FABRÍCIO CARVALHO TORRES

Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie
Oryctolagus cuniculus como fonte de células-tronco

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientadora: Profa. Dra. Consuelo Junqueira
Rodrigues

São Paulo

2009

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Paulo**, pelo caráter, amor e dedicação a mim e à minha mãe.

Ao meu tio **Juarez**, um segundo pai, sempre ao meu lado.

À minha tia **Maria** por ter me dado meus amigos e irmãos **Ciro** e **Vitor** e minha querida prima **Lara**.

Meus tios **Vera** e **José Gaspar**, exemplos a serem seguidos de dedicação a vida médica e a docência.

E, à minha amada mãe **Heloisa**, por tudo que eu sou.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Consuelo Junqueira Rodrigues**, pelo constante apoio e oportunidade de desenvolver esse trabalho.

Ao Prof. Dr. **Marcus Castro Ferreira**, pela confiança em mim e nas minhas idéias.

Ao Dr. **Ithamar Nogueira Stocchero**, mais do que um amigo, um mentor, obrigado por ter aberto uma centena de portas.

Ao Prof. Dr. **Durvanei Augusto Maria** por suas valiosas explicações e pela contribuição nos estudos celulares.

À Profa. Dra. **Lilian Piñero Eça**, pelo incentivo e por mostra-me a importância de nossas pesquisas.

Alexandre Queiroz Silva, sua disponibilidade e vontade em ajudar foram fundamentais para o êxito desse estudo.

Aos meus tios, Prof. Dr. **José Carvalhido Gaspar** e Profa. Dra. **Vera Lúcia Venâncio Gaspar**, pelas inúmeras horas dedicadas à finalização desse trabalho.

À minha Tia, Profa. **Maria Rinaldi Carvalho Venâncio**, pela adequação dessa tese às normas ortográficas e gramaticais.

Aos Profs. Drs. **Raul José Mauad Júnior** e **Robert Jan Bloch**, pelo apoio e incentivo ao meio acadêmico.

Aos funcionários do laboratório de microcirurgia da disciplina de cirurgia plástica, **Edna** sempre solícita e prestativa, **Maria** e **Ronaldo** pela dedicação e cuidados com os coelhos, sem vocês ficaria difícil conduzir meus estudos.

Shirley, Maria das Graças, Leide e **Eliane**, sempre contribuindo para o bom andamento desse trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) que concedeu bolsa para esse trabalho.

“O verdadeiro valor das coisas
é o esforço e o problema de
as adquirir”.

Adam Smith

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals 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 Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Lista de abreviaturas.....	
Lista de símbolos.....	
Lista de tabelas.....	
Lista de gráficos.....	
Lista de figuras	
Resumo.....	
Summary.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1. Célula	3
2.2. Célula-tronco.....	4
2.3. Célula-tronco embrionária versus adulta.....	7
2.4. Célula-tronco adulta.....	9
2.4.1. Mesenquimal versus hematopoiética.....	9
2.5. Diferenciação das células-tronco.....	12
2.6. Perspectivas da utilização clínica de células-tronco.....	12
3. OBJETIVO.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1. Animais.....	16
4.1.1. Estudo anatômico da bolsa adiposa interescapular.....	16
4.2. Lipoaspiração como meio para aquisição de células-tronco.....	18
4.2.1. Anestesia.....	18
4.2.2. Preparo do animal.....	19
4.3. Lipoaspiração	19
4.3.1. Sutura.....	20
4.3.2. Curativo.....	21
4.3.3. Eutanásia.....	21
4.4. Isolamento e expansão celular.....	21
4.5. Análise da expansão celular.....	26
4.6. Caracterização das células-tronco do tecido adiposo de coelhos por citometria de fluxo.....	27
4.7. Análise das fases do ciclo celular de células-tronco provenientes do tecido adiposo de coelhos.....	29
4.8. Análise estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31

5.1. Células-tronco adultas.....	35
5.2. Avaliação da expansão celular.....	36
5.3. Ciclo celular.....	38
5.4. Expressão dos marcadores de superfície.....	39
6. DISCUSSÃO.....	45
6.1. Célula-tronco adulta versus embrionária.....	45
6.2. Fonte de células-tronco adultas: hematopoiética versus mesenquimal.	49
6.3. Nomenclatura.....	52
6.4. Células-tronco do tecido adiposo	52
6.4.1. Facilidade de obtenção: lipoaspiração ou lipectomia.....	52
6.4.2. Baixa morbidade na extração.....	53
6.4.3. Grande volume de tecido doador.....	54
6.4.4. Rendimento elevado.....	55
6.5. Caracterização das células-tronco.....	57
6.6. Plasticidade efetiva.....	58
6.7. Linhas de pesquisa	59
7. CONCLUSÕES.....	62
8. ANEXOS.....	63
9. REFERÊNCIAS.....	74

Lista de abreviaturas

ASAPS	American Society for Aesthetic Plastic Surgery
BD	Becton-Dickinson
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CPH	Complexo principal de histocompatibilidade
CT	Célula-tronco
CTA	Células-tronco adultas
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTMO	Células-tronco da medula óssea
CTTA	Células-tronco do tecido adiposo
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EUA	Estados Unidos da América
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
FL2	Intensidade de fluorescência 2
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FN	Fibroblasto normal
FSC	Dispersão frontal de luz
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina-eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento <i>insulin-like</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MCI	Massa celular interna
MO	Medula óssea
NZB	Nova Zelândia Branco
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
RNAse	Ribonuclease

SBCP	Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Dispersão lateral de luz
TA	Tecido adiposo
TGF	Fator transformador de crescimento
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC-F	Unidades formaoras de colônia fibroblástica
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Lista de símbolos

α	Alfa
β	Beta
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
et al.	e outros
Fig.	Figura
g	Grama
G	Gauge
g'	Força da gravidade
Kg	Quilograma
l	Litro
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimol
nm	Nanômetro
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
°C	Grau Celsius
n°	Número
®	Marca registrada
X	Veze
%	Percentagem

Lista de tabelas

Tabela 1	Tempo cirúrgico e volume de gordura retirada dos coelhos submetidos a lipoaspiração.....	32
Tabela 2	Peso corporal dos coelhos e das bolsas adiposas.....	34
Tabela 3	Fases do ciclo celular das células-tronco do tecido adiposo por citometria de fluxo.....	38
Tabela 4	Fases do ciclo celular de fibroblasto normal por citometria de fluxo.....	39
Tabela 5	Valores individuais do ciclo celular de fibroblasto normal.....	39
Tabela 6	Proporção da aquisição de fluorescência com anticorpos específicos CD 90, HLA-DR e caspase 3.....	43

Lista de gráficos

Gráfico 1	Curva de crescimento de células mesenquimais indiferenciadas de coelhos com 24 e 48 horas de incubação.....	37
Gráfico 2	Curva de crescimento de células mesenquimais indiferenciadas de coelhos com 72 e 96 horas de incubação.....	37
Gráfico 3	Histograma da morfologia das células-tronco do tecido adiposo.....	40
Gráfico 4	Controle negativo inespecífico para o fluorocromo FITC (anticorpo anti-CD3).....	41
Gráfico 5	Controle negativo inespecífico para o fluorocromo PE (anticorpo anti-CD4)	41
Gráfico 6	Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti-CD90.....	42
Gráfico 7	Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti-HLA-DR.....	42
Gráfico 8	Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti-caspase 3.....	43
Gráfico 9	Marcadores de superfície celular – células-tronco do tecido adiposo.....	44

Lista de figuras

Figura 1	Célula-tronco deverá ser capaz de originar células maduras de linhagens celulares distintas (endoderma, mesoderma e ectoderma).....	6
Figura 2	Células-tronco embrionárias são encontradas exclusivamente no estágio de blastocisto (4º ao 5º dia de desenvolvimento do embrião). Após a fase de blastocisto, no feto, no recém-nascido ou indivíduo adulto é possível a aquisição apenas de células-tronco adultas	8
Figura 3	Fotografia da dissecação e exposição da bolsa de tecido adiposo.....	17
Figura 4	Fotografia onde se evidencia: A- músculo. B- vaso sanguíneo. C- bolsa adiposa.....	18
Figura 5	Fotografia de coelho já submetido à tricotomia, anestesiado e posicionado sobre a mesa cirúrgica.....	19
Figura 6	Fotografia do procedimento de aspiração de gordura da bolsa adiposa interescapular.....	20
Figura 7	Fotografia da peça extraída do coelho e colocada em uma placa de Petri com solução tampão fosfato para ser processada em capela de segurança biológica.....	22
Figura 8	O tecido adiposo já limpo (sem excesso de tecido conjuntivo e vasos) e fragmentado para melhor aproveitamento na etapa de digestão enzimática	23
Figura 9	A - tecido adiposo antes de ser levado ao agitador magnético e da digestão enzimática	24
	B - tecido adiposo já submetido à digestão enzimática pela colagenase.....	
Figura 10	Tubo Falcon após centrifugação. A seta indica o botão celular contendo a fração estroma vascular, onde se encontram as células-tronco.....	25
Figura 11	Garrafas de cultura de células em expansão no interior da estufa.....	25
Figura 12	A- produto de lipoaspiração imediatamente após sua coleta.	31
	B- cânula de lipoaspiração com 3,5mm de diâmetro.....	
Figura 13	Projeção da bolsa de tecido adiposo, localizada ao longo da linha dorsal mediana, cerca de 3 a 5cm da inserção do crânio	33

Figuras 14 e 15	O corpo adiposo interescapular é composto por dois lóbulos (direito e esquerdo), unidos por um istmo na sua parte central.....	33
Figura 16	Fotomicrografia das células-tronco (obtidas do tecido adiposo do coelho n°3) descongeladas e cultivadas em lamínula por um dia, coradas com hematoxilina-eosina. Aumento de 100x.....	36
Figura 17	Fotomicrografia de células-tronco em lamínula no quarto dia de incubação. Células coradas com hematoxilina-eosina. Aumento de 100x, mostrando a rápida expansão e confluência celular.....	36

Resumo

Torres FC. *Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 90p.

Nos últimos anos, as células-tronco, devido a sua capacidade de originar diversos tecidos corporais e pelo poder de auto-renovação, impulsionaram os estudos de engenharia tecidual, sobretudo em medicina regenerativa. Nesse aspecto, o tecido adiposo vem se mostrando como fonte ideal para obtenção de tais células, devido à facilidade de captação, à baixa morbidade associada ao procedimento e ao elevado rendimento celular. Com o objetivo de estabelecer um modelo experimental versátil e que satisfizesse várias áreas de interesse, propôs-se o coelho *Oryctolagus cuniculus* como fonte de tecido adiposo. Esse animal apresenta bolsa adiposa interescapular com peso médio de 17,2g, o que corresponde a cerca de 6,6 g/Kg em machos adultos (peso corporal médio de 2590g). A coleta do material foi por meio de lipoaspiração a seco, com cânula de 3,5mm; levou-se em média, 11 minutos para o procedimento, obtendo-se aproximadamente 10 ml de gordura. Após o processamento pela técnica enzimática, em cada mililitro de gordura encontrou-se em média 1×10^5 células-tronco. O estudo constatou ainda que, por meio da criopreservação em nitrogênio líquido, as células mantinham suas características citométricas após períodos de congelamento que variaram de uma semana a 13 meses. As células apresentaram características de sua indiferenciação, como a expressão dos marcadores de superfície: CD90, 80,6%; HLA-DR, 2,8% e caspase 3, 10,5%. A análise do ciclo celular com 100% de confluência mostrou que 70,8% das células encontravam-se quiescentes; 22,1% apoptóticas. As células com alta capacidade replicativa, que corresponde à fase S do ciclo celular, 1,4% e 0,9% encontravam-se em replicação, mostrando que as células-tronco do tecido adiposo, em cultura, não apresentam uma proliferação descontrolada, tendendo a se estabilizar, principalmente quando atingem confluência máxima em monocamada. Todas essas vantagens fazem com que o modelo proposto possa ser facilmente reprodutível, contribuindo para o estudo das células-tronco do tecido adiposo.

Descritores: Células-tronco; Medicina regenerativa; Modelo experimental.

Summary

Torres FC. *The interscapular adipose tissue from rabbit *Oryctolagus cuniculus* as a source of stem cells* [PhD thesis]. São Paulo: Medical School, University of São Paulo; 2009. 90p.

In the latest years, the study on tissue engineering, mainly in the area of regenerative medicine, has advanced because the medical community is highly interested in stem cells. This is due to both the potential of these cells to originate any body tissue and their power of self-renewal. Adipose tissue has been used as an ideal source of such cells, due to the simplicity of their collection, high cellular yield, and low morbidity associated with the procedure. In order to establish a versatile experimental model, which could meet the needs of researchers from various areas, the rabbit *Oryctolagus cuniculus* was proposed as a source of adipose tissue. This animal has an adipose pad in the interscapular region with an average weight of 17.2g, which corresponds to about 6.6g of fat material per kilogram of an adult male animal (mean body weight = 2.6kg). The material was collected by means of a liposuction procedure. Using a 3.5-mm diameter tube, a volume of nearly 10ml of fat material was obtained in a mean time of 11min. After processing the fat tissue by enzymatic technique, about 1×10^5 stem cells were found per milliliter of fat material. Using cryopreservation of the cells by freezing them in liquid nitrogen, it was observed that the cytometric characteristics were maintained after a period of time ranging from 1 week to 13 months. The cells presented evident characteristics of undifferentiation, such as expression of the surface markers CD90, HLA-DR, and Caspase-3 (80.6, 2.8, and 10.5 %, respectively). Analysis of the cellular cycle with 100% confluence allowed us to show that 70.8% of the cells were quiescent, 22.1% were apoptotic, 1.4% had high replication capacity (phase S of the cellular cycle) and 0.9% were already in replication (phase G2/M), indicating that stem cells from adipose tissue did not show uncontrolled proliferation, tending to stabilize, mainly when they reach maximal confluence in monolayer. These advantages make this model easily reproducible, facilitating the study of adipose tissue stem cells.

Descriptors: Stem cells; Regenerative medicine; Experimental model.

1.Introdução

A partir do século XX, não mais de 100 anos atrás, a medicina começava a deixar de ter o caráter predominantemente empírico, dando passos decisivos na busca de soluções para algumas enfermidades até então consideradas incuráveis.

O conhecimento preciso da anatomia e da fisiologia humana, a descoberta de antibióticos e vacinas, o entendimento das interações bioquímicas e hormonais propiciaram grandes avanços para a área médica.

Ao mesmo tempo, o progresso resultou em intervenções anestésicas efetivas e mais seguras, técnicas cirúrgicas aprimoradas, transplantes de órgãos e uma infinidade de outros conhecimentos e recursos que concorreram para a melhor compreensão do organismo humano e sua capacidade de recuperar-se frente a situações graves.

Com isso, novas drogas e terapias de vanguarda, a cada dia, vêm nos surpreendendo e tirando o status de incurável ou modificando o prognóstico fechado de inúmeras afecções que outrora assolavam a humanidade.

A qualidade de vida e, principalmente, a longevidade do ser humano, deram um salto significativo. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a expectativa de vida do brasileiro era de 34 anos em 1910. Em 2008, já havia aumentado mais de 100%, chegando a 72,7 anos. E, para os próximos anos, espera-se um aumento ainda mais significativo, aproximando de índices como o do Japão que, em 2005, já era de 81,9 anos (IBGE).

No passado, eram comuns as mortes por doenças infecciosas, muitas vezes decorrentes de problemas de saneamento básico, falta de

vacinas, de antibióticos e dos recursos da terapia intensiva. Atualmente, com o envelhecimento da população, nas últimas décadas, houve uma mudança significativa nas causas de mortalidade. Começaram, então, a predominar as mortes por doenças decorrentes da longevidade, sobretudo as degenerativas, de acordo com dados do DATASUS (2007) e da Organização Mundial da Saúde (OMS- 2007).

Contudo, as doenças degenerativas, assim como as sequelas de traumas que acometem grande número de pessoas, em idade economicamente ativa, fizeram surgir a necessidade de se prover órgãos e tecidos, que fossem capazes de recuperar estruturas orgânicas degeneradas ou lesadas.

Surge, assim, o grande desafio para a ciência contemporânea: a incessante, e talvez utópica, busca da tão almejada medicina regenerativa.

2. Revisão da literatura

2.1. Célula

A procura por novas modalidades terapêuticas para antigos e até então intratáveis problemas fizeram a medicina se voltar para o próprio indivíduo no estudo de sua menor estrutura viva: a célula, reconhecendo poder encontrar ali a chave para a resolução de questões até então consideradas insolúveis.

Importantes avanços no campo da biologia celular permitiram elucidar os processos de diferenciação celular e a interação entre diferentes tipos celulares, além do mecanismo de atuação dos fatores bioativos. Esses conhecimentos criaram condições para iniciar a compreensão dos mecanismos que estimulam a regeneração tecidual e a substituição de tecidos senescentes por tecidos novos (Chajchir et al., 2005).

Este progresso está vinculado ao aperfeiçoamento das técnicas de isolamento celular, ao maior controle das culturas e à possibilidade de uma diferenciação celular dirigida, bem como ao conhecimento dos mecanismos gênicos, que tornaram a terapia celular e a manipulação celular terapêutica opções factíveis (Sherley, 2002; Lee et al., 2003a).

Todo este avanço resultou no conceito de engenharia tecidual, que é o desenvolvimento de tecidos artificiais com base em conhecimentos de física e química aplicados à biologia.

Atualmente, o grande instrumento em engenharia de tecidos é a célula-tronco, devido à sua pluripotencialidade (capacidade de originar diversos tecidos corporais) e ao poder de auto-renovação (Amint et al., 2000; Vacanti e Vacanti, 2000; Walgenbach et al., 2001). Isso propiciou um progresso significativo em várias áreas, sobretudo nos procedimentos

reconstrutivos (Morain, 2005; Goessler et al., 2005; Sándor e Suuronen, 2008).

A vantagem de se utilizar tecidos do próprio indivíduo em intervenções reparadoras vem ao encontro àqueles problemas inerentes aos materiais aloplásticos (material inerte com risco de extrusão e limitação de suas dimensões) e às implicações adversas ao uso de tecidos não autólogo (dificuldade na captação e problemas de histocompatibilidade) (Clavijo-Alvarez et al., 2006).

Porém, a utilização de tecido autólogo tem uso limitado, devido à escassez local e às sequelas significativas em áreas doadoras, principalmente quando se necessita de quantidade mais vultosa (Gomillion e Burg, 2006), o que restringe a atuação do cirurgião reparador às limitações impostas por técnicas como enxertias e confecções de retalhos.

Atualmente, com o uso de técnicas de bioengenharia, os tecidos autólogos vêm se tornando uma alternativa com grande potencial (Cuenca-López et al., 2008; Jabbarzadeh et al., 2008; Cherubino et al., 2009), e se colocam na vanguarda dos procedimentos reconstrutivos, pois, com pequenas alíquotas de células específicas (células-tronco), podem-se conseguir grandes expansões e diferenciações celulares dirigidas. Dessa forma, a limitação tecidual nas intervenções reparadoras usuais deixa de ser um entrave.

2.2. Célula-tronco

A maioria dos tecidos adultos contêm populações de células capazes de renovação após trauma, doença ou envelhecimento (Pittenger et al., 1999). Essas células são denominadas células-tronco (CT) e, em princípio, seriam um reservatório de células indiferenciadas (Slack, 2000; Tae et al., 2006).

Como a célula-tronco tem propriedade plástica, capaz de originar várias linhagens celulares distintas, a cada dia, seu uso no reparo de tecidos e órgãos (principalmente em doenças degenerativas) vem se mostrando promissor e se tornando mais popular (Strem et al., 2005).

O processo de diferenciação que leva a célula a se especializar nos diversos tecidos corporais (pele, nervos, músculos, ossos) é influenciado pelo microambiente ao qual a célula é exposta e regulado pela expressão gênica (genes específicos são ativados ou desativados na célula-tronco, originando os diversos fenótipos). Entretanto, sua presença em determinado tecido não significa que irá repará-lo quando lesado. Este fato intrigante abre um grande campo na pesquisa, ou seja, encontrar uma chave que ative essas células na busca da regeneração tecidual (Caplan, 2007).

Uma célula indiferenciada, para ser considerada célula-tronco, deve atender aos seguintes critérios de acordo com Zuk et al., 2002 e Rosenthal, 2003: ser originária de outra célula-tronco (de organismo adulto ou embrionária); possuir prolongada capacidade de auto-renovação e propiciar divisão assimétrica (uma das células-filha deverá ser capaz de originar células especializadas, representativas dos três folhetos embrionários - ectoderma, mesoderma e endoderma), como representado pela Figura 1.

Figura 1 – Célula-tronco deverá ser capaz de originar células maduras de linhagens celulares distintas (endoderma, mesoderma e ectoderma).

Dois modelos básicos de divisão permitem a replicação e a diferenciação de uma célula-tronco. Segundo o modelo determinístico, a divisão sempre gera uma célula-tronco e uma célula diferenciada; no modelo estocástico (aleatório), algumas células-tronco geram somente células diferenciadas, e outras geram somente novas células-tronco.

2.3. Célula-tronco embrionária versus adulta

Há dois tipos básicos de CT. As células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA) ou somáticas.

No ser humano, a fertilização (fusão espermatozóide-óvulo) normalmente ocorre na tuba uterina. Mesmo antes de sua implantação definitiva no útero, ocorre uma série de divisões celulares. Por volta do 4º ao 5º dia de desenvolvimento, o embrião (zigoto) é denominado blastocisto. Nesta fase do desenvolvimento, o blastocisto apresenta uma camada externa, que formará a placenta, e uma massa celular interna (MCI), que dará origem ao feto.

As CTE são retiradas da MCI de um embrião normal (produzido por técnica de fertilização *in vitro*) e encaminhadas para cultura celular em condições apropriadas (Findikli et al., 2006). Em cultura, expandem-se (replicam-se) indefinidamente, mantendo o potencial de originar qualquer tipo de célula.

Células-tronco adultas são obtidas após a fase embrionária (de blastocisto), sejam elas provenientes de organismo adulto, recém-nascido ou do próprio feto. A Figura 2 ilustra este fato.

Figura 2 – Células-tronco embrionárias são encontradas exclusivamente no estágio de blastocisto (4º ao 5º dia de desenvolvimento do embrião). Após a fase de blastocisto, no feto, no recém-nascido ou indivíduo adulto é possível a aquisição apenas de células-tronco adultas.

2.4. Célula-tronco adulta

2.4.1. Mesenquimal versus Hematopoiética

As células-tronco adultas podem ser originadas de uma grande variedade de tecidos, entre eles: medula óssea, pele, mucosa intestinal, polpa dentária, córnea, sangue de cordão umbilical, tecido nervoso e adiposo (Verfaillie, 2002; Musina et al., 2006).

Essas células, por sua vez, podem ser classificadas como hematopoiéticas ou mesenquimais, dependendo do tecido de origem (medula óssea, sangue do cordão umbilical, tecido mesenquimal), características que conferem versatilidade adicional às CTA.

A medula óssea (derivada do folheto mesodérmico) é composta de células-tronco hematopoiéticas (CTH) e um estroma mesenquimal (Friedenstein et al., 1968; Friedenstein et al., 1974). As linhagens da fração de CTH são capazes de se diferenciar em células maduras do sangue, sendo usadas nos transplantes de medula óssea desde a década de 50 (Lorenz et al., 1951; Ford et al., 1956; Nowel et al., 1956; Gengozian et al., 1957). Já as células da linhagem mesenquimal (células-tronco mesenquimais - CTM) tornaram-se foco de grandes estudos apenas recentemente (Caplan, 1991).

O sangue do cordão umbilical também é fonte importante de células-tronco hematopoiéticas, sendo objeto de pesquisa desde a década de 80. Em 1989, Gluckman et al. fizeram o primeiro transplante em paciente com anemia de Fanconi, após coleta de CT do sangue do cordão umbilical de um irmão com HLA (*human leukocyte antigens* – antígeno leucocitário humano) compatível.

Por sua vez, o compartimento mesenquimal é composto por várias células, como células reticulares, macrófagos, adipócitos e células endoteliais (Mayani, 1996; Koller et al., 1997), sendo as células reticulares fibroblásticas a população mais frequentemente encontrada

o que corresponde entre 45 a 55% do montante celular (Andreoni et al., 1990).

Friedenstein et al. (1970) deram início ao estudo de células-tronco mesenquimais. Na época, devido à semelhança morfológica com fibroblastos em cultura, foram denominadas unidades formadoras de colônia fibroblástica (UFC-F).

Cerca de vinte anos depois, Caplan (1991) propôs que as UFC-F corresponderiam às células-tronco mesenquimais do embrião. Assim, a comunidade científica passou a se interessar mais pelo estudo dessas células e, a partir daí, surgiram vários trabalhos (Prockop, 1997; Pittenger et al., 1999; Mason et al., 2000).

As publicações começaram tímidas mas, a partir do final da década de noventa, intensificaram-se os trabalhos ligados à engenharia tecidual e à medicina regenerativa.

Naquela época, a utilização de células pluripotentes, inicialmente de origem embrionária, começava a aumentar, impulsionada por estudos como os de Thomson et al., (1998), que conseguiram isolar células-tronco embrionárias humanas e obter diferenciação. Foi quando surgiram as primeiras pesquisas constatando o grande potencial replicativo das CTM e sua capacidade para se diferenciarem em várias células do tecido conjuntivo.

Inúmeros trabalhos abordavam o tema CTM e verificou-se que vários, senão todos os tecidos corporais, continham células-tronco - parede dos vasos sanguíneos (Abedin et al., 2004), órgãos fetais (Campagnoli et al., 2001), polpa dentária (Gronthos et al., 2000) músculo, tecido nervoso, bulge do pelo, sangue do cordão umbilical (Sarugaser et al., 2005) e osso. Muitas vezes com fins de auto-reparação e manutenção tecidual, foram denominadas à época células-tronco tecido-específicas.

A partir de então, vários centros de pesquisa têm isolado CTM e, atualmente, já se consegue diferenciá-las em múltiplas linhagens distintas, o que impulsionou significativamente os estudos com as CTA.

Porém, a maior parte dos serviços tentava descobrir a fonte ideal de captação das CT para o melhor desenvolvimento de suas linhas de pesquisa.

Ao mesmo tempo em que se observava a grande variedade tecidual que contém CT, vista como uma fonte doadora em potencial (Pountos et al., 2005; Hui et al., 2005), limitações importantes eram observadas: ora o tecido doador não se apresenta em grande volume, como a polpa dentária ou bulge do pelo, ora a morbidade significativa, à sua captação, como nos músculos, cartilagem ou no tecido nervoso.

Assim, a captação com possível aplicabilidade clínica ficou restrita à medula óssea. Apesar de volumes não tão expressivos e morbidade não desprezível, à época era considerada a melhor fonte doadora de células-tronco.

Aparece, então, em 2001, o trabalho pioneiro de Zuk et al. (2001) que afirmava conter o lipoaspirado humano células multipotentes que poderiam representar uma fonte alternativa às CTMO. Deu-se início a uma série de pesquisas, em que inúmeros autores conseguiram desenvolver várias linhagens celulares a partir de células-tronco provenientes do tecido adiposo humano e de modelos experimentais animais (Planat-Bernard et al., 2004; Shi et al., 2005; Conejero et al., 2006). A grande vantagem era não acarretar morbidade relevante na captação do tecido doador de CT (Parker et al., 2006).

2.5. Diferenciação das células-tronco

A plasticidade, capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares, é a propriedade fundamental das células-tronco.

O potencial da população celular da medula óssea para se diferenciar em fenótipos mesenquimais já é conhecido há algumas décadas (Friedenstein et al., 1966; Ashton et al., 1980; Bab et al., 1984).

Evidências mais contundentes e diferenciações múltiplas foram comprovadas por outros autores (Hauner et al., 1987; Löffler e Hauner, 1987; Grigoradis et al., 1988; Cheng et al., 1994) que, usando meios de cultura com suplementação adequada, conseguiram levar células mesenquimais indiferenciadas humanas e de animais a se diferenciar em outras linhagens, como condrogênica, osteogênica e adipogênica.

Dennis et al. (1999), utilizando células mesenquimais indiferenciadas isoladas de medula óssea do fêmur e da tíbia de camundongos, mostraram a capacidade para se diferenciar em fenótipos mesenquimais como condrócitos, adipócitos e osteoblasto.

Zuk et al. (2002) estudaram células provenientes de lipoaspirado e células de medula óssea humana, as quais foram induzidas a múltiplas diferenciações. Linhagens adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica foram obtidas usando fatores de indução específicos.

2.6. Perspectivas da utilização clínica de células-tronco

Devido à sua plasticidade e à grande capacidade de crescimento em cultura, as CTM se tornaram um instrumento importante na medicina regenerativa.

Tendo em vista a reparação de um tecido, as CT podem ser administradas tanto na forma indiferenciada (Lu et al., 2008) como na diferenciada (Conejero et al., 2006), após estímulos específicos. Podem ainda estar associadas a biomateriais (Cui et al., 2007; De Girolamo et al., 2008; Zuk, 2008; Tapp et al., 2009), com o intuito de restaurar uma estrutura anatômica (Arthur et al., 2009).

Na área da cardiologia, o uso das CT vem se mostrando promissor, com o propósito de diminuir a perda miocitária, após isquemia cardíaca, e diminuir o risco de insuficiência cardíaca, por induzir a angiogênese (Sunkomat e Gaballa, 2003).

Stamm et al. (2003) associaram cirurgia de revascularização do miocárdio à injeção intramiocárdica na concentração de $1,5 \times 10^6$ CT em áreas peri-infarto e observaram aumento da motilidade e da perfusão da área infartada.

Tateishi-Yuyama et al. (2002) submeteram pacientes portadores de doença arterial periférica à injeção de CT no músculo gastrocnêmio, com melhora da perfusão periférica e dos sintomas, além de um aumento significativo de vasos colaterais vistos à arteriografia.

Em relação às doenças auto-imunes, já se começa a vislumbrar algumas opções de tratamento com as células-tronco, sobretudo na esclerose múltipla que, desde os estudos pioneiros de Fassas et al. (1997), passou a apresentar resultados favoráveis com a utilização de CT autólogas. No lúpus eritematoso sistêmico, as CT também mostraram respostas significativas, como no estudo de Jayne e Tyndall (2004), que evidenciaram remissão de 66% em pacientes tratados com transplante de CTH. No Brasil, Voltarelli et al. (2004) mostram um aumento da casuística do tratamento desse tipo de afecções com resultados promissores.

Observou-se resultados satisfatórios com a aplicação local de CT em pacientes com fissura anal (Garcia-Olmo et al., 2008).

Substitutos cutâneos associados a CT mostram-se promissores (Vermette et al., 2007; Altman et al., 2008)

Trabalhos de engenharia tecidual, direcionados à reconstrução de vários tipos de estruturas orgânicas, têm sido realizados com sucesso (Moseley et al., 2006; Stosich e Mao, 2007) e, sobretudo em afecções craniofaciais, já se mostram perspectivas favoráveis utilizando-se CT (Mao et al., 2006; Moreau et al., 2007; Zuk, 2008).

A literatura é rica e evidencia o poder plástico das CTA. A diferenciação em tecidos especializados constitui apenas o primeiro passo da bioengenharia tecidual (Pittenger et al., 1999; James et al., 1999; De Ugarte et al., 2003a; Fraser et al., 2006).

A estrutura tridimensional de um tecido ainda não foi obtida com êxito. A relação das células entre si e a multiplicidade celular de um tecido ainda não podem ser obtidas em laboratório. Entretanto, a utilização clínica de células-tronco é factível, e resultados promissores já podem ser observados em vários centros de pesquisa (Walgenbach et al., 2001; Goessler et al., 2005).

3. Objetivo

Estabelecer um modelo experimental para o estudo das células-tronco provenientes de tecido adiposo.

- Selecionar um animal que possua tecido adiposo em quantidade significativa e que seja adequado a intervenções cirúrgicas.
- Eleger técnica cirúrgica eficaz e com baixa morbidade para a captação tecidual.
- Utilizar um método eficiente para isolamento das células-tronco.

4. Metodologia

Os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq.) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Protocolo nº 1143/05 de 14 de dezembro de 2005 (Anexo 1).

Foram seguidas normas internacionais para experimentação em animais. A pesquisa foi realizada com coelhos cedidos pela Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da FMUSP.

Esse trabalho desenvolveu-se conjuntamente no Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Cirurgia Plástica - Laboratório de Investigação Médica (LIM) 4 e no Laboratório de Anatomia Médico - Cirúrgica – LIM 2 da Disciplina de Topografia Estrutural Humana do Departamento de Cirurgia da FMUSP.

4.1. Animais

Foram estudados coelhos da espécie *Oryctolagus cuniculus*, adultos machos da raça Nova Zelândia Branco (NZB).

A casuística desse trabalho foi de 24 animais, sendo 13 deles utilizados para o estudo anatômico relacionado ao acúmulo adiposo interescapular e 11 submetidos à lipoaspiração.

4.1.1 Estudo anatômico da bolsa adiposa interescapular

A amostra constou de 13 animais cujas características anatômicas relacionadas à abordagem do acúmulo adiposo interescapular foram estudadas.

Após os coelhos terem sido anestesiados, com lâmina de bisturi número 15, procedeu-se à incisão longitudinal mediana de 3 cm de comprimento no panículo carnoso, cerca de 5cm caudalmente à inserção do crânio, coincidindo com o ponto de maior projeção do acúmulo gorduroso.

Em seguida, realizou-se a dissecação do subcutâneo com tesoura de Íris curva de 12 cm, expondo a bolsa de tecido adiposo, para se proceder a lipectomia (Figura 3).

Figura 3 - Fotografia da dissecação e exposição da bolsa de tecido adiposo.

Individualizada a bolsa, que é envolta por delgada fáscia, procedeu-se à ressecção total da mesma.

A hemostasia compressiva foi realizada com sucesso na totalidade dos animais, não havendo necessidade de ligadura vascular ou cauterização de vasos, pois esses são de pequeno calibre e localizam-se em área de fácil acesso (região central da bolsa adiposa) como mostra a Figura 4.

Figura 4 – Fotografia onde se evidencia: A - músculo. B - vaso sanguíneo. C - bolsa adiposa.

Os coelhos foram mantidos em observação durante três semanas no biotério do LIM 4, em gaiolas individuais, com temperatura, aeração e luz adequadas para os animais, além de alimentação e água.

4.2. Lipoaspiração como meio para aquisição de células-tronco

4.2.1. - Anestesia

Os animais foram anestesiados com uma solução de cloridrato de xilazina - Rompum[®] (5mg/Kg) do laboratório Bayer[®] e cloridrato de ketamina (36,5mg/Kg) do Cristália[®].

As drogas foram administradas separadamente, por via intramuscular, no músculo glúteo superficial.

Utilizou-se seringa de 10 ml e agulha Becton-Dickinson[®] (BD) 0,70 por 30 mm, 22G (gauge).

4.2.2. Preparo do animal

Após entrarem em plano anestésico, os animais foram submetidos à tricotomia da região dorsal. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica, a qual possuía calha veterinária específica para esse fim (Figura 5).

As orelhas e o dorso foram fixados com auxílio de faixas, para uma melhor exposição das estruturas anatômicas.

Figura 5 – Fotografia de coelho já submetido à tricotomia, anestesiado e posicionado sobre a mesa cirúrgica.

Realizou-se a antissepsia com solução tópica de iodo-povidine, seguida da colocação de campos cirúrgicos estéreis.

4.3. Lipoaspiração

Foi realizada uma incisão de aproximadamente 0,4 cm contígua à área de maior projeção da bolsa adiposa.

Para a lipoaspiração (Figura 6), utilizou-se uma cânula Ritcher[®] reta de 20cm de comprimento, 3,5mm de diâmetro, com 3 orifícios em linha e ponta romba.

Procedeu-se à lipoaspiração seca, sem a aplicação de infiltração- *utiliza-se normalmente uma solução composta de soro fisiológico 0,9% com epinefrina para diminuir a perda sanguínea, além de facilitar a execução do procedimento-*, para não alterar parâmetros a serem analisados.

Os orifícios da cânula ficaram sempre direcionados para a profundidade, e a pressão negativa, que propiciava a aspiração, foi conseguida através de uma seringa BD[®] de 60 ml própria para esse fim.

Figura 6 – Fotografia do procedimento de aspiração de gordura da bolsa adiposa interescapular.

4.3.1. Sutura

A síntese da ferida cirúrgica procedeu-se em plano único.

Foram confeccionados dois pontos simples com fio de nylon Ethicon® 4-0, agulha cortante J-15 de 17 mm.

4.3.2. Curativo

Não foi realizado curativo nem proteção local, por ser uma área com grande mobilidade o que dificultava a aderência do mesmo, além de o ferimento ser pequeno e o animal não acessá-lo facilmente.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com alimentação e água *ad libitum* por três semanas, para observar a evolução pós-operatória.

4.3.3. Eutanásia

Após a finalização dos experimentos, os animais foram sacrificados com técnica ética e reconhecidamente aceita.

Os coelhos, devidamente anestesiados com cloridrato de xilazina e cloridrato de ketamina, foram colocados em câmara de eutanásia já pré-saturada com dióxido de carbono (CO₂). Mantinha-se fluxo de CO₂ até se observar a parada da respiração e dos batimentos cardíacos, constatando-se a morte do animal.

4.4. Isolamento e expansão celular

O método de isolamento das células mesenquimais indiferenciadas ocorre devido a sua propriedade de secretar matriz extracelular. Como apresentam capacidade de crescer, aderindo-se a plástico ou vidro, essas células aderem à superfície do fundo da garrafa de cultura.

Desenvolvido no final da década de 60 (Friedenstein et al., 1970), e com poucas modificações, constitui até os dias de hoje o método padrão para o isolamento das células-tronco mesenquimais.

As etapas das técnicas de isolamento e cultura celular, utilizadas neste estudo para obtenção das células-tronco, são realizadas da seguinte maneira:

O tecido adiposo, extraído assepticamente do coelho, é colocado em um recipiente contendo PBS (solução tampão fosfato - pH 7,4) estéril (Figura 7). Em seguida é encaminhado ao laboratório onde é imediatamente processado.

Figura 7 – Fotografia da peça extraída do coelho e colocada em uma placa de Petri com solução tampão fosfato para ser processada em capela de segurança biológica.

No laboratório, o material colhido foi pesado em balança de precisão Gehaka® AG 200 e encaminhado para processamento em capela de segurança biológica Veco® modelo VLFS-12.

O tecido foi lavado com PBS até a eliminação do sangue visível. E, com auxílio de tesoura e pinça microcirúrgica, o material colhido

(nas lipectomias) foi fragmentado em pequenos blocos para um melhor aproveitamento na etapa de digestão enzimática que se segue (Figura 8).

Figura 8 – O tecido adiposo já limpo (sem excesso de tecido conjuntivo e vasos) e fragmentado para melhor aproveitamento na etapa de digestão enzimática.

A seguir, o tecido adiposo foi colocado em um frasco e, em seguida, colocado no agitador magnético Corning®, modelo Stirrer/Hot Plate, por 60 minutos, a 37°C e, sob agitação constante, foi submetido à digestão enzimática (Figura 9) ^{*1}.

¹ *Solução enzimática (por grama de tecido): 2 ml de meio de cultura DMEM (Dubelcco's Modifield Eagle Medium) na concentração de 2mg/ml de collagenase tipo A, 20mg/ml de BSA (albumina sérica bovina) - fração V, penicilina 124µg/ml e estreptomicina 100µg/ml.

Figura 9 – A - tecido adiposo antes de ser levado ao agitador magnético e da digestão enzimática.

B - tecido adiposo já submetido à digestão enzimática pela colagenase.

Passados 60 minutos, a digestão foi interrompida pela adição de SFB (soro fetal bovino) em um volume correspondente a 10% do total da solução enzimática.

O material digerido foi transferido para um tubo Falcon de 50 ml e colocado na centrífuga Fanem[®] modelo 206-R.

A suspensão de células foi então centrifugada por 5 minutos a 200g' (força da gravidade).

Após centrifugação, o sobrenadante, contendo a fração adipocitária, foi desprezado, e o botão celular, contendo a fração estroma vascular, foi ressuspensionado em DMEM contendo 10% de SFB (Figura 10).

Figura 10 - Tubo Falcon após centrifugação. A seta indica o botão celular contendo a fração estroma vascular, onde se encontram as CT.

A seguir, as células foram plaqueadas, em garrafa de cultura primária de 25cm², com DMEM e 10% SFB.

As garrafas foram encaminhadas para estufa Forma Scientific®, modelo 3546 a 37°C, com concentração de 5% de dióxido de carbono, local em que as células permaneceram a fim de se expandirem (Figura 11).

Figura 11 - Garrafas de cultura de célula em expansão celular no interior da estufa.

Durante os dois primeiros dias, as garrafas foram lavadas com PBS para retirar debris, hemácias e outras células não aderentes. As células mesenquimais indiferenciadas aderem-se à superfície do fundo da garrafa de cultura, não sendo eliminadas pela lavagem.

Após esse período, trocou-se o meio de cultura em dias alternados e esperava-se que as células alcançassem cerca de 70% de confluência.

Nessa etapa da cultura (cultura primária), quando as células alcançaram a confluência esperada, elas foram submetidas à tripsinização**² (a enzima tripsina é uma protease utilizada para destruir as proteínas nas junções que interconectam as células), com 5ml de Tripsina-EDTA Sigma[®], formando uma suspensão celular.

Essa suspensão pode servir para transferência das células para uma garrafa de 75cm², a fim de haver uma amplificação do número celular (primeira passagem) ou encaminhada para a utilização em algum experimento (retornando as células para o indivíduo doador).

4.5. Análise da expansão celular

Após crescimento e confluência, em garrafas de cultura de 25cm², as CTTA foram tripsinizadas. A concentração celular foi ajustada inicialmente em 10⁷ CTTA/ml, e a viabilidade celular obtida pelo teste de exclusão pelo azul Tripán, sendo em média, superior a 98%.

² ***Técnica de tripsinização: Após se retirar a garrafa da estufa, aspira-se o meio de cultura, acrescenta-se PBS (5 ml para garrafas de 25cm²) e deixa-se por 3 minutos. Em seguida, acrescenta-se tripsina-EDTA Sigma[®], e deixa-se atuar por 3 minutos; as moléculas de adesão serão digeridas, e as células ficarão em suspensão. Adiciona-se então SFB para inativar a enzima e impedir que comprometa a viabilidade celular. Em seguida, a suspensão celular é colocada em um tubo Falcon, sendo centrifugada por 5 minutos a 200 g'. O pellet resultante é novamente colocado em DMEM com 10% de SFB.*

As curvas de crescimento foram realizadas em placas de cultura com 96 orifícios e fundo chato. Diferentes concentrações celulares foram estudadas (de 1×10^6 a 7×10^3 CTTA).

A viabilidade e a proporção de proliferação celular foi determinada pelo teste colorimétrico MTT, que é um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo no produto formazana (Mosmann, 1983; Wilson, 2000).

Após o plaqueamento das CTTA em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), as células foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂. Quatro horas antes de terminar os intervalos estabelecidos (24, 48, 72 e 96h), foram adicionados 20µL de MTT Sigma® na concentração final de 10 µg/mL.

Completado cada período, foram retirados 180µL do sobrenadante de cada poço e adicionados 150µL de dimetilsulfóxido Sigma® e homogeneizado em leitor de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), para a completa dissolução dos cristais de sal formados pelo metabolismo mitocondrial. As placas foram obtidas pela leitura em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 540nm.

Os resultados foram analisados através da absorvância de cada poço. Os experimentos foram realizados em triplicatas, e cada concentração celular avaliada em octuplicata.

4.6. Caracterização das células-tronco do tecido adiposo de coelhos por citometria de fluxo

Estudou-se a expressão de marcadores de superfície em células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo extraídas da bolsa adiposa do dorso de coelhos.

Os marcadores utilizados no estudo estão abaixo relacionados, seguidos dos tipos celulares em que se expressam e de suas funções conhecidas ou postuladas.

HLA-DR: As moléculas de classe II são compostas por duas cadeias polipeptídicas, uma α e uma β , ambas codificadas no complexo principal de histocompatibilidade (CPH), e por um peptídeo antigênico. Estes genes (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) são agrupados como gene classe II. As moléculas de classe II são expressas apenas por um subgrupo de células hematopoiéticas, denominadas células apresentadoras de antígenos, como por exemplo, células B, macrófagos, células de Langerhans, células dendríticas e células do epitélio tímico.

CD 90/thy1: Pode ser expresso em uma gama de células, entre elas: timócitos, células T periféricas, células CD34+, células-tronco hematopoiéticas, células-tronco mesenquimais e neurônios.

Caspase 3: É uma proteína que está intimamente ligada à fase de iniciação da morte celular programada - apoptose. Sua expressão reflete a proporção de células mortas e vivas na cultura.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (*Fluorescence Activated Cell Analyser*) BD.

O citômetro estava acoplado a um microcomputador Macintosh, que permitiu análise e detecção dos marcadores fluorescentes acoplados aos anticorpos monoclonais. A aquisição dos dados e análise dos resultados foi realizada com o programa Cell Quest BD. A aquisição inicial de eventos (cada evento corresponde a uma célula) foi realizada através da dispersão frontal (FSC) e lateral de luz (SSC), que avalia respectivamente o tamanho das células e a complexidade ou granulosidade das mesmas. Em cada aquisição foram mensurados 100.000 eventos. Como controles negativos, foram utilizados anticorpos do mesmo isotipo dos anticorpos monoclonais sem especificidade antigênica.

As células foram estudadas quando, em cultura, alcançaram 70% de confluência.

4.7. Análise das fases do ciclo celular de células-tronco provenientes do tecido adiposo de coelhos

Alíquotas de CTTA de coelhos foram congeladas em tampão citrato (2mM) e mantidas em nitrogênio líquido. A determinação do ciclo celular foi determinada em citometria de fluxo FACScalibur, utilizando-se a metodologia do iodeto de propídio.

Depois de descongeladas, as células foram colocadas em garrafas de cultura e mantidas em estufa até atingirem 100% de confluência.

Alcançada a confluência esperada, as células foram incubadas por 10 minutos, à temperatura ambiente, com 30mg/ml de solução de tripsina Difco Laboratories® e, em seguida, com 5g/l de inibidor de tripsina Sigma Chemical® e 0,1 g/l de ribonuclease – A Sigma Chemical®.

Logo após, as suspensões celulares foram incubadas com 250ml de RNase e coradas com iodeto de propídio 50mg/ml. A seguir, avaliadas em citômetro de fluxo baseado em lâmpada de mercúrio, utilizando-se eritrócitos de frango para calibração das células.

A análise foi realizada com identificação da população celular, em *gate* ou quadrante definido de população celular homogênea, pelo sistema de aquisição de imagem Cell Quest BD, procedendo-se em citômetro de fluxo FACScalibur pela medida da intensidade de fluorescência (FL2) do conteúdo de DNA.

Os histogramas de DNA foram analisados em programa de computador MOD-FIT BD, o que permitiu avaliar, através de detecção de alterações do DNA, a ploidia em que se encontravam as células, distribuídas nas fases do ciclo celular.

As fases do ciclo celular são denominadas de G0/G1, células quiescentes, não proliferativas; de S, fase de síntese do material genético (duplicação); de G2/ M, células em período pré-replicativo e já em mitose; e de apoptose, fase subdiplóide, caracterizada por morte celular programada.

4.8. Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo método de análise de variância ANOVA, seguido do teste comparativo múltiplo de Turkey-Kramer e Kruskal-Wallis.

Os valores foram expressos em média com desvio padrão, considerando-se como valores significativos $p < 0,05$.

5. Resultados

O modelo experimental proposto para obtenção de células-tronco, coelhos machos adultos da raça Nova Zelândia Branco, mostrou-se adequado, confiável e de fácil manejo.

Em relação à anestesia aplicada nos animais por via intramuscular, observou-se que não houve complicações ou mortes. Entretanto, dois animais (8,3%), em sequência, permaneceram apenas torporosos, necessitando dose suplementar de anestésico (50% da dose inicial), para atingir plano anestésico satisfatório. Esse fato foi imputado à provável alteração no lote das drogas anestésicas.

Não houve mortes nem complicações pós-operatórias durante os 21 dias de observação.

O procedimento cirúrgico de lipoaspiração, como mostra a Tabela 1, teve um tempo de 8 a 15 minutos, com a média de 11 minutos, para extração de cerca de 6 a 15 ml (média de 10 ml) do acúmulo adiposo da região dorsal do coelho (Figura 12).

Figura 12 – A- produto de lipoaspiração imediatamente após sua coleta. B- cânula de lipoaspiração com 3,5mm de diâmetro.

Tabela 1 - Tempo cirúrgico e volume de gordura retirada dos coelhos submetidos a lipoaspiração.

Coelho-n°	Tempo cirúrgico - min	Volume aspirado - ml
1	14	8
2	12	6
3	15	9
4	14	8
5	11	12
6	11	14
7	9	15
8	10	10
9	10	8
10	8	11
11	9	13

O corpo adiposo interescapular constitui tecido fonte de CT preconizado na atual pesquisa. O acúmulo de tecido adiposo localiza-se a cerca de 3 a 5 cm da inserção do crânio no sentido craniocaudal, ao longo da linha dorsal mediana (Figura 13).

Figura 13 – Projeção da bolsa de tecido adiposo, localizada ao longo da linha dorsal mediana, cerca de 3 a 5 cm da inserção do crânio.

Essa porção de tecido adiposo apresenta forma semelhante a um “H”. É composta por dois lóbulos, direito e esquerdo, que se projetam sobre as escápulas do animal, unidos por um istmo, localizado na linha média da região interescapular (Figuras 14 e 15).

Figuras 14 e 15 – O corpo adiposo interescapular é composto por dois lóbulos (direito e esquerdo), unidos por um istmo na sua parte central.

A bolsa adiposa situa-se sob o panículo carnoso, envolta por uma fina cápsula e por tecido conectivo frouxo. Os músculos trapézio e platisma estão em íntimo contato com a sua superfície inferior.

O peso do corpo adiposo foi verificado em 13 coelhos. O peso corporal médio desses animais variou de 2200g a 2900g, com a média de 2590g. Observou-se uma variação do peso da bolsa adiposa conforme a massa do animal, a maior pesou 25,8g e a menor 11,9g, com uma média de 17,2g por coelho. Proporcionalmente, a maior bolsa adiposa correspondeu a 9,5g/kg e a menor, 5g/kg, com uma média de 6,6g de tecido adiposo por kg de massa corporal do animal (Tabela 2).

Tabela 2 - Peso corporal dos coelhos e das bolsas adiposas.

Coelho-nº	Peso - g	Bolsa adiposa - g
1	2700	17,5
2	2550	20,9
3	2400	14,6
4	2700	11,9
5	2720	19,3
6	2200	13,2
7	2530	14,7
8	2900	15,4
9	2370	25,8
10	2800	14,6
11	2480	13,1
12	2540	22,7
13	2750	20,3

5.1. Células-tronco adultas

Extraído o tecido adiposo, e após o processamento com digestão pela colagenase, o material foi centrifugado, e todo o sobrenadante foi desprezado. O botão celular foi novamente colocado em suspensão em meio de cultura DMEM com 10% de SFB.

Em seguida, o material foi colocado em garrafa de cultura e completado com meio de cultura DMEM. Durante 2 dias, essa cultura foi lavada várias vezes com PBS, para eliminação dos debris, hemácias e células não aderentes.

A contagem das células-tronco foi então realizada pelo método da câmara de Neubauer, constando que, em cada mililitro de gordura, encontrava-se em média 1×10^5 CT.

As células-tronco foram mantidas em cultura até alcançarem cerca de 70% de confluência na garrafa, quando se interrompeu a expansão através da técnica de tripsinização.

A partir desse momento, alíquotas celulares foram congeladas, expandidas ou encaminhadas para análise de parâmetros celulares.

Após períodos de armazenamento em nitrogênio líquido, que variaram de 1 semana a 13 meses, as células mantinham suas características citométricas (morfológicas e expressão de marcadores), além de se expandirem com taxas semelhantes às células cultivadas a fresco, constatando a efetiva criopreservação celular (Figuras 16 e 17).

Figura 16 – Fotomicrografia das células-tronco (obtidas do tecido adiposo do coelho nº3) descongeladas e cultivadas em lamínula por um dia, coradas com hematoxilina-eosina. Aumento de 100x.

Figura 17 – Fotomicrografia de células-tronco em lamínula no quarto dia de incubação. Células coradas com hematoxilina-eosina. Aumento de 100x, mostrando a rápida expansão e confluência celular.

5.2. Avaliação da expansão celular

Os resultados mostraram que, em todas as concentrações celulares avaliadas, nos períodos de 24 e 48 horas, foram observadas respostas significantes na manutenção da viabilidade celular e na capacidade proliferativa (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curva de crescimento de células mesenquimais indiferenciadas de coelhos com 24 e 48 horas de encubação.

Por outro lado, os resultados das curvas no período de 96 horas mostram nitidamente a diminuição das células e da viabilidade celular na concentração de 10^6 células CTTA, representando, em média, uma redução de 84%. (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva de crescimento de células mesenquimais indiferenciadas de coelhos com 72 e 96 horas de encubação.

Nas concentrações iniciais menores que 10^3 CTTA/ml, observa-se que a resposta proliferativa é similar às concentrações maiores que 10^5 CTTA/ml. (Anexos 2 a 9).

Não foi notada formação de agregados multiestratificados celulares ou formação de multicamadas celulares; todas as células cultivadas apresentavam-se em monocamadas no final de cada período de tempo.

5.3. Ciclo celular

Os resultados foram expressos em média percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular: apoptótica, G0/G1, S e G2/M.

A distribuição quanto ao ciclo celular das CTTA em cultura, analisada em citometria de fluxo, mostrou uma maior proporção de células na fase G0/G1, em que as mesmas encontravam-se quiescentes, (70,8% $\pm$ 4,9); seguido pelas células em apoptose (22,1% $\pm$ 5,1); e proporções celulares menores nas fases pré-replicativa e durante a replicação, fase S, (1,4% $\pm$ 0,2) e fase G2/M (0,9% $\pm$ 0,1) (Tabela 3).

Tabela 3 - Fases do ciclo celular das células-tronco do tecido adiposo por citometria de fluxo.

	G0/G1	Apoptose	Fase S	G2/M
Média	70,78	22,10	1,41	0,95
Desvio padrão	4,87	5,12	0,23	0,07

n=8

Ao se analisar os dados obtidos de cultura primária de fibroblasto humano normal (FN), verificou-se uma proporção de 3,7% $\pm$ 0,9 de células em apoptose, 65,5% $\pm$ 3,8 de células quiescentes, 7,4% $\pm$ 4,4 com capacidade de síntese e 23,3% $\pm$ 5,3 em divisão celular (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Fases do ciclo celular de fibroblasto normal por citometria de fluxo.

	G0/G1	Apoptose	Fase S	G2/M
Média	65,54	3,7	7,42	23,34
Desvio padrão	3,85	0,91	4,41	5,27

n=10

Tabela 5 - Valores individuais do ciclo celular de fibroblasto normal.

	G0/G1	Apoptose	Fase S	G2/M
1	69,5	4,2	5,6	20,7
2	60,0	2,4	2,7	34,9
3	71,6	2,9	2,9	22,6
4	66,5	3,3	2,7	27,5
5	64,9	3,6	3,8	27,7
6	60,4	4,5	12,2	22,9
7	69,7	4,5	7,6	18,2
8	64,8	5,2	11,3	18,7
9	64,2	3,8	13,2	18,8
10	63,8	2,6	12,2	21,4

Comparando a proporção de células em apoptose, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) entre as CTTA em relação aos FN, uma diminuição da proporção de CTTA com capacidade de síntese ($p < 0,05$) e uma diminuição altamente significativa de células em proliferação ($p < 0,001$) (Anexo 10).

5.4. Expressão dos marcadores de superfície

O *software* utilizado para avaliação, Cell Quest (BD), recebeu os dados, plotados em *dots*, distribuindo-se as células em diferentes populações.

O histograma de cada amostra reflete, de forma indireta, a quantidade de moléculas expressas por célula, ou seja, a intensidade de fluorescência arbitrária, que determina o número percentual de células que expressaram cada receptor específico.

A análise das células-tronco do tecido adiposo, por citometria de fluxo, mostrou uma população homogênea quanto ao tamanho e à granulosidade, obtida através do programa Cell Quest (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Histograma da morfologia das CTTA. Notar a distribuição homogênea da população celular.

Como controle negativo inespecífico para o fluorocromo FITC, foi utilizado o anticorpo anti-CD3 (isotipo IgG 2a) de camundongo; os resultados mostraram marcação de apenas 4,9% das células da amostra (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Controle negativo inespecífico para o fluorocromo FITC (anticorpo anti-CD3).

Para controle negativo inespecífico para o fluorocromo PE, foi utilizado o anticorpo anti-CD4 (isotipo IgG 2a) de camundongo; os resultados evidenciaram ausência de marcação em 97,6% das células (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Controle negativo inespecífico para o fluorocromo PE (anticorpo anti-CD4).

As amostras, avaliadas conjuntamente, representaram, em média, 73,1% $\pm$ 5,6 da população celular total (Anexo 11).

A aquisição da fluorescência com anticorpos específicos CD 90, HLA-DR e caspase 3 , conjugado aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeritrina (PE), demonstraram que a fluorescência adquirida com estes marcadores localizava-se no quadrante R2, definido após a aquisição (Gráficos 6, 7 e 8 respectivamente).

Gráfico 6 - Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti-CD 90.

Gráfico 7 - Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti-HLA-DR.

Gráfico 8 – Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti caspase 3.

A proporção da intensidade de fluorescência para os marcadores mostraram, em média, a expressão para os marcadores CD 90, $80,6\% \pm 0,7$; HLA-DR, $2,8\% \pm 1,6$; e caspase 3, $10,5\% \pm 2,5$, respectivamente. Os dados estão representados na Tabela 6 e no Gráfico 9.

Tabela 6 - Proporção da aquisição de fluorescência com anticorpos específicos CD 90, HLA-DR e caspase 3.

	HLA-DR	CD 90	Caspase 3
Média	2,83	80,59	10,49
Desvio padrão	1,60	0,73	2,48

n=4

Gráfico 9 - Marcadores de superfície celular – células-tronco do tecido adiposo.

6. Discussão

Nos últimos anos, os pesquisadores ficaram frente a dois embates científicos acerca do caminho que seguiriam os estudos sobre as células-tronco: CT adulta ou CT embrionária? e CT de origem mesenquimal ou CT hematopoiética?

Refletindo pelo número de publicações e por resultados concretos das pesquisas, parece haver pouca dúvida sobre as vantagens das células-tronco adultas sobre as embrionárias e da vertente mesenquimal à hematopoiética das CTA.

6.1. Célula-tronco adulta versus embrionária

Células-tronco adultas versus embrionárias talvez tenha sido e ainda é o maior e mais polêmico ponto no direcionamento das pesquisas sobre as CT.

Aspetos religiosos e jurídicos à parte, alguns pontos básicos merecem ser esclarecidos e debatidos a propósito do rumo científico que orienta a tendência dos estudos sobre as células-tronco.

Os defensores das células-tronco embrionárias questionavam a suposta plasticidade inefetiva das células-tronco adultas. Porém, com o passar dos anos e após muitas publicações, tais afirmações se mostraram sem fundamento (Pittenger 1999 et al., Zuk et al., 2001; Verfaillie et al., 2002).

É sabido que, com o envelhecimento humano, há um déficit progressivo na capacidade regenerativa dos tecidos, com redução em sua capacidade de reparação frente a uma injúria. Essa diminuição na habilidade do tecido lesado em se recuperar sozinho ocorre devido a um decréscimo na migração, proliferação e diferenciação de células-

tronco tecido-específicas (células indiferenciadas de “reserva” capazes de se multiplicar e se especializar no tecido ao qual pertencem).

Muitos estudos mostram esse tipo de redução no potencial regenerativo com o avanço da idade. Trabalhos com células-tronco de modelos animais distintos (ratos e coelhos) evidenciaram um menor número de células viáveis em cultura, quando essas provinham de animais mais velhos, sugerindo uma diminuição da capacidade proliferativa (Fibbe e Noort, 2003; Stenderup et al., 2003; Stenderup et al., 2004). Este fato de a regeneração estar ligada à idade cronológica é facilmente respaldado em várias áreas da medicina como, por exemplo, a diferença da velocidade da consolidação de fraturas entre crianças e idosos.

Na mesma linha de estudo, Shi et al. (2005) , utilizando CTTA extraídas da bolsa de gordura da região inguinal de ratos com seis e 60 dias de idade, mostraram que células de animais jovens têm taxa de proliferação maior em relação às células de ratos adultos. Porém, ambas parecem mostrar níveis similares de diferenciação osteogênica *in vitro*, indicando que o potencial de plasticidade osteogênica (diferenciação em tecido ósseo) de células mesenquimais indiferenciadas de tecido adiposo se mantém com o envelhecimento do indivíduo.

Esse fato tem sido confirmado em trabalhos de revisão de literatura como o de Verfaillie (2002), ao afirmar que CT adultas mantêm um grande potencial de diferenciação.

Assim, embora haja uma diminuição na capacidade proliferativa de CT de indivíduos mais velhos, seu potencial para diferenciação em tecidos distintos não diminui com o envelhecimento. Esta conclusão respalda e incentiva a tendência atual para pesquisa com células-tronco de organismos adultos, pois o principal argumento usado por

seus opositores é que elas não apresentariam uma boa capacidade plástica quando comparadas com CTE (Strem et al., 2005).

Tratando-se de células-tronco de origem embrionária, alguns aspectos negativos, comentados a seguir, são particularmente relevantes, o que limita significativamente a sua utilização tanto em pesquisas como principalmente na clínica médica.

Uma das dificuldades é a de obtenção, pois essas células devem ser de linhagens retiradas da MCI de embriões na fase de blastocisto. Técnica complexa, restrita a poucos centros e com êxito muito baixo.

No Brasil, a Lei de Biosegurança 11.105 de 24 de março de 2005, regulamenta a utilização de embriões humanos para fins de pesquisas, e disponibiliza somente aqueles gerados por fertilização *in vitro*, e que sejam inviáveis ou estejam congelados há pelo menos três anos, o que deve ser acompanhado da devida autorização dos genitores (Imprensa Nacional, 2005).

As CTE apresentam ainda alta tendência ao desenvolvimento de teratoma, principalmente quando essas células são empregadas ainda não diferenciadas (Koch et al., 2006).

Instabilidade cromossômica (Draper et al., 2004; Cowan et al., 2004, Verlinsky et al., 2005) por diferenciação anômala (mutações) pela exposição a fatores mitógenos presentes nos meios de cultura e contaminação por produtos animais usados continuamente em cultura celular (Martin et al., 2005), são também pontos de grande preocupação por parte dos cientistas no uso das CTE.

Na atual pesquisa, para avaliar a real capacidade proliferativa das CTTA, realizou-se, por citometria de fluxo, avaliação do ciclo celular de amostras em cultura com 100% de confluência.

A pesquisa evidenciou que a grande maioria das células encontravam-se quiescentes, $70,8\% \pm 4,8$; seguida pelas apoptóticas, $22,1\% \pm 5,1$. As células, com alta capacidade replicativa (fase S do ciclo celular) $1,4\% \pm 0,2$, e as que se encontravam replicando (fase G2/M), $0,9\% \pm 0,1$, apresentavam-se em proporções bem reduzidas. O estudo também mostrou que as CTTA, em cultura, como tendem a se estabilizar quando atingem confluência máxima em monocamada, não apresentam proliferação descontrolada e assim não propiciam mutações e desenvolvimento de tumores.

A comparação da proporção das células em apoptose ($22,1\%$), frente às células em processo de síntese e início de divisão celular (fases S e G2/M - $2,4\%$) nessas culturas com 100% de confluência é um sinal de expansão controlada. Muitos dos genes que condicionam a proliferação celular, oncogêneses e gêneses supressores de tumores estão, também, envolvidos na iniciação do processo de apoptose, e a inibição por si só do processo de apoptose leva à sobrevivência prolongada e à manutenção das células. Assim, a apoptose representa um dos mecanismos de eliminação seletiva de células cuja sobrevivência poderia prejudicar o bem estar do organismo.

Outro aspecto que gera grande apreensão e limita uma ampla utilização clínica das CTE é que, procedendo-se ao transplante de CTE, o indivíduo receptor estará recebendo tecido alógeno, com células imunologicamente competentes. Essas podem causar uma reação do transplante contra o hospedeiro por incompatibilidade do sistema HLA, podendo haver necessidade da utilização de imunossupressores, com toda a carga de efeitos adversos, ao longo da vida do indivíduo receptor.

Contudo, as células-tronco adultas se mostram cada vez mais adequadas à pesquisa médica: não propiciam o desenvolvimento de teratomas; apresentam mutações menos frequentes que as embrionárias; sua coleta é menos laboriosa; podem ser obtidas de

múltiplas fontes doadoras e não apresentam problemas de histocompatibilidade, por serem de origem autóloga. Menos importante cientificamente, porém de valiosa repercussão, o uso de CTA também não suscita discussões, sejam elas de caráter religioso, ético (Findikli et al., 2006), político (Susan, 2005) ou legal.

6.2. Fonte de células-tronco adultas: hematopoiética versus mesenquimal

Posteriormente ao estabelecimento das vantagens das CTA frente às embrionárias, veio o embate dos defensores das CTA de origem hematopoiética frente aos apologistas das células-tronco adultas mesenquimais.

A partir dos trabalhos pioneiros de Friedenstein et al. (1970), que versavam sobre as CTM, houve uma grande lacuna científica, e poucos autores escreveram sobre o tema. Porém, nos últimos 5 anos, inúmeros trabalhos têm sido publicados, colocando as CT de origem mesenquimal como objeto de grande interesse científico. Segundo Covas (2006), em 1997, somente dois trabalhos, na literatura mundial, abordavam o tema; já em 2005, 577 trabalhos foram publicados. Esse tipo de progressão no interesse, visto poucas vezes na área médica, mostra uma busca por recursos terapêuticos de vanguarda que possam ter ampla aplicação na medicina.

Mesmo com esse interesse crescente pelas CTM, a principal fonte doadora de células indiferenciadas não se alterava: a medula óssea continuava sendo a região mais abordada para esse fim. Possivelmente, pela experiência dos pesquisadores na utilização, há décadas, de células medulares de linhagem hematopoiéticas no tratamento de doenças hematológicas (Lang et al., 2003) e nos transplantes de medula (ou transplante de células-tronco

hematopoiéticas), que, de acordo com Zago (2006), a medula óssea continua sendo a única modalidade terapêutica com CT humanas que faz parte da prática médica em escala global.

Porém, recentemente, surgiram alguns questionamentos acerca das células mesenquimais captadas da medula óssea. A extração dessas células é um procedimento doloroso, com significativa morbidade (Anderlini et al., 2001) e com baixo rendimento celular (Zuk et al., 2001).

Esse baixo rendimento inicial obriga a uma expansão *ex vivo* para obter um número relevante de células para um experimento ou para utilização clínica (Ogawa et al., 2004; Lin et al., 2006), o que demanda mais tempo e mais recursos, além do risco de contaminação e de perda celular.

A coleta de CTMO é realizada, através de punção aspirativa na crista ilíaca, sob anestesia geral. O volume aspirado é muitas vezes insatisfatório, sendo necessário proceder a punções múltiplas e bilaterais para se obter volume significativo (De Ugarte et al., 2003b)

Outro inconveniente, a morbidade do procedimento de aquisição de CTMO, é constatado por vários autores (Auquier et al., 1995; Nishimori et al., 2002), como dor prolongada no local das punções, com limitação de movimentação e taxas de infecção não desprezíveis.

Assim como na medula, as células-tronco, provenientes de sangue de cordão umbilical, tão alardeadas nos últimos anos, principalmente pelos bancos privados de armazenamento, também vêm se mostrando em número insuficiente. Necessita-se de grande expansão *in vitro* para se atingir um número adequado à utilização clínica, ou até mesmo tendo que se dispor de duas unidades distintas (simultaneamente), como mostra Bittencourt et al. (2002).

Além disso, a possível utilização clínica das CT de cordão é extremamente restrita (até o momento apenas para algumas poucas doenças hematológicas), levando a uma baixa probabilidade de uso (cerca de uma para 20.000) associado a custos onerosos de armazenamento.

Essas significativas limitações levaram à busca de novas fontes doadoras de células mesenquimais indiferenciadas, de modo a minimizar o desconforto e a morbidade (Goessler et al., 2005).

Outro objetivo seria eliminar ou diminuir substancialmente a necessidade de expansão celular em cultura, o que motivou a procura por um tecido doador que fosse abundante no organismo.

Associado a esses pontos, sua captação deveria ser tecnicamente fácil, para não ficar restrita a poucos centros.

Boa plasticidade, alto rendimento celular (número de células-tronco por grama/mililitro de tecido doador) e grande potencial proliferativo colocavam-se como outras diretrizes na procura pela fonte ideal de CT.

Na busca pelo tecido doador ideal para fornecer CTM, as pesquisas apontaram para células-tronco isoladas do tecido adiposo (CTTA) (Zuk et al., 2001).

Assim como a medula óssea, o tecido adiposo deriva do folheto embrionário mesodérmico e possui uma população heterogênea de células estromais: adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais, células musculares lisas e células mesenquimais indiferenciadas (Hausman, 1981; Hausman, 1982; Loffler e Hauner, 1987).

O tecido adiposo apresenta indiscutível vantagem como fonte de células-tronco (Kokai et al., 2005; Parker e Katz, 2006) pela facilidade de obtenção por meio de lipoaspiração ou lipectomia, baixa morbidade

à extração, elevado rendimento celular (Zhu et al., 2008), rápida expansão em cultura e principalmente pelo grande volume de tecido doador disponível (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; De Ugarte et al., 2003b; Bunnell et al., 2008).

Essas características associadas à possibilidade de criopreservação (preservação e manutenção da viabilidade e integridade funcional das células após o descongelamento) (Aird et al., 1992 ; Aust et al., 2004), colocam o tecido adiposo como o grande instrumento atual em biotecnologia, como evidenciado por Gabbay et al. (2006) e exposto nos tópicos que se seguem.

6.3. Nomenclatura

Na literatura são encontradas as seguintes denominações para células-tronco provenientes do tecido adiposo: células precursoras de adipócitos (Hauner et al., 1989); células-tronco derivadas do tecido adiposo (Gimble e Guilak., 2003); pré-adipócitos; fração estroma vascular; células estromais derivadas do tecido adiposo (Safford et al., 2002); células multipotentes derivadas do tecido adiposo; células-tronco adultas do tecido adiposo (Miranville et al., 2004; Mitchell et al., 2006); células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo e células-tronco mesenquimais. Na atual pesquisa, utiliza-se a denominação células-tronco do tecido adiposo (CTTA) assim como Fraser et al. (2006), pois a literatura recente tem adotado essa terminologia.

6.4. Células-tronco do tecido adiposo

6.4.1. Facilidade de obtenção: lipoaspiração ou lipectomia

Pode-se obter tecido adiposo por lipectomia (ressecção tecidual com utilização de instrumentos incisivos, como tesoura e bisturi) ou por

lipoaspiração (aspiração de tecido adiposo através de cânulas conectadas a uma fonte que forneça pressão negativa).

A realização de lipoaspiração com propósito de captação de células-tronco não requer grandes volumes, sendo facilmente exequível com anestesia local.

Lipoaspiração atualmente é a cirurgia plástica eletiva mais realizada no mundo. No Brasil, em 2004, foram realizados 198.137 procedimentos, segundo dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica (SBCP-2004); enquanto, nos Estados Unidos da América (EUA), 478.251 lipoaspirações foram realizadas naquele mesmo ano, de acordo com a Sociedade Americana de Cirurgia Plástica Estética (*American Society for Aesthetic Plastic Surgery* - ASAPS, 2005).

Por se tratar de um procedimento usual no dia-a-dia do cirurgião plástico, as técnicas de lipoaspiração são muito bem estabelecidas e dominadas por um grande número de médicos, além de dispensar aparato sofisticado, principalmente em se tratando de volumes pequenos (cerca de 200 ml) como na coleta de material para captação das células-tronco (Strem et al., 2005).

O presente estudo mostra que a lipoaspiração da gordura localizada no dorso dos coelhos é um procedimento facilmente executável, com instrumentais usuais e com um tempo cirúrgico exíguo (11 minutos em média para captação de cerca de 10ml de gordura).

6.4.2. Baixa morbidade na extração

Lipectomia e lipoaspiração são procedimentos com elevado grau de segurança, quando executados por profissional habilitado. Na Alemanha, Lehnhaedt et al. (2008) estudaram, retrospectivamente, as mortes de pessoas que foram submetidas a cirurgia plástica entre 1998

e 2002. Observaram cerca de uma morte a cada 50.000 lipoaspirações e uma complicação grave a cada 14.000 procedimentos, nas quais se retiravam, em média 3,75 litros de gordura.

Segundo a Sociedade Americana de Cirurgia Dermatológica, nenhuma morte foi registrada em 66.570 procedimentos realizados entre 1994 e 2000 e 4.527 (0,068%) complicações adversas importantes foram constatadas (Housman et al., 2002). Dados norte americanos e germânicos mostram baixa morbidade, porém estatisticamente diferentes, provavelmente devido aos menores volumes retirados nos procedimentos realizados pelos dermatologistas dos EUA.

Na atual pesquisa, dos 11 coelhos submetidos a lipoaspiração, e nos 13 em que se procedeu à lipectomia, não se observou nenhuma morte ou complicação pós-operatória.

6.4.3. Grande volume de tecido doador

O volume do TA pode sofrer variações ao longo da vida do indivíduo. Pequenos aumentos podem ser devidos a uma variação no ritmo de acúmulo lipídico no interior de adipócitos (hipertrofia); por outro lado, grandes aumentos geralmente ocorrem à custa da geração de novos adipócitos (hiperplasia), (Hausman et al., 2001; Rupnick et al., 2002). Esses aumentos são mediados pelas CT e por células progenitoras do tecido adiposo (pré-adipócitos) (Rodeheffer et al., 2008).

Stocchero et al. (2006), em trabalho intitulado *Liposuctionable Fat: A Hypothetic Model*, procuraram avaliar o máximo de gordura lipoaspirável em um indivíduo. Após aspirarem 1.643 áreas corporais em 506 indivíduos, concluíram que é possível obter tecido adiposo em uma proporção de 7% do peso corporal em mulheres e 4% do peso corporal em homens.

Utilizando-se os dados do referido autor, para efeito de cálculo, poderíamos obter de 2,8 a 4,9 kg de tecido adiposo lipoaspirável em um indivíduo adulto (70 kg). Essa quantidade de tecido doador de CT supera enormemente qualquer outra fonte disponível no organismo.

Os coelhos NZB, da atual pesquisa, tinham em média 2590g de peso corporal, com um acúmulo adiposo dorsal de cerca 17,2g (0,6% do peso do animal) apenas naquela região abordada.

6.4.4. Rendimento elevado

O rendimento celular, número de CT por mililitro de tecido utilizado, é outro fator preponderante quando se analisa a fonte doadora ideal, que, teoricamente, deve ter uma grande concentração de CT em pequena alíquota tecidual.

Após o procedimento de extração das CT, muitas vezes a quantidade se mostra insuficiente para uma pronta utilização clínica ou em pesquisa. Nesses casos há necessidade de expansão *in vitro* para se obter a um número adequado de células (Ogawa et al., 2004).

Quanto menor é a quantidade inicialmente captada de CT, mais longo é o tempo requerido para a expansão em cultura. Na mesma proporção, aumenta-se o risco de contaminações, por múltiplas manipulações celulares. Além disso, observa-se aumento da frequência de alterações cromossômicas, por exposição prolongada aos fatores mitogênicos, presentes no meio de cultura.

Enquanto na medula óssea, em 10^5 células, é possível obter apenas uma CT (Rickard et al., 1996; Bruder et al., 1997; Pittenger et al., 1999), no tecido adiposo, é possível obter de 1×10^6 CT/g de gordura (Zhu et al., 2008) ou 2 a 3×10^8 células a partir de 300 ml de produto

lipoaspirado (Zuk et al., 2001); isto corresponde a um rendimento aproximado de 6×10^5 células/ml.

Em uma revisão de literatura, autores como D'Ippolito et al., (1999) e Muschler et al., (2001) mostraram que, em um indivíduo adulto normal, em 40 ml de medula óssea, existe cerca de $2,4 \times 10^4$ células mesenquimais indiferenciadas (6×10^2 células/ml). Comparando esses dados com gordura lipoaspirada, nota-se uma surpreendente diferença. Aust et al. (2004), submetendo paciente a lipoaspiração sob anestesia local, conseguiram, em média, cerca de 1×10^6 CT em 200 ml de tecido lipoaspirado (5×10^3 células/ml). Portanto, um rendimento celular nove vezes maior quando o tecido doador é o adiposo.

Trabalho na mesma linha e com resultado igualmente satisfatório foi realizado por Strem et al. (2005) no qual, estudando 56 indivíduos, constataram um rendimento celular de 5.000 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de tecido adiposo ao passo que, em material extraído da medula óssea, obtiveram apenas 100 a 1.000 UFC por ml. Diferença também substancial de rendimento celular a favor das CT provenientes do tecido adiposo frente ao aspirado medular.

Por ser o tecido adiposo a fonte de CT com maior potencial de rendimento, ele é visto como a grande perspectiva nas pesquisas em engenharia tecidual e medicina regenerativa, como fonte ideal de células indiferenciadas. Uma indicação da tendência em se utilizar CTTA é o número crescente de relevantes publicações a respeito desse tema (Cowan et al., 2004; Kokai, et al., 2005; Choi et al., 2006; Gabbay et al., 2006; Clavijo-Alvarez et al., 2006; Boquest et al., 2007).

O método utilizado, no presente trabalho, para o isolamento das CTTA, que consistia na digestão enzimática do tecido adiposo de coelhos, se mostrou rápido e efetivo. Na atual pesquisa obteve-se um rendimento celular de 1×10^5 células/ml de tecido adiposo, que corresponde a 1×10^6 CT por animal.

6.5. Caracterização das células-tronco

A identificação e a caracterização precisa das células-tronco são feitas a partir da expressão de receptores, que são marcadores de superfície celular. Sua análise em conjunto indica as características funcionais e biológicas da origem da linhagem celular em questão (*National Institutes of Health and Human Services*, 2001).

As células-tronco podem ser corretamente caracterizadas com o auxílio de instrumentos como microscópio óptico e citômetro de fluxo, que permitem, respectivamente, visualizar as células, quantificar e analisar parâmetros físicos e biológicos múltiplos.

Inúmeros marcadores imunofenotípicos estão presentes nas CTTA, porém sem especificidade. Devido à ausência da expressão específica dos marcadores que permitem sua identificação, torna-se necessário analisar um conjunto deles para sua correta caracterização (De Ugarte et al., 2003a).

Na atual pesquisa, o estudo morfológico das CTTA evidenciou que a população celular se mostrava homogênea, e a expressão dos marcadores de superfície caracterizou tais células como indiferenciadas.

Nesse trabalho a expressão do marcador CD90 mostrou-se específico, representando em média $80,6\% \pm 0,7$, o que caracteriza a origem mesenquimal indiferenciada dessas células.

Na literatura, Zuk et al. (2002), De Ugarte et al. (2003a), Miyazaki et al. (2005) e Bobis et al. (2006) mostraram a efetiva expressão do CD90 em populações de células-tronco isoladas tanto da medula óssea quanto do produto lipoaspirado humano. Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos nesse estudo.

6.6. Plasticidade efetiva

Vários estudos mostram que o tecido adiposo contém uma população de CT pluripotentes, capazes de se diferenciar em várias linhagens mesenquimais. Um exemplo é o trabalho de Lee et al. (2003b), que usaram CTTA de ratos *Lewis*, as quais se diferenciaram em linhagens adipogênica e osteogênica *in vitro*, apontando, ainda a formação de osso e gordura *in vivo*.

Planat-Bernard et al. (2004) estudaram a plasticidade de células do tecido adiposo humano, mostrando que células adipocitárias maduras podem se desdiferenciar em células imaturas. Essas apresentaram ainda potencial para se diferenciar em adipócitos *in vitro* e *in vivo*, além de poderem adquirir o fenótipo endotelial, participando da formação de vasos sanguíneos *in vivo*. Estas observações sugerem que adipócitos e células endoteliais apresentam um precursor comum, estando essas células indiferenciadas realmente presentes no tecido adiposo.

A capacidade da CTTA, para se diferenciar em várias linhagens, aparece quando estas são cultivadas em meios específicos, como nos estudos abaixo.

Quando a cultura é realizada em presença de ácido ascórbico, β -glicerolfosfato, dexametasona e análogos da vitamina D, há diferenciação para osteoblasto (Halvorsen et al., 2001; Zuk et al., 2002), com marcadores de osteogênese.

Em ambiente tridimensional, e suplementando-se o meio com fator de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$ - *transforming growth factor* - fator transformador de crescimento), podem ser evidenciados marcadores específicos de condrogênese, como colágeno tipo II (Winter et al., 2003; Dragoo et al., 2003).

Obtém-se diferenciação adipocitária quando as células são cultivadas na presença de isobutilmetilxantina, o que as leva à síntese de ácidos graxos e acúmulo de gotículas de gordura no citoplasma (James et al., 1999) .

A presença de dexametasona e hidrocortisona, na cultura, eleva a expressão de marcadores de músculo (Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2002), inclusive a diferenciação em cardiomiócitos (Rangappa et al., 2003; Gaustad et al., 2004; Planat-Benard et al., 2004); que também são obtidos com outros indutores como TGF- α 1 (Behfar et al., 2002) ou azacitidina (Pittenger e Martin, 2004).

Suplementando-se o meio com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento *insulin-like* (IGF-1), as células apresentam diferenciação endotelial (Miranville et al., 2004).

Ashjian et al. (2003), utilizando insulina e indometacina em culturas de células mesenquimais, após algum tempo, notaram atributos de células neuronais.

Devido a esse vasto poder plástico, associado às vantagens na captação e ao grande potencial proliferativo (Dai et al., 2005; Mischen et al., 2008), além de uma interação satisfatória com biomateriais (De Girolamo et al., 2008), as CTTA colocam-se em posição de destaque nas pesquisas da atualidade (Bajada et al., 2008).

6.7. Linhas de pesquisa

Na literatura não se encontrou unanimidade ou uma tendência de utilização de algum modelo experimental específico nas linhas de pesquisa com células-tronco (Ichioka et al., 2004; Lee et al., 2003; Neels et al., 2004; Simman et al., 2005; Dudas et al., 2006; Buján et al., 2006)

Muitos trabalhos utilizam ratos *Wistar*, ou camundongos isogênicos, modelos experimentais consagrados e úteis em pesquisas no âmbito da clínica médica, para testes de novas drogas ou terapias com CT para afecções de tratamento clínico.

O uso de CTTA autólogas, nesses modelos experimentais habituais em ratos, tem sido outro entrave. Como são animais muito pequenos, apresentam escassas áreas com tecido adiposo em volume significativo para a captação de CT.

Alguns centros têm utilizado espécies distintas em seus experimentos (Bai et al., 2004) (por exemplo, captam CTTA humano e utilizam as mesmas células em experimentos com coelhos ou ratos *Wistar*), exatamente pela falta de um modelo experimental do qual se pudesse captar gordura suficiente para o isolamento das CT e, ao mesmo tempo, possuísse uma superfície corporal satisfatória aos experimentos cirúrgicos propostos. Pela ocorrência de viés em suas pesquisas, seja pela reação inflamatória exuberante, ou pelo processo de rejeição, não é mais aceito, por trazer prejuízo aos estudos e tirar a credibilidade das pesquisas com CTTA no âmbito da cirurgia plástica.

Procurou-se então estabelecer um modelo experimental adequado para o estudo das CTTA, que pudesse ter aplicação em várias linhas de pesquisa, sobretudo em cirurgia plástica.

A cirurgia plástica lida com diversos tecidos e possui várias áreas de atuação; necessita, assim, de um modelo experimental versátil, que satisfaça às múltiplas linhas de atuação (queimaduras e substitutos cutâneos, reconstrução de ossos da face, malformações congênitas, reparação de sequelas traumáticas e oncológicas, substitutos condrais, regeneração de nervos periféricos e feridas).

Além dessas ponderações, outros aspectos técnicos dificultam a escolha de um modelo experimental ideal que satisfaça amplamente a expectativa dos pesquisadores.

Ao se optar por trabalhar com células-tronco de linhagem humana, necessita-se de animais de experimento imunossuprimidos (Clavijo-Alvarez et al., 2006; Portinho et al., 2006; Miyazaki et al., 2008; Kurita et al., 2008) quer por uso de imunossupressores quer por utilização de animais provenientes de linhagem geneticamente estabelecida (como, por exemplo, os camundongos atímicos), para que não haja rejeição ao xenoenxerto. Estes têm manejo complexo no laboratório, altas taxas de mortalidade, além da dificuldade de manipulação cirúrgica

Outra opção seriam os animais de médio porte, como ovinos e suínos, que possuem abundante área de tecido adiposo como fonte doadora de células-tronco, porém envolvem trabalhosa e dispendiosa manutenção em laboratório, uma vez que requerem grandes espaços físicos para seu manejo e poucos biotérios conseguiriam se adequar satisfatoriamente para trabalhar com eles, criando dificuldades ou até mesmo inviabilizando trabalhos com um número significativo de animais (Cui et al., 2007).

Quanto aos animais de pequeno porte, como os ratos *Wistar* (modelo experimental dos mais consagrados), esses não apresentam dificuldade no manejo. Porém, a escassez de tecido adiposo impossibilita a pronta utilização dos mesmos, pois não têm número de células suficientes (Lu et al., 2008), sendo necessária uma expansão demorada em laboratório, podendo inviabilizar a pesquisa, seja pelo custo elevado, tempo prolongado de espera ou a dificuldade de se atingir número suficiente de CT.

Na presente pesquisa, optou-se, então, pelo coelho *Oryctolagus cuniculus*, da raça Nova Zelândia Branco, animal de porte corporal satisfatório à realização de procedimentos cirúrgicos variados, fácil manejo em laboratório e custo aceitável, como fizeram Dudas et al. (2006) e Salles et al. (2006).

7. Conclusões

O coelho *Oryctolagus cuniculus* da raça Nova Zelândia Branco pode ser considerado um modelo adequado, pelo grande e localizado acúmulo de tecido adiposo.

- A captação tecidual por lipoaspiração foi rápida, eficaz e com baixa morbidade.
- O método de isolamento celular por digestão enzimática mostrou ser eficiente e facilmente exequível.
- A bolsa de tecido adiposo apresenta quantidade significativa de células-tronco.
- As células apresentam características de indiferenciação.

Todas essas vantagens fazem com que este modelo possa ser facilmente reprodutível, contribuindo para o estudo das células-tronco do tecido adiposo.

8. Anexos

Anexo 1 - Aprovação do estudo pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). O título foi modificado posteriormente.

APROVAÇÃO

A 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, em sessão de 14.12.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1143/05**, intitulado: **"Influência das células tronco adultas na vascularização de retalho cutâneo em coelho."** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX, 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra Consuelo Junqueira Rodrigues**
Pesquisador (a) Executante: **Dr. Fabrício Carvalho Torres**

CAPPesq, 14 de Dezembro de 2005.

Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno Pereira
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Clínica Cirúrgica - FMUSP

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo 2 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)						
The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.						
Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.						
Comparison				Mean Difference	q	P value
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	48hs		-0.03330	1.304	ns P>0.05
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2407	9.427	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7467	29.245	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	48hs vs 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2074	8.123	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	48hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7134	27.941	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	72hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.5060	19.818	*** P<0.001
Difference				Mean Difference	95% Confidence Interval	
					From	To
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	48hs		-0.03330	-0.1319	0.06535
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2407	-0.3393	-0.1421
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7467	-0.8453	-0.6481
1,5x10 ⁴	48hs - 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2074	-0.3060	-0.1088
1,5x10 ⁴	48hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7134	-0.8120	-0.6148
1,5x10 ⁴	72hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.5060	-0.6046	-0.4074

Anexo 3 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de 5×10^5 células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison				Mean Difference	q	P value	
=====				=====	=====	=====	
5x10 ⁵	24hs	vs	5x10 ⁵ 48hs	0.1680	5.374	**	P<0.01
5x10 ⁵	24hs	vs	5x10 ⁵ 72hs	0.1920	6.141	***	P<0.001
5x10 ⁵	24hs	vs	5x10 ⁵ 96hs	-0.1850	5.917	**	P<0.01
5x10 ⁵	48hs	vs	5x10 ⁵ 72hs	0.02400	0.7677	ns	P>0.05
5x10 ⁵	48hs	vs	5x10 ⁵ 96hs	-0.3530	11.291	***	P<0.001
5x10 ⁵	72hs	vs	5x10 ⁵ 96hs	-0.3770	12.059	***	P<0.001

Difference				Mean Difference	95% Confidence Interval	
=====				=====	From	To
=====				=====	=====	=====
5x10 ⁵	24hs	-	5x10 ⁵ 48hs	0.1680	0.04721	0.2888
5x10 ⁵	24hs	-	5x10 ⁵ 72hs	0.1920	0.07121	0.3128
5x10 ⁵	24hs	-	5x10 ⁵ 96hs	-0.1850	-0.3058	-0.06421
5x10 ⁵	48hs	-	5x10 ⁵ 72hs	0.02400	-0.09679	0.1448
5x10 ⁵	48hs	-	5x10 ⁵ 96hs	-0.3530	-0.4738	-0.2322
5x10 ⁵	72hs	-	5x10 ⁵ 96hs	-0.3770	-0.4978	-0.2562

Anexo 4 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison			Mean Difference	q	P value	
2,5x10 ⁵	24hs vs 2,5x10 ⁵	48hs	0.01300	0.2665	ns	P>0.05
2,5x10 ⁵	24hs vs 2,5x10 ⁵	72hs	0.04800	0.9839	ns	P>0.05
2,5x10 ⁵	24hs vs 2,5x10 ⁵	96hs	-0.3560	7.298	***	P<0.001
2,5x10 ⁵	48hs vs 2,5x10 ⁵	72hs	0.03500	0.7175	ns	P>0.05
2,5x10 ⁵	48hs vs 2,5x10 ⁵	96hs	-0.3690	7.564	***	P<0.001
2,5x10 ⁵	72hs vs 2,5x10 ⁵	96hs	-0.4040	8.282	***	P<0.001

Difference			Mean Difference	95% Confidence Interval	
				From	To
2,5x10 ⁵	24hs - 2,5x10 ⁵	48hs	0.01300	-0.1755	0.2015
2,5x10 ⁵	24hs - 2,5x10 ⁵	72hs	0.04800	-0.1405	0.2365
2,5x10 ⁵	24hs - 2,5x10 ⁵	96hs	-0.3560	-0.5445	-0.1675
2,5x10 ⁵	48hs - 2,5x10 ⁵	72hs	0.03500	-0.1535	0.2235
2,5x10 ⁵	48hs - 2,5x10 ⁵	96hs	-0.3690	-0.5575	-0.1805
2,5x10 ⁵	72hs - 2,5x10 ⁵	96hs	-0.4040	-0.5925	-0.2155

Anexo 5 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de $1,25 \times 10^5$ células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison		Mean Difference		q	P value	
1,25x10 ⁵	24hs vs 1,25x10 ⁵	48hs	-0.01400	0.4097	ns	P>0.05
1,25x10 ⁵	24hs vs 1,25x10 ⁵	72hs	-0.03300	0.9658	ns	P>0.05
1,25x10 ⁵	24hs vs 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3900	11.414	***	P<0.001
1,25x10 ⁵	48hs vs 1,25x10 ⁵	72hs	-0.01900	0.5561	ns	P>0.05
1,25x10 ⁵	48hs vs 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3760	11.004	***	P<0.001
1,25x10 ⁵	72hs vs 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3570	10.448	***	P<0.001

Difference		Mean Difference		95% Confidence Interval	
				From	To
1,25x10 ⁵	24hs - 1,25x10 ⁵	48hs	-0.01400	-0.1460	0.1180
1,25x10 ⁵	24hs - 1,25x10 ⁵	72hs	-0.03300	-0.1650	0.09901
1,25x10 ⁵	24hs - 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3900	-0.5220	-0.2580
1,25x10 ⁵	48hs - 1,25x10 ⁵	72hs	-0.01900	-0.1510	0.1130
1,25x10 ⁵	48hs - 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3760	-0.5080	-0.2440
1,25x10 ⁵	72hs - 1,25x10 ⁵	96hs	-0.3570	-0.4890	-0.2250

Anexo 6 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de 6×10^4 células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison				Mean Difference	q	P value	
6x104	24hs vs 6x104	48hs		-0.05000	2.320	ns	P>0.05
6x104	24hs vs 6x104	72hs		-0.08500	3.944	*	P<0.05
6x104	24hs vs 6x104	96hs		-0.5680	26.357	***	P<0.001
6x104	48hs vs 6x104	72hs		-0.03500	1.624	ns	P>0.05
6x104	48hs vs 6x104	96hs		-0.5180	24.037	***	P<0.001
6x104	72hs vs 6x104	96hs		-0.4830	22.413	***	P<0.001

Difference				Mean Difference	95% Confidence Interval	
					From	To
6x104	24hs - 6x104	48hs		-0.05000	-0.1333	0.03326
6x104	24hs - 6x104	72hs		-0.08500	-0.1683	-0.001738
6x104	24hs - 6x104	96hs		-0.5680	-0.6513	-0.4847
6x104	48hs - 6x104	72hs		-0.03500	-0.1183	0.04826
6x104	48hs - 6x104	96hs		-0.5180	-0.6013	-0.4347
6x104	72hs - 6x104	96hs		-0.4830	-0.5663	-0.3997

Anexo 7 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de 3×10^4 células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.
Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.

Comparison				Mean Difference	q	P value	
3x104	24hs vs 3x104	48hs		-0.1056	4.203	*	P<0.05
3x104	24hs vs 3x104	72hs		-0.2826	11.248	***	P<0.001
3x104	24hs vs 3x104	96hs		-0.7886	31.390	***	P<0.001
3x104	48hs vs 3x104	72hs		-0.1770	7.045	***	P<0.001
3x104	48hs vs 3x104	96hs		-0.6830	27.187	***	P<0.001
3x104	72hs vs 3x104	96hs		-0.5060	20.141	***	P<0.001

Difference				Mean Difference	95% Confidence Interval	
					From	To
3x104	24hs - 3x104	48hs		-0.1056	-0.2027	-0.008525
3x104	24hs - 3x104	72hs		-0.2826	-0.3797	-0.1855
3x104	24hs - 3x104	96hs		-0.7886	-0.8857	-0.6915
3x104	48hs - 3x104	72hs		-0.1770	-0.2741	-0.07993
3x104	48hs - 3x104	96hs		-0.6830	-0.7801	-0.5859
3x104	72hs - 3x104	96hs		-0.5060	-0.6031	-0.4089

Anexo 8 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de $1,5 \times 10^4$ células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)						
The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.						
Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.						
Comparison				Mean Difference	q	P value
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	48hs		-0.03330	1.304	ns P>0.05
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2407	9.427	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	24hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7467	29.245	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	48hs vs 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2074	8.123	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	48hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7134	27.941	*** P<0.001
1,5x10 ⁴	72hs vs 1,5x10 ⁴	96hs		-0.5060	19.818	*** P<0.001
Difference				Mean Difference	95% Confidence Interval	
					From	To
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	48hs		-0.03330	-0.1319	0.06535
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2407	-0.3393	-0.1421
1,5x10 ⁴	24hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7467	-0.8453	-0.6481
1,5x10 ⁴	48hs - 1,5x10 ⁴	72hs		-0.2074	-0.3060	-0.1088
1,5x10 ⁴	48hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.7134	-0.8120	-0.6148
1,5x10 ⁴	72hs - 1,5x10 ⁴	96hs		-0.5060	-0.6046	-0.4074

Anexo 9 - Análise estatística da curva de crescimento das CTTA na concentração de 7×10^3 células/ml.

One-way Analysis of Variance (ANOVA)						
The P value is < 0.0001, considered extremely significant. Variation among column means is significantly greater than expected by chance.						
Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test						
If the value of q is greater than 3.864 then the P value is less than 0.05.						
Comparison			Mean Difference	q	P value	
7x103	24hs vs 7x103	48hs	0.02185	1.189	ns	P>0.05
7x103	24hs vs 7x103	72hs	0.02130	1.159	ns	P>0.05
7x103	24hs vs 7x103	96hs	-0.6711	36.529	***	P<0.001
7x103	48hs vs 7x103	72hs	-0.0005500	0.02994	ns	P>0.05
7x103	48hs vs 7x103	96hs	-0.6929	37.719	***	P<0.001
7x103	72hs vs 7x103	96hs	-0.6924	37.689	***	P<0.001
Difference			Mean Difference	95% Confidence Interval		
				From	To	
7x103	24hs - 7x103	48hs	0.02185	-0.049130	0.09283	
7x103	24hs - 7x103	72hs	0.02130	-0.049680	0.09228	
7x103	24hs - 7x103	96hs	-0.6711	-0.7421	-0.6001	
7x103	48hs - 7x103	72hs	-0.0005500	-0.071530	0.07043	
7x103	48hs - 7x103	96hs	-0.6929	-0.7639	-0.6220	
7x103	72hs - 7x103	96hs	-0.6924	-0.7634	-0.6214	

[illegible]

Anexo 11 - Análise da média da população das CTTA pelo programa Cell Quest, evidenciando alta taxa de semelhança morfológica.

	Group A	Group B	Group C
Col. title	morfologia		
Mean	73.1		
Standard deviation (SD)	5.658		
Sample size (N)	8		
Std. error of mean(SEM)	2.000		
Lower 95% conf. limit	68.369		
Upper 95% conf. limit	77.831		
Minimum	64.400		
Median (50th percentile)	75.000		
Maximum	78.000		
Normality test KS	0.2711		
Normality test P value	0,0856		
Passed normality test?	Yes		

9. Referências

Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Cir Res*. 2004; 95:671-6.

Aird W, Labopin M, Gorin NC. Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 1992; 9:487-90.

Altman AM, Matthias N, Yan Y, Song YH, Bai X, Chiu ES, Slakey DP, Alt EU. Dermal matrix as a carrier for in vivo delivery of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials*. 2008; 29:1431-42.

American Society for Aesthetic Plastic Surgery. Cosmetic surgery quick facts 2005. Citado em 13/09/2008. Disponível em <http://surgery.org/press/proceduresfacts-asqf.php>.

Amint M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomsom JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000; 227:271-8.

Anderlini P, Rizzo JD, Nugent ML, Schmitz N, Champlin RE, Horowitz MM. Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International bone marrow registry and European Group for Blood and Marrow Transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2001; 27:689-92.

Andreoni C, Moreau I, Rigal D. Long-term culture of human bone marrow. Characterization of adherent cells in flow cytometry. *Exp Hematol*. 1990; 18:431-7.

Arthur A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J Cell Physiol*. 2009; 218:237-45.

Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, De Ugarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*. 2003; 111:1922-31.

Ashton BA, Allen TD, Howlett CR, Eaglesom CC, Haattori A, Owen ME. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop*. 1980; 151:294-307.

Auquier P, Macquart-Moulin G, Moatti JP, Blache JL, Novakovitch G, Blaise D, Faucher C, Viens P, Maraninchi D. Comparison of anxiety pain and discomfort in two procedures of hematopoietic stem cell collection: leukocytapheresis and bone marrow harvest. *Bone Marrow Transplant*. 1995; 16:541-7.

Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, Du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004; 6:7-14.

Bab I, Howlett CR, Ashton BA, Owen ME. Ultrastructure of bone and cartilage formed in vivo in diffusion chambers. *Clin Orthop*. 1984; 187:243-54.

Bai JZ, Ding WM, Liu ZJ, Yu MJ, Tian JH, Wang F, Du J, Zhang XY, Li LS, Shen L. Transferrin receptor expression of human mesenchymal stem cells and in vitro tracking by autoradiography after transplantation in spinal cord. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2004; 18;36:276-80.

Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2:169-83.

Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Pucat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J*. 2002; 16:1558-66.

Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, Dal Cortivo L, Marolleau JP, Garnier F, Ribaud P, Gluckman E. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 2002; 99:2726-33.

Bobis S, Jarochoa D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical application. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44:215-230.

Boquest AC, Noer A, Sorensen AL, Vekterud K, Collas P. Methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. *Stem Cells*. 2007; 25:852-61.

Bruder JE, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self removal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive sub cultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 1997; 64:278-94.

Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008; 45:115-20.

Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first trimester fetal blood, liver and bone marrow. *Blood*. 2001; 98:2396-402.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007; 213:341-7.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9:641-50.

Chajchir A, Fabrizio D, Chajchir G, Celi E. Growth factors in plastic surgery. *Aesthetic Plast Surg*. 2005; 29:295-9.

Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang S-F, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endo*. 1994; 134:277.

Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen Med*. 2009; 4:109-17

Choi YS, Cha SM, Lee YY, Kwon SW, Park CJ, Kim M. Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345:631-7.

Clavijo-Alvarez JA, Rubin JP, Bennett JMS, Nguyen VT, Dudas JBS, Underwood C, Marra KG. A novel perfluoroelastomer seeded with adipose-derived stem cells for soft-tissue repair. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 118:1132-1142.

Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, Breitbart AS. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117: 857-63.

Covas DM. Células-tronco mesenquimais. In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006, p.35-48.

Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Wirmeyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, MacMahon AP, Powers D, Melton DA. Derivation of embryonic stem cell lines from human blastocysts. *New Engl J Med*. 2004; 350:1353-6.

Cuenca-López MD, Zamora-Navas P, García-Herrera JM, Godino M, López-Puertas JM, Guerado E, Becerra J, Andrades JA. Adult stem cells applied to tissue engineering and regenerative medicine. *Cell Mol Biol*. 2008; 54:40-51.

Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, Yin S, Liu W, Cao Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*. 2007; 28:5477-86.

Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, et al. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. 2005; 112:214-23.

DATASUS (2007). Citado em 01/09/2008. Disponível em <http://www.datasus.gov.br>.

De Girolamo L, Sartori MF, Arrigoni E, Rimondini L, Albisetti W, Weinstein RL, Brini AT. Human adipose-derived stem cells as future tools in tissue regeneration: osteogenic differentiation and cell-scaffold interaction. *Int J Artif Organs*. 2008; 31:467-79.

Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res*. 1999; 14:700-9.

De Ugarte DA, Zuk PA, Elbarbart A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003a; 89:267-70.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003b; 174:101.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999; 14:1115-22.

Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pad. *J Bone Joint Surg*. 2003; 85:740-7.

Draper SJ, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, Meisner I, Zwaka T, Thomson JA, Andrews PW. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultures human embryonic stem cells. *Nat Biotech*. 2004; 22:53-4.

Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, Penascino VM, Mooney MP, Jiang S, Rubin JP, Losee JE. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg*. 2006; 56:543-8.

Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, Tsompanakou A. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant*. 1997; 20:637-8.

Fibbe WE, Noort WA. Mesenchymal stem cell and hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Acad Sci*. 2003; 996:235-44.

Findikli N, Candan NZ, Kahraman S. Human embryonic stem cell culture: current limitations and novel strategies. *Reprod Biomed Online*. 2006; 13:581-90.

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*. 1956; 177:452-4.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006; 24:150-4.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970; 3:393-403.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6:230-47.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of hematopoietic tissues. Cloning in vitro and transplantation in vivo. *Transplantation*. 1974; 17:331-40.

Friedenstein AJ, Piatetzky SII, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966; 16:381-90.

Gabbay JS, Heller JB, Justin B, Scott A, Zuk PA, Spoon DB, Wasson KL, Jarrahy R, Benhaim P, Bradley JP. Osteogenic potential of human adipose-derived stem cells in 3-dimensional matrix. *Ann Plast Surg*. 2006; 57:89-93.

Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula including Crohn's disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008; 8:1417-23.

Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 314:420-7.

Gengozian N, Urso IS, Congdon CC, Conger AD, Makinodan T. Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1957; 96:714-20.

Gimble JM, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003; 5:362-9.

Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989; 321:1174-8.

Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with adult stem cells in reconstructive surgery. *Int J Mol Med*. 2005; 15:899-905.

Gomillion CT, Burg KJ. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27:6052-63.

Grigoradis A, Heersche JNM, Aubin J. Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 1988; 106:2139-51.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:13625-30.

Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimple JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2001; 7:729-41.

Hauner H, Entehrenmann G, Wabistch MGD, Aillaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest.* 1989; 84:1663-70.

Hauner H, Schmid P, Pfeiffer EF. Glucocorticoids and insulin promote the differentiation of human adipocyte precursor cells into fat cells. *J Clin Endocrinol.* 1987; 64:832-5.

Hausman DB, Di Girolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001; 2:239-254.

Hausman GT, Campion DR. Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. *J Anim Sci.* 1982; 55:1336-42.

Hausman GT. Techniques for studying adipocytes. *Stain Technol.* 1981; 56:149-54.

Hausman TS, Lawrence N, Mellen BG, George MN, Filippo JS, Cervenky KA, De Marco M, Feldman SR, Fleischer AB. The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol Surg.* 2002; 28:971-8.

Hui JH, Li L, Teo YH, Ouyang HW, Lee EH. Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng.* 2005; 11:904-12.

Imprensa Nacional. Diário Oficial da União; Lei de Biosegurança 11.105 ; n.142, p.1, 28 de março de 2005.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE. Citado em 13/09/2008. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>.

Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, Lv Q, Nair LS, Doty SB, Laurencin CT. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:11099-104.

Jayne D, Tyndall A. Autologous stem cell transplantation for systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 2004; 13:168-76.

Koch CA, Jordan CE, Platt JL. Complement-dependent control of teratoma formation by embryonic stem cells. *J Immunol.* 2006; 177:4803-9.

Kokai LE, Rubin JP, Marra KG. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* 2005; 116:1453-60.

Koller MR, Manchel I, Palsson BO. Importance of parenchymal: stromal cell ration for the ex vivo reconstruction of human hematopoiesis. *Stem Cells.* 1997; 15:305-13.

Kurita M, Matsumoto D, Shigeura T, Sato K, Gonda K, Harii K, Yoshimura K. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121:1033-41.

Lang P, Handgretinger R, Niethammer D. Transplantation of highly purified CD34+ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood*. 2003; 101:163-6.

Lee HS, Crany GG, Merok JR, Tunstead JR, Hatcher NL, Panchaliganm K, Powers MJ, Sherley J. Clonal expansion of adult rat hepatic stem cell lines by suppression of asymmetric cell kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003a; 83:760-71.

Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, Laser J, Chen J, Kogon AJ, Nanda D, Grant RT, Breitbart AS. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*. 2003b; 50:610-7.

Lehnhardt M, Homann HH, Daigeler A, Hauser J, Palka P, Steinau HU. Major and lethal complications of liposuction: a review of 72 cases in Germany between 1998 and 2002. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121:396-403.

Lin Y, Chen X, Yan Z, Liu L, Tang W, Zheng X, Li Z, Qiao J, Li S, Tian W. Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem*. 2006; 285:69-78.

Löffler G, Hauner H. Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part II: The regulation of the adipogenic conversion by hormones and serum factors. *Klin Wochenschr*. 1987; 65:812-20.

Lorenz E, Uphoff ED, Reid TR, Shelton E. Modification of acute irradiation injury in mice and pigs by bone marrow injection. *Radiology*. 1951; 58:863-77.

Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121:50-8.

Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res*. 2006; 85:966-79.

Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cell express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*. 2005; 11:228-32.

Mason JM, Breitbart AS, Barcia M. Cartilage and bone regeneration using gene enhanced tissue engineering. *Clin Orthop*. 2000; 379(suppl): S171-8.

Mayani H. Composition and function of the microenvironment in human myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996; 10:1041-7.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004; 110:349-55.

Mischen BT, Follmar KE, Moyer KE, Buehrer B, Olbrich KC, Levin LS, Klitzman B, Erdmann D. Metabolic and functional characterization of human adipose-derived stem cells in tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 122:725-38.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Dihalvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem cells*. 2006; 24:376-385.

Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, Sintuu C, Wang JC. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine*. 2008; 33:863-9.

Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torri S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells subcutaneous adipose tissue. *Differentiation*. 2005; 73:69-78.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109:199-209.

Morain WD. The stem of our future. *Ann Plast Surg.* 2005; 54: 577-8.

Moreau JL, Caccamese JF, Coletti DP, Sauk JJ, Fisher JP. Tissue engineering solutions for cleft palates. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65:2503-11.

Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118(3 Suppl):S 121-8.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65:55-63.

Muschler GF, Nitto H, Boehm CA, Easley KA. Age and gender related change in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. *J Orthop Res.* 2001; 19:117-25.

Musina RA, Bekchanova ES, Belyavskii AV, Sukhikh GT. Differentiation potential of mesenchymal stem cells of different origin. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2006; 141:147-51.

National Institutes of Health and Human Services. Report stem cells: scientific progress and future research directions. 2001. Citado em 25/08/2008. Disponível em <http://www.stemcells.nih.gov>.

Nishimori M, Yamada Y. Health related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan. *Blood.* 2002; 99:1995-2001.

Nowel PC, Cole LJ, Habermeyer JG, Roan PL. Grown and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res.* 1956; 16:258-61.

Ogawa R, Mizuno H, Watanabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T. Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP

transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 25;319:511-7

Organização Mundial de Saúde 2007. Citado em 25/08/2008. Disponível em <http://www.who.int/countries/bra/es/>.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001; 410:701-5.

Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther*. 2006; 6:567-78.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-7.

Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutic. *Cir Res*. 2004; 95:9-20.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004; 109:656-63.

Portinho CP, Collares MVM, Silvia FH, Nardi MB, Pinto RA, Siqueira E, Morellato G, Sumino K. Reconstrução de calota craniana com células-tronco mesenquimais indiferenciadas: estudo experimental. *Rev Soc Bras Cir Plast*. 2006; 21:161-5.

Pountos I, Giannoudis PV. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury*. 2005; 36(suppl 3):S 8-12.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276:71-4.

Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Sim EK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissues into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003; 75:775-9.

Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs B. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1996; 11:312-24.

Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. 2008; 135:240-9.

Rosenthal N. Prometheus's vulture and stem cell promise. *N. Engl. J. Med*. 2003; 17:267-74.

Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:10730-5.

Safford KM, Hicok KC, Safford SD. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 294:371-9.

Salles AG, Valler CS, Ferreira MC. Histologic response to injected phosphatidylcholine in fat tissue: experimental study in a new rabbit model. *Aesthetic Plast Surg*. 2006; 30:479-84.

Sándor GK, Suuronen R. Combining adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds and growth factors: an overview of tissue engineering. *J Can Dent Assoc*. 2008; 74:167-70.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells*. 2005; 23:220-9.

Sherley JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells*. 2002; 20:561-72.

Shi Y-Y, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plas Reconstr Surg*. 2005; 116:1686-96.

Slack JMW. Stem cells in epithelial tissues. *Science*. 2000; 287:1431-3.

Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica 2004. Citado em 05/04/2008. Disponível em <http://www.cirurgioplastica.org.br/membros/gallup.cfm>.

Stamm C, Westphal B, Kleine HD. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*. 2003; 361:45-6.

Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*. 2003; 33:919-26.

Stenderup K, Rosada C, Justesen J, Al-Soubky T, Dagnaes-Hansen F, Kassem M. Aged human bone marrow stromal cells maintaining bone forming capacity in vivo evaluated using an improved method of visualization. *Biogerontology*. 2004; 5: 107-18.

Stocchero IN, Stocchero GFM, Stocchero GF, Fonseca ASF. Liposuctionable fat: a hypothetical model. *Plas Rec Surg*. 2006; 117: 337-8.

Stosich MS, Mao JJ. Adipose tissue engineering from human adult stem cells: clinical implications in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119:71-83.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keiko J Med*. 2005; 54:132-141.

Sunkomat JN, Gaballa MA. Stem cell therapy in ischemic heart disease. *Cardiovasc Drug Rev.* 2003; 21:327-42.

Susan O. Stem cell - research signposts and roadblocks. *N Engl J Med.* 2005; 353:1-4.

Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed Mater.* 2006; 1:63-71.

Tapp H, Hanley EN Jr, Patt JC, Gruber HE. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. *Exp Biol Med.* 2009; 234:1-9.

Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemic by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet.* 2002; 360:427-35.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145-7.

Vacanti JP, Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. In Lanza PR, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering.* 2 Ed. San Diego: Academic Press. 2000, p.37.

Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002; 12:502-8.

Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukharensko V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, Kuliev A. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod Biomed Online.* 2005; 10:105-10.

Vermette M, Trottier V, Ménard V, Saint-Pierre L, Roy A, Fradette J. Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials*. 2007; 28:2850-60.

Voltarelli JC, Stracieri AB, Rodrigues MC. Outcome of autologous HSCT for severe and refractory autoimmune disease in Brazil. *Bone Marrow Transplant*. 2004; 33(suppl 1): S145.

Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ, Bjorn G. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec*. 2001; 263:372-8.

Wilson AP. In: Cytotoxicity and viability assays in animal cell culture: a practical approach. 3rd ed. Oxford University Press: Oxford 2000 p. 175-219.

Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum*. 2003; 48:418-29.

Zago MA. Terapia celular, transplante de células, de tecidos ou de órgãos In: Zago MA, Covas DT. *Células-tronco a nova fronteira da medicina*. São Paulo: Atheneu; 2006, p.109-13.

Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct*. 2008; 26:664-75.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7:211-28.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13:4279-95.

Zuk PA. Tissue engineering craniofacial defects with adult stem cells? Are we ready yet? *Pediatr Res*. 2008; 63:478-86.