditamos que apenas os produtos sintetizados pelas ADSCs sejam necessários para que ocorra melhora da cicatrização e diminuição dos efeitos deletérios dos AGEs nos fibroblastos.⁴⁰

6. CONCLUSÃO

Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) são capazes de sintetizar lisozima e colágenos I, II e III.

Fibroblastos de pacientes diabéticos e não diabéticos, cultivados com meio de cultura contendo produtos finais de glicação avançada (AGEs), retornam a uma resposta fisiológica quando é adicionado o produto sintetizado pelas ADSCs a essas culturas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.
2. Isaac C, Ladeira PRS, Rêgo FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica [Physiological wound healing]. Rev Med (São Paulo). 2010;89(3/4):125-31.
3. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clin Dermatol. 2007;25(1): 9-18.
4. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound Repair Regen. 2008;16(5):585-601.
5. Noor S, Zubair M, Ahmad J. Diabetic foot ulcer-A review on pathophysiology, classification and microbial etiology. Diabetes Metab Syndr. 2015;pii. S1871-4021(15)00035-1.
6. Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report, 2014. Estimates of diabetes and its burden in the United States, 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov/diabetes/pdfs/data/2014-report-estimates-of-diabetes-and-its-burden-in-the-united-states.pdf>. Acessado em 2015 (13 jul).

7. Gomes MB, Gianella D, Faria M, Tambascia M, Fonseca RM, Réa R, et al. Prevalence of Type 2 diabetic patients within the targets of care guidelines in daily clinical practice: a multi-center study in Brazil. *Rev Diabet Stud.* 2006;3(2):82-7.
8. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;67(1):3-21.
9. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1219-22.
10. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *JAMA.* 2005;293(2):217-28.
11. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care.* 2005;28(2):461-71.
12. Ladeira PRS, Isaac C, Paggiaro AO, Hosaka EM, Ferreira MC. Úlceras nos membros inferiores de pacientes diabéticos: mecanismos moleculares e celulares [Lower limb ulcers in diabetic patients: molecular and cellular mechanisms]. *Rev Med (São Paulo).* 2011;90(3):122-27.

13. Sweitzer SM, Fann SA, Borg TK, Baynes JW, Yost MJ. What is the future of diabetic wound care? *Diabetes Educ.* 2006;32(2):197-210.
14. Rafehi H, El-Osta A, Karagiannis TC. Genetic and epigenetic events in diabetic wound healing. *Int Wound J.* 2011;8(1):12-21.
15. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia.* 2011;44(2):129-46.
16. Niu Y, Xie T, Ge K, Lin Y, Lu S. Effects of extracellular matrix glycosylation on proliferation and apoptosis of human dermal fibroblasts via the receptor for advanced glycosylated end products. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(4):344-51.
17. Zheng F, Cai W, Mitsuhashi T, Vlassara H. Lysozyme enhances renal excretion of advanced glycation endproducts in vivo and suppresses adverse age-mediated cellular effects in vitro: a potential AGE sequestration therapy for diabetic nephropathy? *Mol Med.* 2001;7(11):737-47.
18. Niyonsaba F, Ogawa H. Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme. *J Dermatol Sci.* 2005;40(3):157-68.

19. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
20. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais (revisão) [Biological characteristics of mesenchymal stem cells: (review)]. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2009;31(supl. 1):25-35.
21. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008;45(2):115-20.
22. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010;126(4):1163-71.
23. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
24. Hassan HT, El-Sheemy M. Adult bone-marrow stem cells and their potential in medicine. *J R Soc Med*. 2004;97(10):465-71.

25. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(13):8932-7.
26. Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):661-9.
27. Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torii S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation*. 2005;73(2-3):69-78.
28. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 2003;70(4):300-6.
29. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(10):845-53.

30. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87(1):125-8.
31. Kim WS, Park BS, Kim HK, Park JS, Kim KJ, Choi JS, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *J Dermatol Sci*. 2008;49(2):133-42.
32. Bullock AJ, Higham MC, MacNeil S. Use of human fibroblasts in the development of a xenobiotic-free culture and delivery system for human keratinocytes. *Tissue Eng*. 2006;12(2):245-55.
33. Waterborg JH, Matthews HR. The lowry method for protein quantitation. *Methods Mol Biol*. 1984;1:1-3.
34. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.
35. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045-56.

36. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005;33(11):1402-16.
37. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
38. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
39. Fadel L, Viana BR, Feitosa MLT, Ercolin ACM, Roballo KCS, Casals JB, et al. Protocolos para obtenção e isolamento de células tronco mesenquimais de duas fontes em ovinos [Protocols for obtainment and isolation of two mesenchymal stem cell sources in sheep]. *Acta Cir Bras*. 2011;26(4):267-73.
40. Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2007;48(1):15-24.

41. van der Veen VC, Vlig M, van Milligen FJ, de Vries SI, Middelkoop E, Ulrich MM. Stem cells in burn eschar. *Cell Transplant*. 2012;21(5):933-42.
42. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
43. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem*. 2004;14(4-6):311-24.
44. Cho JW, Kang MC, Lee KS. TGF- β 1-treated ADSCs-CM promotes expression of type I collagen and MMP-1, migration of human skin fibroblasts, and wound healing in vitro and in vivo. *Int J Mol Med*. 2010;26(6):901-6.
45. Kim WS, Park BS, Sung JH. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(7):879-87.
46. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(4):513-22.

47. De Rosa A, De Francesco F, Tirino V, Ferraro GA, Desiderio V, Paino F, et al. A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009;15(4):659-67.
48. Rodrigues JP, Paraguassú-Braga FH, Carvalho L, Abdelhay E, Bouzas LF, Porto LC. et al. Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cryobiology*. 2008;56(2):144-51.
49. Hino A, Mihara K, Nakashima K, Takano H. Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(5):1386-91.
50. van den Bogaerdt AJ, van der Veen VC, van Zuijlen PP, Reijnen L, Verkerk M, Bank RA, et al. Collagen cross-linking by adipose-derived mesenchymal stromal cells and scar-derived mesenchymal cells: Are mesenchymal stromal cells involved in scar formation? *Wound Repair Regen*. 2009;17(4):548-58.
51. Colazzo F, Sarathchandra P, Smolenski RT, Chester AH, Tseng YT, Czernuszka JT, et al. Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: implications for heart valve tissue engineering. *Biomaterials*. 2011;32(1):119-27.

52. Luo S, Shi Q, Zha Z, Yao P, Lin H, Liu N, et al. Morphology and mechanics of chondroid cells from human adipose-derived Stem cells detected by atomic force microscopy. *Mol Cell Biochem.* 2012;365(1-2):223-31.
53. Li YM, Tan AX, Vlassara H. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nat Med.* 1995;1(10):1057-61.
54. Maharlooei MK, Bagheri M, Solhjoui Z, Jahromi BM, Akrami M, Rohani L, et al. Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(2):228-34.
55. Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, et al. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. *Ann Plast Surg.* 2009;62(3):317-21.
56. Hosaka EM. Comparação de modificações nos comportamentos celular e gênico de fibroblastos derivados de úlcera de membro inferior em indivíduos diabéticos e de pele normal [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2010.

57. Alikhani Z, Alikhani M, Boyd CM, Nagao K, Trackman PC, Graves DT. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*. 2005;280(13):12087-95.
58. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol*. 2001;159(2):513-25.