



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRUNO BOSCH VOLPE

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FÍSTULAS GASTROINTESTINAIS QUANDO TRATADAS
COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ESTROMAIS
DE TECIDO ADIPOSEO ADERIDAS A FIOS DE SUTURA**

***EVALUATION OF THE HEALING PROCESSES OF ENTEROCUTANEOUS
FISTULAS WHEN TREATED WITH MESENCHYMAL STROMAL CELLS
ATTACHED IN SUTURE FILAMENTS***

CAMPINAS

2017

BRUNO BOSCH VOLPE

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE
FÍSTULAS GASTROINTESTINAIS QUANDO TRATADAS
COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ESTROMAIS
DE TECIDO ADIPOSEO ADERIDAS A FIOS DE SUTURA**

***EVALUATION OF THE HEALING PROCESSES OF ENTEROCUTANEOUS
FISTULAS WHEN TREATED WITH MESENCHYMAL STROMAL CELLS
ATTACHED IN SUTURE FILAMENTS***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas como parte
dos requisitos exigidos para obtenção do título de
Doutor em Ciências, na área de Fisiopatologia
Cirúrgica

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO BRUNO BOSCH VOLPE E ORIENTADO PELA
PROFA DRA. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-3369/2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

V888a Volpe, Bruno Bosch, 1988-
Avaliação do processo de cicatrização de fistulas gastrointestinais quando tratadas com células-tronco mesenquimais estromais de tecido adiposo aderidas a fios de sutura / Bruno Bosch Volpe. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Ângela Cristina Malheiros Luzo.
Coorientador: Joaquim Murray Bustorff-Silva.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Células-tronco. 2. Fístula. 3. Cicatrização. 4. Sutura. 5. Doença de Crohn. I. Luzo, Ângela Cristina Malheiros. II. Bustorff-Silva, Joaquim Murray. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the healing process of enterocutaneous fistulas when treated with mesenchymal stromal cells attached in suture filaments

Palavras-chave em inglês:

Stem cells

Fistula

Healing process

Suture

Crohn disease

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Ângela Cristina Malheiros Luzo [Orientador]

Carlos Augusto Real Martinez

Petra Karla Böckelmann

Omar Feres

Ana Cristina Aoun Tannuri

Data de defesa: 31-07-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

BRUNO BOSCH VOLPE

ORIENTADOR: ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

MEMBROS:

1. PROF. DR. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

2. PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

3. PROF. DRA. PETRA KARLA BÖCKELMANN

4. PROF. DR. OMAR FERES

5. PROF. DRA. ANA CRISTINA AOUN TANNURI

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 31/07/2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de ter saúde, de ter uma família feliz, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas, de ter seguido este caminho e, mais uma vez, conquistar um objetivo.

À toda minha família, em especial aos meus pais Lúcia e Cesar, e também ao meu irmão André, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão e amor. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas!

A minha noiva Natália, por todo o apoio, incentivo, amizade e amor. Agradeço pela compreensão e por estar ao meu lado sempre me motivando.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ângela Luzo, por sua orientação na realização desta tese. Agradeço a sua compreensão, confiança e amizade. Muito obrigado pelas oportunidades oferecidas e pelo privilégio de trabalhar ao seu lado. A finalização deste trabalho é fruto de sua orientação e uma conquista nossa.

Aos meus co-orientadores Prof. Dr. Joaquim Bustorff e Prof. Dr. Wagner Fávaro, pela fundamental orientação e ajuda científica na realização deste trabalho. Agradeço pela oportunidade de poder desfrutar do amplo conhecimento dos senhores. Os resultados obtidos neste trabalho são frutos das orientações dos senhores. Obrigado pela amizade desses anos todos.

Aos alunos, funcionários, toda a equipe de trabalho do laboratório do Hemocentro/Unicamp e principalmente minha querida amiga Adriana Duarte. Todos me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho. Agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e por todo o carinho.

A todos do Laboratório de Carcinogenese Urogenital e Imunoterapia pela ajuda e orientações no trabalho. Também agradeço pela amizade e pelos bons momentos ao longo desses anos.

RESUMO

As fístulas enterocutâneas (FE) são de difícil cicatrização e manejo, associam-se a sepse, desnutrição, distúrbios hidroeletrólíticos, dentre outros. O processo de cicatrização ocorre de maneira coordenada, sendo que fatores de crescimento (VEGF/FGF/TGF- α /PDGF) e citocinas (IL/TNF- α /IFN- γ) estão diretamente ligados e apresentam importantes funções nos processos de cicatrização e inflamação. A síntese e degradação da matriz extracelular (MEC) estão ligadas ao reparo de feridas, formação de fibrose crônica, morfogênese e invasão e metástase de tumores. As células-tronco mesenquimais (MSCs) têm alta capacidade proliferativa, podendo se diferenciar em várias linhagens celulares, apresentando ação imunomodulatória e efeito parácrino, podendo melhorar o processo de cicatrização. Em estudo anterior, dissertação de mestrado, foi realizada a caracterização das AT-MSCs na 4ª passagem celular e também a comprovação, através de microscopias, de que as AT-MSCs têm capacidade de aderir a fios de sutura, permanecendo viáveis e proliferando. Estes fios foram utilizados em modelo animal de FE do ceco e promoveram uma melhor e mais eficaz cicatrização, num menor tempo. Já o atual estudo, tem como principal objetivo avaliar e compreender, do ponto de vista histopatológico, como o processo de cicatrização de FE ocorreu em modelo animal idêntico ao estudo anterior, após o tratamento com fios de sutura contendo AT-MSCs aderidas. As AT-MSCs foram obtidas através do procedimento de lipoaspiração estética de tecido adiposo, realizada em indivíduos saudáveis, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. O tecido adiposo foi submetido ao processo de digestão com colagenase. Na 4ª passagem foram gotejadas 1×10^6 AT-MSCs nos fios de sutura de 4-0 poliglactina e logo em seguida foi adicionada a cola de fibrina (20uL Fibrinogênio, 30uL Trombina e 10uL Cloreto de Cálcio) para ajudar na adesão das células nos fios de sutura. O experimento animal utilizou ratos Wistar (25 animais) distribuídos em 3 grupos: Grupo controle (GC – 5 animais), Grupo fístula sem AT-MSCs (GF – 5 animais) e Grupo fístula com AT-MSCs (GF/AT-MSCs – 15 animais). O GC não sofreu nenhum tipo de lesão e foi sacrificado com 21 dias. No GF o fio de sutura utilizado para formar a fístula foi um fio de sutura sem adesão de AT-MSCs, sendo este grupo acompanhado e sacrificado com 21 dias. Já no GF/AT-MSCs o fio de sutura utilizado para formar a fístula continha 1×10^6 AT-MSCs aderidas. Este grupo foi subdividido em grupos de 7, 14 e 21 dias (5 animais em cada), dias em que os animais foram sacrificados. Essa divisão foi realizada para acompanhar como ocorreu a cicatrização nas diferentes fases deste processo. Após a exposição do ceco foi realizada enterotomia de 5mm, sendo então realizada a sutura da abertura da parede abdominal (superfície interna da pele) com 4 pontos separados com 4-0 poliglactina. A região do ceco do GC e a região onde se encontravam as fístulas dos GF e GF/AT-MSCs foram coletadas e fixadas em Bouin, passando logo em seguida pelas etapas de processamento do material. Algumas lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e outras seguiram o protocolo de imunohistoquímica para os marcadores MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1, VEGF, TLR4, TNF- α e IL-6. Os resultados histopatológicos demonstraram uma melhor recuperação histológica e arquitetônica, muito semelhante ao GC (animais saudáveis) das fístulas dos animais do GF/AT-MSCs com 21 dias. Nos grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias o processo inflamatório foi intenso principalmente na região submucosa, com redução no GF/AT-MSCs 21 dias. As análises imunohistoquímicas demonstraram que houve uma troca de colágeno tipo III para tipo I ao longo do processo de cicatrização, com uma imunomarcação moderada para VEGF, denotando presença de neoangiogênese, com redução importante no grupo GF-AT-MSCs 21 dias. O MMP-2 apresentou baixa marcação no GC, com aumento muito

significativo no GF/AT-MSCs 7 dias e uma queda gradativa nos grupos GF/AT-MSCs 14 e 21 dias, demonstrando a tentativa de uma remodelação tecidual inicial (7 dias) e uma queda importante quando essa remodelação foi alcançada. Já no grupo GF/AT-MSCs 21 dias encontramos alta marcação da MMP-9, podendo estar relacionada com o aumento da migração celular causada pela modulação das MSCs. Encontramos baixa marcação da IL-6 no GC e moderada nos demais grupos, podendo estar relacionados com o trauma causado pela lesão, mesmo o grupo 21 dias apresentando uma melhor cicatrização e queda de processo inflamatório. Já no TLR4 observamos baixa marcação no GC com aumento gradativo nos grupos GF/AT-MSCs 7, 14 e 21 dias. O aumento da expressão do TLR4 pode estar relacionado com a modulação causada pelas AT-MSCs no intuito de mediar a liberação de PGE2 que sinalizaria para os receptores e prostanóides, aumentando a secreção de IL-10 pelos macrófagos e diminuindo a migração/proliferação de neutrófilos para o local da lesão, resultados estes compatíveis com o histopatológico encontrado. O TNF- α apresentou baixa imunomarcação no GC, com um aumento nos grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias e uma queda significativa no grupo GF/AT-MSCs 21 dias, corroborando com os resultados histopatológicos do processo inflamatório. Assim, podemos concluir que houve uma melhor cicatrização no GF/AT-MSCs 21 dias, sendo que as AT-MSCs desempenharam um papel imunomodulador importante neste processo.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, fístula enterocutânea, cicatrização, fio de sutura, Doença de Crohn.

ABSTRACT

Digestive fistulas (DF) are difficult to resolve and surgical failure is frequent. They are responsible for electrolyte disturbances, infections, sepsis, skin lesions, gastrointestinal bleeding, intestinal obstruction and malnutrition. The healing process is related to cellular, molecular and biochemical events, acting and working to regenerate the damaged tissue. Stem cells are characterized by the ability to differentiate into different lineages and by their great capacity of proliferation and self-renewal. Recent studies have shown that stem cell therapy could represent a new approach in this area. Besides their great capacity of proliferation and differentiation to other lineages Mesenchymal stromal cells (MSCs) have also immunomodulatory properties, being easily obtained from adipose tissue (AT). In a previous study, we demonstrated that AT- MSCs could be attached into suture filaments. These filaments were used in the treatment of an animal model with enterocutaneous fistula, similar to those of Crohn's disease and have provided a better and faster fistula healing with statistical significance. The actual study aimed evaluate what were the mechanisms involved that have lead to this better healing, when suture filaments with attached AT-MSCs were used. Adipose tissue was obtained from healthy patients submitted to stetical lipoaspirate procedures (50mL) which have previously assigned a written informed consent form. Adipose tissue will be submitted to collagenase digestion, the acquired cells were cultured in a specific medium. At the 4th passages, AT-MSCs, 1×10^6 cells, were fixed in the suture filament (4-0 Poly Vicryl / Poliglactine 910) by adding fibrin glue (20uL Fibrinogen, 30uL Thrombin and 10uL Calcium Chloride). The animal experiment was carried out with Wistar rats (25 animals) which were divided in three groups; control group (CG - 5 animals) where the animals didn't suffer any injury and were analyzed in the 21th day; fistula group (FG), where the lesion was performed with suture filaments without stem cells (AT-MSCs) and the fistula group/AT-MSCs where suture filaments with added AT-MSCs were applied being analyzed in the 7th, 14th and 21th days, 5 animals each). The cecal fistula was created by incising the cecum and suturing the opening to the surgical wound subcutaneously with four separate stitches that were carried out with or without 1×10^6 AT-MSCs attached in the filaments (FG and F-AT-MSCs groups). After the sacrifice the samples were collected and fixed with Bouin. Then, they were processed due to histological slides being carried out. Some slides were stained with Hematoxylin and eosin and others submitted to immunohistochemistry protocols for MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1, VEGF, TLR4, TNF- α e IL-6 marker. The results showed a better architectural and histological healing in the 21th (F-AT-MSCs group). An intense inflammatory process, in the submucosal area was detected in the 7th and 14th days (F-AT-MSCs) that diminished in day 21. Immunohistochemistry results demonstrated that the collagen type III was exchanged to collagen type I improving the healing process. Moreover, a moderate VEGF immunoreactivity was achieved in these areas in the 7th and 14th days showing the presence of neoangiogenesis, with a great reduction on day 21. There was a weak immunoreactivity of MMP-2 in the CG, otherwise, in the F-AT-MSCs group, a great reactivity was detected in the 7th day that gradual decrease in the 14th and 21th days. These finding probably were related to an initial tendency to tissue-remodeling, and have decreased in day 21 due to the end of the process. The MMP-9 results were similar to MMP-2 in the initial phase (7th day) increasing the immunoreactivity up to the day 21. This high reactivity maybe related to a persistent cell migration to this area due to MSCs immunomodulation. The IL-6 results showed also a weak immunoreactivity in the CG, as expected. The other F-AT-MSCs groups demonstrated a moderate IL-6 reactivity, as a result of the acute trauma phase, even in the

21th day, besides the injured area displayed at that time a complete healing with decrease of the inflammatory process. TLR4 results also demonstrated a weak reactivity in the CG increasing gradually in the F-AT-MSCs groups. The TLR4 increase may be due to the MSCs immunomodulation property leading to PGE2 releases that would signaling to E prostanoïd receptors increasing secretion of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by macrophages, preventing neutrophils from migrating/proliferating into the injured tissue areas. The TNF- α results were weak in the CG, showing at the F-AT-MSCs group a gradual increase in the first 14th days, decreasing in day 21. These data may explain the histological findings which demonstrated a low number of neutrophil with great reduction of inflammatory reaction. The 21th day (F-AT-MSCs group) results demonstrated that AT-MSCs with their immunomodulatory properties were able to induce a better healing and might be useful to repair digestive fistulas.

Key words: mesenchymal stem cells, enterocutaneous fistula, healing proces, suture filaments and Crohn's disease.

LISTA DE QUADROS, TABELAS E GRÁFICOS

QUADRO 1. FATORES DE CRESCIMENTO, SUAS CÉLULAS PRODUTORAS (FONTES) E FUNÇÕES NO ORGANISMO. ADAPTADA DE ROBBINS.....	28
TABELA 1. FUNÇÕES E CARACTERÍSTICAS DE CADA FUNÇÃO RELACIONADA A MEC.....	29
TABELA 2. CITOCINAS, SUAS CÉLULAS PRODUTORAS E OS EFEITOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO.....	32
TABELA 3. MECANISMOS E FUNÇÕES DE IMUNOSSUPRESSÃO MEDIADAS PELAS MSCS.....	46
TABELA 4. PRINCIPAIS MMPS DE MATRIZ E SEUS SUBSTRATOS ESPECÍFICOS.....	48
TABELA 5. CARACTERÍSTICAS DOS ANTICORPOS PRIMÁRIOS PARA IMUNOMARCAÇÃO.....	60
TABELA 6. VALORES MÉDIOS DA AVALIAÇÃO DA ANGIOGÊNESE, PRESENÇA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO, REAÇÃO GIGANTOCELULAR E COLAGENIZAÇÃO NO CECO DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E NAS REGIÕES DA FÍSTULA DOS ANIMAIS TRATADOS COM FIO DE SUTURA CONTENDO AT-MSCs NOS DIFERENTES TEMPOS (7, 14 E 21 DIAS).....	66
TABELA 7. INTENSIDADE DA IMUNOMARCAÇÃO PARA OS DIFERENTES ANTÍGENOS NA REGIÃO DO CECO DOS GRUPOS CONTROLE, 7 DIAS, 14 DIAS E 21 DIAS.....	69
GRÁFICO 1. COMPARAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA ÁREA DA FÍSTULA NOS 3 GRUPOS DURANTE 21 DIAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. MODELO HIPOTÉTICO DA PATOFISIOLOGIA PARA FORMAÇÃO DE FÍSTULA. EM PACIENTES COM DOENÇA DE CROHN, OS FIBROBLASTOS DA LÂMINA PRÓPRIA, TEM SEU POTENCIAL DE MIGRAÇÃO REDUZIDO E PODEM APRESENTAR UMA MIGRAÇÃO SEM SUCESSO PARA O LOCAL COM DEFEITO (ÚLCERA), NÃO REALIZANDO A CONTRAÇÃO TECIDUAL NO LOCAL, REDUZINDO A SÍNTESE DE MATRIZ EXTRACELULAR E CONSEQUENTEMENTE NÃO REALIZANDO O FECHAMENTO DA FERIDA (LADO ESQUERDO DA FIGURA). PARA REESTABELECEM E FECHAR A FERIDA AS CÉLULAS EPITELIAIS MIGRAM PARA A PAREDE DA ÚLCERA. PARA ACELERAR ESSA MIGRAÇÃO AS CÉLULAS EPITELIAIS PASSAM A APRESENTAREM FENÓTIPO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS COM PERDA DO CONTATO CÉLULA-CÉLULA, INFILTRANDO CAMADAS MAIS PROFUNDAS DA PAREDE INTESTINAL FORMANDO A FÍSTULA (LADO DIREITO DA FIGURA).....19
- FIGURA 2. DIFERENÇA DO LOCAL DO INTESTINO AFETADO NA COLITE ULCERATIVA E NA DOENÇA DE CROHN.....21
- FIGURA 3. PATOGENICIDADE DA DC ASSOCIADA A FÍSTULA. OS DEFEITOS DA BARREIRA EPITELIAL DO INTESTINO FAVORECEM A INVASÃO DE PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS (PAMPS) PARA DENTRO DA MUCOSA INTESTINAL (1). EM UMA DAS VIAS (2), PARA A CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS, AS CÉLULAS DO EPITÉLIO INTESTINAL SOFREM UMA TRANSIÇÃO DE EPITELIAL PARA MESENQUIMAL. A SEGUNDA PROPOSTA (3), ENTRADA DOS PAMPS PODE INDUZIR A REAÇÃO INFLAMATÓRIA RESULTADO DO AUMENTO DA SECREÇÃO DE TNF. O AUMENTO DO TNF INDUZ A UMA SECREÇÃO DE TGF- E VÁRIAS MOLÉCULAS ASSOCIADAS A INVASÃO CELULAR, COMO IL-13 E INTEGRINA-6, E AUMENTANDO A ATIVAÇÃO DAS MMPs CONTRIBUINDO PARA UM CRESCIMENTO CELULAR INVASIVO. UMA ATIVAÇÃO EXCESSIVA DAS MMPs E UMA ELEVADA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS INVASORAS CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DA FÍSTULA.....23
- FIGURA 4. CLASSIFICAÇÃO E PODER DE DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO.....35
- FIGURA 5. VISÃO GERAL DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO *HOMING* CELULAR.....43
- FIGURA 6. IMUNOMODULAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE ATRAVÉS DA AÇÃO DAS AT-MSCS.....45
- FIGURA 7. CARACTERÍSTICAS DA VIA CLÁSSICA E VIA TRANS-SINALIZAÇÃO. A) A VIA CLÁSSICA LEVA A ATIVAÇÃO DAS VIAS JAK/STAT, AKT E MAPK ALTERANDO A TRANSCRIÇÃO. A LIBERAÇÃO DE CITOCINAS LEVA A UMA INIBIÇÃO DO FEEDBACK ATRAVÉS DE SOCS. B) NA TRANS-SINALIZAÇÃO OCORRE UMA MAIOR SINALIZAÇÃO DA VIA JAK/STAT EM RELAÇÃO A MAPK ATRAVÉS DA SUPRESSÃO DE SOCS. A FALTA DE UM FEEDBACK CAUSANDO UM AUMENTO DA ATIVAÇÃO DE JAK/STAT LEVA A UMA MAIOR TRANSCRIÇÃO DAS CITOCINAS E UM ESTADO PRÓ-INFLAMATÓRIO.....51
- FIGURA 8. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ESTROMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSEO.....55
- FIGURA 9. DESENHO EXPERIMENTAL DO GRUPO ANIMAL.....57
- FIGURA 10. GRUPO CONTROLE. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. OBSERVA-SE A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA. A CICATRIZAÇÃO DA FÍSTULA NÃO OCORREU. A REGIÃO ESTAVA COM ALTO DÉBITO DE FEZES.....63
- FIGURA 11. FIGURA 11. GRUPO INJEÇÃO DE CÉLULAS. LEGENDA: A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA APÓS A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. NOTA-SE QUE HOUE CICATRIZAÇÃO NO LOCAL DA FÍSTULA.....63
- FIGURA 12. FIGURA 12. GRUPO FIO DE SUTURA COM CÉLULAS ADERIDAS. LEGENDA: A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA APÓS A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. A CICATRIZAÇÃO DA FÍSTULA FOI TOTAL. O CÍRCULO DEMONSTRA A ÁREA ONDE ESTAVA A FÍSTULA.....63

FIGURA 13. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (COLORAÇÃO HE) DOS GRUPOS CONTROLE (A, B E C), FÍSTULA (D, E E F), 7 DIAS (G, H E I), 14 DIAS (J, K E L) E 21 DIAS (M, N E O). G = GLÂNDULA INTESTINAL / S = SUBMUCOSA / BV = VASO SANGUÍNEO / MM = MUSCULAR DA MUCOSA / CI = CAMADA MUSCULAR CIRCULAR INTERNA / LE = CAMADA MUSCULAR LONGITUDINAL EXTERNA / * = REAÇÕES INFLAMATÓRIAS.....67

FIGURA 14. AS INTENSIDADES DE ANTÍGENOS MARCADOS COM IMUNOHISTOQUÍMICA DO CECO NOS GRUPOS CONTROLE (A, B, C E D), 7 DIAS (E, F, G E H), 14 DIAS (I, J, K E L) E 21 DIAS (M, N, O E P). AS IMUNOMARCAÇÕES PARA MMP-2 ESTÃO REPRESENTADAS EM A, E, I E M; PARA MMP-9 EM B, F, J E N; PARA COL3A1 EM C, G, K E O; E FINALMENTE PARA COL1 EM D, H, L E P.....70

FIGURA 15. AS INTENSIDADES DE ANTÍGENOS MARCADOS COM IMUNOHISTOQUÍMICA DO CECO NOS GRUPOS CONTROLE (A, B, C E D), 7 DIAS (E, F, G E H), 14 DIAS (I, J, K E L) E 21 DIAS (M, N, O E P). AS IMUNOMARCAÇÕES PARA VEGF ESTÃO REPRESENTADAS EM A, E, I E M; PARA TLR4 EM B, F, J E N; PARA TNF- α EM C, G, K E O; E FINALMENTE PARA IL-6 EM D, H, L E P.....71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DII – DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

DC – DOENÇA DE CROHN

RCU – RETOCOLITE ULCERATIVA

Th1 – CÉLULA T HELPER CD4+1

Th2 – CÉLULA T HELPER CD4+2

ANCA – ANTICORPO DO CITOPLASMA DE NEUTRÓFILO

ASCA – ANTICORPO CONTRA *SACCHAROMYCES CEREVISIA*

PCR – PROTEÍNA C-REATIVA

IRM – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

EFG – FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

TGF- α – FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR ALFA

PDGF – FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

VEGF – FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR

FGF – FATOR DE CRESCIMENTO DOS FIBROBLASTOS

TGF- β – FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA

IL – INTERLEUCINA

TNF – FATOR DE NECROSE TUMORAL

IFN – INTERFERON

MEC – MATRIZ EXTRACELULAR

CAM – MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

GAGs – GLICOSAMINOGLICANAS

AH – ÁCIDO HIALURÔNICO

EPC – CÉLULAS ENDOTELIAIS PROGENITORAS

MMP – METALOPROTEINASE DE MATRIZ

CT – CÉLULAS-TRONCO

HLA – SISTEMA DE HISTOCOMPATIBILIDADE LEUCOCITÁRIA

HSC – CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

MSC – CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

AT-MSC – CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO

USSC – CÉLULAS-TRONCO SOMÁTICAS IRRESTRITAS

VSCS – CÉLULAS-TRONCO SEMELHANTES AS EMBRIONÁRIAS

CU – CORDÃO UMBILICAL

SCU – SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

MHC – COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE MAIOR

IBMF – 3-ISOBUTIL-1-METILXANTINA

PLA – CÉLULAS DO PROCESSADO LIPOASPIRADO

TA – TECIDO ADIPOSEO

SVF – FRAÇÃO CELULAR DO ESTROMA VASCULAR

PSGL-1 – GLICOPROTEÍNA LIGANTE DE SELECTINA-P

HCELL – GLICOPROTEÍNA LIGANTE DE SELECTINA-L/-E

HGF – FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO

NGF – NEUROTROFIN-3

TLR – RECEPTORES DE MEMBRANA TOLL-LIKE

PAMP – PADRÕES MOLECULARES ASSOCIADOS A PATÓGENOS

PGE2 – PROSTAGLANDINA E 2

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
1. Fístulas	17
2. Doença inflamatória intestinal (DII).....	20
3. Doença de Crohn (DC).....	21
A. Histórico	21
B. A Doença de Crohn e fístulas	22
4. Regeneração e reparo tecidual	27
5. Ação da matriz extracelular na regeneração e reparo tecidual	28
6. Reparação tecidual	30
7. Células-tronco	34
A. Células-tronco embrionárias	36
B. Células-tronco adultas	36
C. Células-tronco mesenquimais (Mesenchymal stem cells - MSCs)	37
D. Células-tronco mesenquimais de Tecido Adiposo (AT-MSCs)	39
8. Homing Celular – MSCs Homing	41
9. Imunomodulação e Efeito parácrino das Células-tronco.....	43
10. Vias e proteínas estudadas	47
A. Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 / MMP-9).....	47
B. Receptores do tipo Toll-Like (TLR2 e TLR4).....	48
C. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)	49
D. Colágenos: Tipo I e Tipo III.....	49
E. Interleucina-6.....	50
F. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	51
OBJETIVOS	53
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
MATERIAL E MÉTODOS	54
1. Fontes de obtenção de AT-MSCs	54
2. Extração de AT-MSCs.....	54
3. Caracterização das AT-MSCs	55
4. Adesão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura	55
5. Procedimento animal – fístula cecal	56
A. Grupo experimental	56
B. Anestesias	56
C. Procedimento cirúrgico	57
6. Preparação do material histológico	57

7. Análise Histopatológica – Hematoxilina e Eosina (H.E.).....	58
8. Preparação das lâminas para imunohistoquímica	59
9. Análises Estatísticas	61
RESULTADOS	62
1. Avaliação do processo de cicatrização por imagem (ImageJ)	62
2. Análise histopatológica – Coloração HE.....	64
3. Imunomarcação dos Antígenos: MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1, VEGF, TNF- α e IL-6	68
Grupos.....	69
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS.....	99
1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo ..	99
2. COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA)	102
3. ARTIGO CIENTÍFICO (REVISTA CITOTHERAPY).....	103

INTRODUÇÃO

1. Fístulas

As fístulas representam uma série de transtornos e complicações aos pacientes, sendo elas um dos problemas cirúrgicos que mais necessitam de atenção médica. Elas estão associadas a uma alta morbidade e mortalidade, além de serem historicamente associadas à manutenção do paciente por um longo período no hospital, diminuindo a qualidade de vida (1)

Elas são uma comunicação anormal entre qualquer parte do trato digestivo e outra víscera intra-abdominal (fístula interna). Podem também ser uma comunicação anormal entre uma parte do trato digestivo e a superfície cutânea (fístula enterocutânea), chamando-se assim de fístula externa. Em ambas ocorre drenagem de secreção digestiva chamada de débito (2, 3)

A incidência do surgimento de fístulas na população geral está entre 1,04 a 2,32 casos a cada 100 mil habitantes, sendo que os homens apresentam maior prevalência e a idade de maior incidência está entre 30 e 50 anos (4). As taxas de mortalidade ficam entre 5% e 20%, havendo nos últimos anos uma melhoria desses índices. O fechamento espontâneo das fístulas apresenta taxas abaixo de 25%. A taxa de cicatrização se eleva para 75-85% após o tratamento cirúrgico (1, 5).

As fístulas podem surgir de maneira espontânea durante a evolução de doenças intestinais inflamatórias (DII), principalmente na Doença de Crohn (Figura 1), como evolução de tuberculose intestinal e ainda em casos de traumas abdominais fechados, doenças pancreáticas, dentre outras. Podem ainda ocorrer, devido a complicações pós-operatórias, especialmente em cirurgias de urgência, sendo esta a principal causa de aparecimento de fístula em 75-85% dos casos (2, 6, 7). Nesses casos podem ocorrer por fatores como má técnica cirúrgica; ou ainda, fatores sistêmicos como uso de corticoesteróides, desnutrição ou outros motivos ainda não explicáveis. As fístulas geralmente aparecem entre o quinto e décimo dia do pós-operatório (8).

Podemos classificar as fístulas digestivas do ponto de vista anatômico, fisiológico e etiológico. Quanto à localização anatômica, além de classificadas em internas e externas, devem ser classificadas como gástrica, pancreática, duodenal, jejunal, ileal ou colônica. A classificação do ponto de vista fisiológico leva em conta o volume do efluente (débito) em 24 horas, sendo classificado como alto (maior que 500 mL), moderado (entre 200 mL e 500 mL) e baixo (menor que 200 mL). É de grande importância a avaliação do débito da fístula, pois além de causar um grande impacto fisiológico no paciente, tem grande importância para se considerar o tipo de tratamento e também é fator prognóstico independente de probabilidade de fechamento e óbito. Por último temos a classificação etiológica, que leva em conta a doença que determinou o aparecimento da fístula (congenita ou adquirida), ainda sendo classificada como primária quando o seu surgimento se dá através de processos patológicos intestinais e secundárias, quando aparecem após intervenções cirúrgicas (8-11).

As fístulas podem causar uma série de transtornos e problemas para o paciente como sepse, processos infecciosos, lesões na superfície cutânea, distúrbios hidroeletrólíticos, desnutrição, hemorragia digestiva, obstrução intestinal, entre outros. A gravidade de todos esses problemas depende de uma série de questões como etiologia, tipo e localização anatômica da fístula, débito da fístula e idade do paciente (3, 10, 12). A sepse e suas implicações sistêmicas estão entre os problemas mais sérios causados pelas fístulas para os pacientes. Em muitos casos a sepse pode ser uma manifestação inicial de formação de fístulas. Outros problemas como desequilíbrio hidroeletrólítico e a desnutrição também são importantes fatores para aumentar as taxas de morbidade e mortalidade (13).

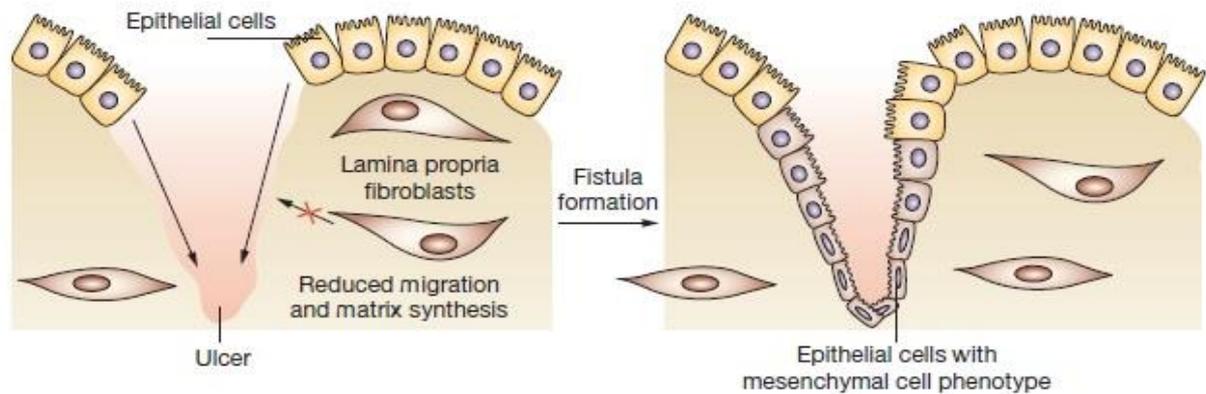


Figura 1. Modelo hipotético da fisiopatologia para formação de fístula. Em pacientes com Doença de Crohn, os fibroblastos da lâmina própria, tem seu potencial de migração reduzido e podem apresentar uma migração sem sucesso para o local com defeito (úlceras), não realizando a contração tecidual no local, reduzindo a síntese de matriz extracelular e conseqüentemente não realizando o fechamento da ferida (Lado esquerdo da figura). Para reestabelecer e fechar a ferida as células epiteliais migram para a parede da úlcera. Para acelerar essa migração as células epiteliais passam a apresentarem fenótipo de células mesenquimais com perda do contato célula-célula, infiltrando camadas mais profundas da parede intestinal formando a fístula (lado direito da figura) (10).

Quanto ao diagnóstico das fístulas existem algumas modalidades de diagnósticos, porém a tomografia computadorizada e a ultrassonografia vêm sendo muito utilizadas no diagnóstico de lesões intra-abdominais. Outros exames como o raio-x com contraste de bário e o exame de imagem de difusão por ressonância magnética (IRM) também vem sendo utilizados. Em alguns casos, para um diagnóstico mais preciso, a fístula deve ser guiada através do seu sítio fistuloso utilizando-se fistulografia e endoscopia (14, 15).

Após o diagnóstico é importante iniciar o tratamento o mais rápido possível. O tratamento das fístulas pode ocorrer através da utilização de medicamentos, acompanhamento e tratamento nutricional e intervenção cirúrgica. O tratamento inicial deve ser através de utilização de medicamentos e suporte nutricional adequado com controle e correção do desequilíbrio hidroeletrólítico. Caso não exista melhora significativa da cicatrização da fístula deve-se realizar intervenção cirúrgica auxiliar e posteriormente a cirurgia definitiva.

O controle e suporte nutricional do paciente deve ser iniciado o mais rápido possível com o objetivo de diminuir a deterioração do estado nutricional (7). A partir do trabalho de *Chapman et al.* na década de 60 (16), onde ele demonstrou a importância da nutrição adequada do paciente para o tratamento de fístulas, o

suporte nutricional foi implantado e reconhecido como um dos tratamentos de grande importância para os pacientes com fístulas. *Meguid e Campos 1996* demonstraram que com o suporte nutricional adequado as taxas de fechamento espontânea das fístulas que eram de 37% passaram para 89% e as taxas de mortalidade que eram de 55% reduziram para 12% (17).

Como descrito, a grande causa do surgimento de fístulas acontece por complicações em cirurgias eletivas, porém, existem ainda os pacientes com doenças inflamatórias intestinais, principalmente Doença de Crohn, que muitas vezes, como evolução da doença, apresentam o surgimento de fístulas. Desta forma, é de grande importância que tratamentos alternativos e inovadores sejam estudados para evitar a formação de fístulas em cirurgias eletivas e também melhorar a cicatrização das fístulas dos pacientes tanto com Doença de Crohn quanto os que apresentarem fístulas por outros motivos.

2. Doença inflamatória intestinal (DII)

A doença inflamatória intestinal (DII) é caracterizada por ser uma doença crônica derivada da ativação imunológica inapropriada da mucosa. As duas enfermidades que compreendem a DII são a colite ulcerativa e a Doença de Crohn (DC). A diferença entre as duas doenças se dá basicamente pela diferença do local do trato gastrointestinal (GI) afetado e pela expressão morfológica (Figura 2). Basicamente podemos descrever a colite ulcerativa como uma DII grave que se limita ao cólon e reto, em contrapartida a DC pode afetar qualquer região do trato gastrointestinal (18). A profundidade do tecido comprometido também é um fator que diferencia as duas doenças, sendo que na colite ulcerativa ela se estende pela mucosa e submucosa enquanto na DC ela é tipicamente transmural (que se estende por todas as regiões do tecido) (19).

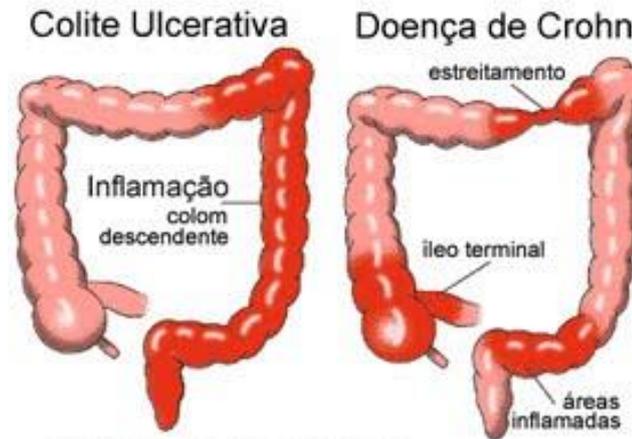


Figura 2. Diferença do local do intestino afetado na Colite ulcerativa e na Doença de Crohn.

3. Doença de Crohn (DC)

A. Histórico

A doença que ficou conhecida mundialmente como Doença de Crohn não é uma doença nova. Em 170 d.C. Soranus de Êfeso descreveu em seu livro características de uma doença muito semelhante à DC. Porém, a DC levou muitos anos para se tornar uma enfermidade clínica conhecida. Para que o reconhecimento clínico da doença ocorresse, três publicações foram essenciais: 1 – T.K. Dalziel de Edimburgo, em 1913; 2 – Eli Moschcowitz e A.O. Wilensky, dos hospitais Monte Sinai e Beth (de Nova Iorque e Boston consecutivamente), em 1923 e por fim; 3 – Crohn, Ginzburg e Oppenheimer, do Hospital Monte Sinai, em 1932 (20, 21).

O trabalho que marcou a história da DC foi o trabalho: *Regional ileitis: a pathologic and clinical entity* (1932) (21), com grande aceitação mundial. Este trabalho foi desenvolvido por Burril B. Crohn, Alexander A. Berg, Leon Ginzburg e Gordon D. Oppenheimer. O grupo que foi liderado pelo Dr. Crohn apresentou seu trabalho em 2 de maio de 1932 na cidade de Atlanta e seu trabalho foi publicado no mesmo ano na revista *Transactions of the AGA – Annals*. Sabe-se que a doença ficou conhecida como Doença de Crohn devido a inúmeras publicações, principalmente da revista *Lancet*, que sempre a citavam desta forma (20).

No Brasil quem primeiro publicou um caso de ileíte regional foi Berardinelli, em 1943. Somente em 1960, com a importante publicação de H.E. Lockhart-Mummery e Basil Morson, onde apresentaram uma descrição histológica e

clínica detalhada do processo inflamatório da DC e da retocolite ulcerativa (RCU), podendo assim separar as duas enfermidades, detalhando o conhecimento de doença segmentar e inflamação granulomatosa, dando assim um entendimento melhor dos mecanismos envolvidos em ambas as doenças (20).

B. A Doença de Crohn e fístulas

Como mencionado anteriormente a DC pode ocorrer em qualquer região do trato GI sendo mais comum nas regiões do íleo terminal, válvula ileocecal e ceco (18). A doença se caracteriza pela formação de estenoses, úlceras, trajetos fistulares (fístulas) e granulomas intestinais (22). Ainda como características clínicas o paciente pode apresentar febre moderada, diarreias recorrentes, perda de peso, má absorção de nutrientes, obstrução intestinal e fístulas para o intestino adjacente ou outras regiões como a pele abdominal. A doença pode apresentar crises intermitentes alternando com fases de remissão que podem variar de semanas a meses, afetando a vida social, familiar e até mesmo as perspectivas de emprego.

A fisiopatologia da DC ainda não está totalmente descrita e esclarecida, mas se sabe que fatores genéticos, defeitos na barreira da mucosa intestinal, desregulação imunológica e infecções patogênicas persistentes estão relacionados à DC (22). Na DC os tecidos afetados possuem macrófagos ativado fenotipicamente heterogêneos, expressando CD14, diferentemente do intestino normal onde os macrófagos são controlados pelo microambiente, apresentando uma produção restrita de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α/β e TNF-alfa) (23). Apresenta também um número reduzido de células dendríticas (CD) ativadas, com receptores muito expressos, aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias como as IL-6 e IL-12 (20). A imunidade adaptativa também está relacionada com a DC, sendo que os anticorpos produzidos pelas células B e as alterações de síntese e secreção das IgM, IgG e IgA estão alterados na doença, com aumento tanto sérico quanto na mucosa. As células T *helper* CD4⁺1 (Th1) produzem IFN- γ e as células T *helper* CD4⁺2 (Th2) produzem IL-4, IL-5 e IL-13, que estão relacionados com o desencadeamento da doença. Na DC as células dendríticas produzem mais IL-12, aumentando a ativação de Th1 e conseqüentemente a resposta inflamatória. O equilíbrio entre todo esse sistema é fundamental para a manutenção da homeostase da mucosa intestinal (Figura 3) (24).

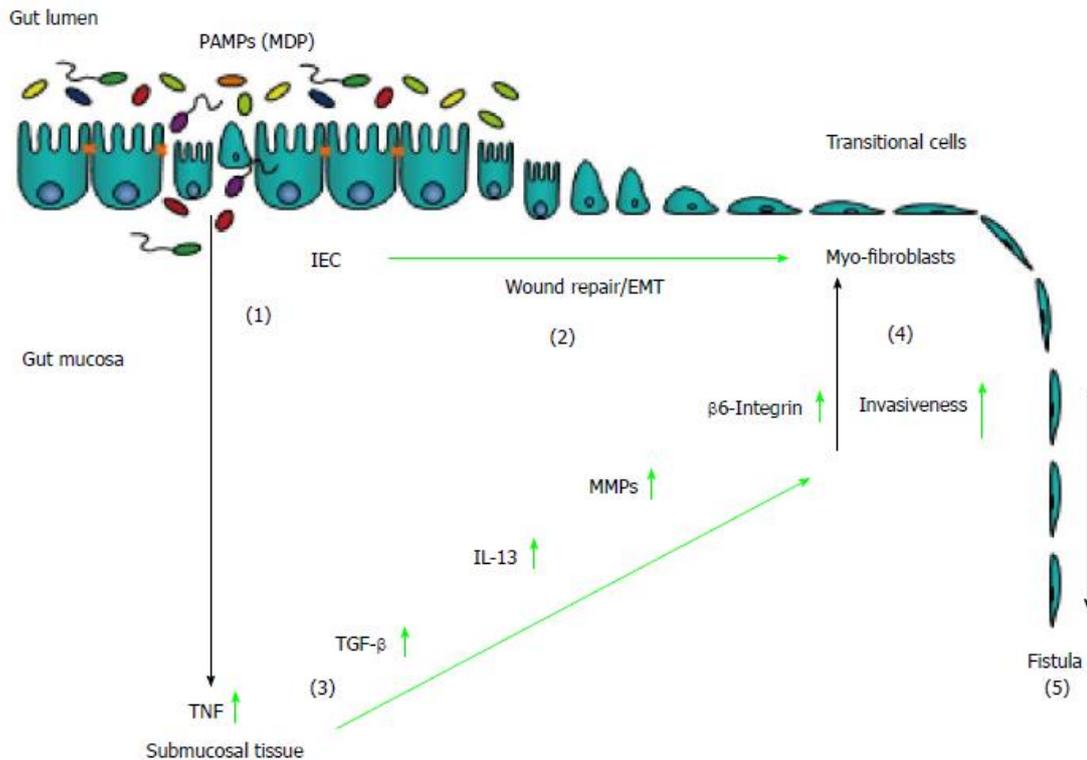


Figura 3. Patogenicidade da DC associada a fístula. Os defeitos da barreira epitelial do intestino favorecem a invasão de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) para dentro da mucosa intestinal (1). Em uma das vias (2), para a cicatrização de feridas, as células do epitélio intestinal sofrem uma transição de epitelial para mesenquimal. A segunda proposta (3), entrada dos PAMPs pode induzir a reação inflamatória resultado do aumento da secreção de TNF. O aumento do TNF induz a uma secreção de TGF- β e várias moléculas associadas a invasão celular, como IL-13 e integrina-6, e aumentando a ativação das MMPs contribuindo para um crescimento celular invasivo. Uma ativação excessiva das MMPs e uma elevada expressão de moléculas invasoras contribuem para a formação da fístula (25)

O diagnóstico das DII pode apresentar algumas dificuldades por serem consideradas doenças multifatoriais e que mesmo em alguns casos, onde a doença está em estágios mais avançados, não é possível distinguir entre a DC e a colite ulcerativa. Em sua grande maioria exames histopatológicos, quadro clínico e exame de colonoscopia podem estabelecer o diagnóstico diferencial entre as DII. Os marcadores sorológicos têm se tornado uma ferramenta importante no diagnóstico, prognóstico e resposta terapêutica. Os mais utilizados são o anticorpo citoplasma de neutrófilos (ANCA) e o anticorpo contra *Saccharomyces cerevisia* (ASCA). Assim que o diagnóstico é estabelecido, ainda se pode utilizar testes como proteína C-reativa (PCR), entre outros, para avaliação da atividade e estado da doença (26, 27).

Para que o tratamento da DC tenha sucesso terapêutico é fundamental analisar o grau da atividade inflamatória, sua extensão e o comportamento da doença (estenosante e penetrante ou fistulizante). Atualmente são utilizados no tratamento da DC derivados salicílicos (sulfassalazina e mesalazina), corticosteroides (prednisona, prednisolona e hidrocortisona), antibióticos, imunossupressores (azatioprina, 6-mercaptopurina, cloroquina e metotrexato), além da terapia biológica (infliximabe, adalimumabe, certalizumabe pegol e natalizumabe). Mesmo com tantas possibilidades de tratamento exames de imagem com ressonância magnética evidenciaram que a terapia com anticorpos anti-TNF alfa promovem uma cicatrização parcial dos trajetos fistulosos, com fechamento dos orifícios externos o que favoreceria a formação de abscessos de repetição. Um estudo populacional mostrou que após o emprego de terapia biológica, a ocorrência de abscessos perianais aumentou cerca de três vezes (28). O manejo da DC é desafiador, com manifestações limitantes que determinam sensível comprometimento na qualidade de vida do paciente. As formas mais graves de DC estão associadas com índices de recidiva elevados, apesar do tratamento adequado (28-32). Cabe destacar que um número significativo de pacientes será submetido a vários procedimentos cirúrgicos a despeito dos recentes avanços terapêuticos e resistência a corticoides, pois além da resposta ser variável, as fístulas na DC frequentemente apresentam trajetos irregulares e secundários, dificultando seu tratamento.

Apesar da grande maioria das fístulas ocorrerem em pacientes que não apresentam DII, por diversas causas descritas na introdução deste trabalho, os pacientes com DC também apresentam fístulas. O manejo e tratamento desses pacientes já é desafiador e apresenta ainda maior dificuldade quando há o surgimento de fístulas. Na grande maioria dos casos os pacientes que apresentam fístulas com DC ficam internados por longos períodos (6 a 8 semanas ou mais) e apresentam altas taxas de recidiva, diminuindo a qualidade de vida e aumentando muito os gastos hospitalares.

Assim, é de grande importância que novos métodos de tratamento e/ou métodos alternativos em conjunto com os já utilizados sejam estudados para melhorar o processo de cicatrização dessas fístulas nos pacientes que apresentam a fístula associada a DC.

O tratamento medicamentoso muitas vezes é realizado com inibidores de secreção gástrica, onde temos como maior exemplo a somatostatina, que diminui a produção de ácido gástrico e pancreático, diminuindo o débito fistuloso e tamponando a mucosa gástrica. É importante o controle clínico do paciente através do uso de medicamentos antes do início do tratamento nutricional (3). Glucocorticóides, com grande potencial anti-inflamatório, são muito utilizados no tratamento de pacientes com DC, porém não são efetivos no tratamento das fístulas desses pacientes (10, 11). Os antibióticos são amplamente utilizados para o tratamento das fístulas, sendo o metronidazol o antibiótico mais utilizado. Geralmente há melhora após 6-8 semanas da administração do antibiótico, que deve ser mantida por mais alguns meses (11). Em um estudo com 18 pacientes tratados com o antibiótico metronidazol por 10 semanas consecutivas, 56% dos pacientes apresentaram cicatrização completa das fístulas perianais (33).

Alguns imunossuppressores, como o azatioprina e o 6-mercaptopurina, apresentam bons resultados no tratamento de pacientes com Doença de Crohn. No tratamento das fístulas os dois imunossuppressores apresentaram resultados satisfatórios (54%) no fechamento de vários tipos de fístulas (enterocutâneas, perianais, retrovaginal, dentre outras) (10, 11). Ainda, o tratamento medicamentoso pode ser realizado com terapia biológica com os medicamentos infliximab, adalimumab e certolizumab. Estes medicamentos são imunomoduladores utilizados também em alguns tratamentos de diversos tipos de câncer. Eles são denominados de medicamentos biológicos e inibem TNF- α . O adalimumab se liga aos receptores de TNF- α na superfície celular, o certolizumab se liga às formas de TNF- α solúvel e associado à membrana e o infliximab se liga às formas solúvel e transmembrana de TNF- α . O infliximab é o mais utilizado, apresentando bons resultados nos tratamentos (10). No estudo ACCENT II (*A Crohn's Disease Clinical Trial Evaluating Infliximab in a New Long-Term Treatment Regimen in Patients with Fistulizing Crohn's Disease*) que envolveu 282 pacientes com Doença de Crohn e fístulas, 195 (69%) pacientes responderam ao tratamento com o infliximab (11, 34).

A intervenção cirúrgica pode ser utilizada no tratamento de fístulas com caráter de urgência. Porém em sua grande maioria as cirurgias se tornam eletivas, onde primeiramente há uma melhora do estado nutricional do paciente antes da primeira intervenção cirúrgica. 25-30% dos pacientes com Doença de Crohn que

apresentam fístulas necessitam de intervenção cirúrgica como método de tratamento. Uma nova intervenção desses pacientes apresenta grandes taxas de morbidade e mortalidade, sendo que esta opção deve ser escolhida somente após outras opções de tratamento menos invasivas serem descartadas (13, 35). Todas essas questões e o quadro clínico do paciente com muitas deficiências tornam o tratamento das fístulas um grande desafio.

Alguns pontos são de grande importância no tratamento das fístulas. O controle do débito impede distúrbios hidroeletrolíticos (ácido-base) decorrentes da perda excessiva de líquidos. Esse controle diminui as taxas de mortalidade e aumentam as taxas de fechamento espontâneo (36). O controle e tratamento da sepse em pacientes com fístulas também deve ser considerado importante, pois esses pacientes apresentam as taxas de mortalidade mais altas (80% dos pacientes vão a óbito).

Como há grande heterogeneidade nos pacientes que apresentam fístulas, as taxas de mortalidade variam muito. No geral as intervenções cirúrgicas eletivas apresentam taxas de mortalidade de apenas 2% enquanto nas cirurgias eletivas de fístulas essa taxa pode variar de 6% a 48% (14, 15). Essa variação ocorre por existirem muitos fatores que influenciam no tratamento da fístula, como, a sepse local ou sistêmica, o grau de desnutrição inicial do paciente, o valor diário de débito, a origem e quantidade de fístulas.

Mesmo apresentando várias alternativas e meios de tratamentos diferentes as fístulas são consideradas de difícil tratamento. As taxas de mortalidade variam muito e a resposta aos tratamentos também varia de um paciente para outro. Além, a qualidade de vida do paciente comprometida e o tempo de internação geralmente longo, de 6 a 8 semanas, podendo se estender por mais tempo. A falta de um tratamento que seja realmente efetivo, o longo período de internação e com isso alto custo hospitalar, e as chances de recidiva fazem com que novos métodos e alternativas de tratamentos sejam pesquisados e aplicados para ajudar em uma melhor cicatrização e recuperação dos pacientes que apresentam fístulas.

4. Regeneração e reparo tecidual

A partir do momento em que ocorre lesão de células e tecidos uma série de eventos se inicia para realizar o processo de “cura”, sendo este processo dividido em regeneração e reparo. A regeneração se dá pela reconstituição completa do tecido lesionado ou perdido, enquanto o reparo restaura estruturas originais mas causa desarranjos estruturais. Todos esses eventos que coordenam a proliferação celular, são orientados por polipeptídeos chamados de fatores de crescimento, que se ligam a receptores específicos liberando sinais para as células alvo. O fator de crescimento epidérmico (EFG), fator de crescimento transformador alfa (TGF- α), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) podem ser considerados os mais importantes e envolvidos na regeneração e reparo tecidual (Quadro 1) (37).

Além dos fatores de crescimento, as citocinas, polipeptídeos produzidos em resposta a microrganismos e outros antígenos, apresentam algumas funções importantes na inflamação e como medidores das respostas imunes. As citocinas são produzidas por vários tipos celulares e podem ter atuação de amplo espectro. Dentre as principais citocinas encontram-se as interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF) e interferon (IFN- γ). O conhecimento da ação e função das citocinas tem grande aplicação terapêutica, pois inibir ou modificar estas ações no processo de inflamação e reações imunes, pode ajudar a controlar os efeitos prejudiciais que danificam os tecidos (37).

Fator de crescimento	Fonte	Funções
Fator de crescimento epidérmico (EFG)	Plaquetas e macrófagos	Estimula formação do tecido de granulação
Fator de crescimento transformador alfa (TGF- α)	Macrófagos e linfócitos T	Estimula a replicação de muitas células epiteliais
Fator de crescimento transformador beta (TGF- β)	Macrófagos, linfócitos T, plaquetas, células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas	Estimula angiogênese, fibroplasia e a proliferação de ceratinócitos
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, macrófagos, células endoteliais, células musculares lisas e ceratinócitos	Estimula a produção de metaloproteinases de matriz, fibronectina e ácido hialurônico, angiogênese e contração da ferida
Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	Muitos tipos celulares	Aumenta a permeabilidade vascular e promove a angiogênese
Fator de crescimento dos fibroblastos (FGF)	Macrófagos, mastócitos, linfócitos T, células endoteliais e fibroblastos	Estimula migração de ceratinócitos, a angiogênese, a contração da ferida e deposição de matriz

Quadro 1. Fatores de crescimento, suas células produtoras (fontes) e funções no organismo. Adaptada de Robbins (37).

5. Ação da matriz extracelular na regeneração e reparo tecidual

A matriz extracelular (MEC) apresenta papel fundamental no processo de regeneração e reparo. A MEC é composta basicamente por três grupos de moléculas: proteínas estruturais fibrosas (colágenos e elastina), glicoproteínas adesivas e proteoglicanos. Essas moléculas constituem duas formas básicas de MEC, a matriz intersticial, encontrada nos espaços entre as células do tecido conjuntivo, das células epiteliais, endoteliais e do músculo liso e as membranas basais que estão associadas às superfícies celulares (18, 38).

A MEC está em constante processo de remodelação e sua síntese e degradação acompanha os processos de regeneração, reparo de feridas, processos de formação de fibrose crônicas, morfogênese, invasão e metástase de tumores. Ela regula o crescimento, proliferação e a diferenciação das células que estão presentes ao seu interior. Secreta ainda água e minerais, dando turgor às células de tecidos moles e rigidez aos ossos com a secreção dos minerais (Tabela 1).

Função	Características
Suporte mecânico	Para ancoragem e migração celular, além da manutenção da polaridade celular.
Crescimento celular	Componentes da MEC regulam a proliferação celular.
Armazenamento e apresentação de moléculas reguladoras	Permite a rápida difusão de fatores de crescimento após lesão local ou durante a regeneração.
Manutenção da diferenciação celular	Influencia no grau de diferenciação das células via integrinas de superfície celular.
Estabelecimento de microambientes teciduais	Limite entre um tecido e outro.
Arcabouço para renovação tecidual	Renovação somente em caso das estruturas do MEC não serem lesadas, caso isso ocorra, há deposição de colágeno e formação de cicatriz.

Tabela 1. Funções e características de cada função relacionada a MEC.

Entre os principais componentes da MEC podemos citar: o colágeno, o conjunto elastina, fibrilina e fibras elásticas; proteínas de adesão; glicosaminoglicanos e proteoglicanos. O colágeno é a proteína mais comum no ser humano, sendo atualmente conhecidos 27 tipos de colágeno. Os colágenos I, II, III, V e XI são chamados de fibrilares. Como principal característica, a molécula de colágeno apresenta uma estrutura longa e rígida, no qual três cadeias polipeptídicas de colágeno (cadeias α) são enroladas umas às outras formando uma estrutura semelhante a uma corda. Os colágenos são ricos em prolina e glicina que são importantes na formação da fita tripla helicoidal (18).

Diferentemente do colágeno, que fornecem resistência a tensão, as fibras elásticas dão aos tecidos a possibilidade de se expandir e contrair (flexibilidade). Como exemplo podemos citar a pele, os pulmões, os vasos sanguíneos, que necessitam da elasticidade para exercer suas funções, de modo que esses tecidos sofram estiramento e retornem ao tamanho original após a distensão. As fibras elásticas são formadas principalmente de elastina. As proteínas de adesão, também chamadas de moléculas de adesão celular (CAM), são formadas pela família das imunoglobulinas, caderinas, integrinas e selectinas. Essas proteínas atuam como receptores transmembrana promovendo a interação célula-célula, que pode ser entre células semelhantes ou distintas, auxiliando também na migração celular para outros sítios.

A MEC ainda é formada pelos glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos. Os GAGs são açúcares ácidos de cadeias longas, não ramificadas e compostas por unidades dissacarídeas repetitivas ligadas a uma proteína central, formando moléculas chamadas de proteoglicanos. Os proteoglicanos apresentam função de organizar a MEC, além de exercer papéis da regulação da estrutura e

permeabilidade do tecido conjuntivo. As GAGs se apresentam em quatro estruturas diferentes: heparan-sulfato, dermatan-sulfato, queratan-sulfato e hialuronana (38). As três primeiras são sintetizadas no retículo citoplasmático e organizadas no complexo de Golgi, já a hialuronana, também conhecido como ácido hialurônico (AH), é sintetizada na membrana plasmática e diferente das demais não está ligada a uma proteína central. O AH é formado por uma cadeia flexível e extremamente longa, fazendo com que se formem soluções extremamente viscosas, fundamentais na estruturação de alguns tecidos (ex: cordão umbilical), sendo fundamental na migração celular e dando ao tecido conjuntivo capacidade de resistir a forças de compressão e ainda proporciona elasticidade e lubrificação para as cartilagens das articulações (18, 39).

6. Reparação tecidual

O processo de cicatrização é um procedimento comum a todas as feridas e está diretamente relacionado com as condições gerais do organismo. Este processo ocorre de maneira coordenada, através de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que agem de maneira conjunta para que ocorra a reconstituição do tecido afetado (40).

Diferentemente da regeneração, no reparo ocorre um rearranjo estrutural sem total regeneração da área comprometida ou lesionada. Isso ocorre por deposição de colágeno e outros elementos da MEC promovendo a formação de uma cicatrização inadequada com fibrose. Quando acontece uma reação inflamatória, ocasionada pela lesão, há a deposição de componentes da MEC e a angiogênese é estimulada; entretanto, se a lesão continuar, a inflamação crônica leva a uma excessiva deposição de colágeno tipo I conhecida como fibrose, onde as fibras de colágeno estão desorganizadas. Na grande maioria dos processos de cicatrização, ocorre uma combinação de reparação e regeneração (18).

Alguns autores dividem o reparo tecidual em três fases: inflamação, formação do tecido de granulação com depósito de matriz extracelular (fase de proliferação) e remodelação (41).

A fase inflamatória se inicia diretamente após ocorrer a lesão, liberando vários fatores vasoativos e, com a ajuda do endotélio lesado juntamente com as plaquetas faz com que a cascata de coagulação se inicie. As plaquetas têm um

papel importante no processo de cicatrização, são elas as responsáveis pela formação do arcabouço inicial (adesão plaquetária) e ativação dos fatores de coagulação, para a produção da rede de fibrina, com conseqüente formação do coágulo sanguíneo, na superfície da lesão. O coágulo é formado por uma rede de fibrina, fibronectina e componentes do complemento, sendo responsável por estancar o sangramento e funcionando como arcabouço para as células que estão migrando para o local da lesão (18). A ativação das plaquetas leva a liberação do conteúdo dos grânulos alfa, existentes no interior das plaquetas, que contêm vários fatores de crescimento (TGF- β , FGF, EGF, PDGF) e interleucinas, que serão responsáveis também pelos processos de reparação, diferenciação celular, indução da angiogênese, dentre outros, assim como atrair os neutrófilos para o local da lesão. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no local da lesão, eles migram da borda da incisão para o coágulo liberando radicais livres que ajudam na destruição de bactérias e assim são gradativamente substituídos por macrófagos (41).

Os monócitos migram para a ferida após 48 horas da lesão, se diferenciando em macrófagos, sendo de fundamental importância. Essas células têm papel fundamental no desbridamento, removendo resíduos extracelulares, fibrina e outros corpos estranhos; liberando citocinas e fatores de crescimento (PDGF, TNF, TGF- β , FGF, IL-6), contribuindo na angiogênese, fibroplasia (produção de tecido fibroso) e síntese de matriz extracelular (Tabela 2) (40).

A segunda fase no processo de cicatrização é a fase de proliferação, onde ocorre a epitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e depósito de colágeno. Entre 24 e 72 horas os fibroblastos e as células endoteliais se proliferam formando o tecido de granulação, que dá a característica macia e rósea das feridas. Este tecido apresenta grande proliferação de fibroblastos, que migram dos tecidos vizinhos para a ferida onde são ativados pelo PDGF, e a presença de novos vasos sanguíneos, devido à liberação de VEGF, pelas plaquetas. A epitelização ocorre de forma rápida, geralmente entre 24 e 48 horas, sendo que as células epiteliais da membrana basal migram da borda da ferida para reestabelecer e formar a barreira protetora. No início é formada uma matriz provisória formada principalmente de fibrina, fibronectina e colágeno tipo III, sendo gradativamente substituída por uma matriz que contém colágeno tipo I. Após esse processo as fibras

de colágeno se tornam mais abundantes, a epiderme recupera sua espessura e arquitetura normais. Fibroblastos e leucócitos secretam collagenases que causam a lise da matriz antiga, sendo importante um equilíbrio entre a lise da matriz antiga e a síntese da nova matriz (18, 40, 41).

A angiogênese é essencial para uma cicatrização adequada, que pode ocorrer pela ramificação de vasos preexistentes ou pelo recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPC) da medula óssea (42). Muitos fatores de crescimento estão envolvidos no processo de angiogênese, mas com certeza o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais importante. Além de ser liberado pelas plaquetas, é secretado por muitas células tronco mesenquimais estromais, induzindo a migração das EPCs, aumentando a proliferação e diferenciação dessas células nos locais onde está ocorrendo a angiogênese (43).

Células produtoras	Citocinas	Efeito
Macrófagos, endotélio	TNF- α (fator de necrose tumoral alfa)	Super-expressão de selectinas no endotélio, aumento da síntese de NOSi e supra-regulação de intefrinas.
Plaquetas, macrófagos	EGF (fator de crescimento epidérmico)	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos, proliferação e quimioatração de queratinócitos.
Macrófagos, endotélio, fibroblastos	FGF (fator de crescimento dos fibroblastos)	Quimiotaxia e proliferação de fibroblastos e queratinócitos, potente fator angiogênico.
Fibroblastos	KGF (fator de crescimento dos queratinócitos)	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
Células mesenquimais	HGF (fator de crescimento dos hepatócitos)	Quimiotaxia e proliferação de queratinócitos.
Macrófagos, queratinócitos	VEGF (fator de crescimento vascular endotelial)	Potente fator angiogênico.
Plaquetas, macrófagos, endotélio, queratinócitos	PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas)	Quimiotaxia de polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblastos, degradação do colágeno I e síntese do III.
Plaquetas, macrófagos, endotélio, queratinócitos, fibroblastos	TGF- β (fator transformador do crescimento beta)	Quimiotaxia de polimorfonucleares, síntese de NOSi, proliferação de fibroblastos e diferenciação para miofibroblastos, degradação do colágeno III e síntese do I, fator angiogênico.
Macrófagos	INF- γ (interferon gama)	Diferenciação de monócitos em macrófagos e ativação destes; aumento da síntese de NOSi.
Macrófago, endotélio, queratinócitos	IL-1 (interleucina 1)	Super-expressão de selectinas no endotélio e aumento da síntese se NOSi.
Macrófagos, fibroblastos	IL-8 (interleucina 8)	Quimioatraente para polimorfonucleares e macrófagos.

Tabela 2. Citosinas, suas células produtoras e os efeitos no processo de cicatrização. Adaptada de Issac et al. 2010 (44).

A última fase, remodelação, tem como principal característica a deposição de colágeno de maneira organizada, onde o equilíbrio entre síntese e degradação da MEC se faz necessário. Alguns fatores de crescimento irão estimular a síntese de colágeno e outras moléculas, a síntese de metaloproteinases de matriz (MMP), que degrada os componentes da MEC. O colágeno inicialmente formado é mais fino que o presente na pele normal. Com o passar do tempo, o colágeno inicial (tipo III) é reabsorvido e um colágeno mais espesso é produzido. O processo de reestruturação da matriz também ocorre nesta fase. Fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que lisam a matriz antiga para que haja um equilíbrio entre síntese e lise da matriz. Mesmo com o passar do tempo, o colágeno do local da lesão será menos organizado que o da pele normal (18, 40, 45).

No final do processo o colágeno fibrilar tipo I está presente em maior quantidade nos locais de reparo, sendo este o tipo de colágeno importante no desenvolvimento da força tênsil nas feridas em cicatrização. Um processo importante na cicatrização de feridas é a chamada contração, que ajuda a fechar e reduz a área de superfície. A contração ocorre geralmente em grandes ferimentos e se inicia nas bordas da ferida com uma rede de miofibroblastos que produzem grandes quantidades de componentes da MEC. Os miofibroblastos são formados a partir da diferenciação de fibroblastos por efeito do TFN- α , FGF-2 e PDGF liberado pelos macrófagos (46).

Apesar de todo o processo de cicatrização ser bastante eficiente ele pode ser afetado e comprometido por fatores locais e sistêmicos do indivíduo. Como fatores locais, podemos citar:

- Infecção - causa importante no retardo da cicatrização;
- Fatores mecânicos secundários a movimentos bruscos e precoces - separam as margens da ferida e retardam a reparação;
- Corpos estranhos - fragmentos como vidro, aço, etc, impedem o processo de reparação;
- Tamanho, localização e tipo de ferida - as feridas em áreas mais vascularizadas cicatrizam com mais facilidade, além da diferença entre grandes e pequenas lesões.

Já como fatores sistêmicos podemos citar:

- Alterações metabólicas - doenças que alteram o estado metabólico do indivíduo, como a Diabetes, dificultando a reparação de feridas;
- Nutrição - fator de grande importância no processo de cicatrização, já que a deficiência de proteínas e mesmo vitamina C alteram a síntese de colágeno e retardam o processo;
- Circulação sanguínea - doenças e anomalias no sistema retardam a cicatrização e hipóxia;
- Hormônios - alguns possuem efeitos anti-inflamatórios como os glicocorticoides e inibem a síntese de colágeno.

Existem ainda algumas deficiências de reparo que complicam o processo de cicatrização. Entre elas um aumento da contração da ferida (contratura) pode resultar deformidades na ferida e dos tecidos ao redor. Outra deficiência ocorre quando há formação inadequada do tecido de granulação e uma organização deficiente da cicatriz. Ainda, a formação excessiva de componentes do processo de cicatrização, podem levar a formação de cicatrizes hipertróficas e queloides (18).

A deposição de colágeno é normal em todo processo de reparação tecidual e quando em excesso pode causar a formação de cicatriz ou fibrose. O termo fibrose indica a deposição de colágeno em doenças crônicas onde os estímulos são ativados constantemente causando disfunção do tecido ou órgão e muitas vezes a insuficiência dele. A ativação constante leva a um processo de inflamação crônica, proliferação e ativação de macrófagos e linfócitos.

7. Células-tronco

Por definição, as células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de auto-geração, que apresentam grande poder de divisão, se diferenciando em diversas linhagens celulares e grande capacidade de proliferação (Plasticidade celular). Essa capacidade de auto-geração faz com que as CT se multipliquem, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição da sua população nos tecidos de maneira constante (47, 48).

As CT já são utilizadas há muito tempo em terapias de doenças hematológicas e do sistema imune. Essas células, *in vivo*, se dividem de forma assimétrica dando sempre origem a outra CT e uma célula progenitora, que irá originar uma célula madura diferenciada. As CT apresentam resultados promissores na medicina regenerativa (49-51).

As CT podem ser classificadas quanto a sua origem e plasticidade celular. Quanto a plasticidade podemos classificar como totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Figura 4). As CT totipotentes são células que têm capacidade de se diferenciar em todos os tecidos do organismo humano, inclusive os gametas (óvulo e espermatozoide) e os anexos embrionários. Como exemplo de célula totipotente temos o zigoto. As CT pluripotentes apresentam capacidade de se diferenciar em todos os tecidos e células dos três folhetos germinativos (endoderma, mesoderma e ectoderma) menos gametas e os anexos embrionários, sendo essas as células-tronco embrionárias. As CT multipotentes apresentam uma capacidade de se diferenciar mais limitada, se diferenciando em alguns tipos celulares. Já na classificação das CT quanto a sua origem elas podem ser classificadas em CT embrionárias ou CT adultas (52-54).

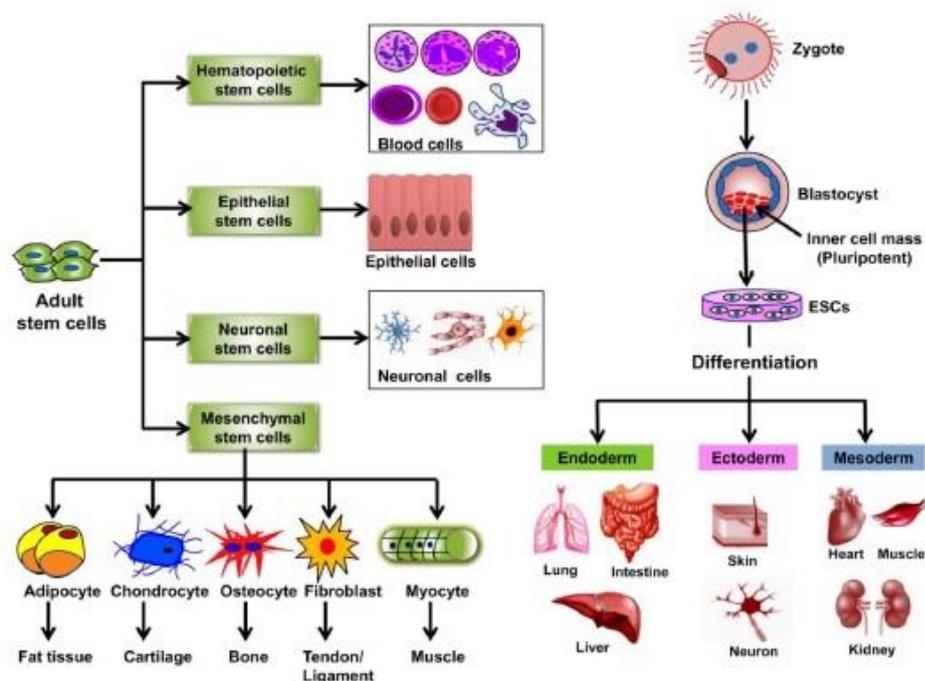


Figura 4. Classificação e poder de diferenciação das células-tronco (55)

A. Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias são as células derivadas da massa interna do blastocisto, que se proliferam indefinidamente conservando sua pluripotência e mantendo essas características *in vitro*. As CT embrionárias podem ser totipotentes como o zigoto ou pluripotentes como as células na fase de mórula (8 blastômeros) ou blastocisto (100 células) (52, 54, 56).

B. Células-tronco adultas

As células-tronco adultas são encontradas em praticamente todos os tecidos do organismo adulto e são consideradas células multipotentes, que possuem a capacidade de se diferenciarem em muitos tecidos, mais sua capacidade é mais restrita que a das células pluripotentes (53). As CT derivadas de medula óssea e cordão umbilical já são utilizadas na clínica há muitos anos. Os primeiros transplantes de medula óssea foram realizados entre 1957-58, pelos Professores E. Donnall Thomas nos Estados Unidos e por George Mathé em Paris, ambos ainda sem conhecimento do sistema de histocompatibilidade leucocitária (HLA). Ao redor do final da década de sessenta, o grupo de Professor Donnall Thomas teve êxito no primeiro transplante alogênico de medula óssea, compatível ao sistema de histocompatibilidade HLA. No Brasil, o primeiro transplante ocorreu em Curitiba, realizado pelos Professores Ricardo Pasquini e Eurípedes Ferreira, em 1979. Hoje a técnica é amplamente conhecida e utilizada sendo considerada a primeira técnica de terapia celular (53, 57, 58). A maior dificuldade com relação ao transplante de medula óssea é encontrar doadores compatíveis ao sistema HLA (antígeno leucocitário humano). Devido à diversidade de etnias encontradas hoje em nossa sociedade a chance de se achar um doador HLA compatível no âmbito familiar é de 25% e de 1 para 100.000 pessoas (0,00001%) fora do âmbito familiar (59).

A medula óssea é uma fonte heterogênea de células-tronco apresentando desde CT hematopoiéticas (*hematopoietic stem cell – HSC*) comprometidas com a linhagem hematopoiética, dando origem às células do sangue, como hemácias, linfócitos, plaquetas e granulócitos (60-62), até células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell – MSC*), além das células-tronco somáticas irrestritas (*unrestrict somatic stem cells - USSC*), as células-tronco semelhante a embrionária

(*very small embryonic like - VSEL*) com plasticidade semelhante às embrionárias e células-tronco endoteliais (62).

O cordão umbilical (CU) e o sangue do cordão umbilical (SCU) são outras importantes fontes de CT, que começaram a ser utilizadas a partir da década de 90. Assim como a medula óssea o CU e o SCU são ricos em HSC, MSC, USSC, VSEL e endoteliais. O SCU atualmente pode ser armazenado para uso futuro (criopreservação) em bancos públicos e apresentam a grande vantagem de ter células linfoides mais imaturas, permitindo o transplante sem a total compatibilidade ao sistema HLA, realizando apenas sorologia completa com técnicas de biologia molecular do sangue materno (63). Alguns estudos demonstram que as CT provenientes do sangue de cordão umbilical se diferenciam em células endoteliais (64-66), cardiomiócitos (67, 68), células nervosas (67, 69), entre muitas outras linhagens celulares.

C. Células-tronco mesenquimais (Mesenchymal stem cells - MSCs)

As CT mesenquimais (*mesenchymal stem cell – MSCs*), de um modo geral, apresentam algumas características principais como: são células aderentes que após passaram por várias passagens celulares em cultura se tornam uma população morfológica homogênea; e devem, obrigatoriamente, se diferenciar na linhagem mesodérmica (adipogênica, condrogênica e osteogênica). As MSCs apresentam grande capacidade de diferenciação para outras linhagens como cartilagem, ossos, tecido adiposo, músculo esquelético, tendões (49, 70), hepatócitos, neurônios, cardiomiócitos (71), mioblastos (72), células endoteliais e vasculares, células pancreáticas, progenitores hematopoiéticos, células neuronais (64, 65, 73), entre outros.

As MSCs foram descritas na década de 70 por Friedenstein e cols (74). Essas células podem ser encontradas em todos os tecidos humanos como, líquido amniótico, placenta, tecido muscular, dentre outras fontes. As suas principais fontes como mencionado acima são medula óssea, sangue de cordão umbilical e tecido adiposo, sendo esta, uma fonte promissora para a terapia celular. Existem ainda, outras fontes de MSCs como polpa dentária, líquido amniótico, placenta humana, sangue menstrual, geleia de Wharton, entre outras fontes menos utilizadas (75-87).

As MSCs devem ser aderente ao plástico e apresentar marcação positiva para os marcadores celulares CD90 (Thy-1), CD105 (SH2), CD73 (SH3/4), CD44 e Stro-1, além das moléculas de adesão CD106, CD166, ICAM-1 (molécula de adesão intracelular) e CD29. Elas devem ser negativas para marcadores de linhagem hematopoiética como CD34, CD45, CD14 e CD11; devem ser ainda negativas para CD80, CD86, CD40 e para as moléculas de adesão CD31, CD18 e CD56. Essas células apresentam fenótipo MHC I positivo (MHC = complexo de histocompatibilidade maior / *major histocompatibility complex*) e MHC II negativo (88-90). Como mencionado acima essas células devem apresentar a capacidade de se diferenciar na linhagem mesodérmica. Para promover a diferenciação adipogênica geralmente as células são incubadas com dexametasona, insulina, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMF) e indometacina. Os acúmulos lipídicos nos vacúolos podem ser marcados com oil red. Na diferenciação condrogênica essas células devem ser incubadas com fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e são analisadas através de marcação histológica com azul de toluidina, demonstrando a matriz extracelular e os glicosaminoglicanos. Por último, na diferenciação osteogênica, são incubadas com ácido ascórbico, glicerofosfato- β e dexametasona de 2 a 3 semanas. As evidências de uma formação óssea são confirmadas através de marcação positiva com alizarin red (90).

As MSCs apresentam a habilidade de migrar de um tecido para o outro, através do sistema circulatório, possivelmente ao aumento de sinais em resposta de uma lesão ou necessidade de reparo. Essa habilidade de migração ainda não é totalmente conhecida, porém ela está diretamente ligada as quimiocinas e a seus receptores. Alguns estudos apontam o envolvimento do CXCL12 (fator derivado de célula estromal-1 / *stromal cell-derived factor-1*) e seu receptor CXCR4 como cruciais na mobilização e "*homing*" de células-tronco hematopoiéticas (91). Já outros estudos demonstram a expressão de CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 e CCR10 e não da CXCR4 no controle da migração das MSCs para outros tecidos (92). Ainda existem muitos estudos que tentam entender como o "*homing*" das MSCs funciona e quais as moléculas e quimiocinas envolvidas.

D. Células-tronco mesenquimais de Tecido Adiposo (AT-MSCs)

Atualmente, falta ainda consenso na literatura sobre a nomenclatura ideal para as CT do tecido adiposo. Alguns autores referem-se a essas células como: células do processado de lipoaspirado (*processed lipoaspirate cells - PLA*) (93), células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (*adipose tissue - mesenchymal stem cells - AT-MSCs*) (94, 95), células-tronco multipotentes derivadas de gordura (*multipotent adipose-derived stem cells - MADs*) (96, 97), células-tronco derivadas de tecido adiposo (*adipose tissue-derived stem cells - ASC*) (98, 99), células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo (*adipose tissue-derived stromal cells - ADSC, ATSC*) (100, 101), células estromais de adulto derivado de tecido adiposo (*adipose tissue derived adult stem cells - ADAS*) (102, 103), ou células derivadas de tecido adiposo (*adipose tissue-derived cells - ADC*) (104, 105). Embora haja uma discordância quanto a nomenclatura, a população celular é a mesma. Nesta tese, usaremos o termo “células-tronco mesenquimais estromais derivadas de tecido adiposo” (AT-MSCs) pois esta nomenclatura vem sendo utilizada com maior frequência em trabalhos publicados recentemente.

O tecido adiposo (TA) é um tecido de organização complexa, originário do mesoderma embrionário, formado basicamente de adipócitos maduros e imaturos, que acumulam lipídeos (gordura) no citoplasma; e pelo estroma-vascular que contém fibroblastos, células endoteliais, linfócitos, macrófagos, células-tronco e pré-adipócitos. O TA é responsável por coordenar uma série de processos como: metabolismo energético, atividades imunológicas e atividades neuroendócrinas (53). A fração celular do estroma-vascular (*stromal-vascular cell fraction - SVF*) é composta por uma população heterogênea de células tendo como principal os pré-adipócitos, que se proliferam, se autorrenovam e se diferenciam em adipócitos maduros. A porção SVF do TA vem sendo foco de muitos estudos, sendo que este compartimento é uma fonte rica em células-tronco mesenquimais (106).

O TA é constituído de dois tipos de adipócitos, marrom e branco, que diferem em suas propriedades. O adipócito do TA marrom apresenta núcleo centralizado, muitas mitocôndrias e diversos vacúolos lipídicos pequenos. Já os adipócitos do TA branco têm como principal característica um único vacúolo de

tamanho grande, desta forma sua mitocôndrias e núcleo se localizam na periferia do citoplasma (53).

Uma das principais funções do TA é a liberação de hormônios, conhecidos como adipocinas, que controlam e regulam muitos processos dentro do organismo como homeostase glicêmica, pressão arterial, coagulação sanguínea, angiogênese, entre outros. Como principais adipocinas (proteínas e fatores não protéicos) liberadas pelo TA podemos citar: a leptina – responsável pela sinalização de estoque de energia corporal ao sistema nervoso central, a adiponectina – aumenta a sensibilidade a insulina, e a resistina – diferentemente da adiponectina a resistina aumenta a resistência à insulina (53).

Além de ser uma rica fonte de células, o tecido adiposo subcutâneo, principalmente o tecido adiposo branco, apresenta fácil acesso através de procedimento cirúrgico simples (lipoaspiração), obtendo-se uma grande quantidade de tecido (107, 108). Os riscos comumente envolvidos com a lipoaspiração do volume proposto são mínimos, entre os quais: dor no pós-operatório (tratada com analgésicos) e equimose (duração limitada em até 14 dias). A ocorrência de infecção é extremamente baixa, tendo em vista a observação da técnica (realização em ambiente hospitalar, forma asséptica, uso de materiais descartáveis). Riscos maiores (como perfuração da parede abdominal) são evitados pela observância da técnica cuidadosa (manobras de pinçamento bidigital do tecido dermo-gorduroso a ser aspirado, exame pré-operatório excluindo-se a eventual presença de hérnias).

O isolamento das MSCs de tecido adiposo é considerado simples com obtenção de um grande número de células, que apresentam grande capacidade de proliferação e diferenciação (plasticidade celular) (109-111). Geralmente são extraídas e isoladas 1×10^6 AT-MSCs a cada 50 mL com aproximadamente 95% de pureza (106). Lembrando que o procedimento de lipoaspiração é um processo rotineiro na medicina e considerado simples, que propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo que seria descartado (110, 112, 113). Em grande parte dos estudos as AT-MSCs são cultivadas e expandidas em culturas monocamadas em placas de cultura de plástico contendo meio de cultura e 10% de soro fetal bovino (106).

As AT-MSCs apresentam maior capacidade de proliferação em cultura quando comparadas as MSCs derivadas de medula óssea. As taxas de proliferação dessas células são influenciadas e variam de acordo com a idade do doador (quanto menor a idade melhores as taxas de proliferação), o tipo e localização do tecido adiposo lipoaspirado (tecido adiposo marrom ou branco e subcutâneo ou visceral), o procedimento de coleta e as condições da cultura celular que dependem de formulações diferentes de meios de cultura (106, 114).

As MSCs ainda apresentam algumas características que são muito importantes na terapia celular e medicina regenerativa, que são: o efeito parácrino, imunomodulação e o *homing* celular.

8. *Homing* Celular – MSCs *Homing*

Uma das principais características que tornam as MSCs muito utilizadas nas pesquisas em terapia celular é chamada de *homing* celular. Ele ocorre quando a vasculatura de um tecido captura as MSCs realizando sua transmigração através do endotélio. Mesmo ainda não sendo muito bem conhecido, muitos trabalhos vêm demonstrando que este processo de *homing* das MSCs é muito semelhante ao dos leucócitos (Figura 5). Em um primeiro momento essas células entram em contato com as células do endotélio desacelerando o fluxo sanguíneo, em um segundo momento são ativadas por receptores acoplados a proteína-G seguido de uma ativação dependente de integrina. Após esse processo as células migram através do endotélio e da membrana basal subjacente (115-117).

Diferentes tipos de moléculas estão envolvidas e são necessárias nas diferentes fases deste processo. No primeiro momento estão envolvidas as selectinas-P e E, assim como a glicoproteína ligante de selectina-P (PSGL-1), presentes no endotélio. No *homing* celular das células endoteliais da medula óssea, o ligante selectina-L/-E (HCELL), uma glicofoma especializada da CD44, é muito importante para a realização da migração (116), sendo que muitos estudos têm observado a interação entre essas moléculas no *homing* das MSCs. Além disso, muitos estudos vêm demonstrando que a interação entre essas duas selectinas é muito importante para a migração de leucócitos através da parede endotelial para locais com injúrias e processos inflamatórios (117).

Os receptores acoplados a proteína-G também participam do processo de *homing*. Um dos receptores mais estudados é o CXCR4-SDF-1 (receptor de quimiocina tipo-4 e fator derivado de célula estromal-1). Apesar da expressão desses receptores nas MSCs, que apresentam muitas controvérsias, elas possuem importante função fisiológica (116). As integrinas (VCAM-1-VLA-4 / molécula de adesão celular vascular 1 e antígeno 4 tardio) são importantes no terceiro passo para o *homing* celular, pois essas integrinas realizam uma firme adesão entre as células e o endotélio, sendo que a inibição da integrina $\beta 1$ (juntamente com a integrina $\alpha 4$ forma a VLA-4) pode anular o *homing* das MSCs. Mesmo não se tendo consenso de como ocorre todo o processo nas AT-MSCs, um estudo sugere que a molécula CD24 é um provável ligante para a selectina-P. No último estágio para a migração celular as metaloproteínases (MMP), principalmente as MMP-2 e MMP-9, têm importante função por degradarem colágeno, principal componente da membrana basal, ajudando assim na migração das células através do endotélio vascular (116-118).

Alguns trabalhos têm estudado alguns fatores que influenciam a migração das MSCs. *Herrera et al. 2007*, demonstrou a importância da CD44 para o recrutamento das MSCs. O grupo injetou células-tronco mesenquimais da medula óssea CD44^{+/+} e CD44^{-/-} em camundongos com insuficiência renal aguda, demonstrando a presença das CD44^{+/+} e ausência das CD^{-/-} na microcirculação renal dos animais, sugerindo que a CD44 é muito importante para o recrutamento dessas células (119). Em outro estudo as células-tronco foram observadas na medula óssea, no fígado, baço e pulmões após algumas injeções de MSCs. Neste estudo também foi observado um aumento do *homing* celular em animais mais jovens após as injeções, com uma diminuição quando a passagem das células era maior (120).

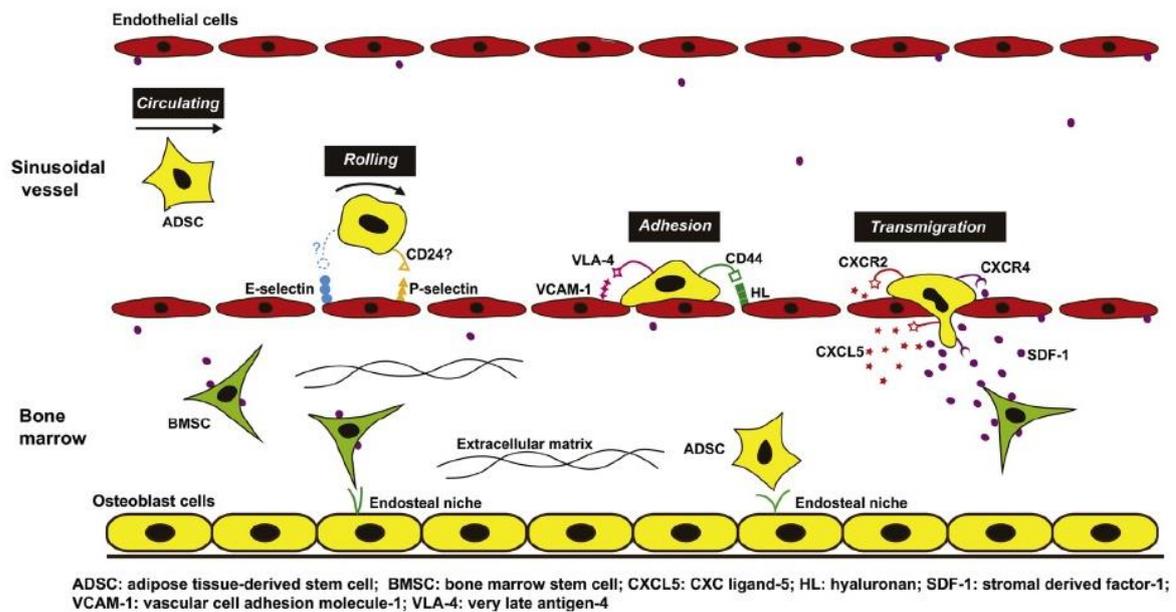


Figura 5. Visão geral dos mecanismos envolvidos no homing celular (117)

As MSCs ainda apresentam capacidade de interagir com o organismo através de efeito parácrino (interação e comunicação entre células vizinhas) e imunomodulador (controle das reações imunológicas com ajuste ao nível desejado), se tornando desta forma células que apresentam grande potencial para fins experimentais e, em um futuro, como fontes de células-tronco autólogas de fácil obtenção e manipulação, serão muito utilizadas na terapia celular e medicina regenerativa (121, 122). As propriedades de imunomodulação e efeito parácrino serão descritas a seguir.

9. Imunomodulação e Efeito parácrino das Células-tronco

Desde a identificação e descoberta da presença de células-tronco no tecido adiposo, há mais de 40 anos, essas células vêm sendo cada vez mais pesquisadas e utilizadas na medicina regenerativa e engenharia de tecidos (123). Durante a resposta imune as MSCs se comunicam com o microambiente inflamatório, sendo que as MSCs expressam um grande número de moléculas de superfície celular (integrinas e moléculas de adesão) que promovem a interação com as células do sistema imune (Figura 6) (124).

Mattar et al. 2015 avaliou a ação das MSCs sobre os linfócitos T (CD4+ Th1), que são as principais células responsáveis por respostas imunes pró-

inflamatórias e ação contra distúrbios autoimunes específicos. Esse estudo demonstrou que as MSCs inibem a ação dessas células (125). *Cho et al.* 2014 descreveu que as MSCs reduziram a liberação de citocinas associadas a Th2 (IL-4 e IL-5) e aumentaram a secreção de interferon (IFN- γ) e IL-2 derivados de Th1 (126). Em um ambiente com processo inflamatório, níveis elevados de IFN- γ e TNF- α faz com que as MSCs aumentem a expressão de TGF- β , levando as células Th1 a expressarem mais IL-10 e assim reduzindo a produção de IFN- γ (125).

Mattar et al. 2015 ainda relata a ação das MSCs sobre os linfócitos T (CD4⁺ Th2), essas que tem papel fundamental na defesa contra parasitas extracelulares, aumentando a produção de IL-4 anti-inflamatória pelas células Th2 supostamente através da via PGE2 (125). Em doenças inflamatórias que estão associadas com quantidades elevadas de células Th2, como na Doença de Crohn, as MSCs inibiram a produção de IL-4 e IL-5 produzidas pelas Th1 e aumentaram IFN- γ e IL-2 que são derivadas de Th1, melhorando o processo inflamatório (126, 127). A ação das células-tronco mesenquimais estromais sobre os linfócitos é dependente da dosagem de células. *Machado e col.* 2014, apresentaram um estudo *in vitro* demonstrando que quanto maior foi a quantidade de MSCs em cultura de células maior foi a ação de inibição sobre os linfócitos (128).

As MSCs também realizam modulação dos linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), que são as principais células de ação contra células infectadas por vírus e células tumorais, também tendo papel primordial na resposta autoimune e na rejeição de transplantes. A ativação das células T CD8⁺ é desencadeada quando há interação do receptor de células T com o complexo HLA específico (125). Os estudos apontam que as MSCs apresentam capacidade de diminuir a resposta imune das células T CD8⁺ inibindo sua proliferação e maturação (126, 129).

O estudo de *Chen et al.* 2014, relatou que as MSCs induzem o aumento da secreção de IL-10 por monócitos (CD14⁺) suprimindo a proliferação e crescimento de células T (130). As MSCs promovem a sobrevivência de monócitos e induz sua diferenciação para macrófagos tipo 2 (CD163⁺ e CD206⁺) que secretam IL-10 (131). Também são capazes de inibir a função pró-inflamatória dos macrófagos e das células dendríticas, fazendo com que essas células apresentem uma resposta mais imunossupressora (125).

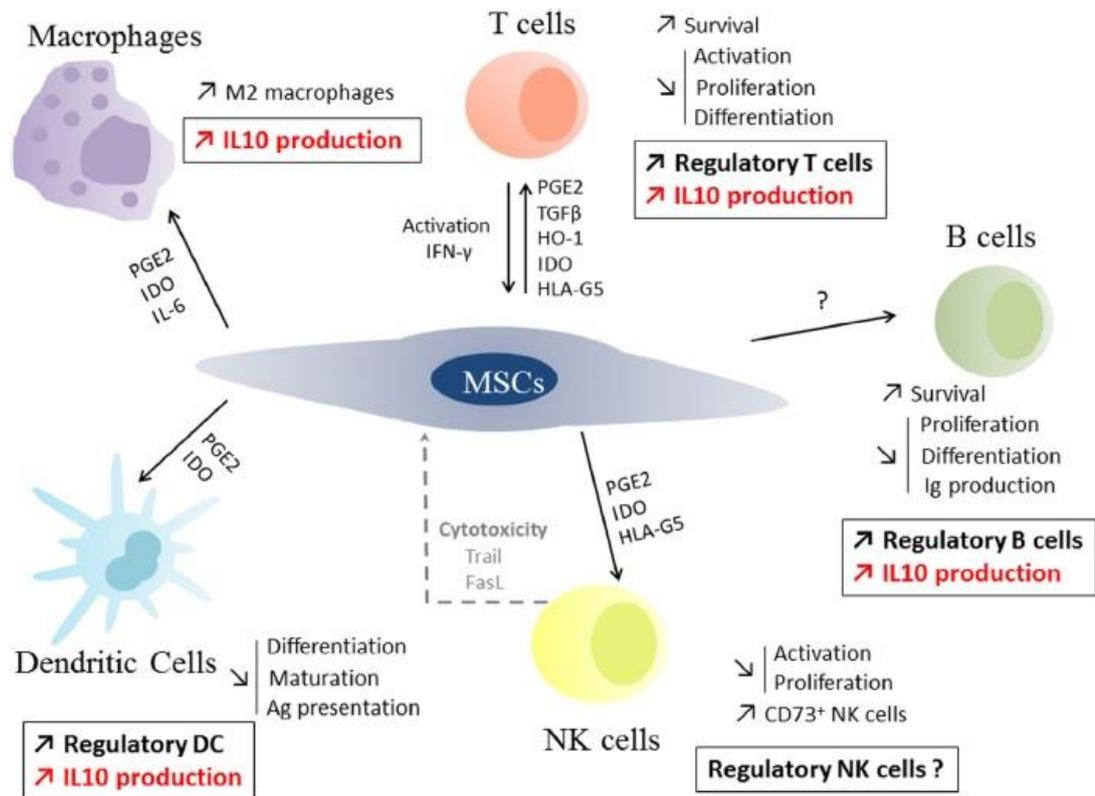


Figura 6. Imunomodulação das células do sistema imune através da ação das AT-MSCs (124)

As MSCs também tem efeito sobre a proliferação dos linfócitos B, suprimindo a diferenciação em plasmócitos (132). Essas células inibem as propriedades quimiotáticas dos linfócitos B interferindo nos receptores quimiotáticos (CXCR4/CXCR5/CXCR12). Esse efeito sobre os linfócitos também foi demonstrado em estudo *in vivo*, onde foram capazes de suprimir os antígenos específicos IgG1 e IgM em camundongos imunizados com antígenos de células T dependentes e independentes (128).

Quanto a angiogênese sabemos que ela é peça fundamental no processo de cicatrização e que as MSCs secretam fatores de crescimento e através do contato célula-célula conduzem o processo de angiogênese na reparação tecidual. *Malhotra et al. 2016* demonstra em seu trabalho a capacidade dessas células de liberar VEGF ajudando no processo angiogênico tanto *in vitro* quanto *in vivo* (122).

Na fase inflamatória do processo de reparo a ação das MSCs aumenta a produção de fatores anti-inflamatórios como as Interleucinas IL-10, IL-4 e TGF- β ;

ajudam ainda na produção local de pró-inflamatórios como IFN- γ e TNF- α . Isso auxilia que o processo de reparo passe para a próxima fase sem se tornar uma ferida crônica. As MSCs secretam fatores de crescimento como EGF, IGF, HGF e VEGF, que auxiliam nesse processo, apresentando ainda a capacidade de influenciar outras células do microambiente melhorando todo o processo (122).

Mesmo com o aumento do número de estudos que utilizam MSCs em medicina regenerativa e o avanço nas pesquisas, ainda não se sabe todos os mecanismos envolvidos na imunossupressão causada pelas MSCs, em terapias regenerativas. Sabe-se que essas células têm a capacidade de induzir a ação de imunossupressão no microambiente onde estão, e isso pode estar relacionado pela falta de imunogenicidade deste tipo de célula (Tabela 3). A principal molécula solúvel envolvida nesse processo é a HLA-G5, um antígeno das classes HLA-1, que é liberado após contato das MSCs com as células T. Assim HLA-G5 inibe a lise das MSCs alogênicas que seria mediada pelas células natural killer (NK), bem como a secreção de IFN- γ por estas células (128).

EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DAS MSCS	MECANISMOS
INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	1. IDO 2. Óxido nítrico (ON)
INDUÇÃO DA ANERGIA DE LINFÓCITOS T	Mediada por fatores solúveis e pelo contato célula-célula
INDUÇÃO DA APOPTOSE DE LINFÓCITOS T	1. IDO e IFN- γ 2. Mecanismo independente HLA-G
INDUÇÃO DAS CÉLULAS T REGULADORAS (CD4⁺ CD25⁺)	Mediada por fatores solúveis e pelo contato célula-célula
MODULAÇÃO DAS CÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS	1. Regulação descendente da expressão de MHC-II 2. Diminuição da secreção de IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12

Tabela 3. Mecanismos e funções de imunossupressão mediadas pelas MSCs. Adaptada de Abumarre *et al.* 2012 (133).

Matthay et al. 2017 e *Krasnodembskaya et al. 2010*, ainda demonstram que as MSCs podem apresentar propriedades antimicrobianas com a liberação de fatores solúveis, através de ação direta ou indireta. Em um estudo em camundongos com pneumonia (*E. coli*) foi demonstrado que as MSCs liberam proteínas e

peptídeos como o LL-37 (cathelicidin – peptídeo antimicrobiano de amplo espectro encontrado em humanos) e o lipocalin-2, levando a uma exclusão das bactérias. Outro mecanismo de ação microbiana dessas células inclui o catabolismo do tryptophan pela indolamina 2,3-dioxigenase (134, 135).

Outras propriedades pró-regenerativa das MSCs são a ação anti-oxidativa e o efeito anti-apoptótico que leva a uma diminuição da gravidade da lesão. Uma grande variedade de fatores secretados por essas células são responsáveis por esses efeitos, são eles: fator de crescimento semelhante a insulina tipo-1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento nervoso (NGF) e neurotrofin-3 (NTF3) (134).

10. Vias e proteínas estudadas

A. Metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 / MMP-9)

As metaloproteinases (MMPs) da matriz são constituídas por um grupo de enzimas que tem como principal função a degradação dos componentes da MEC e das membranas basais. Hoje são conhecidos mais de 20 tipos de MMP que são classificadas em 5 grupos (Tabela 4) de acordo com sua especificidade (colagenases, gelatinases, estromelinas, tipo-membrana e outros). As MMPs degradam as macromoléculas da matriz, principalmente o colágeno, a fibronectina, a laminina e a proteoglicana (136-138)

As MMPs necessitam da presença de zinco (Zn^{++}) para realizarem suas funções de degradação. Elas são produzidas principalmente pelos leucócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e por células mesenquimais. Essas células respondem a presença de alguns fatores de crescimento (IL-1, TNF- α e TGF- α), liberando as MMPs para o meio extracelular. Sua atividade é controlada por inibidores teciduais específicos, chamados de TIMPs. As TIMPs regulam o nível de ativação das MMPs, sendo muito importante para manter um equilíbrio e assim manter a homeostase da MEC (136, 137). As MMPs estudadas neste trabalho foram a MMP-2 e MMP-9, estas que são classificadas como gelatinases.

Número	Enzima	Substrato específico
<i>MMP-2</i>	Gelatinase A	Pró-MMP-9 e fibronectina
<i>MMP-9</i>	Gelatinase B	Gelatin, fibronectina, elastina, colágeno IV, V, VII, X e colágeno I desnaturado
<i>MMP-3</i>	Estromelisina-1	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicana, colágeno VI, V, IX, X, Pró-MMPs -1, -7, -8, -9, -13
<i>MMP-10</i>	Estromelisina-2	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicana, colágeno IV, V, IX, X
<i>MMP-7</i>	Matrilisina	Fibronectina, elastina, colágeno IV
<i>MMP-12</i>	Metaloelastase	Elastina
<i>MMP-1</i>	Colagenase	Pró-MMP-9
<i>MMP-8</i>	Neutrófil colagenase	Colágeno helicoidal
<i>MMP-13</i>	Colagenase-3	Colágeno helicoidal

Tabela 4. Principais MMPs de matriz e seus substratos específicos (136).

B. Receptores do tipo Toll-Like (TLR2 e TLR4)

Os receptores de membrana Toll-like (TLR) são proteínas que desempenham papel importante no reconhecimento de patógenos, além de gerar sinais para a produção de citocinas pró-inflamatórias. Em humanos, hoje, temos identificados e classificados 10 tipos de TLR exercendo papel importante nos sistemas de imunidade inata e adquirida (139, 140).

Os TLRs estão presentes nos macrófagos, células dendríticas e nos neutrófilos exercendo o papel de reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). Alguns TLRs estão presentes na membrana celular e outros estão localizados no espaço intracelular. O TLR 4, estudado neste trabalho, é de membrana celular (139, 140).

Após a ativação da via TLR muitas citocinas, principalmente as interleucinas, são liberadas agindo no organismo no combate dos microorganismos. Um equilíbrio entre a ativação e inativação dos receptores se faz necessária para evitar uma resposta inflamatória excessiva. Algumas doenças crônicas inflamatórias

e autoimunes apresentam falta do equilíbrio entre ativação e inativação dos receptores TLR. Uma pequena ativação dos receptores TLR pode levar a uma grande susceptibilidade a patógenos, enquanto uma alta ativação geralmente está relacionada com doenças autoimunes (139, 140).

C. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

A formação da rede vascular normal no organismo humano ainda é pouco entendida, acreditando-se que para a formação da rede vascular há a secreção balanceada e equilibrada de fatores por diversas moléculas. Essas moléculas incluem principalmente as citocinas da família VPF/VEGF – fator de permeabilidade vascular/fator de crescimento endotelial vascular (43).

As citocinas chamadas de VEGF ainda são responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos em resposta a ferimentos, tumores, processos inflamatórios crônicos, entre outros estímulos patológicos. Muitas vezes os vasos sanguíneos formados podem apresentar algumas alterações em relação a sua organização celular, estrutura e função (43).

O VEGF é membro de uma família de citocinas que exercem diversas funções na angiogênese fisiológica e patológica. A família VPF/VEGF pertence ao grupo de glicoproteínas diméricas e é constituída do VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e VEGF-F, além do fator de crescimento placentário (PGF). De todos estes, o VEGF-A, é o mais estudado e compreendido. Sua ativação desencadeia diversas vias de sinalização intracelular que agem na proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e mitogênese das células endoteliais (141, 142).

A indução da angiogênese ocorre através da atuação direta do VEGF nas células endoteliais. O VEGF se liga e ativa os receptores de membrana pertencentes a família de receptores tirosina quinase iniciando e ativando as vias que resultam na indução da angiogênese (141)

D. Colágenos: Tipo I e Tipo III

O colágeno é a proteína fibrosa mais importante da constituição dos tecidos conjuntivos. A família de colágenos é composta por 27 proteínas isoformas que contém cadeias peptídicas dos aminoácidos glicina (33,5%), lisina, prolina

(12%), hidroxilisina, hidroxiprolina (10%) e alanina. Essas cadeias são as responsáveis pela formação das fibras de colágeno que proporcionam elasticidade e resistência. Como principal função, as fibras de colágeno ajudam na fixação de células na matriz extracelular contribuindo para sua integridade estrutural (143, 144).

O colágeno é formado durante o desenvolvimento embrionário e também através de processos de regeneração e reparo tecidual. As moléculas de colágeno são secretadas por fibroblastos (células do tecido conjuntivo) na forma solúvel de procolágeno, formado de peptídeos globulares de nitrogênio (N-) e carbono (C-) terminais. O procolágeno é secretado dentro de vesículas formadas pelo complexo de Golgi e em seguida é secretado na matriz extracelular. Na matriz, com a ação das N- e C-peptases, há a clivagem das duas estruturas globulares iniciando o processo de fibrilogênese (produção de colágeno) (143, 145).

A produção e biossíntese de colágeno ocorre em várias etapas no organismo, sendo que para ser renovado há a necessidade inicial da degradação do colágeno para que em seguida se inicie a síntese de um novo. Devido ao grande número de etapas envolvidas na síntese de colágeno erros podem acontecer, sejam por falhas enzimáticas ou processos patológicos (144).

Neste trabalho foram estudados os colágenos fibrilares tipo I e tipo III, que variam em sua composição e distribuição de aminoácidos dentro do organismo. O colágeno tipo I é o mais comum e o mais estudado, sendo a principal proteína estrutural da pele, tendão e osso (145). Na região da lesão, fístula, espera-se encontrar, nos primeiros dias do processo de cicatrização, mais colágeno tipo III com uma transição gradual do colágeno tipo III para o colágeno tipo I com o aumento dos dias de cicatrização.

E. Interleucina-6

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina que pertence a uma classe de pequenas proteínas que estão relacionadas com a proliferação e diferenciação celular, sobrevivência e apoptose celular. A IL-6 está envolvida na resposta imune de fase aguda, atuando ao mesmo tempo com ação pró-inflamatória e anti-inflamatória. Essa citocina é produzida por vários tipos celulares como, fibroblastos, monócitos, macrófagos e células tumorais sendo sua produção regulada pela

prostaglandina E2 (PGE2) e pelo fator de crescimento transformados beta (TGF- β) (146).

A IL-6 pertence a uma família de proteínas que utiliza a GP130, proteína de transdução de sinal. A IL-6 se liga ao seu receptor (IL-6R) formando um complexo que está associado a GP130. Existem dois tipos de receptores (IL-6R) para a IL-6, o receptor ligado a membrana e o solúvel (mIL-6R e sIL-6R respectivamente). O primeiro é ativado pela via clássica, já o segundo é o responsável pela ativação via trans-sinalização (Figura 7) (147). O receptor sIL-6R pode ser encontrado em todos os biofluidos do corpo, enquanto o mIL-6R só é encontrado em hepatócitos e alguns leucócitos (146).

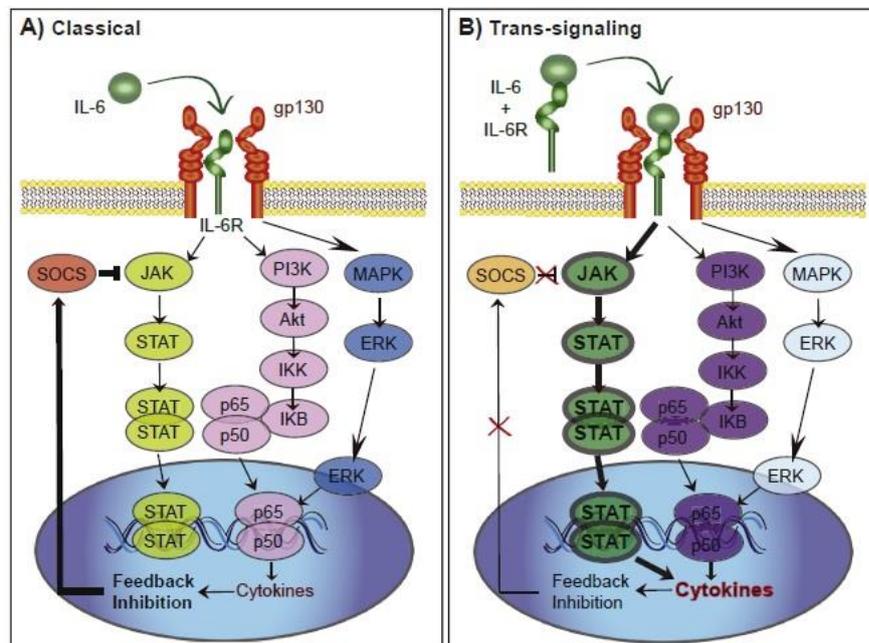


Figura 7. Características da via clássica e via trans-sinalização. A) A via clássica leva a ativação das vias JAK/STAT, AKT e MAPK alterando a transcrição. A liberação de citocinas leva a uma inibição do feedback através de SOCS. B) Na trans-sinalização ocorre uma maior sinalização da via JAK/STAT em relação a MAPK através da supressão de SOCS. A falta de um feedback causando um aumento da ativação de JAK/STAT leva a uma maior transcrição das citocinas e um estado pró-inflamatório. Adaptado de Georgia et al. (147).

F. Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α , citocina pró-inflamatória Th1, tem como principal papel no organismo promover resposta imune e inflamatória através do recrutamento de monócitos e neutrófilos para o local da lesão/infecção. Ele é produzido por linfócitos, monócitos ou macrófagos ativados, que tem como principal estímulo a presença de

lipopolissacarídeos que são encontrados nas membranas das bactérias *gram negativas*. A partir daí o TNF- α produzido se liga aos receptores específicos, TNF-R I e II, para realizar no organismo seus efeitos biológicos (148, 149).

Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que irão determinar o efeito e ação dominante do TNF- α no organismo. Em baixas concentrações, o TNF- α age nas células endoteliais ocasionando vasodilatação e estimulando a secreção de quimiocinas que atraem leucócitos gerando um processo inflamatório local, possibilitando desta forma um combate a focos infecciosos (148). Outra ação do TNF- α no organismo é desencadear o processo de apoptose celular (150).

Por participar ativamente do processo de inflamação em locais de infecção, o TNF- α e as citocinas da família TNF- α e seus inibidores, vem sendo muito estudados e utilizados na terapia de doenças autoimunes e no câncer (150).

Assim, é de grande importância a avaliação de todas as vias e proteínas aqui citadas para um melhor entendimento do processo de cicatrização das fístulas enterocutâneas quando tratadas com fios de sutura com células-tronco mesenquimais aderidas. Um melhor entendimento do processo de reparo tecidual se faz necessário para que novas abordagens terapêuticas sejam desenvolvidas.

OBJETIVOS

Este estudo tem como principal objetivo avaliar e compreender, do ponto de vista celular e molecular, como o processo de cicatrização de fístulas enterocutâneas, em modelo animal, ocorreu após o tratamento das feridas com fios de sutura contendo células-tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter e caracterizar as AT-MSCs para garantir que as células utilizadas neste estudo realmente são células-tronco mesenquimais estromais;
2. Estabelecer protocolos de imunohistoquímica e determinar os anticorpos que participam do processo de cicatrização para avaliar como ocorreu o processo de cicatrização das fístulas enterocutâneas em modelo animal;
3. Avaliar através de testes de imunohistoquímica, como se deu a cicatrização das fístulas enterocutâneas em modelo animal, com o tratamento utilizando fios de sutura enriquecidos com AT-MSCs.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Fontes de obtenção de AT-MSCs

As células-tronco mesenquimais estromais (AT-MSC) foram obtidas de tecido adiposo humano de pacientes hígidos submetidos a cirurgia de lipoaspiração estética, sob anestesia geral. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1 - processo CEP-Nº 839/2008) foi aplicado a todos os pacientes submetidos a lipoaspiração que tenham concordado com a doação. Foram selecionados pacientes entre 20 e 50 anos e excluídos os pacientes diabéticos e hipertensos.

2. Extração de AT-MSCs

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com PBS (*phosphate-buffered saline*) para remover traves de tecido conjuntivo e hemácias. Para cada 10mL de tecido, a proporção das substâncias para o tampão de digestão foi de: 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de albumina sérica bovina (BSA), 20ml de D-MEM Low Glucose e 10µl de gentamicina. A mistura foi adicionada ao tecido e tratada em banho-maria à 37°C por 30 minutos, agitando-se o recipiente a cada 5 minutos. Após a digestão completa do tecido, a reação foi interrompida com 10mL de soro fetal bovino (FBS). A seguir, foi centrifugada por 15 minutos a 1500rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de células re-suspenso em 10mL de D-MEM Low Glucose com 10% do volume de FBS. O meio de cultura foi trocado após 24 horas e a cada 3 dias consecutivamente, até que as células aderidas ao plástico atingissem a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células foram então tripsinizadas [tripsina 0,005% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)], retiradas da garrafa e colocadas em outras duas garrafas (processo denominado passagem celular) até chegar na 4ª passagem da cultura, quando as células foram utilizadas para os demais métodos do trabalho (Figura 8).

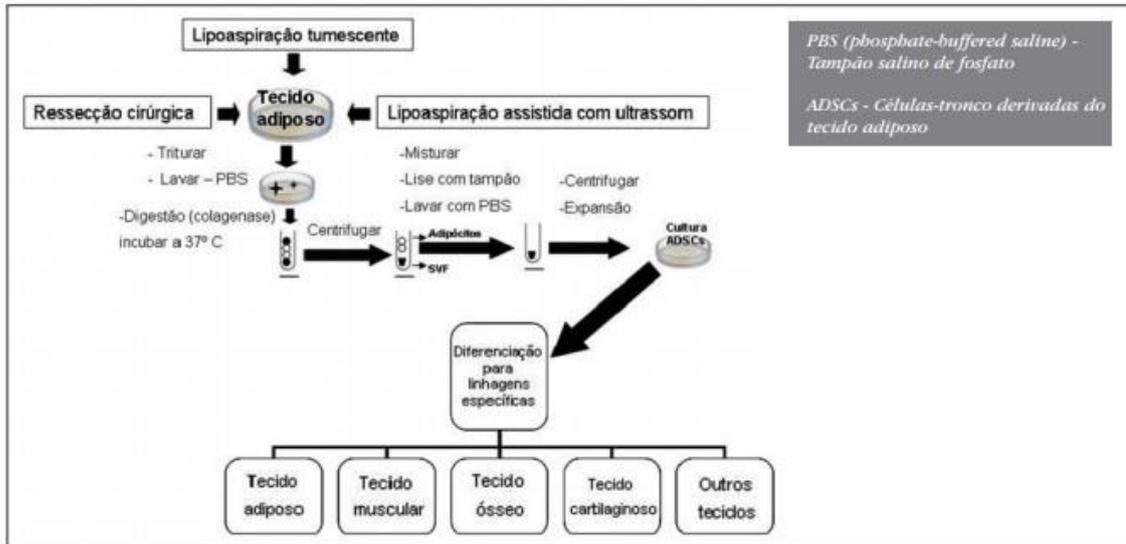


Figura 8. Obtenção de células-tronco mesenquimais estromais a partir de tecido adiposo (151).

3. Caracterização das AT-MSCs

Toda a caracterização das AT-MSCs utilizadas neste estudo [diferenciação mesodérmica *in vitro* (linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica)], imunofenotipagem através de citometria de fluxo, análise citoquímica das AT-MSCs diferenciadas, imunocitoquímica e microscopia confocal, citogenética e atividade da enzima telomerase) foram realizadas em estudo anterior de dissertação de mestrado e já publicados no artigo “*Mesenchymal stromal cells from adipose tissue attached to suture material enhance the closure of enterocutaneous fistulas in a rat model*” publicado em 2014 e anexado no final desta tese (Anexo 3) (152).

4. Adesão das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura

Foram utilizados fios de sutura 4-0 Poly Vicryl J-304 Poliglactina 910. Para ajudar na fixação das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura foi utilizada cola de fibrina (fabricação própria). A preparação da cola de fibrina teve as seguintes proporções: 20uL de fibrinogênio, 30uL de trombina e 10uL de cloreto de cálcio para cada fio. Após a preparação da cola de fibrina, os fios de sutura foram abertos dentro do fluxo laminar e colocados em placas para cultivo celular. Em seguida foram gotejadas 1×10^6 AT-MSCs em cima de cada fio de sutura

e logo em seguida foi adicionada a cola de fibrina ao longo de toda a extensão do fio. Após a execução de todo este procedimento adicionamos 25mL de meio de cultura DMEM baixa concentração de glicose mais 10% do volume de soro fetal bovino (FBS) para o crescimento das células. A fixação e proliferação celular foram observadas após 24 horas.

5. Procedimento animal – fístula cecal

A. Grupo experimental

Todos os procedimentos utilizados neste estudo estão de acordo com os “Princípios éticos na experimentação animal” e foram aprovados pelo CEUA/Unicamp (protocolo nº 3293-1) (Anexo 2). Neste estudo foram utilizados animais da espécie *Rattus norvegicus albinus*, cepa Wistar (25 animais), com 10 semanas de vida do sexo masculino. A colônia de ratos Wistar foi monitorada pela Seção de Qualidade Sanitária do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP descritas por Gilioli et al, 2000 e Gilioli, R., 2003 (153, 154). Após a cirurgia e aplicação dos fios de sutura com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas, os animais foram mantidos sob condições assépticas pré-determinadas pelo Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP.

Os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo controle (GC – 5 animais), Grupo fístula sem AT-MSCs (GF – 5 animais) e Grupo fístula com AT-MSCs (GF/AT-MSCs – 15 animais). O GC não sofreu nenhum tipo de lesão e foi sacrificado com 21 dias. No GF o fio de sutura utilizado para formar a fístula foi um fio de sutura sem adesão de AT-MSCs, sendo este grupo acompanhado e sacrificado com 21 dias. Já no GF/AT-MSCs o fio de sutura utilizado para formar a fístula continha 1×10^6 AT-MSCs aderidas. Este grupo foi subdividido em grupos de 7, 14 e 21 dias (5 animais em cada), dias em que os animais foram sacrificados (Figura 9). Essa divisão foi realizada para acompanhar como ocorreu a cicatrização nas diferentes fases deste processo.

B. Anestésias

Os animais foram anestesiados com Ketamina (80mg/kg) e Xylazina (10 mg/kg), diluído em PBS, via intraperitoneal, na cirurgia para a formação da fístula.

Para realizar a eutanásia dos animais foi utilizada câmara de CO² para todos os grupos.

C. Procedimento cirúrgico

O procedimento cirúrgico foi realizado segundo protocolo desenvolvido pelo mesmo grupo de pesquisa em estudo anterior (152). Após serem anestesiados e colocados em posição de decúbito dorsal, foi feita a depilação seguida de antissepsia da parede abdominal com polivinilpirrolidona-iodo 1%. Em seguida foi realizada a laparotomia mediana de 7mm dando acesso ao ceco, que foi exposto e submetido a enterotomia de 5mm na borda antimesentérica. Após a abertura do ceco foram dados quatro pontos com fio de sutura (4-0 Poly Vicryl J-304 Poliglactina 910) com AT-MSCs aderidas da borda antimesentérica com a pele, formando a fístula.

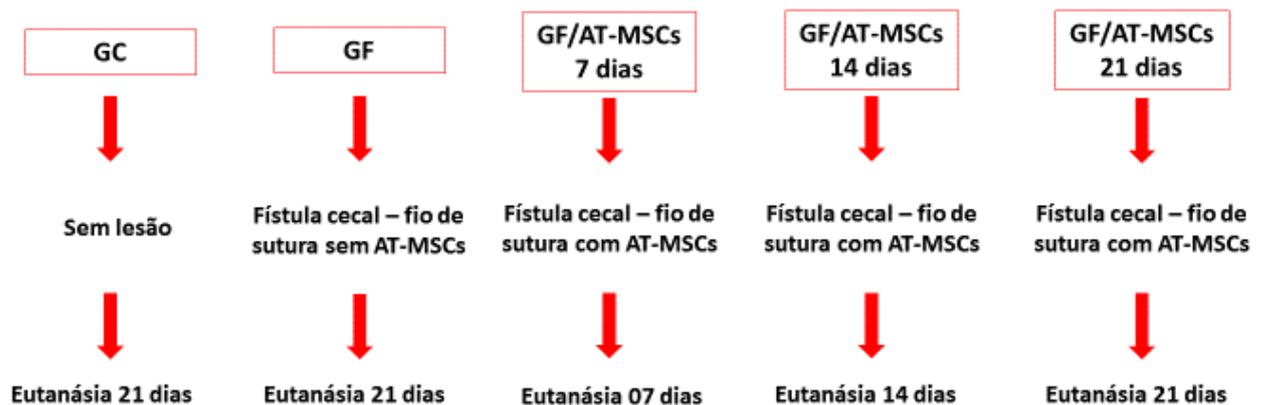


Figura 9. Desenho experimental do grupo animal.

6. Preparação do material histológico

Coleta das amostras: Nos dias em que os animais foram sacrificados os segmentos de ceco e pele, onde houve a formação da fístula, foram removidos através de necropsia do animal. As peças foram clivadas (para a redução de seu tamanho e assim permitir a penetração mais fácil do fixador) e ficaram com tamanhos em torno de 8mm.

Fixação: Após a coleta das amostras, essas foram colocadas diretamente no fixador Bouin e deixadas por doze horas. Após este período as peças passaram

por pelo menos 10 lavagens com álcool 70% para a retirada do ácido pícrico presente no Bouin e que danifica o tecido.

Desidratação: As amostras foram colocadas em álcool 80%, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 100% III e álcool 100% IV por 30 minutos, nesta ordem.

Diafanização: Após a desidratação as amostras foram colocadas em álcool/xilol por 15 minutos e em xilol I, xilol II e xilol/parafina por 30 minutos, nesta ordem.

Inclusão: Antes de se iniciar o processo de inclusão das peças, os moldes foram colocados na estufa (60°C) para estarem quentes no momento da inclusão. As peças foram então colocadas em parafina I e parafina II por 1 hora, nesta ordem. Após esta etapa o molde foi retirado da estufa (um de cada vez) e foi colocado parafina; a posição da peça foi ajustada dentro do molde e este foi logo em seguida colocado na placa resfriadora até que o molde com a peça esfriasse completamente.

Microtomia: Foram realizados cortes de 5 micrômetros de espessura em micrótomo Leica rotativo automatizado (RM2255). Após a realização dos cortes as lâminas ficaram em estufa (37°C) durante 48 horas.

7. Análise Histopatológica – Hematoxilina e Eosina (H.E.)

Antes do processo de coloração, as lâminas foram colocadas na estufa (60°C) durante 1 hora e 30 minutos para a desparafinização. Após esta etapa as lâminas passaram pelo processo de hidratação: Xilol I – 10 minutos, Xilol II – 10 minutos, Xilol/Álcool – 5 minutos, Álcool absoluto – 5 minutos, Álcool 80% - 5 minutos, Álcool 70% - 5 minutos e água – 5 minutos.

Concluída a hidratação as lâminas foram colocadas no corante Hematoxilina de Harris por 1 minuto e logo após foram deixadas em água corrente durante 10 minutos. As lâminas foram colocadas no corante Eosina Alcoólica durante 1 minuto e em seguida foi realizada a desidratação: Álcool 80% - 5 minutos, Álcool 95% - 5 minutos, Álcool 95% - 5 minutos, Álcool absoluto I – 5 minutos, Álcool absoluto II – 5 minutos, Xilol I – 5 minutos e Xilol II – 5 minutos.

Com a finalização desta etapa foi realizada a montagem das lâminas. Em cada lâmina foi adicionado uma gota de Entellan (Merk) sobre o corte e a lamínula foi posicionada para completar a montagem das lâminas, que ficaram 3 dias em

temperatura ambiente para secar e estarem prontas para a visualização no microscópio.

A análise histopatológica (HE) foi realizada em todos os 3 grupos descritos acima (7, 14 e 21 dias) e também no grupo fístula (GF), onde foi realizada a mesma cirurgia para formação da fístula no animal, com a diferença do fio de sutura utilizado ser um fio de sutura convencional, sem a adesão de AT-MSCs. Esse grupo foi acompanhado por 21 dias onde foi sacrificado e teve as peças coletadas para realização das técnicas histológicas.

8. Preparação das lâminas para imunohistoquímica

Amostras do ceco de todos os animais de cada grupo experimental (n=5 animais por grupo), as mesmas utilizadas para as análises histopatológicas, foram utilizadas para imunohistoquímica. Foram obtidos cortes com 5µm de espessura no micrótomo rotativo *Slee CUT5062 RM 2165* (Slee Mainz, Mainz, Alemanha), coletados em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada por incubação dos cortes no tampão citrato (Antigen Retrieval Buffer) pH=6,0 a 95°C em panela a vapor. As lâminas foram colocadas no tampão a 95°C e deixadas por 30 minutos para que ocorresse a recuperação antigênica. Após esse período as lâminas foram deixadas 5 minutos em temperatura ambiente e houve a troca do tampão por água destilada. Os cortes foram secos ao redor e circundados com caneta hidrofóbica. O bloqueio das peroxidases endógenas foi obtido através da aplicação do bloqueador de peroxidase por 10 minutos e 5 minutos seguidamente. Após o bloqueio as lâminas foram lavadas três vezes com TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20) por 5 minutos cada vez. O bloqueio de proteínas inespecíficas ocorreu com BSA 3% durante 1 hora. Posteriormente, os antígenos MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1A1, VEGF-A, TLR-4, TNF-α e IL-6 foram localizados através dos anticorpos primários específicos (Tabela 5), diluídos em BSA 1% e armazenados *overnight* a 4°C. Após esse período os cortes foram lavados três vezes com TBS-T por 5 minutos cada lavagem. O *kit Advance™ HRP* (Dako Cytomation Inc., EUA) foi usado para detecção dos antígenos de acordo com as instruções do fabricante. Após lavagem com tampão TBS-T, os cortes foram incubados com anticorpo secundário HRP conjugado proveniente do *kit Advance™ HRP* por 40 minutos e, posteriormente foram lavados novamente por três vezes com

TBS-T por 5 minutos cada lavagem. Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB), lavados com água destilada com a ajuda de pipeta Pasteur e contra corados com Hematoxilina de Harris por 10 segundos. Em seguida as lâminas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e passaram pelo processo de desidratação, onde passaram pelas etapas de: álcool 70% - 5 minutos, álcool absoluto I – 5 minutos, álcool absoluto II – 5 minutos, xilol I – 5 minutos, xilol II – 5 minutos. Para finalizar foi instilado algumas gotas de Entellan (Merk, Alemanha) sobre a lâmina para fixação da lamínula. As lâminas foram avaliadas no fotomicroscópio *DM2500* (Leica, Munique, Alemanha).

Para avaliar a intensidade das imunorreatividades dos antígenos, a porcentagem de células e/ ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos foi examinada em três campos para cada anticorpo com aumento de 400x utilizando o *software Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) A intensidade da marcação foi graduada em uma escala de 0-3, e expressa como 0 (ausência de imunorreatividade), 0% de células e/ ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos; 1 (fraca imunorreatividade), 1-35% de células e/ ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos; 2 (moderada imunorreatividade), 36-70% de células e/ ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos; 3 (intensa imunorreatividade), >70% de células e/ ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos (modificado de Garcia et al., 2016) (155).

Anticorpos Primários	Espécie hospedeira	Código	Fonte
MMP-2	Camundongo (monoclonal)	gtx30147	<i>GeneTex, EUA</i>
MMP-9	Coelho (policlonal)	ab38898	<i>abcam, EUA</i>
COL3A1	Coelho (policlonal)	sc-28888	<i>Santa Cruz, EUA</i>
COL1	Camundongo (monoclonal)	sc-293182	<i>Santa Cruz, EUA</i>
VEGF	Camundongo (monoclonal)	sc-53462	<i>Santa Cruz, EUA</i>
TLR4	Camundongo (monoclonal)	sc-293072	<i>Santa Cruz, EUA</i>
TNF- α	Bode (policlonal)	sc-1350	<i>Santa Cruz, EUA</i>
IL-6	Coelho (policlonal)	sc-1265	<i>Santa Cruz, EUA</i>

Tabela 5: Características dos Anticorpos Primários para Imunomarcção.

9. Análises Estatísticas

As análises imunohistoquímicas para os diferentes antígenos foram avaliadas através do teste de proporção. Para essas análises, erro tipo-I de 5% foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

1. Avaliação do processo de cicatrização por imagem (ImageJ)

A avaliação do processo de cicatrização por imagem foi realizada em trabalho anterior, dissertação de mestrado e em artigo publicado (Anexo 3) (152), onde foram avaliados a cicatrização visual e por imagem de fístulas do ceco com a pele em animais divididos em três grupos: Grupo controle – sem tratamento, Grupo injeção de células – foram injetadas 1×10^6 AT-MSCs ao redor da fístula e Grupo fio + células – o fio de sutura utilizado para simular a ferida continha 1×10^6 AT-MSCs aderidas. Todos os grupos foram acompanhados por 21 dias.

No Grupo controle (Figura 10) nenhum dos animais teve o fechamento por completo da fístula, com débito médio de fezes (entre 200mL e 500mL/dia). No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm^2) menos a área final (mm^2), foi de 46,54%. Nenhum tipo de tratamento foi realizado com o grupo controle.

No grupo injeção de células (Figura 11) todos os animais tiveram uma recuperação e um tempo de fechamento da área da fístula (mm^2) melhor comparados ao grupo controle. No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm^2) menos a área final (mm^2), foi de 71,80%.

Por fim, no grupo fístula + células (Figura 12) no 15º dia a maioria dos animais já não apresentava débito de fezes e estavam com a cicatrização bem avançada. No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm^2) menos a área final (mm^2), foi de 90,34%.

A análise estatística comprovou que os grupos injeção e fio + célula tiveram uma evolução da área da fístula (mm^2) melhor que o grupo controle ($p < 0,05$). Observamos que no Gráfico 1 a área da fístula (mm^2) do grupo sutura (vermelho) tem um decréscimo significativo logo no terceiro dia, diminuindo progressivamente ao longo dos dias.

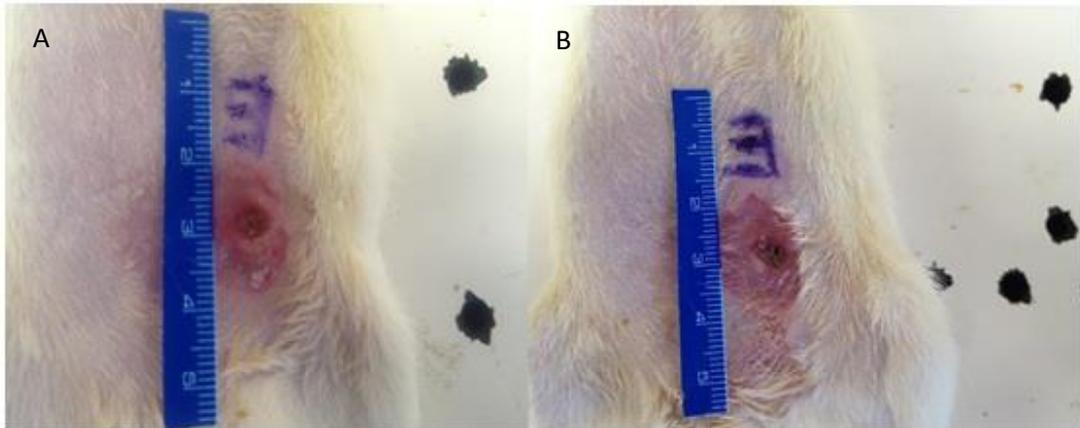


Figura 10. Grupo controle. A: 1º dia da formação da fístula. Observa-se a formação da fístula. B: 21º dia. A cicatrização da fístula não ocorreu. A região estava com alto débito de fezes.

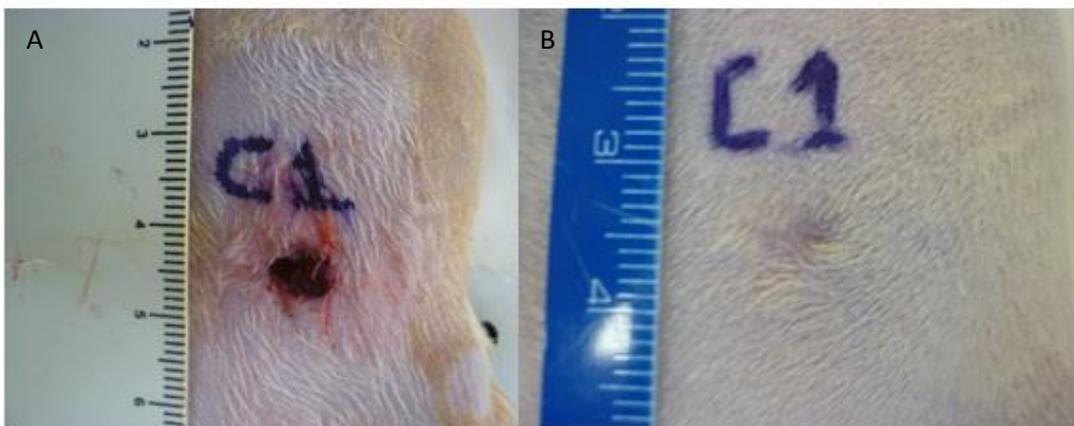


Figura 11. Grupo injeção de células. Legenda: A: 1º dia da formação da fístula. B: 21º dia após a formação da fístula. Nota-se que houve cicatrização no local da fístula.

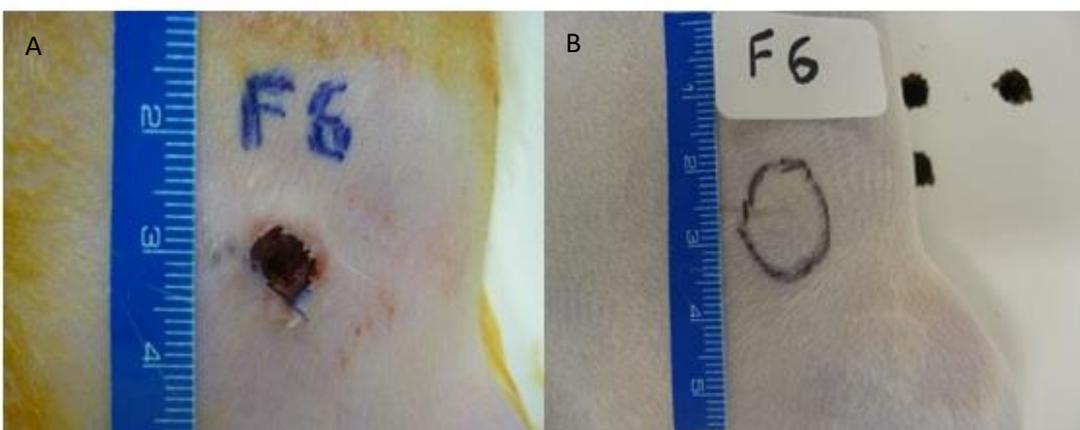
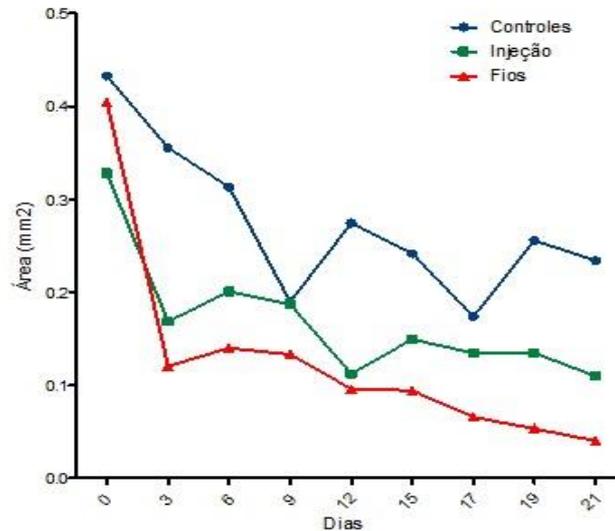


Figura 12. Grupo fio de sutura com células aderidas. Legenda: A: 1º dia da formação da fístula. B: 21º dia após a formação da fístula. A cicatrização da fístula foi total. O círculo demonstra a área onde estava a fístula.

Gráfico 1. Comparação da evolução da área da fístula nos 3 grupos durante 21 dias (152).



2. Análise histopatológica – Coloração HE

A mucosa do ceco dos animais do grupo controle foi constituída por epitélio cilíndrico simples com células caliciformes, sobre uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, contendo criptas de *Lieberkühn* (glândulas intestinais) (**Figuras 13a, 13b, 13c**). A submucosa foi formada por tecido conjuntivo fibroelástico rico em fibras colágenas (**Figuras 13a, 13b, 13c**). A camada muscular foi formada por túnicas de músculo liso, uma circular interna e outra longitudinal externa (**Figuras 13a, 13b, 13c**). Os processos de angiogênese e colagenização foram discretos nos animais do grupo Controle, enquanto que os processos inflamatórios e reação gigantocelular foram ausentes (**Tabela 6**).

A fístula na região do ceco (GF) foi caracterizada por quebra da arquitetura do alinhamento vertical das glândulas intestinais (padrão conhecido como tubo de ensaio). As glândulas apresentaram formatos irregulares e foram separadas por linfócitos e plasmócitos da lâmina própria expandida (**Figuras 13d, 13e, 13f**). Os processos de angiogênese e colagenização foram discretos nos animais desse grupo, enquanto que o processo inflamatório foi moderado e se localizou na submucosa e entre as glândulas intestinais (**Figuras 13d, 13e, 13f; Tabela 6**). A reação gigantocelular foi ausente nos animais desse grupo (**Tabela 6**).

Os animais tratados cirurgicamente com fio de sutura recoberto com AT-MSCs após 7 e 14 dias apresentaram melhor arranjo arquitetônico e formatos mais regulares das glândulas intestinais, sendo mais evidentes no grupo 14 dias em relação ao grupo 7 dias (**Figuras 13g, 13h, 13i, 13j, 13k, 13l**). O processo inflamatório foi intenso nos grupos 7 e 14 dias, localizando-se predominantemente na região submucosa. Entre as glândulas intestinais, o processo inflamatório foi reduzido, principalmente, no grupo 14 dias (**Figuras 13h, 13i, 13k, 13l; Tabela 6**). O processo de angiogênese foi intenso nos animais dos grupos 7 e 14 dias (**Figuras 13h, 13k; Tabela 6**). A colagenização foi moderada no grupo 7 dias e intensa no grupo 14 dias (**Figuras 13g, 13h, 13i, 13j, 13k, 13l; Tabela 6**). A reação gigantocelular foi moderada tanto nos animais do grupo 7 dias quanto no grupo 14 dias (**Tabela 6**).

Os animais tratados cirurgicamente com fio de sutura recoberto com AT-MSCs após 21 dias apresentaram melhor recuperação histológica, assemelhando-se ao grupo Controle (**Figuras 13, 13n, 13o**). As glândulas intestinais apresentaram formato característico com alinhamento vertical. Não foram evidenciados infiltrados inflamatórios entre as glândulas (**Figuras 13m, 13n, 13o**). Os processos angiogênicos e inflamatórios foram discretos, enquanto que a colagenização foi intensa nos animais desse grupo (**Figuras 13m, 13n, 13o; Tabela 6**). A reação gigantocelular foi ausente (**Tabela 6**).

Tabela 6. Valores Médios da avaliação da angiogênese, presença de infiltrado inflamatório, reação gigantocelular e colagenização no ceco dos animais do grupo Controle e nas regiões da fístula dos animais tratados com fio de sutura contendo AMSCs nos diferentes tempos (7, 14 e 21 dias).

Grupos	Angiogênese	Infiltrado Inflamatório	Reação Gigantocelular	Colagenização
Controle	1	0	0	1
Fístula	1	2	0	1
7 dias	3	3	2	2
14 dias	3	3	2	3
21 dias	1	1	0	3

Parâmetros: angiogênese, infiltrado inflamatório, reação gigantocelular tipo corpo estranho ao redor do fio de sutura e colagenização foram graduados de 1 a 4, sendo: ausente - 0; discreto - 1; moderado - 2; acentuado - 3.

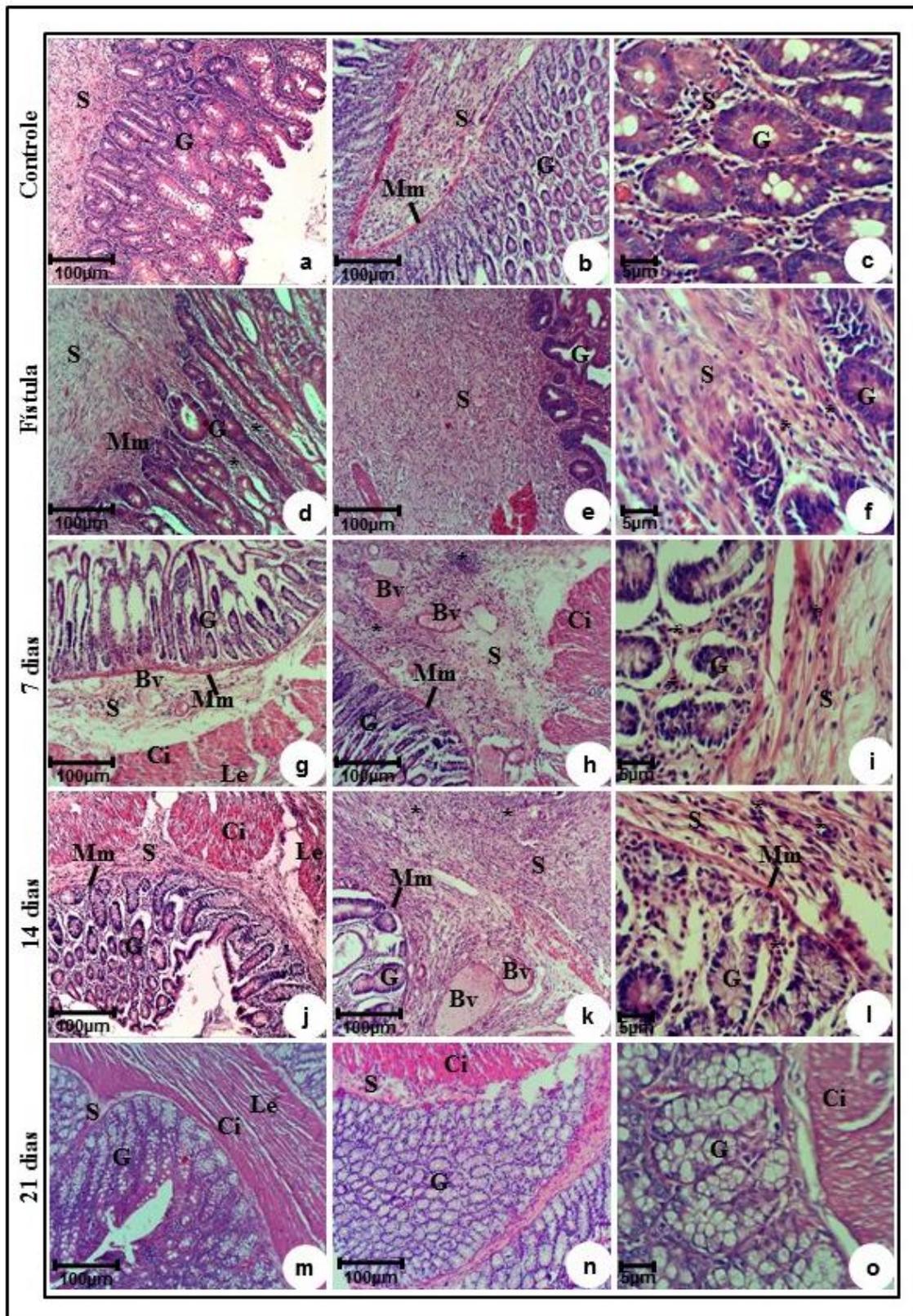


Figura 13. Análise histopatológica (coloração HE) dos grupos controle (a, b e c), fístula (d, e, f), 7 dias (g, h e i), 14 dias (j, k e l) e 21 dias (m, n e o). G = glândula intestinal / S = submucosa / Bv = vaso sanguíneo / Mm = muscular da mucosa / Ci = camada muscular circular interna / Le = camada muscular longitudinal externa / * = reações inflamatórias.

3. Imunomarcção dos Antígenos: MMP-2, MMP-9, COL3A1, COL1, VEGF, TNF- α e IL-6

As imunomarcações para MMP-2 foram significativamente intensas no grupo 7 dias, moderadas no grupo 14 dias e fracas nos grupos 21 dias e Controle (**Figuras 14a, 14e, 14i, 14m; Tabela 7**). Intensas imunorreatividades para MMP-9 foram verificadas no grupo 21 dias, moderadas nos grupos 7 dias e 14 dias, e fracas no grupo Controle (**Figuras 14b, 14f, 14j, 14n; Tabela 7**).

As imunomarcações para COL3A1 foram significativamente moderadas nos grupos 14 dias e 7 dias e fracas nos grupos 21 dias e Controle (**Figuras 14c, 14g, 14k, 14o; Tabela 7**). Em contraste, as imunorreatividades para COL1 foram significativamente intensas no grupo Controle, moderadas nos grupos 21 dias e 14 dias, e fracas no grupo 7 dias (**Figuras 14d, 14h, 14l, 14p; Tabela 7**).

As imunorreatividades para VEGF foram significativamente moderadas nos grupos Controle, 7 dias e 14 dias, e fracas no grupo 21 dias (**Figuras 15a, 15e, 15i, 15m; Tabela 7**). Intensas imunorreatividades para TLR4 foram verificadas no grupo 21 dias, moderadas nos grupos 7 dias e 14 dias, e fracas nos grupos Controle (**Figuras 15b, 15f, 15j, 15n; Tabela 7**).

As imunomarcações para TNF- α e IL-6 foram significativamente moderadas nos grupos 7 dias, 14 dias e 21 dias, e fracas no grupo Controle (**Figuras 15c, 15d, 15g, 15h, 15k, 15l, 15o, 15p; Tabela 7**).

Tabela 7: Intensidade da imunomarcção para os diferentes antígenos na região do ceco dos grupos Controle, 7 dias, 14 dias e 21 dias.

Antígenos	Grupos			
	Controle (n= 5)	7 dias (n= 5)	14 dias (n= 5)	21 dias (n= 5)
MMP-2	1 (28,4%)*	3 (87,1%)*	2 (46,7%)	1 (15,0%)
MMP-9	1 (17,3%)	2 (46,9%)	2 (41,2%)	3 (78,3%)*
COL3A1	1 (9,8%)	2 (41,9%)*	2 (44,0%)*	1 (11,9%)
COL1	3 (78,3%)*	1 (13,6%)	2 (39,5%)	2 (52,7%)
VEGF	2 (45,9%)*	2 (40,1%)*	2 (43,8%)*	1 (28,4%)
TLR4	1 (5,3%)	2 (57,8%)	2 (61,5%)	3 (88,4%)*
TNF- α	1 (7,5%)	2 (38,1%)*	2 (39,8%)*	2 (28,1%)*
IL-6	1 (6,1%)	2 (37,7%)*	2 (38,2%)*	2 (38,0%)*

0, ausência de reatividade; 1, fraca imunoreatividade (1% – 35% células e/ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos); 2, moderada imunoreatividade (36% – 70% células e/ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos); 3, intensa imunoreatividade (>70% células e/ou elementos fibrilares da matriz extracelular positivos).

*Significância estatística (teste de proporção, $p < 0.0001$)

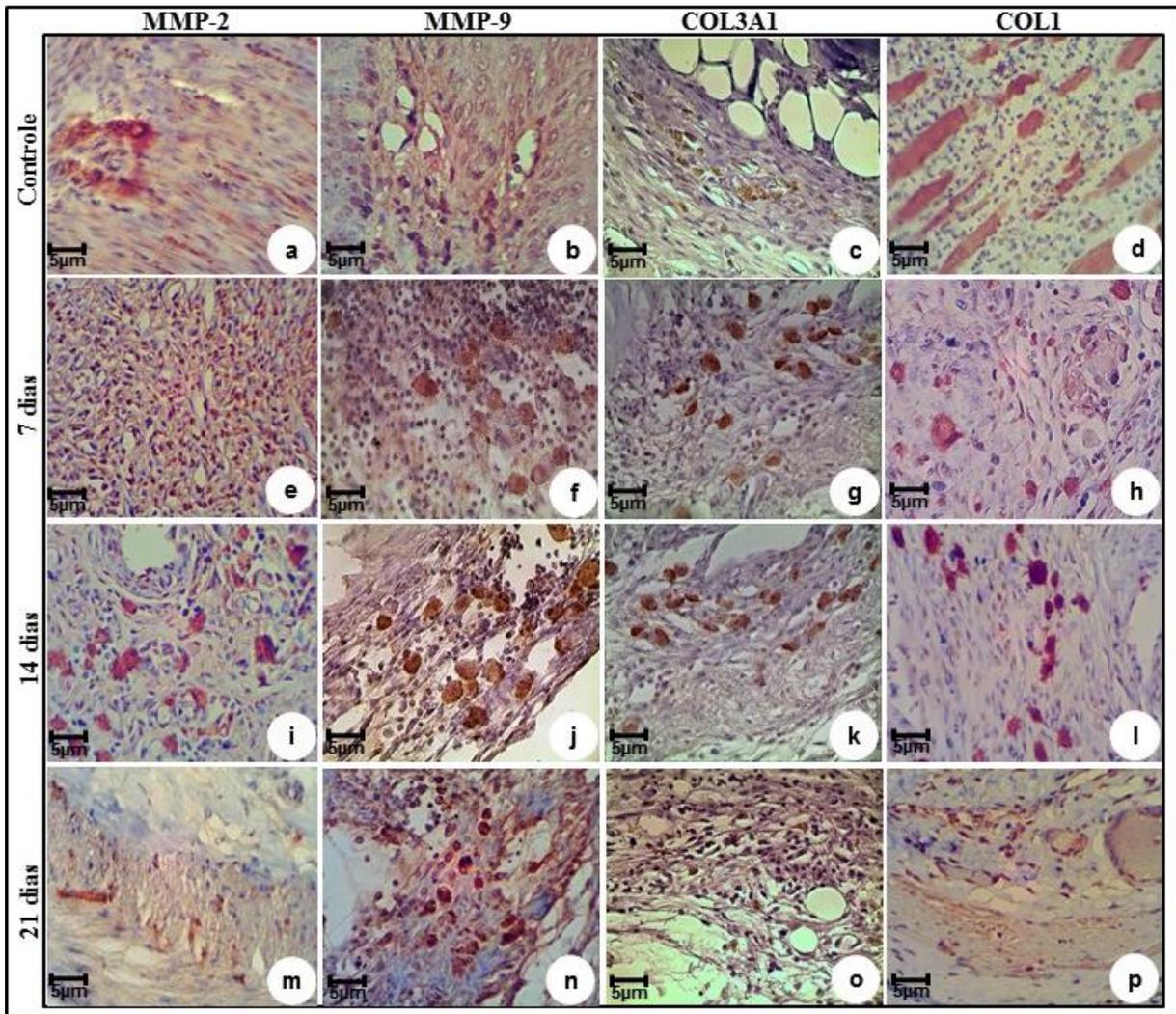


Figura 14. As intensidades de antígenos marcados com imunohistoquímica do ceco nos grupos controle (a, b, c e d), 7 dias (e, f, g e h), 14 dias (i, j, k e l) e 21 dias (m, n, o e p). As imunomarcações para MMP-2 estão representadas em a, e, i e m; para MMP-9 em b, f, j e n; Para COL3A1 em c, g, k e o; e finalmente para COL1 em d, h, l e p.

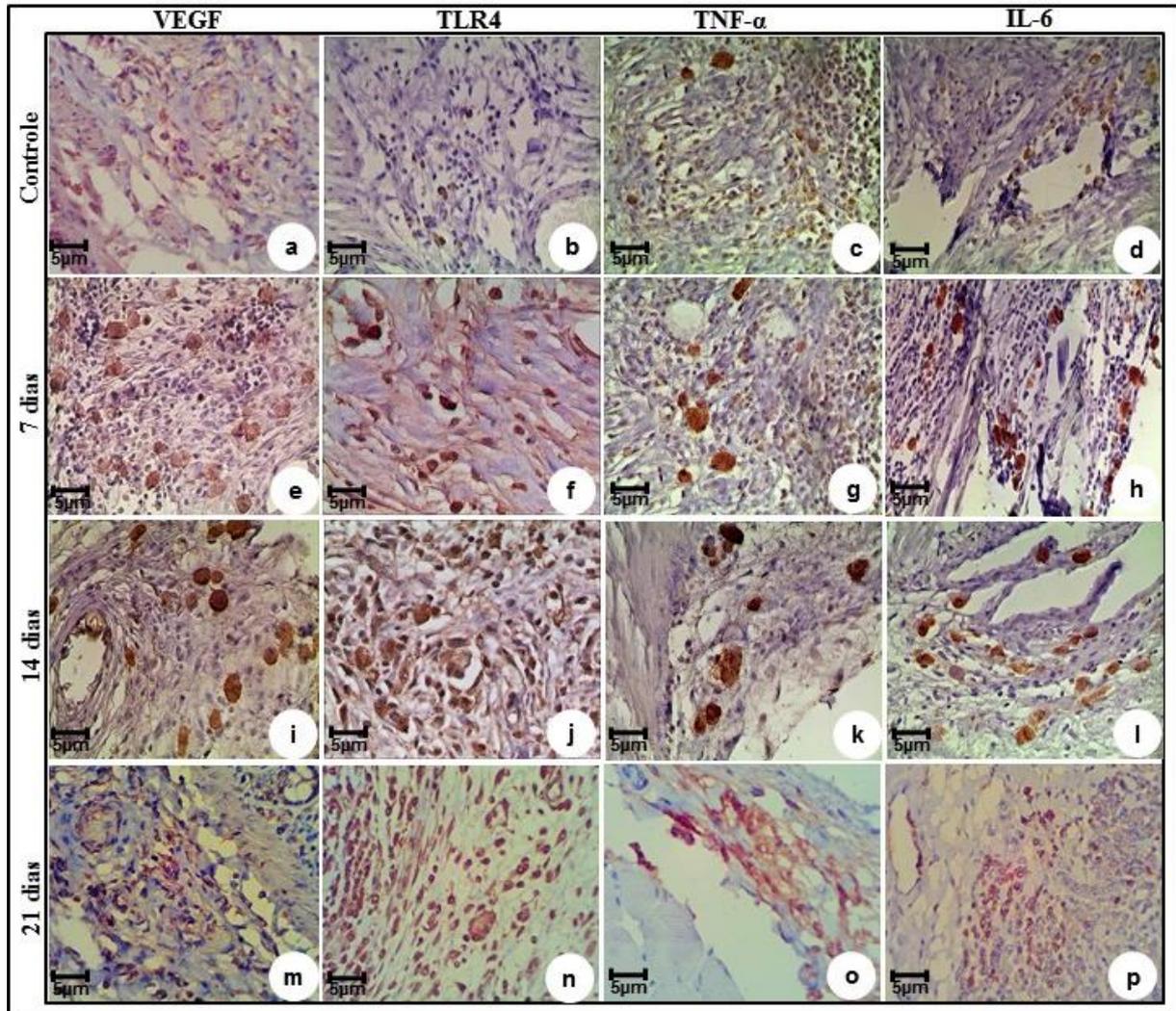


Figura 15. As intensidades de antígenos marcados com imunohistoquímica do ceco nos grupos controle (a, b, c e d), 7 dias (e, f, g e h), 14 dias (i, j, k e l) e 21 dias (m, n, o e p). As imunomarcações para VEGF estão representadas em a, e, i e m; para TLR4 em b, f, j e n; Para TNF- α em c, g, k e o; e finalmente para IL-6 em d, h, l e p.

DISCUSSÃO

A presença de fístulas acarreta muitas complicações que diminuem a qualidade de vida dos pacientes. A desnutrição, o estado clínico anterior ao surgimento da fístula, a sepse e processos infecciosos aumentam a complexidade e dificultam o tratamento e a recuperação do paciente.

Muitos trabalhos demonstram a importância de um controle nutricional adequado do paciente para uma cicatrização mais rápida do trajeto fistuloso. *Mukherjee et al. 2016* descreve que para a síntese de colágeno ocorrer de forma ideal, há a necessidade de uma energia nutricional adequada através de aminoácidos, vitaminas, alguns minerais e oxigênio, sendo estes a chave para o sucesso de reparo. Os pacientes com fístulas enterocutâneas requerem um controle nutricional complexo, já que perdem muitos fluídos, eletrólitos e proteínas através do débito da fístula. Esses pacientes chegam a perder 1g de proteína a cada 500mL de débito, podendo chegar a 29g a cada 1L. Para uma nutrição adequada esses pacientes necessitam de 25-35kcal/kg/dia de calorias não proteicas e 1.5-2.5g/kg/dia de proteínas (156).

Yassin et al. 2014 publicou um estudo de revisão com análise da combinação de tratamento cirúrgico e medicamentoso em pacientes com Doença de Crohn e fístulas perianais. Foram incluídos na análise estudos que apresentavam como tratamento e/ou o tratamento medicamentoso com imunomoduladores e terapias anti-TNF e/ou tratamento cirúrgico. Foram incluídos 24 estudos totalizando 1139 pacientes, onde 40% recebeu somente um dos tratamentos e 60% recebeu os tratamentos combinados. Muitos estudos não mencionavam quais pacientes tinham realizado um dos tratamentos ou se esses tratamentos foram realizados em conjunto. Assim, somente 8 estudos compararam ambos os tipos de terapia (isolada ou em conjunto), apresentando uma população de estudo de 797 pacientes. Dos 448 que foram submetidos à uma única terapia, 43% apresentaram melhora; já dos 349 que realizaram ambos os tratamentos, a melhora foi de 52%. Não houve resposta a um dos tratamentos em 34% dos casos e 23% quanto o tipo de tratamento foi conjunto (157).

Na DC todas as estruturas da parede intestinal apresentam espessamento, causada pelo acúmulo de MEC. Mesmo com tantos estudos, a fisiopatologia da DC ainda não é muito clara acreditando-se que a inflamação prolongada (crônica) e a formação de fibrose podem levar a uma diminuição da luz intestinal, perda da motilidade e conseqüentemente aumentar as restrições do intestino. O mecanismo de fibrose é bastante complexo, incluindo a proliferação e migração de fibroblastos. A inflamação persistente do intestino leva a um aumento do fator de crescimento fibroblástico (FGF) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), além das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α (158).

Além de todos os problemas clínicos e a baixa qualidade de vida que os pacientes com DC apresentam, ela ainda pode ser considerada uma doença com relevância clínico-epidemiológica, apresentando como principais afetados adultos jovens, que estão no auge da atividade produtiva e que irão passar por longos períodos de tratamento, sendo assim, um importante fator da saúde pública (159).

No trabalho da escola de medicina da Universidade de Louisville, *Draus e colaboradores 2006*, analisaram os resultados de pacientes com fístulas e não portadores da Doença de Crohn nos tratamentos com octreotide, fechamento através de vácuo, cola de fibrina e tratamento cirúrgico entre os anos de 1997 e 2005, com 106 pacientes incluídos no estudo. O octreotide foi utilizado em 24 pacientes e na profilaxia de 4 pacientes após a intervenção cirúrgica definitiva para fechamento da fístula. Em 8 dos 24 pacientes o débito da fístula diminuiu (>50%), sendo que desses 8 pacientes 4 tiveram fechamento da fístula sem necessidade de cirurgia. Dos 24 pacientes 30% apresentaram fechamento espontâneo, 50% necessitaram de cirurgia e 20% das fístulas não cicatrizaram. Já o sistema de vácuo foi utilizado em 13 pacientes, sendo que somente em 1 paciente houve fechamento da fístula, nos outros 12 houve a necessidade de cirurgia para o fechamento. Por fim, a cola de fibrina foi utilizada em 8 pacientes, sendo que 7 apresentavam baixo débito. Somente 1 paciente, com baixo débito, respondeu a cola de fibrina (5).

Ainda, 77 pacientes dos 106 realizaram tratamento cirúrgico com 89% de cicatrização da fístula. Dos outros 29 que não realizaram o tratamento cirúrgico, 60% tiveram o fechamento da fístula. Do total de pacientes 7 morreram durante o tratamento, sendo 3 por sepse e 4 pacientes por complicações de cânceres de ovário, cólon e reto (5).

De Groof *et al.* 2016 realizou uma revisão sistemática e meta-análise do tratamento de fístulas perianais em pacientes com Doença de Crohn. O trabalho analisou o tratamento de 1449 pacientes que apresentavam acometimento perianal e realizam o tratamento com anti-TNF. Em 22 estudos citados os pacientes foram tratados com infliximab, em 8 estudos com adalimumab e em 4 estudos com ambos os medicamentos, porém sem comparação com grupo placebo. Alguns estudos realizaram o acompanhamento dos pacientes durante 8 semanas e outros durante 5 anos. Nos 34 estudos mencionados foram relatadas taxas entre 16,7% e 93% de fechamento completo das fístulas. O fechamento parcial foi relatado em 21 estudos com taxas de 8% a 91,2% (160). No trabalho de Dewint *et al.* 2014 as taxas de fechamento completo e parcial das fístulas foram de 43% e 54% respectivamente após 24 semanas de acompanhamento (161). Voltando ao trabalho de *De Groof et al.* 2016 somente em 11 dos 34 estudos a recidiva foi mencionada com taxas entre 8% e 40,9% (160).

A discrepância entre as taxas de fechamento por completo das fístulas (16% a 93%) nos indicam que há uma variação muito grande do sucesso no tratamento dos pacientes com acometimento perianal. Essa grande variação e também as taxas de recidiva apresentadas no trabalho, entre 8% e 40%, nos levam a acreditar na grande dificuldade no tratamento de fístulas, tanto em pacientes portadores de Doença de Crohn, quanto em pacientes com acometimento de fístulas enterocutâneas de outras origens. A grande disparidade entre as taxas e resultados obtidos nos faz pensar em novos métodos de tratamento para esses pacientes.

A análise dos dados citados acima denotou a presença de uma baixa qualidade de vida desses pacientes e também em muitos casos, quando a fístula volta a abrir (recidiva), esses pacientes necessitam de uma nova fase de tratamento, demandando alto custo hospitalar, por ficarem internados por um período de tempo que pode variar de 2 a 8 semanas. Assim, os excelentes resultados de cicatrização obtidos em experimentos pré-clínicos, em modelo animal com fístulas enterocutâneas, onde foram utilizados fios de sutura com AT-MSCs aderidas, objeto de estudo deste trabalho, fazem crer que a técnica pode ser uma nova perspectiva de tratamento de fístulas enterocutâneas, diminuindo o tempo de internação, as taxas de recidiva e aumentando a qualidade de vida do paciente.

Em estudo anterior, dissertação de mestrado, as AT-MSCs foram caracterizadas realizando os testes de diferenciação mesodérmica *in vitro* (linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica), imunofenotipagem através de citometria de fluxo, análise citoquímica das AT-MSCs diferenciadas, imunocitoquímica e microscopia confocal, citogenética e atividade da enzima telomerase, seguindo as orientações da “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*”. Comprovamos que as células utilizadas no estudo anterior, assim como as utilizadas neste estudo são realmente células-tronco mesenquimais. Também foram realizadas as microscopias confocal de imunofluorescência e eletrônica de varredura comprovando que as células ficaram aderidas aos fios de sutura. O teste Live and Dead foi realizado para demonstrar que as células se mantiveram vivas e viáveis quando aderidas aos fios de sutura (Anexo 3) (152).

Foram realizados ainda (Anexo 3), os estudos em modelo animal (ratos), fístula enterocutânea do ceco com a pele, comparando-se a cicatrização das fístulas em três diferentes grupos (grupo controle, grupo AT-MSCs e grupo fio + AT-MSCs) e observando uma melhor e mais rápida cicatrização nos grupos onde as AT-MSCs foram utilizadas no tratamento das fístulas. Entre esses dois grupos, o grupo onde o fio com células aderidas foi utilizado foi o que apresentou melhores resultados de cicatrização dos animais.

Um estudo realizado por *Kim et al. 2013*, analisou a sobrevivência das AT-MSCs quando cultivadas junto com cola de fibrina. A cola de fibrina utilizada nos experimentos foi a comercial *Greenplast kit*. Para analisar a capacidade de sobrevivência das AT-MSCs junto com a cola de fibrina, foram preparados em placas de cultura, AT-MSCs mais cola de fibrina na concentração $5 \times 10^5 / 200 \mu\text{L}$, sendo a viabilidade analisada nos dias 0, 3, 7 e 14. Os resultados demonstraram que mais de 95% das AT-MSCs sobreviveram junto com a cola de fibrina até o 14º dia, durante todo esse tempo a morfologia das células permaneceram arredondadas. Por outro lado, o grupo controle, sem cola de fibrina, apresentou viabilidade de 76% das células no 14º dia (162).

O mesmo estudo ainda avaliou o poder de migração dessas células para o local de reparo (sítio inflamatório) e a capacidade de secretar fatores de crescimento. O teste para avaliar a migração das células para o sítio inflamatório foi

realizado *in vitro* e demonstrou que não houve migração das AT-MSCs para o local. No teste da capacidade de secretar fatores de crescimento, foram avaliados os fatores VEGF e HGF e observou-se que as células, quando incubadas com cola de fibrina, continuaram a secretar esses fatores nos 15 dias analisados. Já no grupo controle, de células sem cola de fibrina, houve uma queda significativa da secreção desses fatores durante os 14 dias analisados (162).

Semelhante ao estudo de Kim, neste estudo, quando aderimos as células nos fios de sutura com ajuda de cola de fibrina, padronizada para este fim, com concentração dos reagentes diferente da cola comercial, os resultados demonstraram que a cola de fibrina não interferiu na sobrevivência e viabilidade das células. Os resultados sustentam a possibilidade de se utilizar AT-MSCs e cola de fibrina em possíveis tratamentos. O fato das células continuarem a secretar os fatores de crescimento reforça os resultados de que a cola de fibrina não interfere na viabilidade celular. Uma possível hipótese para a não transferência das células para o sítio inflamatório, nos testes realizados pelo estudo citado acima, seria a concentração da cola de fibrina comercial, fazendo com que as células ficassem presas na cola e se impossibilitassem de se transferir e agir no local de reparo.

Uma vantagem e característica do fio de sutura com AT-MSCs aderidas utilizadas neste estudo é que a concentração e quantidade de trombina e fibrinogênio, utilizados para formar a cola de fibrina, foram modificados para fazerem uma fixação das células nos fios de maneira “ideal”, fazendo com que as células ficassem fixas nos fios de sutura, mas também migrassem do fio para o local da lesão, agindo e melhorando a cicatrização. Observando os resultados do estudo pré-clínico (Anexo 2) vimos uma melhor cicatrização das fístulas nos animais onde as AT-MSCs foram utilizadas no tratamento, subentendendo assim que as células migraram do fio de sutura para o local da lesão e agiram no local para ajudar no processo de cicatrização.

Lee et al. 2013 realizou um estudo clínico entre os anos de 2010 e 2012 com 43 pacientes que apresentaram fístulas perianais associadas a Doença de Crohn. Foram injetadas 1×10^7 AT-MSCs por centímetro de fístula em cada paciente. Após 8 semanas as células foram injetadas novamente nas fístulas que não haviam se fechado completamente. Os pacientes foram observados nas semanas 4, 6 e 8 e após 10 meses da injeção de células. Do total de pacientes 33 realizaram o

tratamento com a injeção de células apresentando os seguintes resultados: 26 dos 33 (78,8%) pacientes tiveram fechamento completo da fístula após a primeira injeção de células. 7 pacientes receberam a segunda injeção de células e apenas 1 (14,3%) apresentou o fechamento da fístula. No geral 81,8% dos pacientes tratados obtiveram melhora e fechamento das fístulas (163).

Um estudo realizado por *Garcia-Olmo et al. 2015*, testou o tratamento de fístulas anais recorrentes com células-tronco. Os pacientes que participaram do estudo já tinham passado por várias intervenções cirúrgicas para o fechamento da fístula e apresentaram recidiva. Esses pacientes passaram por uma intervenção cirúrgica seguida da injeção de AT-MSCs autólogas (quantidade de células variou dependendo do tamanho da fístula) e o resultado foi observado após 8 semanas. Após 1 ano de tratamento os pacientes também foram observados para analisar se a cicatrização por completa da fístula tinha sido alcançada. Foram tratados 10 pacientes sendo que 3 apresentavam fístulas associadas a Doença de Crohn e 7 não tinham ligação com a doença. Após 8 semanas da injeção das células, 6 pacientes responderam ao tratamento e 3 apresentaram uma resposta parcial. Após 1 ano 60% apresentaram a cicatrização por completa (164).

Outro estudo do mesmo grupo, porém comandado por *Sanz-Baro et al. 2015*, analisou se o tratamento de fístulas perianais associada a DC com AT-MSCs sofreu algum tipo de interferência quando, após o tratamento, as pacientes engravidaram. Os resultados de fertilidade e gravidez não sofreram alterações devido ao tratamento prévio com AT-MSCs. As células também não influenciaram o desenvolvimento do recém-nascido e não houve nenhum sinal de malformação (165).

O grupo de Garcia-Olmo ainda realizou outros estudos clínicos no tratamento de fístulas com AT-MSCs. No trabalho de 2005 o grupo iniciou os testes em 5 pacientes com diferentes tipos de fístulas. Ao final do tratamento, 8 semanas após a injeção de células, 75% das fístulas foram consideradas curadas (166). Esse índice é considerado melhor que os tratamentos convencionais para fístulas. Podemos considerar como ponto negativo do trabalho a falta de padronização do tempo de cultivo da cultura de AT-MSCs e também do número de células injetadas em cada paciente.

Outro trabalho mais recente, 2012, do mesmo grupo, também tratou pacientes que apresentavam fístulas com AT-MSCs. Esse estudo, por se tratar de um estudo clínico em fase 3, foi realizado em mais de um centro de pesquisa e conteve 200 pacientes. Esses pacientes foram divididos de forma randomizada em 3 grupos, sendo que o grupo 1 (64 pacientes) recebeu 2×10^7 células, o grupo 2 (60 pacientes) recebeu 2×10^7 células mais cola de fibrina e o grupo 3 (59 pacientes) recebeu somente cola de fibrina. As fístulas que não estavam cicatrizadas com 12 semanas após a injeção de células receberam uma segunda dose com 4×10^7 AT-MSCs. Os pacientes foram observados com 24 e 26 semanas e 1 ano após a primeira injeção de células. Os resultados após 24 e 26 semanas foram de 39,1%, 43,3% e 37,3% nos três grupos, respectivamente. Após 1 ano os resultados nos grupos foram de 57,1%, 52,4% e 37,3%, respectivamente. Os resultados demonstraram que o tratamento de fístulas com células-tronco pode ser uma forma efetiva, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados (167).

Forbes et al. 2014, realizou a injeção de células-tronco da medula óssea em pacientes com Doença de Crohn tratados com terapia biológica (infiximab ou adalimumab). Participaram do estudo 16 pacientes com DC e atividade >250 . As células ($2 \times 10^6/\text{kg}$), alogênicas, foram injetadas durante 4 semanas. Completaram o estudo 15 pacientes, apresentando como resultado queda de 129 em média da atividade da doença após 42 dias. Ao final do estudo 12 pacientes apresentaram resposta clínica e 8 tiveram remissão clínica. O estudo concluiu que as células-tronco ajudaram na melhora dos pacientes com DC (168).

Como mencionado, vários estudos apresentam propostas para se utilizar células-tronco na tentativa de melhorar a cicatrização e recuperação de pacientes com acometimento de vários tipos de fístulas, principalmente perianais. Alguns trabalhos realizam a aplicação das células concomitantemente com algum outro método de tratamento (cirurgia, medicamentos, cola de fibrina) e alguns ainda fazem uma segunda fase de tratamento com células nos pacientes que não apresentaram melhora. O tempo de observação dos pacientes também muda de um trabalho para o outro, porém em quase todos eles há um acompanhamento durante as semanas consideradas primordiais (6-8 semanas) para o fechamento da fístula e muitos deles ainda fazem um acompanhamento final com vários meses ou até mesmo anos.

O trabalho de *Garcia-Olmo et al. 2015* não apresentou a quantidade de células injetadas em cada paciente, somente citando que o número de células injetadas variou de acordo com o tamanho da fístula. Outro trabalho realizado pelo grupo, *Garcia-Olmo e colaboradores 2005*, apresentou o número de células injetadas em cada paciente, mas não padronizou o número de células, havendo fístulas consideradas fechadas com a injeção de $6,1 \times 10^6$ células e fístulas consideradas não cicatrizadas com a injeção de 10×10^6 células.

Mesmo com a falta de padronização em alguns trabalhos e com a grande variedade de protocolos implantados, todos os trabalhos apontam as MSCs como um possível novo tipo de tratamento, seja ele em conjunto com algum outro tratamento ou sozinho, para pacientes com fístulas associadas ou não a DC. Como possível atuação das MSCs no local da lesão, realizando uma melhor cicatrização, estão o efeito parácrino e imunomodulatório.

Voswinkel et al. 2013 descreveu uma proposta de ação das MSCs sobre as células dendríticas. As MSCs apresentam efeito imunomodulatório interagindo com as células tanto do sistema imune adaptativo quanto do inato. Essas células inibem a secreção de TNF- α e promovem a secreção de IL-10, causando um efeito no estado de maturação das células dendríticas e nas suas propriedades funcionais, resultando em uma resposta imune anti-inflamatória. Quando as MSCs estão presentes no microambiente inflamatório, elas inibem a secreção de IFN- γ derivado das Th1 e células NK, diminuindo ainda a secreção de IL-4 derivado das Th2. Ainda é provável que as MSCs realizem a imunomodulação através do contato célula-célula e fatores secretados (169).

Muitas pesquisas têm estudado o potencial das MSCs em imunomodular à resposta imune através do contato célula-célula e efeito parácrino. O efeito parácrino é causado pela liberação de fatores como IL-6, IL-10, TGF- β , IDO, PGE-2, HGF e NO. Estudos recentes tem demonstrado que as MSCs expressam os receptores Toll-Like (TLR) 2, 3, 4, 7 e 9, que estão envolvidos com propriedades imunomodulatórias. Ainda demonstram a capacidade de migração dessas células para os sítios inflamatórios, sugerindo que esta migração ocorra da mesma maneira que os leucócitos são recrutados para estes locais. Essa similaridade pode ser

devido aos mesmos receptores de quimiocinas (CCR1, 2, 3, 4 e 8 e CXCR1, 2 e 3) que ambas as células possuem (170).

Um outro estudo fez a análise de vários trabalhos comparando as propriedades imunomodulatórias das MSCs derivadas de tecido adiposo, medula óssea e outros tecidos de origem como placenta e sangue de cordão umbilical. Em todos os trabalhos as MSCs derivadas de todos os tipos de tecidos apresentaram capacidade imunomodulatória sendo uma importante alternativa para a medicina regenerativa. Os vários tipos de protocolos aplicados em cada um desses trabalhos e a heterogenicidade das populações de MSCs são considerados obstáculos para se comparar os efeitos imunomodulatórios de cada população celular. O trabalho aponta como maior capacidade de imunomodulação as MSCs derivadas de medula óssea e outras fontes como as derivadas de tecido adiposo (125).

Reckhenrich et al. 2014 realizou um estudo com fios de sutura com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas e analisou a capacidade dessas células aderidas promoverem cicatrização. Após o isolamento, cultivo e caracterização das MSCs foi realizada a adesão das células nos fios de sutura. Foi utilizado fios de sutura Vicryl de 3cm. Em cada fio foi adicionado 5×10^5 MSCs na cavidade dos fios, que ficaram incubados por 24 horas a 37°C e 5% de CO_2 em meio de cultura. Após o período de incubação foram realizados testes de microscopia, quantificação da atividade metabólica e criopreservação para avaliar se as células estavam fixas e viáveis nos fios de sutura (171).

Os resultados de microscopia demonstraram que houve uma adesão e distribuição homogênea das células nos fios. Houve também uma forte interação intercelular formando um complexo tridimensional entre as células e os fios. O teste de atividade metabólica demonstrou que houve uma queda significativa da atividade das células aderida aos fios de sutura após 8 dias quando comparada a atividade no primeiro dia. No teste para comparar a atividade metabólica dessas células no fio de sutura e após a utilização do fio não houve diferença significativa. No teste de criopreservação, as células aderidas aos fios de sutura, mantiveram 78% da sua atividade metabólica após ficarem 8 dias congeladas e serem descongeladas (171).

A primeira grande diferença quando comparamos o trabalho de *Reckhenrich et al. 2014* (171) com o estudo aqui descrito é o tamanho do fio de

sutura, 3cm em um e 30cm no outro. Essa diferença é importante quando imaginamos esse fio de sutura com células aderidas como uma possível ferramenta utilizada em cirurgias e tratamentos para ajudar na cicatrização. Os fios de 3cm não poderiam ser utilizados e assim há a necessidade de obtermos a fixação de células-tronco em fios de sutura de tamanhos maiores e que as células fiquem aderidas com homogeneidade em toda a extensão do fio. No trabalho de *Reckhenrich et al. 2014* foram colocadas 5×10^5 células em cada fio de 3cm através da injeção das células, com seringa, dentro da cavidade do fio.

Os testes da atividade metabólica e o da criopreservação são muito importantes para determinar se as células que foram aderidas continuam apresentando atividade e também se após serem descongeladas voltam a apresentar sua atividade normal. Os resultados demonstraram que não houve queda na atividade metabólica das células após a utilização do fio e houve uma pequena queda da sua atividade após ser descongelada. O fato de as células continuarem apresentando viabilidade e atividade metabólica após serem descongeladas é de grande importância quando pensamos que o fio de sutura com células-tronco aderidas poderá ser no futuro um produto que possa ser guardado (criopreservado) por mais tempo para ser utilizado em um futuro próximo.

Outro trabalho realizou testes de proliferação e viabilidade de células-tronco pluripotentes quando utilizadas junto com suturas bioativas no reparo de tendão, em testes *in vitro*. As suturas utilizadas foram de 10cm com 10ug/mL de PLL (poly-L-lysine) e 2×10^6 células. Para avaliar a adesão das células nos fios de sutura foi utilizada a técnica Live and Dead e para determinar como ocorreu a transferência das células para o local de reparo o estudo realizou os testes com marcador DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). O teste Alamar blue ainda foi utilizado para determinar a proliferação e atividade metabólica das células aderidas aos fios (172).

O teste Live and Dead demonstrou que a grande maioria das células estavam vivas e viáveis e poucas células haviam morrido. O teste DAPI apresentou resultados positivos para a adesão das células nos fios de sutura, sendo que controle negativo não demonstrou a presença de células; também demonstrou que houve transferência das células do fio para o tendão. O teste com Alamar blue comprovou que as células se mantiveram vivas ao se transferirem para o tendão e continuaram com atividade metabólica (172).

O trabalho desenvolvido por *Adams et al. 2014* (173) analisou o processo de recuperação de tendões de Aquiles em 3 grupos animais distintos. Um grupo controle, um grupo com sutura do tendão e injeção de MSCs (1×10^6) e outro grupo com fio de sutura carregado de MSCs (1×10^6). A adesão das células nos fios de sutura foi realizada imediatamente antes da utilização dos fios de sutura, sendo que as células (1×10^6) estavam em 25uL de meio de cultura e foram colocadas em um segmento de 2cm do fio. O estudo não apresentou a forma de adesão dessas células nos fios, somente mencionando que os fios (2cm) foram carregados com células imediatamente antes do procedimento cirúrgico. O trabalho demonstrou que houve uma melhor recuperação dos tendões dos grupos onde as MSCs foram utilizadas, indicando uma menor formação de cicatriz. Porém houve uma melhor recuperação (28 dias) no grupo onde foi dada a sutura seguida de injeção das células.

Podemos observar que vários estudos tentam realizar algum tipo de tratamento com células-tronco aderidas a fios de sutura. Em todos os trabalhos se busca uma adesão adequada das células ao material (fio de sutura) e também que essas células fiquem ativas e viáveis quando aderidas para poderem se transferir e atuarem no local da lesão. Um teste muito importante, realizado por um dos trabalhos (171), foi o teste de metabolismo celular das células congeladas após alguns dias (8 dias). Esse teste demonstrou que não houve queda da atividade celular após o descongelamento, colaborando para uma possível adesão das células nos fios de sutura e armazenamento desse fio criopreservado. Um possível armazenamento que mantenha as mesmas condições de metabolismo e ação dessas células atuarem é de grande importância pensando, no futuro, em um possível produto para diversos tipos de tratamento.

A medicina regenerativa tem como principal foco não somente melhorar e acelerar o processo de cicatrização tecidual, mas sim, depois de uma lesão, tentar restaurar as funções “nativas” dos tecidos lesionados. Para chegar a uma cicatrização mais eficiente muitos estudos vem utilizando *scaffolds* e biomateriais que possam carrear células ou fármacos na intenção de ajudar nesse processo.

Para entender um pouco mais de como ocorreu o processo de reparo tecidual nos diversos grupos estudados, foram realizadas as análises histopatológicas (coloração HE). A área estudada foi o ceco, região inicial do

intestino grosso. Diferentemente do intestino delgado, o intestino grosso não possui microvilosidades em seu epitélio, porém encontramos uma grande quantidade de glândulas intestinais exócrinas, também chamadas de glândulas de Lieberkühn. Nessa região do intestino ainda encontramos muitas células caliciformes, que contribuem para a lubrificação da superfície epitelial, células-tronco mesenquimais, células de Paneth e um epitélio classificado como simples colunar. Na lâmina própria e na submucosa podemos observar alguns nódulos linfáticos que estão correlacionados com o acúmulo de bactérias no local. Abaixo da lâmina própria há uma camada muscular.

Podemos comparar os resultados histopatológicos dos grupos GF/AT-MSCs 7, 14 e 21 dias com o grupo GF, onde o fio de sutura utilizado para a formação da fístula era convencional, sem a adesão de AT-MSCs. Neste grupo, após 21 dias, a análise histopatológica demonstrou que não houve reestabelecimento arquitetônico e a lâmina própria estava expandida entre as glândulas, com alguns infiltrados inflamatórios. O processo de angiogênese foi muito discreto nesse grupo assim como o processo de colagenização.

Ficou evidente que houve uma melhor cicatrização no GF/AT-MSCs 21 dias, onde foi utilizado o fio de sutura com AT-MSCs aderidas. Neste grupo as glândulas intestinais já estavam bem alinhadas e apresentavam padrão arquitetônico, com ausência de processos inflamatórios entre as glândulas apresentando assim melhor recuperação histológica. Os processos angiogênicos foram menores que os encontrados nos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias, resultado este encontrado nos testes de imunohistoquímica, onde o VEGF também apresentou fraca imunomarcagem. No grupo 21 dias também houve intensa formação de colágeno, resultado também encontrado na imunohistoquímica com imunorreação moderada do colágeno tipo I neste grupo.

No grupo GF/AT-MSCs 7 dias havia um desarranjo da arquitetura das glândulas intestinais, que foram menos evidentes no grupo 14 dias. O processo inflamatório foi intenso em ambos os grupos, com uma diminuição desse processo entre as glândulas intestinais com mais evidência no grupo 14 dias.

Com os resultados histopatológicos entendemos que mesmo após 21 dias do processo de cicatrização, esse processo aconteceu de forma diferente nos

grupos onde o fio de sutura com AT-MSCs foi utilizado. Nesses grupos, houve uma cicatrização mais eficiente, principalmente no grupo 21 dias. O reestabelecimento da região estudada, principalmente pela troca de colágeno tipo III por colágeno tipo I, resultado demonstrado na imunohistoquímica, fez com que houvesse uma lâmina própria muito próxima a do grupo controle (GC). A diminuição do processo inflamatório entre as glândulas e também na lâmina própria, no grupo 21 dias, se faz importante para a homeostase da região afetada. Entende-se que as AT-MSCs desempenharam um papel fundamental imunomodulando a resposta imune, ajudando e controlando o processo de cicatrização como um todo.

As fibras de colágeno são de grande importância para reestabelecer uma melhor cicatrização, que apresente uma restauração mais próxima do normal. As fibras de colágeno não são formadas por uma molécula simples, e sim, por uma família de moléculas que caracterizam cada um dos 28 diferentes tipos de colágeno descritos até hoje. O colágeno é formado por três cadeias polipeptídicas apresentando em pelo menos uma região uma repetição da sequência de aminoácidos. No colágeno tipo I, a região de glicina-X-Y se repete formando a tripla-hélice (145).

Durante o processo de cicatrização, na fase de proliferação, se inicia uma formação do colágeno tipo III que gradativamente é substituído por um colágeno tipo I. Como observamos nos resultados houve intensa imunorreatividade do COL1 no GC enquanto o COL3 estava com fraca imunorreatividade, seguindo o padrão de colágeno para a região estudada. Com o avanço do processo de cicatrização os resultados demonstraram que houve uma imunorreatividade fraca de COL1 no grupo GF/AT-MSCs 7 dias e uma marcação moderada nos grupos GF/AT-MSCs 14 e 21 dias. Já para o COL3 os grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias apresentaram imunorreatividade moderada com uma marcação fraca no grupo 21 dias. Assim, os resultados confirmam uma maior presença de colágeno tipo III no início do processo de cicatrização com uma conversão gradual para colágeno tipo I ao longo do processo de cicatrização. Essa conversão é importante pois devemos encontrar colágeno tipo I em maior quantidade no intestino (ceco) normal.

A família das proteínas MMPs é responsável pela degradação de matriz extracelular durante a remodelação tecidual em um processo de cicatrização normal. As principais proteínas desta família são as MMP-2 e as MMP-9, estudadas neste

trabalho. Elas são produzidas normalmente por fibroblastos, células endoteliais e adipócitos (174). No grupo controle observamos uma imunomarcção fraca tanto da proteína MMP-2 quanto da MMP-9, resultados estes importantes, pois em condições normais a expressão das MMPs deve ser controlada para que não ocorra uma degradação excessiva da matriz extracelular e conseqüentemente uma elevação da migração celular descontrolada.

Para a proteína MMP-2 encontramos imunorreação significativamente intensa, no grupo GF/AT-MSCs 7 dias, moderada no grupo GF/AT-MSCs 14 dias e fraca no grupo GF/AT-MSCs 21 dias. Ficou demonstrado assim a ação dessa proteína no processo de cicatrização inicial, na tentativa de uma remodelação tecidual e uma queda de sua atividade importante no final do processo de cicatrização. Entretanto, encontramos intensa imunomarcção no grupo GF/AT-MSCs 21 dias e moderada nos grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias para a proteína MMP-9. A alta atividade da MMP-9 no grupo 21 dias pode elevar as taxas de degradação da MEC aumentando a migração celular, que pode estar correlacionada com a modulação das AT-MSCs.

Como não foram encontrados sinais de alterações morfológicas nos resultados histopatológicos entendemos que a alta atividade das MMP-9 no grupo GF/AT-MSCs 21 dias não deve estar relacionado com a participação desta proteína em metástases tumorais.

Em condições normais, a expressão dos receptores TLR geralmente é baixa na mucosa intestinal, apresentando um aumento significativo da expressão em vários tipos de células nas doenças inflamatórias intestinais. Na resposta inflamatória, as células imunes liberam grande quantidade de oxigênio reativo, porém, em resposta a estimulação dos receptores TLR, as AT-MSCs induzem a expressão de uma proteína chave (MnSOD – Manganês superóxido dismutase) contra o stress oxidativo nas mitocôndrias, protegendo as células e aumentando sua sobrevivência nos locais onde se encontram feridas e processos inflamatórios e conseqüentemente realizando efeitos terapêuticos (175). Esta hipótese também é demonstrada por *Wang et al. 2009* que demonstra que a ativação da via do TLR4 protege as MSCs do stress oxidativo que leva a apoptose celular (176).

A migração adequada das MSCs para os locais onde há necessidade de reparo é considerada muito importante para a utilização dessas células em terapias que sejam eficazes. Um estudo sugere que a manipulação e estimulação das vias TLR aumentam a migração, infusão e proliferação das MSCs nos locais da lesão (177).

Assim, nos nossos resultados observamos uma imunorreatividade baixa do TLR4 no grupo controle (GC), com um aumento da imunorreatividade para moderada nos grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias e forte no grupo GF/AT-MSCs 21 dias. A baixa imunorreatividade, no grupo controle, segue os padrões encontrados na mucosa intestinal sendo que o aumento da expressão do TLR4 nos demais grupos pode estar relacionado com a modulação realizada pelas AT-MSCs aderidas ao fio de sutura. Este aumento de TLR4 poderia ser responsável pelo aumento na sobrevivência dessas células no local, diminuindo a proliferação e migração de neutrófilos para a área e conseqüentemente do processo inflamatório no local da lesão.

O VEGF é um mitógeno específico para a formação de células endoteliais vasculares. Existem 5 isoformas da molécula VEGF e elas apresentam seu potencial de expressão elevado em resposta a hipóxia, ativação de oncogenes e por uma grande variedade de citocinas. A indução e ativação do VEGF induz a uma proliferação das células endoteliais, migração celular e inibição da apoptose. A expressão desregulada do VEGF pode levar e contribuir para o desenvolvimento de tumores sólidos havendo ainda muitas doenças que são caracterizadas por uma angiogênese anormal (178).

A principal isoforma do VEGF, VEGF-A, apresenta baixos níveis de expressão em vários tecidos adultos normais e altos níveis em alguns tipos de epitélios normais, como o do córtex adrenal, o do pulmão, o do glomérulo renal, entre outros. O VEGF-A também é muito expresso principalmente em processos de cicatrização e inflamações crônicas. Os efeitos do VEGF-A no organismo podem ser muitos e seus efeitos podem ser imediatos (segundos a minutos), ou mais tardio (horas a dias). É possível se observar vasodilatação e permeabilidade vascular aumentada como ação imediata do VEGF-A. A vasodilatação ocorre primeiramente nas artérias musculares induzindo a síntese de óxido nítrico pelas células

endoteliais, fazendo com que as células da musculatura lisa adjacente relaxem, resultando na queda da pressão arterial (43, 179).

Como efeito prolongado, a ação do aumento dos níveis de VEGF-A, faz uma reprogramação nas células endoteliais causando um aumento na produção de um grande número de diversas proteínas envolvidas e relacionadas a angiogênese. Entre essas proteínas podemos citar as relacionadas com a coagulação e fibrinólise (fatores teciduais, uroquinase), algumas proteases (MMPs), transportadores de glicose, proteínas mitógenas e algumas moléculas de adesão (VCAM, e-selectina) (43, 180).

No trabalho aqui apresentado observamos imunorreação moderada tanto no GC quanto nos grupos GF/AT-MSCs 7 e 14 dias e uma imunorreação fraca no grupo GF/AT-MSCs 21 dias. A marcação moderada nos grupos 7 e 14 dias podem estar correlacionadas com o processo de cicatrização, aumentando ainda a expressão da proteína MMP9. Já, a fraca imunomarcação no grupo de 21 dias nos faz entender que como o processo inflamatório diminuiu e o processo de cicatrização já estava em fase avançada, houve queda na marcação do VEGF relacionadas a estes motivos. Como citado acima, uma expressão aumentada do VEGF pode desencadear alguns tipos de tumores ou mesmo outros tipos de doenças, assim, a queda da marcação no grupo 21 dias é vista como importante para não desencadear outros processos prejudiciais ao organismo.

A IL-6 é uma citocina de atuação tanto na resposta imune inata quanto adaptativa, sendo um importante marcador inflamatório. Ela é sintetizada e secretada pelas células endoteliais, fibroblastos, monócitos, entre outras células e também é estimulada por outras citocinas como a IL-1 e TNF- α . A IL-6 está envolvida em resposta a fase inflamatória aguda, geralmente apresentando níveis baixos no organismo, exceto em infecções e traumas (181). Os resultados apresentados nesta tese, demonstraram uma imunomarcação fraca no GC e significativamente moderada nos grupos GF/AT-MSCs 7, 14 e 21 dias dessa citocina. Como a região da fístula apresenta uma resposta inflamatória aguda entendemos que os níveis de IL-6 aumentados nos grupos 7, 14 e 21 dias estão diretamente relacionados a este processo inflamatório. Um aumento dos níveis de TNF- α também aumenta a estimulação da IL-6. A fraca imunomarcação no GC se deve

aos baixos níveis de IL-6 em organismos normais que não apresentam processo inflamatório agudo, infecções ou traumas.

O TNF- α desempenha um papel importante na regulação de doenças inflamatórias intestinais como na Doença de Crohn. A homeostase entre a microbiota intestinal e os tecidos do hospedeiro é mantida por vários mecanismos, incluindo a secreção de anticorpos IgA, que ajudam a neutralizar toxinas e bloqueiam a ligação dos patógenos ao epitélio intestinal. A grande maioria dos receptores da família TNF são expressos pelas células do sistema imune, sendo que alguns estão ligados a sobrevivência celular e outros com a inflamação. Além disso, também desempenham um papel fundamental na formação de folículos linfóides e na produção de IgA nos tecidos intestinais, necessário para manter a microbiota local e eliminar possíveis patógenos oportunistas (150).

Em nossos resultados observamos uma imunorreação significativamente moderada nos grupos GF/AT-MSCs 7, 14 e 21 dias e fraca no GC. O aumento dos níveis de marcação do TNF- α estão correlacionados com o processo inflamatório agudo e assim como na IL-6 esses níveis se mantêm moderados ao longo dos 21 dias no processo de cicatrização estudado neste trabalho.

Todos esses resultados confirmam que as células-tronco, em um futuro próximo, juntamente com fios de sutura, podem se tornar uma nova forma de terapia ou até mesmo um auxílio aos tratamentos existentes. Os fios de sutura com células aderidas poderão propiciar uma melhor cicatrização e diminuir o tempo de internação dos pacientes com DC, assim como os gastos hospitalares. A melhor cicatrização e recuperação dos pacientes poderá auxiliar em uma melhora na qualidade de vida, favorecer o atendimento de um número maior de pacientes em um espaço de tempo menor.

Ainda, pensando em uma maior utilização do fio de sutura com AT-MSCs aderidas, podemos deslumbrar sua utilização em cirurgias eletivas, sendo que as células aderidas teriam o papel de evitar, por exemplo, a formação de trajetos fistulosos em alguns tipos de cirurgias. O fio de sutura com AT-MSCs aderidas seria utilizado não em um tratamento, mas sim como uma terapia preventiva.

Outra possibilidade seria a utilização da mesma técnica de adesão das células nos fios para se aderir essas células em outros biomateriais aumentando a

possibilidade de utilização das células como alternativa de tratamento. A técnica poderia ser utilizada para adesão de células em polímeros, *scaffolds* entre outros materiais.

CONCLUSÃO

Nos grupos estudados os que apresentaram melhores resultados de cicatrização foram os que utilizaram o fio de sutura com AT-MSCs aderidas. Entre esses grupos, o grupo 21 dias obteve uma melhor cicatrização com reestabelecimento da morfologia do tecido, principalmente da organização arquitetônica e diminuição do processo inflamatório. O grupo 14 dias apresentou melhores resultados que o grupo 7 dias.

A imunohistoquímica demonstrou que houve uma formação de colágeno tipo III no início do processo de cicatrização (grupo 7 dias), com a troca gradual por colágeno tipo I com o avanço do tempo e do processo de cicatrização (grupos 14 e 21 dias).

A alta angiogênese no início da cicatrização foi constatada tanto pela análise histopatológica quanto pelos resultados imunohistoquímicos. A queda dessa atividade também foi demonstrada no grupo 21 dias. Essa atividade é importante no processo de reparo e tende a diminuir com o reestabelecimento da homeostase.

As AT-MSCs desempenharam um papel importante em todo o processo de cicatrização, imunomodulando a resposta imune e ajudando na reparação tecidual da lesão como um todo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Taggarshe D, Bakston D, Jacobs M, McKendrick A, Mittal VK. Management of enterocutaneous fistulae: A 10 years experience. *World J Gastrointest Surg.* 2010;27;2(7):242-6.
2. Souza HPd, Gabiatti G, Dotta F. Fístulas digestivas no trauma. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* 2001;28:138-45.
3. Gomes, CHR, Almeida M, Silva e D, Serpa G. Fístulas digestivas. In: científica U, editor. Montes Claros2004.
4. Romero GT, Santos CH, Cassino PC, Odashiro M, Seno GZ, Alessio GF. Treatment of fistula-in-ano with cyanoacrylate glue with and without prior seton placement in rats. *Acta Cir Bras.* 31. Brazil2016. p. 377-81.
5. Draus JM, Jr., Huss SA, Harty NJ, Cheadle WG, Larson GM. Enterocutaneous fistula: are treatments improving? *Surgery.* 140. United States2006. p. 570-6; discussion 6-8.
6. Lee S-H. Surgical management of enterocutaneous fistula. *Korean J Radiol.* 2012;Jan-Feb;13 Suppl 1:S17-20.
7. Badrasawi M, Shahar S, Sagap I. Nutritional Management in Enterocutaneous Fistula. What is the evidence? *Malays J Med Sci.* 2015;22(4):6-16.
8. Wercka J, Cagol PP, Melo ALP, Locks GdF, Franzon O, Krueel NF. Epidemiology and outcome of patients with postoperative abdominal fistula. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* 2016;43:117-23.
9. Berry SM, Fischer JE. Classification and pathophysiology of enterocutaneous fistulas. *Surg Clin North Am.* 76. United States1996. p. 1009-18.
10. Nielsen OH, Rogler G, Hahnloser D, Thomsen OO. Diagnosis and management of fistulizing Crohn's disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 6. England2009. p. 92-106.
11. Vavricka SR, Rogler G. Fistula treatment: The unresolved challenge. *Dig Dis.* 28. Switzerland: Basel.; 2010. p. 556-64.
12. Nichols F, Overly A. Novel Approach for Enterocutaneous Fistula Treatment with the Use of Viable Cryopreserved Placental Membrane. *Case Rep Surg.* 2016;2016:8797691.
13. Rolandelli R, Roslyn JJ. Surgical management and treatment of sepsis associated with gastrointestinal fistulas. *Surg Clin North Am.* 76. United States1996. p. 1111-22.
14. Foster CE, 3rd, Lefor AT. General management of gastrointestinal fistulas. Recognition, stabilization, and correction of fluid and electrolyte imbalances. *Surg Clin North Am.* 76. United States1996. p. 1019-33.
15. Gerzof SG, Robbins AH, Johnson WC, Birkett DH, Nabseth DC. Percutaneous Catheter Drainage of Abdominal Abscesses. *New England Journal of Medicine.* 1981;305(12):653-7.
16. Chapman R, Foran R, Dunphy JE. 1964.
17. Meguid MM, Campos AC. Nutritional management of patients with gastrointestinal fistulas. *Surg Clin North Am.* 76. United States1996. p. 1035-80.
18. Robbins. Fundamentos de patologia - Robbins & Cotran. 8ª Edição ed2012.
19. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J Dig Dis.* 2010;11(5):266-76.
20. Cardozo WS, Sobrado CW. Doença Inflamatória Intestinal. 1ª ed. Barueri - SP: Manole; 2012.
21. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am J Med.* 13. United States1952. p. 583-90.
22. Ribeiro I. Doença de Crohn: Etiologia, patogênese e suas implicações na Terapêutica 2009.
23. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev.* 2005;206:149-59.
24. Kucharzik T, Maaser C, Luger A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S, et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm Bowel Dis.* 2006;12(11):1068-83.
25. Scharl M, Rogler G. Pathophysiology of fistula formation in Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2014;5(3):205-12.
26. Dotan I. New serologic markers for inflammatory bowel disease diagnosis. *Dig Dis.* 2010;28(3):418-23.
27. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's Disease. *Lancet.* 2012;3;380(9853):1590-605.
28. Ruffolo C, Citton M, Scarpa M, Angriman I, Massani M, Caratozzolo E, et al. Perianal Crohn's disease: is there something new? *World J Gastroenterol.* 2011;17(15):1939-46.

29. Hellers G, Bergstrand O, Ewerth S, Holmström B. Occurrence and outcome after primary treatment of anal fistulae in Crohn's disease. *Gut*. 1980;21(6):525-7.
30. Schwartz DA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, et al. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology*. 122. United States 2002. p. 875-80.
31. Lockhart-Mummery HE. Symposium. Crohn's disease: anal lesions. *Dis Colon Rectum*. 1975;18(3):200-2.
32. Dias CC, Rodrigues PP, da Costa-Pereira A, Magro F. Clinical prognostic factors for disabling Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *World J Gastroenterol*. 2013;19(24):3866-71.
33. Bernstein LH, Frank MS, Brandt LJ, Boley SJ. Healing of perineal Crohn's disease with metronidazole. *Gastroenterology*. 79. United States 1980. p. 357-65.
34. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med*. 350. United States: 2004 Massachusetts Medical Society; 2004. p. 876-85.
35. Fry DE, Osler T. Abdominal wall considerations and complications in reoperative surgery. *Surg Clin North Am*. 1991;71(1):1-11.
36. Gribovskaja-Rupp I, Melton GB. Enterocutaneous Fistula: Proven Strategies and Updates. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016;29(2):130-7.
37. Robbins. Fundamentos de patologia - Robbins & Cotran. 8ª Edição ed2012.
38. Alberts B ea. Biologia Molecular da Célula. 5ª Edição ed. Porto Alegre: ArtMed; 2010. 1054 p.
39. Carvalho HR-P, SM. A Célula. 2ª Edição ed2007. 321 p.
40. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2007;20:51-8.
41. Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. 2005. *2005;41(1):25*.
42. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-6.
43. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and the induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2007;2:251-75.
44. Isaac C, Ladeira PRSd, Rêgo FMPd, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. 2010. *2010;89(3-4):7*.
45. Mori R, Shaw TJ, Martin P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med*. 2008;205(1):43-51.
46. Darby IA, Hewitson TD. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol*. 2007;257:143-79.
47. Shin TH, Kim HS, Choi SW, Kang KS. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Inflammatory Skin Diseases: Clinical Potential and Mode of Action. *Int J Mol Sci*. 18. Switzerland 2017.
48. Rossello RA, Pfenning A, Howard JT, Hochgeschwender U. Characterization and genetic manipulation of primed stem cells into a functional naive state with ESRRB. *World J Stem Cells*. 2016;8(10):355-66.
49. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
50. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
51. Figueroa FE, Carrion F, Villanueva S, Khoury M. Mesenchymal stem cell treatment for autoimmune diseases: a critical review. *Biol Res*. 45. England 2012. p. 269-77.
52. Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6. England 2005. p. 726-37.
53. Carvalho ACCd, Goldenberg RCdS. Células-tronco mesenquimais - Conceitos, métodos de obtenção e aplicações. 1ª edição ed2012. p. 208.
54. Feyen DA, Gaetani R, Doevendans PA, Sluijter JP. Stem cell-based therapy: Improving myocardial cell delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 106. Netherlands: 2016 Elsevier B.V; 2016. p. 104-15.
55. Dayem AA, Choi HY, Yang GM, Kim K, Saha SK, Kim JH, et al. The potential of nanoparticles in stem cell differentiation and further therapeutic applications. *Biotechnol J*. 2016.
56. Hayashi Y, Furue MK. Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5380560.
57. de la Morena MT, Gatti RA. A history of bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am*. 25. United States: 2011 Elsevier Inc; 2011. p. 1-15.
58. Boieri M, Shah P, Dressel R, Inngjerdingen M. The Role of Animal Models in the Study of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and GvHD: A Historical Overview. *Front Immunol*. 2016;7:333.

59. <http://redome.inca.gov.br/>. Instituto Nacional do Câncer [internet] Rio de Janeiro 2009 [
60. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996;87(1):1-13.
61. Lange C, Li Z, Fang L, Baum C, Fehse B. CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem Cells Dev*. 2007;16(2):297-304.
62. Kauts ML, Vink CS, Dzierzak E. Hematopoietic (stem) cell development-how divergent are the roads taken? *FEBS Lett*. 2016.
63. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*. 1997;90(12):5013-21.
64. Harris DT. Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications. *Stem Cell Rev*. 2008;4(4):269-74.
65. Ahrens I, Domeij H, Topcic D, Haviv I, Merivirta RM, Agrotis A, et al. Successful in vitro expansion and differentiation of cord blood derived CD34+ cells into early endothelial progenitor cells reveals highly differential gene expression. *PLoS one*. 2011;6(8):e23210.
66. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, et al. The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells*. 25. United States 2007. p. 2017-24.
67. Ende N, Chen R. Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood. *J Med*. 2002;33(1-4):173-80.
68. Jang YK, Park JJ, Lee MC, Yoon BH, Yang YS, Yang SE, et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *J Neurosci Res*. 2004;75(4):573-84.
69. Zwart I, Hill AJ, Girdlestone J, Manca MF, Navarrete R, Navarrete C, et al. Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli. *J Neurosci Res*. 2008;86(9):1902-15.
70. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2009;31:25-35.
71. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 341. United States 2006. p. 1135-40.
72. Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoïn JP, Caton D, Fournial G, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol*. 2006;208(2):282-8.
73. Hao HN, Zhao J, Thomas RL, Parker GC, Lyman WD. Fetal human hematopoietic stem cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes in vitro. *J Hematother Stem Cell Res*. 2003;12(1):23-32.
74. Friedenstein AJ. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematology and blood transfusion*. 1980;25:19-29.
75. Song HY, Jeon ES, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(11):2357-65.
76. Adegani FJ, Langroudi L, Arefian E, Shafiee A, Dinarvand P, Soleimani M. A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells. *Molecular biology reports*. 2012.
77. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87(1):125-8.
78. Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, Villageois P, Chignon-Sicard B, Dani C. Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012.
79. Fujimura J, Ogawa R, Mizuno H, Fukunaga Y, Suzuki H. Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 333. United States 2005. p. 116-21.
80. Guidotti S, Facchini A, Platano D, Olivetto E, Minguzzi M, Trisolino G, et al. Enhanced osteoblastogenesis of adipose derived stem cells upon spermine delivery via beta-catenin activation. *Stem cells and development*. 2013.
81. Hattori H, Masuoka K, Sato M, Ishihara M, Asazuma T, Takase B, et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;76(1):230-9.

82. Guasti L, Prasongchean W, Kleiftouris G, Mukherjee S, Thrasher AJ, Bulstrode NW, et al. High plasticity of pediatric adipose tissue-derived stem cells: too much for selective skeletogenic differentiation? *Stem cells translational medicine*. 2012;1(5):384-95.
83. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 22. United States2004. p. 560-7.
84. Chang JC, Hsu SH, Chen DC. The promotion of chondrogenesis in adipose-derived adult stem cells by an RGD-chimeric protein in 3D alginate culture. *Biomaterials*. 30. Netherlands2009. p. 6265-75.
85. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*. 2005;54(3):132-41.
86. Cossu G, Mavilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest* 2000;105(12):1669-74.
87. Geng J, Peng F, Xiong F, Shang Y, Zhao C, Li W, et al. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 11. England2009. p. 849-63.
88. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2006;24(5):1294-301.
89. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy*. 2006;8(2):166-77.
90. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 25. United States2007. p. 2739-49.
91. Levesque JP, Hendy J, Takamatsu Y, Simmons PJ, Bendall LJ. Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide. *J Clin Invest*. 2003;111(2):187-96.
92. Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, et al. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*. 2005;14(3):329-36.
93. Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grechi B, et al. Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast Reconstr Surg*. 122. United States2008. p. 614-8.
94. Muller S, Kulenkampff E, Wolfrum C. Adipose Tissue Stem Cells. *Handb Exp Pharmacol*. 2016;233:251-63.
95. Silva FJ, Holt DJ, Vargas V, Yockman J, Boudina S, Atkinson D, et al. Metabolically active human brown adipose tissue derived stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(2):572-81.
96. Wdziekonski B, Mohsen-Kanson T, Villageois P, Dani C. The generation and the manipulation of human multipotent adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;702:419-27.
97. Vieira NM, Brandalise V, Zucconi E, Jazedje T, Secco M, Nunes VA, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell*. 100. England2008. p. 231-41.
98. Domenis R, Lazzaro L, Calabrese S, Mangoni D, Gallelli A, Bourkoula E, et al. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer techniques. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;6(1):2.
99. Zachar V, Rasmussen JG, Fink T. Isolation and growth of adipose tissue-derived stem cells. *Methods Mol Biol*. 2011;698:37-49.
100. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International So. *Cytotherapy*. 2013;15.
101. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 25. United States2007. p. 818-27.
102. Schremel S, Babilas P, Fruth S, Orso E, Schmitz G, Mueller MB, et al. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*. 11. England2009. p. 947-57.
103. Fang B, Li Y, Song Y, Li N, Cao Y, Wei X, et al. Human adipose tissue-derived adult stem cells can lead to multiorgan engraftment. *Transplant Proc*. 42. United States2010. p. 1849-56.

104. Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol.* 2010;25(6):807-15.
105. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, Tamura T, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy.* 10. England2008. p. 417-26.
106. Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells.* 2012;30(5):804-10.
107. Tissiani LAL, Aguena M, Passos-Bueno MR, Alonso N. Efeitos de diferentes pressões de aspiração do tecido adiposo na obtenção de células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica.* 2012;27:509-13.
108. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64-76.
109. Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology.* 2005;33(11):1402-16.
110. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):311-24.
111. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
112. Ginani F, Soares DM, Barboza CAG. Influência de um protocolo de criopreservação no rendimento in vitro de células-tronco derivadas do tecido adiposo. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica.* 2012;27:359-63.
113. Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 20. United States2006. p. 661-9.
114. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 174. Switzerland: 2003 S. Karger AG, Basel; 2003. p. 101-9.
115. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996;272(5258):60-6.
116. De Becker A, Riet IV. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? . 2016.
117. Zhao Y, Zhang H. Update on the mechanisms of homing of adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy.* 18. England: 2016 International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc; 2016. p. 816-27.
118. Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *J Mol Cell Cardiol.* 44. England2008. p. 1072-84.
119. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* 72. United States2007. p. 430-41.
120. Kyriakou C, Rabin N, Pizzey A, Nathwani A, Yong K. Factors that influence short-term homing of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a xenogeneic animal model. *Haematologica.* 93. Italy2008. p. 1457-65.
121. Yong KW, Li Y, Liu F, Bin G, Lu TJ, Wan Abas WA, et al. Paracrine Effects of Adipose-Derived Stem Cells on Matrix Stiffness-Induced Cardiac Myofibroblast Differentiation via Angiotensin II Type 1 Receptor and Smad7. *Sci Rep.* 2016;6:33067.
122. Malhotra S, Hu MS, Marshall CD, Leavitt T, Cheung AT, Gonzalez JG, et al. Mesenchymal Stromal Cells as Cell-Based Therapeutics for Wound Healing. *Stem Cells Int.* 2016;2016:4157934.
123. Bajek A, Gurtowska N, Olkowska J, Kazmierski L, Maj M, Drewa T. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2016;64(6):443-54.
124. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy.* 18. England: 2015 International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc; 2016. p. 160-71.
125. Mattar P, Bieback K. Comparing the Immunomodulatory Properties of Bone Marrow, Adipose Tissue, and Birth-Associated Tissue Mesenchymal Stromal Cells. *Front Immunol.* 2015;6:560.
126. Cho KS, Kim YW, Kang MJ, Park HY, Hong SL, Roh HJ. Immunomodulatory Effect of Mesenchymal Stem Cells on T Lymphocyte and Cytokine Expression in Nasal Polyps. *Otolaryngol*

- Head Neck Surg. 150. England: American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation 2014.; 2014. p. 1062-70.
127. Algeri M, Conforti A, Pitisci A, Starc N, Tomao L, Bernardo ME, et al. Mesenchymal stromal cells and chronic inflammatory bowel disease. *Immunol Lett.* 168. Netherlands: 2015 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V; 2015. p. 191-200.
128. Machado Cde V, Telles PD, Nascimento IL. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(1):62-7.
129. Roemeling-van Rhijn M, Khairoun M, Korevaar SS, Lievers E, Leuning DG, Ijzermans JNM, et al.
130. Chen PM, Liu KJ, Hsu PJ, Wei CF, Bai CH, Ho LJ, et al. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *J Leukoc Biol.* 96. United States: 2014 Society for Leukocyte Biology.; 2014. p. 295-303.
131. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells.* 2013;31(9):1980-91.
132. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 107. United States 2006. p. 367-72.
133. Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8(2):375-92.
134. Matthay MA, Pati S, Lee J-W. Mesenchymal Stem (Stromal) Cells: Biology and Preclinical Evidence for Therapeutic Potential for Organ Dysfunction following Trauma or Sepsis.
135. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells.* 2010;28(12):2229-38.
136. Navarro VPNF, P. Silva, L.A.B. Freitas, A.C. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP.* 2006;Vol. 35 nº4.
137. Pereira A, do Carmo E, Silveira V, Amadei S, Rosa L. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. *Revista Brasileira de Cancerologia [Internet].* 2006; 52(3): 257-262.
138. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta.* 1825. Netherlands: 2011 Elsevier B.V; 2012. p. 29-36.
139. Ferraz E, da Silveira B, Sarmento V, dos Santos J. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. *Rev Gaúcha Odontol.* 2011:8.
140. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(9):1583-97.
141. Capp C. Expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de seus receptores (VEGFR 1 e 2) em amostras de tecido tireoidiano de pacientes com carcinoma medular de tireóide. Porto Alegre 2009.
142. Wise LM, Inder MK, Real NC, Stuart GS, Fleming SB, Mercer AA. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-E encoded by orf virus regulates keratinocyte proliferation and migration and promotes epidermal regeneration. *Cell Microbiol.* 2012;14(9):1376-90.
143. Silva TFd, Penna ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz.* 2012;71(3):10.
144. Junqueira LCUC, J. *Histologia Básica.* 11ª edição ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan; 2008. 524 p.
145. Pawelec KM, Best SM, Cameron RE. Collagen: a network for regenerative medicine. *J Mater Chem B Mater Biol Med.* 2016;4(40):6484-96.
146. Pop VV, Seicean A, Lupan I, Samasca G, Burz CC. IL-6 roles - Molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer - A systemic review. *Immunol Lett.* 181. Netherlands: A 2016 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V; 2016. p. 45-50.
147. Hodes GE, Menard C, Russo SJ. Integrating Interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. *Neurobiol Stress.* 2016;4:15-22.
148. Vitale RF, Ribeiro FdAQ. O papel do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.* 2007;73:123-7.
149. Alijotas-Reig J, Esteve-Valverde E, Ferrer-Oliveras R, Llorba E, Gris JM. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* United States 2017.

150. Gubernatorova EO, Tumanov AV. Tumor Necrosis Factor and Lymphotoxin in Regulation of Intestinal Inflammation. *Biochemistry (Mosc)*. 81. United States2016. p. 1309-25.
151. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2010;85:647-56.
152. Volpe BB, Santos Duarte AdS, Ribeiro TB, Stocchero I, Kharmandayan P, Olalla Saad ST, et al. Mesenchymal stromal cells from adipose tissue attached to suture material enhance the closure of enterocutaneous fistulas in a rat model. *Cytotherapy*. 2014;16(12):1709-19.
153. Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2000;52:33-7.
154. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. 2003. p. 138.
155. Garcia PV, Seiva FR, Carniato AP, de Mello Junior W, Duran N, Macedo AM, et al. Increased toll-like receptors and p53 levels regulate apoptosis and angiogenesis in non-muscle invasive bladder cancer: mechanism of action of P-MAPA biological response modifier. *BMC Cancer*. 2016;16:422.
156. Mukherjee K, Kavalukas SL, Barbul A. Nutritional Aspects of Gastrointestinal Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 5. United States2016. p. 507-15.
157. Yassin NA, Askari A, Warusavitarne J, Faiz OD, Athanasiou T, Phillips RK, et al. Systematic review: the combined surgical and medical treatment of fistulising perianal Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(7):741-9.
158. Chang C-W, Wong J-M, Tung C-C, Shih IL, Wang H-Y, Wei S-C. Intestinal Stricture in Crohn's Disease. 2015.
159. Pereira IC. Aspectos psicossociais associados da Doença de Crohn: Um estudo clínico-qualitativo de pacientes ambulatoriais. Unicamp; 2000.
160. de Groof EJ, Cabral VN, Buskens CJ, Morton DG, Hahnloser D, Bemelman WA. Systematic review of evidence and consensus on perianal fistula: an analysis of national and international guidelines. *Colorectal Dis*. 2016;18(4):O119-34.
161. Dewint P, Hansen BE, Verhey E, Oldenburg B, Hommes DW, Pierik M, et al. Adalimumab combined with ciprofloxacin is superior to adalimumab monotherapy in perianal fistula closure in Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo controlled trial (ADAFI). *Gut*. 63. England2014. p. 292-9.
162. Kim I, Lee SK, Yoon JI, Kim DE, Kim M, Ha H. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(21-22):2373-81.
163. Lee WY, Park KJ, Cho YB, Yoon SN, Song KH, Kim DS, et al. Autologous adipose tissue-derived stem cells treatment demonstrated favorable and sustainable therapeutic effect for Crohn's fistula. *Stem Cells*. 2013;31(11):2575-81.
164. Garcia-Olmo D, Guadalajara H, Rubio-Perez I, Herreros MD, de-la-Quintana P, Garcia-Arranz M. Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells. *World J Gastroenterol*. 2015;21(11):3330-6.
165. Sanz-Baro R, Garcia-Arranz M, Guadalajara H, de la Quintana P, Herreros MD, Garcia-Olmo D. First-in-Human Case Study: Pregnancy in Women With Crohn's Perianal Fistula Treated With Adipose-Derived Stem Cells: A Safety Study. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(6):598-602.
166. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodriguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(7):1416-23.
167. Herreros MD, Garcia-Arranz M, Guadalajara H, De-La-Quintana P, Garcia-Olmo D. Autologous expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex cryptoglandular perianal fistulas: a phase III randomized clinical trial (FATT 1: fistula Advanced Therapy Trial 1) and long-term evaluation. *Dis Colon Rectum*. 55. United States2012. p. 762-72.
168. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, Sparrow MP, Segarajasingam D, Cummins AG, et al. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 12. United States: 2014 AGA Institute. Published by Elsevier Inc; 2014. p. 64-71.
169. Voswinkel J, Francois S, Simon JM, Benderitter M, Gorin NC, Mohty M, et al. Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;45(2):180-92.
170. Lotfinegad P, Shamsasenjan k, Movassaghpour A, Majidi J, Baradaran B. Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. 2014.
171. Reckhenrich AK, Kirsch BM, Wahl EA, Schenck TL, Rezaeian F, Harder Y, et al. Surgical Sutures Filled with Adipose-Derived Stem Cells Promote Wound Healing 2014.

172. Yao J, Korotkova T, Smith RL. Viability and proliferation of pluripotential cells delivered to tendon repair sites using bioactive sutures--an in vitro study. *J Hand Surg Am.* 36. United States: 2011 American Society for Surgery of the Hand. Published by Elsevier Inc; 2011. p. 252-8.
173. Adams SB, Jr., Thorpe MA, Parks BG, Aghazarian G, Allen E, Schon LC. Stem cell-bearing suture improves Achilles tendon healing in a rat model. *Foot Ankle Int.* 35. United States; 2014. p. 293-9.
174. Ara T, Fukuzawa M, Kusafuka T, Komoto Y, Oue T, Inoue M, et al. Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: association with tumor progression and clinical outcome. *J Pediatr Surg.* 33. United States; 1998. p. 1272-8.
175. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of Adult Mesenchymal Stem Cells Activity by Toll-Like Receptors: Implications on Therapeutic Potential. *Mediators of Inflammation.* 2010;2010:9.
176. Wang ZJ, Zhang FM, Wang LS, Yao YW, Zhao Q, Gao X. Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor (TLR)-4 and PI3K/Akt. *Cell Biol Int.* 33. England; 2009. p. 665-74.
177. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008;26(1):99-107.
178. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 1999;13(1):9-22.
179. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 109. England; 2005. p. 227-41.
180. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 9. United States; 2003. p. 669-76.
181. Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Rev SOCERJ.*; 2009.

ANEXOS

1. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para coleta de tecido adiposo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação do processo de cicatrização e ação imunomodulatória de células tronco mesenquimais estromais de tecido adiposo humano quando aderidas a fios de sutura, no tratamento de fístulas gastrointestinais
Número do CAAE:

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Se você não quiser participar desta pesquisa, ou se desistir da doação ou retirar sua autorização, a qualquer momento, não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo no atendimento nos hospitais da UNICAMP.

Justificativa e objetivos:

O objetivo dessa pesquisa é avaliar e entender, do ponto de vista celular e molecular, como o processo de cicatrização de feridas, chamadas de fístulas enterocutâneas, em modelo animal, ocorreu após o tratamento das feridas com fios de sutura contendo células-tronco de tecido adiposo aderidas. Para isso, células obtidas da gordura proveniente de lipoaspiração estética, de indivíduos sem doenças conhecidas, serão diferenciadas em células da linhagem mesenquimal (MSC – AT) e serão aderidas aos fios de sutura. Após a adesão os fios serão utilizados na avaliação de uma melhor cicatrização de feridas (fístulas) em modelo animal.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a doar uma pequena quantidade da gordura lipoaspirada durante a sua cirurgia e que seria jogada no lixo ao final, para ser utilizada nesta pesquisa. A doação da gordura não irá causar nenhum tipo de desconforto e risco para o doador

Esta gordura será dissolvida por uma enzima para ser possível obter as células que serão cultivadas. As células que irão aderir ao plástico da garrafa de cultura irão ser diferenciadas em células mesenquimais estromais, um tipo de célula tronco. A gordura não será armazenada, mas estas células mesenquimais serão congeladas para que possam ser utilizadas durante todo o tempo desta pesquisa.

Seguindo as orientações da Resolução 441/2011 CNS/MS o eventual armazenamento deste material, se necessário, terá características de armazenamento em banco biorrepositor. Portanto, se não forem totalmente utilizadas neste projeto, permanecendo congeladas, poderão ser utilizadas em outros projetos da Instituição, onde houver necessidade de utilizar células mesenquimais estromais obtidas de gordura humana, desde que estes novos projetos tenham sido submetidos e aprovados no Comitê de ética Médica e quando necessário pela CONEP.

Portanto, estou ciente que se não quiser participar desta pesquisa ou desistir da doação não haverá qualquer prejuízo para o meu atendimento nos hospitais da UNICAMP.

Fui também orientado (a) e estou ciente que minha doação é livre e voluntária, podendo desistir da doação a qualquer momento. Estou ciente também que não receberei nenhuma remuneração, compensação material ou financeira ou privilégio pela doação da gordura. Fui também informado (a) que não há benefícios decorrentes da doação da gordura, nem imediatos e nem a longo prazo. Este estudo pretende desenvolver um novo biomaterial para aplicação como implante dentário/ortopédico, que apresente além de melhores propriedades mecânicas, pela formação do revestimento superficial, biocompatibilidade e melhor “osteointegração” (integração com o osso do local a ser implantado).

Estou ciente que serão mantidos tanto o sigilo de meus dados quanto a minha privacidade, em todos os momentos da realização da pesquisa, inclusive no momento da publicação. Nenhuma informação será dada a outras pessoas que não estejam diretamente ligadas à equipe de pesquisadores deste projeto.

() Concordo em participar do presente estudo e AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, que deverá ser aprovada pelo CEP institucional e, se for o caso, pela CONEP.

() Concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa. O descarte do material armazenado será autorizado nas seguintes situações: Será tratado com hipoclorito de sódio, identificado como material infectante e recolhido pelo setor de limpeza para ser enviado para o aterro sanitário, onde será tratado por termodesinfecção em equipamento de micro-ondas e transformado em resíduo comum para ser descartado no próprio aterro.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____.

Contatos:

Em caso de dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato com o pesquisador Bruno Bosch Volpe, Banco de Sangue de Cordão Umbilical e Placentário – Hospital das Clínicas (HC) – Unicamp na Rua Carlos Chagas 480 - Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CEP 13083-878, Campinas - SP, telefone (19) 3521-7003 / 3521-7497 (das 8 às 17 horas), email brunoboschvolpe@gmail.com.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você pode entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 13:30hs e das 13:00hs as 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936; fax (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br. O CEP é constituído por um grupo de profissionais de diversas áreas, com conhecimentos científicos e não científicos que realizam a revisão ética inicial e continuada da pesquisa para proteger seus direitos.

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do(a) participante: _____

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu responsável LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

2. COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL (CEUA)



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação do processo de cicatrização e ação imunomodulatória de células tronco mesenquimais de tecido adiposo humano quando aderidas a fios de sutura, no tratamento de fístulas gastrointestinais em ratos" (protocolo nº 3293-1), sob a responsabilidade de Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo / Bruno Bosch Volpe, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **26 de março de 2014**.

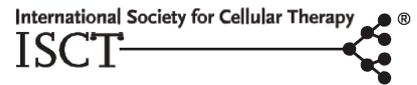
Campinas, 26 de março de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

3. ARTIGO CIENTÍFICO (REVISTA CITOTHERAPY)

Cytotherapy, 2014; 0: 1e11



Mesenchymal stromal cells from adipose tissue attached to suture material enhance the closure of enterocutaneous fistulas in a rat model

BRUNO BOSCH VOLPE¹, ADRIANA DA SILVA SANTOS DUARTE¹, THIAGO BORSOI RIBEIRO¹, ITHAMAR STOCCHERO³, PAULO KHARMANDAYAN³, SARA TERESINHA OLALLA SAAD², JOAQUIM MURRAY BUSTORFF-SILVA⁴ & ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO¹

¹Public Umbilical Cord Blood Bank, Haematology Hemotherapy Center/INCT do Sangue, ²Internal Medicine Department, Faculty of Medical Sciences, Haematology Hemotherapy Center/INCT do Sangue, ³Plastic Surgery Department, Faculty of Medical Sciences, and ⁴Paediatric Surgery Department, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

Abstract

Background aims. Surgical treatment for enterocutaneous fistulas (EF) frequently fails. Cell therapy may represent a new approach to treatment. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have high proliferative and differentiation capacity. This study aimed to investigate whether MSCs could adhere to suture filament (SF), promoting better EF healing. **Methods.** MSCs,

1×10^6 , from adipose tissue (ATMSCs) were adhered to a Polyvicryl SF by adding a specific fibrin glue formulation.

Adhesion

was confirmed by confocal and scanning electron microscopy (SEM). A cecal fistula was created in 22 Wistar rats by incising

the cecum and suturing the opening to the surgical wound subcutaneously with four separate stitches. The animals were randomly allocated to three groups: control (CG)—five animals, EF performed; injection (IG)—eight animals 1×10^6 ATMSCs injected around EF borders; and suture filament (SG): nine animals, sutured with 1×10^6 ATMSCs attached to the filaments with fibrin glue. Fistulas were photographed on the operation day and every 3 days until the 21st day and analyzed by two

observers using ImageJ Software. **Results.** Confocal and SEM results demonstrated ATMSCs adhered to SF (ATMSCs-SF). The average reduction size of the fistula area at 21st day was greater for the SG group (90.34%, $P < 0.05$) than the IG (71.80%) and CG (46.54%) groups. **Conclusions.** ATMSCs adhered to SF maintain viability and proliferative capacity. EF submitted to ATMSCs-SF procedure showed greater recovery and healing. This approach might be a new and effective tool for EF treatment.

Key Words: cell therapy, Crohn disease, enterocutaneous fistula, mesenchymal stem cells, suture filaments

Introduction

A digestive fistula is an abnormal connection between the digestive tract and the abdominal cavity (internal fistula) or the skin surface (enterocutaneous fistula) through which digestive secretion drainage occurs [1]. There are several specific types of fistula, depending on the part of the digestive tract involved. Approximately 85-90% result from surgical complications [1]. Digestive fistulas are responsible for electrolyte disturbances, infections, sepsis, skin lesions, gastrointestinal bleeding, intestinal obstruction and malnutrition [2]. Conventional treatment may be medical, surgical or nutritional. Although a great number of enterocutaneous fistulas close spontaneously, healing time is dependent on the location and nutritional status of the patient and may be associated with a high recurrence rate.

Recent studies have shown that stem cell therapy could represent a new approach in this area. Stem cells are characterized by the ability to differentiate into different lineages and by their great capacity of proliferation and self-renewal. They are classified as totipotent when capable of differentiating into any type of tissue in the human body [3]. Embryonic stem cells, when manipulated before the morula phase, may be an example of these cells. When manipulated during the morula and blastocyst phases, they can differentiate into almost all tissue types in the human body (except placenta and attachments) and are classified as pluripotent [3]. Adult

stem cells (e.g., hematopoietic stem cells from bone marrow, umbilical cord blood as examples) may be classified as multipotent, on their capacity of differentiating into various lineages. Moreover, some groups have discovered many stem cells types that can be found in some sources of hematopoietic stem cells as unrestricted somatic stem cells, very small embryonic-like stem cells and mesenchymal stromal cells (MSCs), rendering great plasticity and proliferative potential [4,5].

MSCs can be obtained from a variety of sources, such as bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue [6-15]. Some studies have shown their capacity to differentiate into mesodermal lineage (adipocytes, osteocytes, chondrocytes) and even cardiomyocytes, hepatocytes and myogenic and neurogenic lineages [16-22]. In addition to being easy to obtain, MSCs can also release various biomolecules (the paracrine effect), can exert immunomodulation properties, have great proliferative capacity and can also differentiate into other lineages (plasticity), rendering these cells viable for use in cell therapy [23-27]. Moreover, MSCs may act as immunomodulators, probably by promoting cell-to-cell contact and release of soluble factors [28]. MSCs were chosen for this study because of their immunomodulatory capacity, which enables, allogeneic or xenogenic transplantation without the use of immunosuppressive agents [29,30]. Delivery of stem cells to the target organ may be accomplished through methods such as topical application, injection or use of carriers [31,32]. In our laboratory, we have developed a method of attaching stem cells to the surface of suture filaments, which can be used as suture material in various situations, such as in the treatment of enterocutaneous fistulae, in an attempt to improve healing and reduce closure time. This study describes the use of such a suture filament with attached MSCs derived from adipose tissue to improve the healing of a cecal fistula in a rat model. Male rats were chosen for the experiments to prevent eventual hormonal bias and to standardize the groups. We reviewed the literature and found an article in which the fistula model was performed and maintained with a Kehr drain [33], which would not be an ideal model for our experiment because it would be better if the fistula were totally closed. Thus, we decided to perform the procedure as described in the Methods section. To our knowledge, this model is the first to be described in the literature.

Methods

MSC isolation and characterization

Adipose tissue was obtained from patients undergoing liposuction. The Ethics Committee of the

Faculty of Medical Sciences (University of Campinas) approved (CEP-No. 839/2008) all procedures, and all patients signed informed consent.

AT underwent collagenase digestion with 20 mg collagenase type 1A buffer (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA), 200 mg bovine serum albumin (Gibco Invitrogen), 20 mL low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco Invitrogen) for each 10 g of adipose tissue for 45 min, at 37°C and shaken every 5 min. After the washing protocol, cells were plated at a density of $1 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ flask in 5 mL of low-glucose DMEM medium (Gibco Invitrogen) supplemented with fetal bovine serum (Vitro-Cell Embriolife, Campinas, São Paulo, Brazil) for 3 days, incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. At 80% of confluence, trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid (Gibco Invitrogen) was added into the culture glass to detached adherent cells, which were not discarded. Adherent cells were washed gently with the same medium and then harvested. At the fourth passage, the AT adherent cells were detached with trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid, and their morphology was analyzed by light microscopy, characterized by flow cytometry, confocal microscopy analysis and differentiation to mesodermal lineage. The cells were submitted to specific protocols for chondrogenic, adipogenic and osteogenic lineage differentiation, the minimal criteria defined by International Society for Cellular Therapy [34]. MSCs genetic stability was also analyzed by telomerase enzyme activity and cytogenetic analysis.

Mesodermal lineages differentiation protocols

Osteogenic differentiation was performed with fourth-passage cells cultured in osteogenic medium, Iscove's Modified Dulbecco's Eagle Medium supplemented with 0.1 mmol/L dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 mmol L-glycerolphosphate (Sigma-Aldrich), and 0.2 mmol ascorbic acid (Sigma-Aldrich) for 3 weeks. The medium was changed twice weekly. Osteogenic morphology was confirmed by light microscopy, and cells were stained by alizarin red.

Adipogenic differentiation was performed with fourth-passage cells cultured with adipogenic medium: Iscove's Modified Dulbecco's Eagle Medium supplemented with 0.5 mmol/L 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (Sigma-Aldrich), 1 mol/hydrocortisone (Sigma-Aldrich), 0.1 mmol/L indomethacin (Sigma-Aldrich) and 10% rabbit serum (Sigma-Aldrich) for 3 weeks. Medium was changed twice weekly. Adipogenic morphology was confirmed by light microscopy, cells were stained using oil red O.

Chondrogenic differentiation was performed with fourth-passage cells that were transferred into a

15-mL polypropylene tube and centrifuged at 1,000 rpm (F0685 Fixed-Angle Rotor, Avanti 30; Beckman Coulter, Inc, Brea, CA, USA) for 5 min to obtain a pelleted micromass at the bottom of the tube. The micromass was then cultured in chondrogenic medium, high-glucose DMEM (Bio-fluid, Rock-ville, MD, USA) supplemented with 0.1 mmol/L dexamethasone, 50 g/mL ascorbic acid, 100 g/mL sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 40 g/mL proline (Sigma-Aldrich), 10 ng/mL transforming growth factor 1 and 50 mg/mL ITS (insulin, transferrin, selenium) premix (Becton, Dickinson, and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 6.25 g/mL insulin, 6.25 g/mL transferrin, 6.25 ng/mL selenium, 1.25 mg/mL bovine serum albumin and 5.35 mg/mL linoleic acid) over 3 weeks. Medium changes were performed twice weekly. Chondrogenic morphology was confirmed by light microscopy, and cells were stained by sirius red, resorcin and fuchsin.

Genetic stability analyses

The telomerase repeat amplification protocol (TRAP) assay procedure was performed according to the manufacturer's instructions using TRAPeze Telomerase Detection Kit (Chemicon International, Millipore, Billerica, MA, USA). Adipose tissue MSC samples of passages 4, 8 and 12 were analyzed. The polymerase chain reaction products were electrophoresed on a 12.5% polyacrylamide gel and visualized with the aid of ethidium bromide. The products were visualized and measured by the Analysis System 120 (ADVIA 120 Hematology System; Siemens AG, Munich, Germany) and Kodak digital science 1D 3.02 software, with CCD imaging system (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Activity in the TRAP assay was detected as a ladder of products with six base increments (starting at 50 nucleotides), and the relative telomere activity was calculated semi-quantitatively by densitometry of the digitized image using the UN-SCAN-IT gel Version 6.1. Negative control was performed with samples heated to 85°C to inactivate the telomerase enzyme and 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate lysis buffer. A sample was scored as telomerase activity positive when positive TRAP results were obtained from at least one protein concentration.

For karyotype analysis, MSCs treated with trypsin were submitted to centrifugation, 1200 rpm, for 10 min. The pellet was resuspended in 0.075 mol/L KCl, 5 mL, 12 min, at 37°C. Cells were fixed with methanol/acetic acid (3:1) and karyotyped using G-banding; the slides were analyzed under a light microscope at 10× and 100× magnifications. Images of the individual metaphase spreads were captured and karyotyped using an automated imaging system for cytogenetic analysis.

Cell adhesion in suture filaments procedures

Quality control experiments to determine the ideal number of cells and the quality of their adhesion in the suture filaments were performed before the beginning of this study. Previous studies were carried out in our group (Larissa Berbet, student. Evaluation of Fibrin Glue adhesion capacity by adding mesenchymal stromal cells on polyurethane scaffolds, an experimental study. 2009) to demonstrate the effectiveness of adding commercial fibrin glue MSCs on biomaterials and suture filaments. The adhesion potential of the glue impaired the migration of the cells to the tissues. Thus, the adhesion procedure in this study was performed with a specific fibrin glue formulation. Cell adhesion in the suture filaments were previously demonstrated and confirmed by confocal fluorescent microscopy and scanning electron microscopy (SEM) animal experiments because the SEM technique kills the cells. Suture filaments with adhered cells from animal experiments were not submitted to SEM analyses but to confocal fluorescence microscopy, carried out with live/dead assay marks for green living and viable cells and red dead and unviable cells to confirm the viability and adhesion of the cells.

Cell adhesion in suture filament animal experiments was performed on poly-vicryl suture filaments. MSCs from adipose tissue were attached to the suture material by the addition of specific fibrin glue. Specific fibrin glue was obtained with 20 uL of fibrinogen, 30 uL of thrombin and 10 uL of calcium chloride. After the fibrin glue was ready, the suture material was divided into 30-cm segments, which were placed in Petri dishes. MSCs (1×10^6), checked by hemocytometer counter, were then dropped over the suture, and fibrin glue was added.

The culture medium described earlier was then added to the plates. Cell growth was observed every 24 h. Cells were labeled before the procedure using the live/dead assay technique. Samples were analyzed by confocal and scanning electron microscopy.

Confocal fluorescence microscopy

Adipose tissue MSCs were stained using live/dead assay. To each sample, 2.5 uL of calcein and 10 uL of propidium iodide were added and left to rest for 30 min at room temperature. The samples were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and taken to a microscope and photographed.

SEM

After 1 day of cell seeding, the stem cells attached to the suture were processed for SEM studies. The

materials were rinsed twice with PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde for 3 h. Stem cells attached to the suture were then dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (60%, 70%, 80%, 90% and 100%) for 15 min each. The stem cells attached to the suture were then sputter coated with gold and observed under SEM.

Animal experiments

The animal experiments were performed in 10-week-old Wistar rats in which an enterocutaneous cecal fistula was created. The study was submitted and approved by the Ethics Committee on animal and also by the Faculty of Medical Sciences Ethic committee (No. 2545-1). Twenty-two animals were used in the experiments. The rat colony was monitored by the Quality Health Section of the Center for Experimental Medicine and Surgery as described by Gilioli *et al.* [35, 36].

Animals were anesthetized intraperitoneally with 80 mg/kg ketamine (Pantex Holland, Duizel, Netherlands) and 10 mg/kg xylazine (Pantex Holland) diluted in PBS. The cecum was accessed through a standard 7-mm stab incision on the lower left side of the abdomen, sparing the colon upon exposure, and a 5-mm enterotomy was performed and sutured to the abdominal wall to create an enterocutaneous fistula. To allow spontaneous closure of the fistula, the opening in the cecum wall was secured to the borders of the surgical wound without maturation. At this point, the animals were randomly allocated into one of three groups:

1. Control group (CG)—the fistula was secured to the abdominal wound using four separate stitches of plain 4-0 Vicryl (Poly J-304 polyglactin 910, Ethicon, São Paulo, Brazil).
2. Injection group (IG)—the fistula was secured to the abdominal wound using four separate stitches of plain 4-0 Vicryl (Poly J-304 polyglactin 910, Ethicon), and a suspension containing 1×10^6 mesenchymal stem cells from adipose tissue was injected subcutaneously around the fistula.
3. Suture group (SG)—the fistula was secured to the abdominal wound using four separate stitches of 4-0 Vicryl (Poly J-304 polyglactin 910, Ethicon) in which 1×10^6 mesenchymal stem cells from adipose tissue had been adhered.

Postoperative closure of the fistula was monitored through photographic documentation starting on the day of the operation and continuing through post-operative days 3, 6, 9, 12, 15, 17, 19 and 21. The animals were euthanized by CO₂ chamber. The ImageJ (RSB, Bethesda, Maryland, USA) software

was used for the analysis of the fistula areas (mm²) of each animal.

Sample size

Minimum sample size was calculated based on a proposed reduction of 50% in the final area of the fistula, considering an alpha value of 5% and a study power of 80%. On the basis of these parameters, minimum sample size was calculated to be five animals per group.

ImageJ

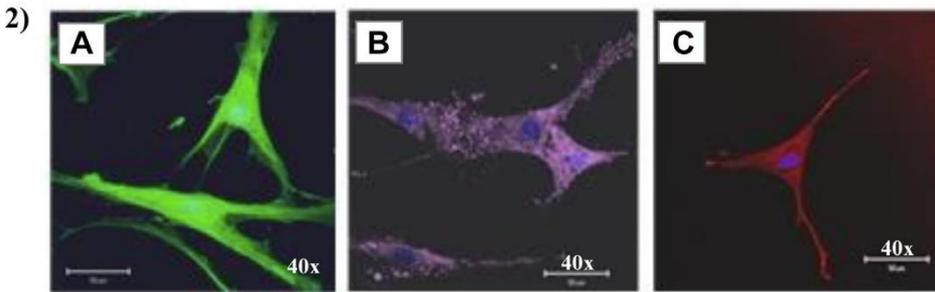
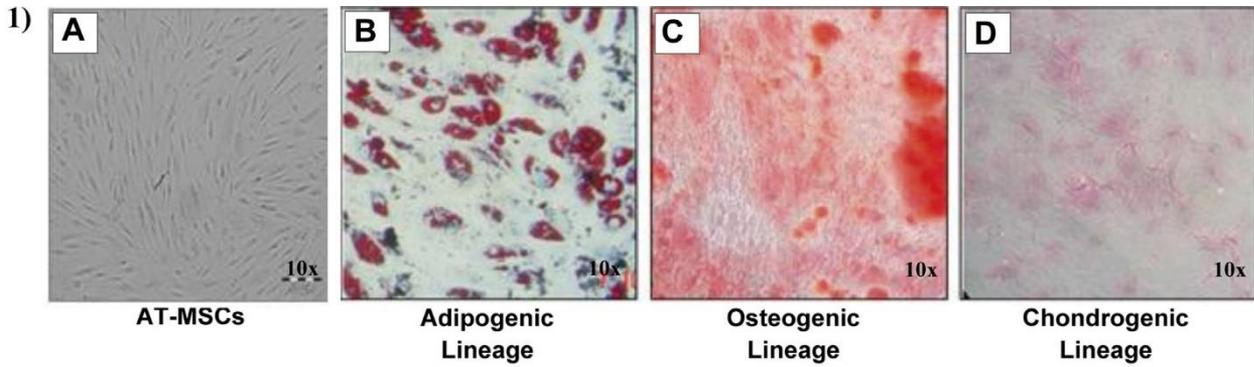
The fistula areas of each animal were analyzed by ImageJ software (Image Processing and Analysis in Java). The photos were taken on the day of surgery and during the post-operative period (PO) on days 3, 6, 9, 12, 15, 17, 19 and 21. The photos were taken with Panasonic Lumix digital camera (Panasonic, São Paulo, Brazil) with Leica lens (DC VARIO-ELMARIT 1:2.8e5.9/5.5e22 ASPH, Leica, Wetzlar, Germany). Images from the fistulae were analyzed by two independent persons using the ImageJ software.

Results

MSCs differentiation and characterization

Figure 1.1A shows adipose tissue submitted to digestion and adherent culture, which led to expansion of adherent cells with spindle-shaped morphology, confirmed by light microscopy. Flow cytometry immunophenotyping of these cells at the fourth passage also demonstrated that the cells were positive for CD90 (99.60%), CD105 (99.30%), CD73 (97.87%) and CD29 (84.11%). The other markers—CD45, HLADR, D34, CD14 and STRO-1—were less than 1% (0.96 T 0.95%) and showed low expression (Figure 1.3). Furthermore, they differentiated into mesodermal lineage (chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages), with morphology confirmed by light microscopy (Figure 1.1B–D), demonstrating that these cells were MSCs. The results obtained by light and confocal microscopy, flow cytometry analyses and the capacity on mesodermal differentiation demonstrated that the adhered cells obtained from adipocyte tissue were MSCs as established by the International Society of Cell Therapy criteria [34].

Telomerase enzyme activity analyses demonstrated that adipose tissue MSCs at P4 showed bands of 56 and 50 bp with related telomerase enzyme activity of 100%. The bands diminished at P8 and P12 with reduction of enzyme activity, which



3) Flow cytometry analysis

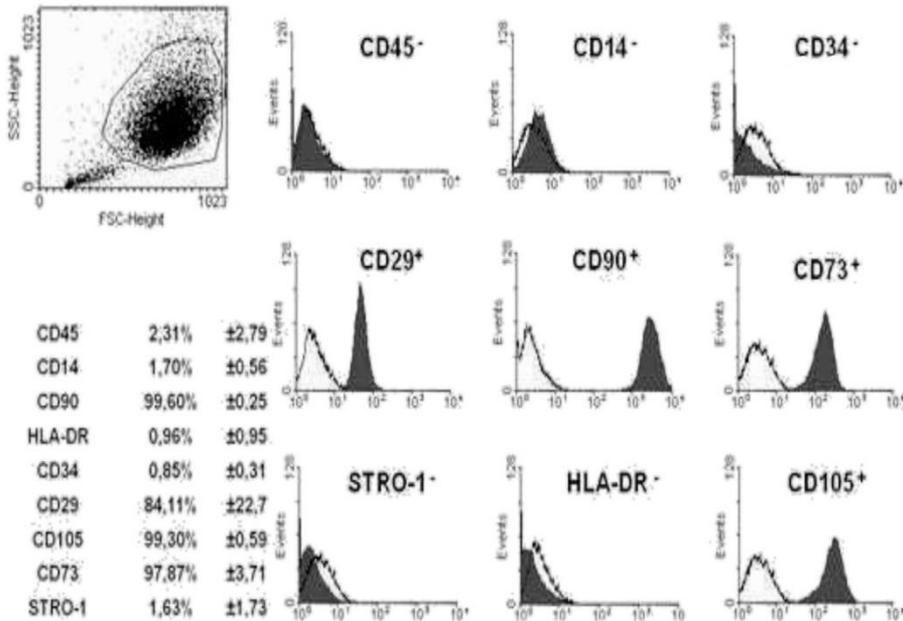
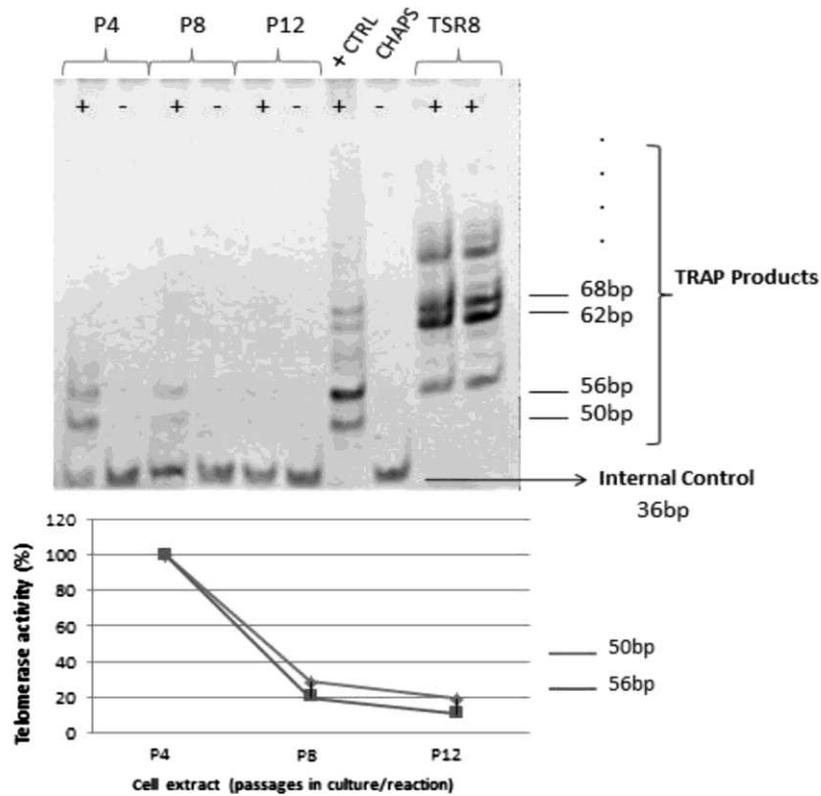


Figure 1. (1) Morphologic analysis and mesodermal differentiation. (A) Light microscopy morphologic analysis showing adipose tissue MSCs with fibroblastic morphology (magnification 10×). (B) MSCs differentiated into adipocytes, lipid vesicles stained with oil red O. (C) MSCs differentiated into osteocytes, calcium storage stained with alizarin red. (D) MSCs differentiated into chondrocytes stained with sirius red, resorcin and fuchsin (magnification 10×). (2) Immunofluorescence microscopy. (A) MSCs stained in green positive for CD73 antibody. (B) MSCs stained in purple positive for CD90 antibody. (C) MSCs stained in red positive for CD105 antibody (magnification 40×). (3) Flow cytometry analysis: MSCs at the 4th passage demonstrated 96.95% of the cells positive for CD90, CD105, CD73 and CD29. The other markers, CD45, HLADR, CD34, CD14 and STRO-1, were <1%.

demonstrated a low potential for instability of these cells (Figure 2.1). Karyotype analyses demonstrated no chromosomal instability or abnormality

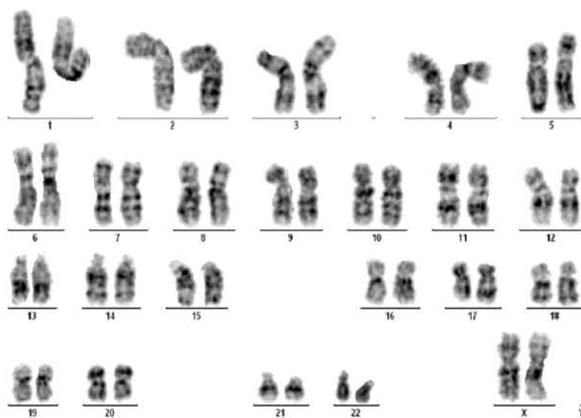
(Figure 2.2). Telomerase enzyme activity and cytogenetic results demonstrated that adipose tissue MSCs were genetically stable.

1) Telomerase enzyme activity analysis



2) Cytogenetic analyses

A - MSCs



B - MSCs

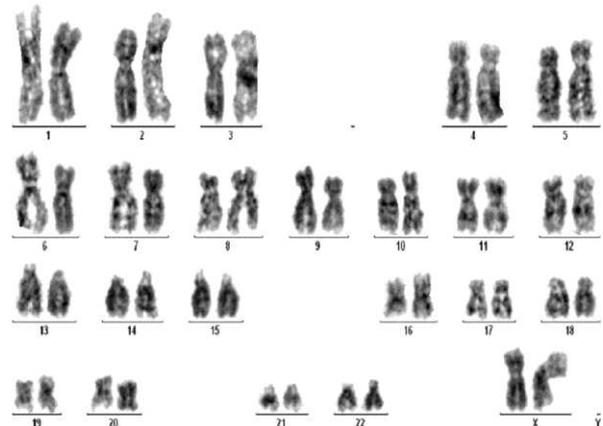


Figure 2. (1) Telomerase enzyme activity: MSCs at fourth passage (P4) showed 56 and 50 bp bands related to 100% of telomerase enzyme activity. Bands diminished at the eighth and 12th passages (P8 and P12), demonstrating that telomerase enzyme activity decreased. (2) Karyotype: (A) MSCs at P8 karyotype analysis. (B) MSCs tenth-passage karyotype analysis. Cytogenetic analysis demonstrated no chromosomal abnormalities.

MSC adhesion to suture filaments

Quality control tests were performed before the animal experiments and ensured that suture filaments had a large quantity of viable adhered MSCs.

Confocal fluorescence microscopy results demonstrated that cells were able to attach and adhere to the suture filaments. Labeled cells adhered to the suture, completely covering the filaments (Figure 3.1).

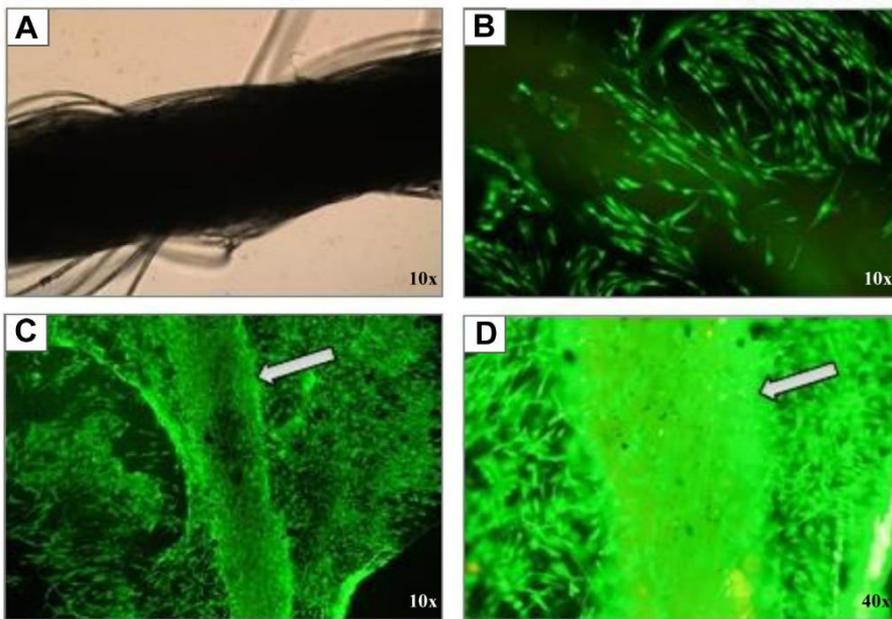
SEM

SEM proved that some cells adhered on the surface of the sutures, and others were detected between the strands of the wires. The fibrin glue formed a "layer" cell between the filaments of the suture (Figure 3.2).

Animal experiment

During the course of the experiment, none of the animals in the control group achieved complete closure of the fistula. The median percentage of reduction of fistula area (mm^2) on the 21st day was 47.10% (T23%). Animals from the injection group displayed increased healing compared with the control group. Fistula area reduction of on the 21th postoperative day was significantly greater in this group than the control, 80.71% (T26%) versus 47.10%; $P < 0.05$. All animals in the suture group displayed increased healing compared with the control group. Fistula area reduction on the 21st post-operative day was significantly greater in this group than the control group 98.27% (T14%) vs. 47.10%; $P < 0.05$; (Figure 4:1, 4.2, 4.3).

1) Immunofluorescence microscopy



2) SEM

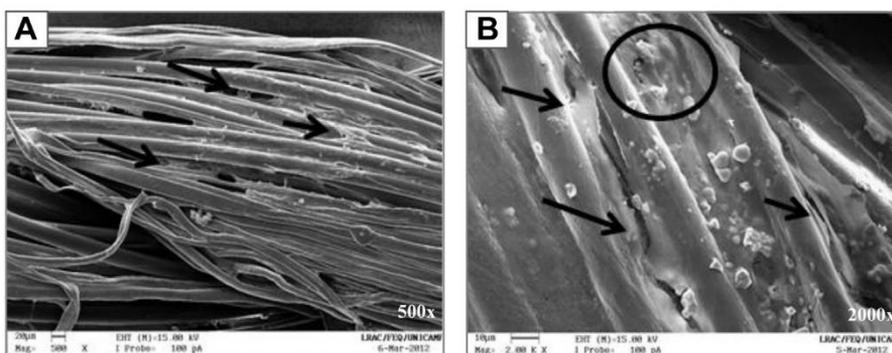


Figure 3. (1) (A) Suture filament control, without fluorescence. (B) Viable MSCs labeled in green (control). (C) Suture filament completely involved by viable cells, indicated by arrows (magnification 10 \times). (D) Suture filament completely involved by viable cells, indicated by arrow (magnification 20 \times). (2) (A) Arrows show well-defined cells on the surface and between the suture filaments (magnification 500 \times). (B) Arrows and circle show cells on the surface of the filament as a cell layer due to the addition of fibrin glue (magnification 2000 \times).

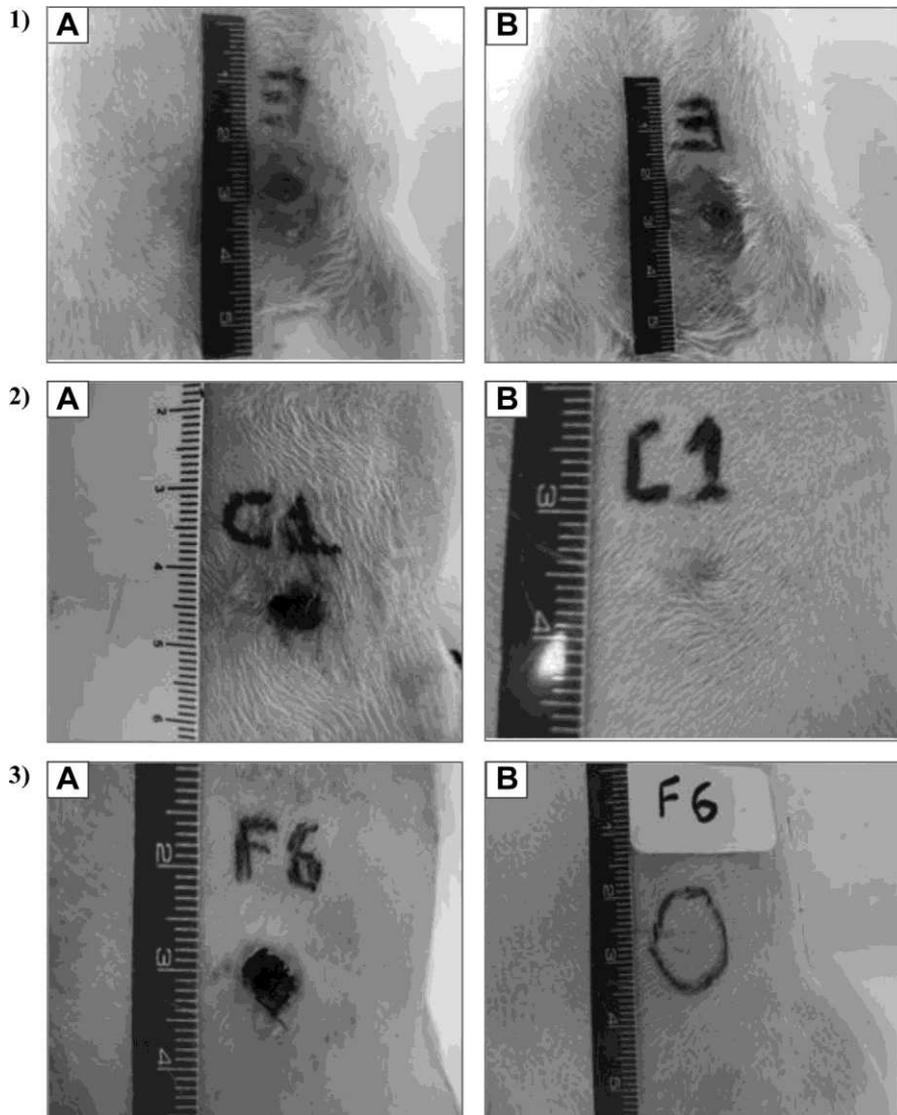


Figure 4. (1) Control group enterocutaneous fistulas (EF) development: (A) first day of fistula generation. (B) Twenty-first day of fistula generation, demonstrating no healing of the fistula. (2) Injection group EF development: (A) first day of fistula generation. (B) Twenty-first day of fistula generation, demonstrating almost complete healing of the fistula. (3) Suture group EF development: (A) First day of fistula generation. (B) Twenty-first day of fistula generation showing complete healing of the fistula.

Discussion

Fistulas continue to cause high levels of morbidity and mortality, although many important factors related to their management are known. Recent improvements in clinical (e.g., infliximab) and surgical treatments have decreased the need for complicated surgeries. Nonetheless, these approaches have not led to a cure. Fistula management in patients with Crohn disease is a challenging problem; many patients do not respond to the available treatments. The reported incidence of fistula in Crohn disease ranges from 17 to 50% of patients [32,37,38], resulting in distressing complications that reduce patient quality of life. Recent studies have shown that

stem cell therapy could represent a new approach in this area.

MSCs show great proliferative capacity; differentiation into mesodermal and other lineages; and a paracrine effect that leads to an immunomodulation state by promoting cell-cell contact and releasing soluble factors, all of which render MSCs a therapeutic alternative. Another advantage is that the cells can be obtained autologously and, in the future, perhaps through allogenic means via umbilical cord blood bank units, which have sufficient quality control to be used as an MSC source [40]. The possibility of accessing adipose tissue through liposuction procedures renders this source an attractive

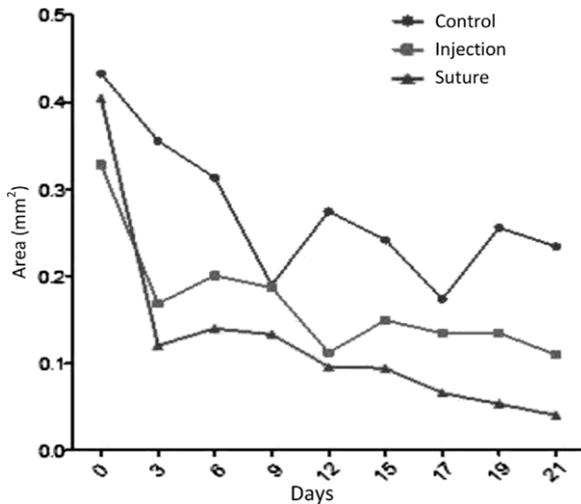


Figure 5. Analyses of fistula area development comparing the three groups demonstrated that when MSCs were used, there was better fistula healing. The suture group results on the third day were similar to the 21st control and injection group results.

alternative for obtaining MSCs. Additionally, liposuction fat is available in large quantities and can be obtained with minimal adverse effects for the patient (local anesthesia) [29,30].

In our study, MSCs were successfully obtained from adipose tissue according to the standards of the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy. Genetic stability analysis was performed by karyotype studies and telomerase enzyme activity analysis. Fidler *et al.* [41] reported that nonmetastatic cells are more stable phenotypically and genotypically compared with metastatic cells, suggesting that the sooner chromosomal instability is detected, the better the chance of metastatic cell detection. Wong *et al.* [39] described that MSCs could transform themselves into malignant cells if submitted to long term *in vitro* expansion, interaction with tumor stroma or genetic manipulation. Human cells have two control points that regulate their viability *in vitro*: senescence and crisis stages. Senescence is associated with telomere shortening; if cells ignore this step, they continue to grow and can then initiate a crisis phase, characterized by widespread chromosomal instability and causing massive apoptosis. At this point, these cells are not recommended for clinical use. Moreover, modulatory behavior of these cells could lead to drug resistance. MSC karyotypes from the three sources analyzed demonstrated no abnormalities, and chromosomes remained stable [41].

Telomerase enzyme activity diminished with the progression of each passage and showed normal activity. The aggressiveness of the tumor cells is known to be related to high levels of telomerase activity. This

enzyme is present in most neoplastic processes and plays an important role in the diagnosis and treatment of cancer, making it one of the important targets for research and therapy [42]. Therefore, MSCs also demonstrate genetic stability, due to telomerase enzyme activity and karyotype analyses results, which may permit their use in regenerative medicine.

The cells were capable of adhering to the suture filaments, which was demonstrated by fluorescence microscopy and SEM.

Recently, preclinical experiments were also reported by Guyette *et al.* [31] showing that MSCs could be attached to suture filaments. Despite the authors having maintained the suture filaments with the attached cells in a bioreactor culture system, the cells did not remain attached to the filaments, as demonstrated by fluorescence microscopy analyses. However, they were able to promote better healing and recovery of the compromised heart area that was submitted to the procedure. Nonetheless, because a large number of cells did not remain attached to the filament, perhaps if used for larger injuries such as enterocutaneous fistula, the healing may not occur [31].

The animal experiments showed that when the MSCs were injected or the suture procedure was performed with filaments where the cells were adhered, a faster and better recovery and healing of the fistulas (injection and suture groups) was observed (Figure 5). The injection group showed a 71.80% reduction of the fistula, a result similar to those published by García-Olmo *et al.* [32]. One of the study groups underwent direct injection of cells at the injury site to determine if this would be more or less effective than treatment with stem cells adhered to sutures. The suture group demonstrated a reduction of 90.34% of the fistula area, probably because of a larger number of the cells adhered to the filaments using a fibrin glue procedure, which might have migrated into the fistula area to promote better healing and recovery to the injured area. Recently, Kin *et al.* demonstrated that adipose tissue MSCs adhered to fibrin glue demonstrated better proliferation and maintained viability until the 14th day of culture [43]. The suture filament procedure could be an effective treatment for enterocutaneous fistulas and useful in other surgical situations.

Although some authors have reported a good initial response using MSCs injected around an enterocutaneous fistula in patients with inflammatory bowel disease [43], the results have also shown that in some cases, the fistulas returned. However, these authors used stem cells to treat enterocutaneous fistulas in a difficult clinical situation in which a severe inflammatory process was active. Our initial experiments did not aim to address this issue, which we intend to investigate in future work.

The MSC mechanisms involved in faster healing and better recovery of enterocutaneous fistulas must be investigated. To date it is not completely understood whether stem cells act by directly migrating to tissue and differentiating into collagen fibers or whether, in addition to the well-known MSC immunomodulation properties, they release interferon-gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 β into the damaged tissue, which might regulate the immune response to promote faster healing and recovery in the compromised area, which could be a possible explanation for our results [44]. Suture filaments with adhered MSCs may represent a new tool for various diseases, providing better healing and recovery of fistulas, reducing the time of hospitalization and improving quality of life. More experiments are necessary to fully investigate the intrinsic mechanisms involved in these effects.

Conclusion

MSCs were successfully obtained from adipose tissue. MSCs were capable of attaching and adhering to suture filaments in the presence of fibrin glue, maintaining their viability and properties. Suture filaments with adhered MSCs promoted better recovery and healing of enterocutaneous fistulas in a rat model of cecal fistula. This new technology may represent an interesting and effective tool for regenerative medicine.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq 482871/2010-5) and has been submitted for a patent (BR 10 2013 012895 3).

Disclosure of interest: The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- [1] Berry SM, Fischer JE. Classification and pathophysiology of enterocutaneous fistulas. *Surg Clin North Am* 1996;76: 1009e18.
- [2] Li D, Wang GY, Dong BH, Zhang YC, Wang YX, Sun BC. Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various cytokines. *Cells Tissues Organs* 2007;186:169e79.
- [3] Eckfeldt CE, Mendenhall EM, Verfaillie CM. The molecular repertoire of the "almighty" stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(9):726e37.
- [4] Matsumoto T, Mugishima H. Non-hematopoietic stem cells in umbilical cord blood. *Int J Stem Cells* 2009;2:83e9.
- [5] Ratajczak MR, Dong-Myung S, Liu R, Mierzejewska K, Ratajczak J, Kucia M, et al. Very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs) and their potential role in aging and organ rejuvenation—an update and comparison to other primitive small stem cells isolated from adult tissues. *Aging* 2012;4: 235e46.
- [6] Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH, et al. *In vitro* differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem Cells* 2006; 24:1759e68.
- [7] Kanematsu D, Shofuda T, Yamamoto A, Ban C, Ueda T, Yamasaki M, et al. Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta. *Differentiation* 2011;82:77e88.
- [8] Partridge TA, Morgan JE, Coulton GR, Hoffman EP, Kunkel LM. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 1989;337:176e9.
- [9] Geng J, Peng F, Xiong F, Shang Y, Zhao C, Li W, et al. Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009;11:849e63.
- [10] Cossu G, Mavilio F. Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective? *J Clin Invest* 2000;105:1669e74.
- [11] Tarnowski M, Sieron AL. Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit* 2006;12:154e63.
- [12] Tajbakhsh S. Losing stem cells in the aged skeletal muscle niche. *Cell Res* 2013;23:455e7.
- [13] Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001;68: 245e53.
- [14] Huang S, Jia S, Liu G, Fang D, Zhang D. Osteogenic differentiation of muscle satellite cells induced by platelet-rich plasma encapsulated in three-dimensional alginate scaffold. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;114(Suppl 5):32e40.
- [15] Zhou Y, Mack DL, Williams JK, Mirmalek-Sani SH, Moorefield E, Chun SY, et al. Genetic modification of primate amniotic fluid-derived stem cells produces pancreatic progenitor cells *in vitro*. *Cells Tissues Organs* 2013;197: 269e82.
- [16] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143e7.
- [17] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568e84.
- [18] Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galipe M, Sbarbati A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008;17:909e16.
- [19] Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24:70e7.
- [20] Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical applications. *Recent Prog Med* 2003;94:478e83.
- [21] Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:1135e40.
- [22] Corre J, Barreau C, Cousin B, Chavoin JP, Caton D, Fournial G, et al. Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors. *J Cell Physiol* 2006;208:282e8.
- [23] Gnecci M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *Faseb J* 2006;20: 661e9.

- [24] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton G. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739e49.
- [25] Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 2012;10:709e16.
- [26] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:44e50.
- [27] Abumaree M, Al Jumah M, Pace RA, Kalionis B. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2012;8:375e92.
- [28] Soleymannejadian E, Pramanik K, Samadian E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. *Am J Reprod Immunol* 2012;67:1e8.
- [29] Li J, Ezzelarab MB, Cooper DK. Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 2012;19:273e85.
- [30] Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev* 2012;21:2770e8.
- [31] Guyette JP, Fakharzadeh M, Burford EJ, Tao ZW, Pins GD, Rolle MW, et al. A novel suture-based method for efficient transplantation of stem cell. *J Biomed Mater Res A* 2013;101A:809e18.
- [32] García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1416e23.
- [33] Medeiros AC, Melo NMC, Macedo LMB, Medeiros IC, Dantas Filho AM, Neto TA. Octreotida no tratamento de fístulas entéricas em ratos. *Acta Cir Bras* 2002;17:116e21.
- [34] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315e7.
- [35] Gilioli R, Andrade LAG, Passos LAC, Silva FA, Rodrigues DM, Guaraldo AMA. Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2000;52:33e7.
- [36] Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. 2003. 138f. PhD thesis - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.
- [37] Casteilla L, Planat-Benard V, Laharraqe P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells* 2011;3:25e33.
- [38] García-Olmo D, Herreros D, De-La-Quintana P, Guadalajara H, Trébol J, Georgiev-Hristov T, et al. Adipose-derived stem cells in Crohn's rectovaginal fistula [article ID 961758]. *Case Report Med* 2010;1e3. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/crim/2010/961758>. Accessed: July, 08, 2014.
- [39] Wong H, Gibbs P. Does Adjuvant chemotherapy in elderly patients with stage III colon cancer really save lives? *J Clin Oncol* 2012;511e2.
- [40] Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 2005;33: 1402e16.
- [41] Fidler IJ. Biological heterogeneity of cancer: implication to therapy. *Hum Vaccin Immunother* 2012;8:1141e2.
- [42] Robart AR, Collins K. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using dis-ease-linked subunit variants. *J Biol Chem* 2010;285: 4375e86.
- [43] Kin I, Lee SK, Yoon JI, Kim da E, Kim M, Ha H. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng* 2013;19: 2373e81.
- [44] Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical transplantation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cell Transl Med* 2012;1:44e50.

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 22, 2017

This Agreement between Dr. Bruno Volpe ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4193801083528
License date	Sep 21, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cytotherapy
Licensed Content Title	Mesenchymal stromal cells from adipose tissue attached to suture material enhance the closure of enterocutaneous fistulas in a rat model
Licensed Content Author	Bruno Bosch Volpe,Adriana da Silva Santos Duarte,Thiago Borsoi Ribeiro,Ithamar Stocchero,Paulo Kharmandayan,Sara Teresinha Olalla Saad,Joaquim Murray Bustorff-Silva,Ângela Cristina Malheiros Luzo
Licensed Content Date	Dec 1, 2014
Licensed Content Volume	16
Licensed Content Issue	12
Licensed Content Pages	11
Start Page	1709
End Page	1719
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	EVALUATION OF THE HEALING PROCESSES OF ENTEROCUTANEOUS FISTULAS WHEN TREATED WITH MESENCHYMAL STROMAL CELLS ATTACHED IN SUTURE FILAMENTS
Expected completion date	Oct 2017
Estimated size (number of pages)	118
Requestor Location	Dr. Bruno Volpe Rua General Osório 216 Bebedouro, São Paulo 14701-020 Brazil Attn: Dr. Bruno Volpe
Billing Type	Invoice
Billing Address	Dr. Bruno Volpe Rua General Osório 216 Bebedouro, Brazil 14701-020 Attn: Dr. Bruno Volpe