



UNICAMP

BRUNO BOSCH VOLPE

**UTILIZAÇÃO DE FIOS DE SUTURA COM
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO ADERIDAS: AVALIAÇÃO
DA CICATRIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE
FÍSTULAS ENTEROCUTÂNEAS EM RATOS.**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

BRUNO BOSCH VOLPE

**UTILIZAÇÃO DE FIOS DE SUTURA COM CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO ADERIDAS: AVALIAÇÃO DA
CICATRIZAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE FÍSTULAS ENTEROCUTÂNEAS
EM RATOS.**

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo

Co-orientadora: Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELO ALUNO BRUNO BOSCH VOLPE E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO.

Assinatura do(a) Orientador(a)

Campinas

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V888u Volpe, Bruno Bosch, 1988-
Utilização de fios de sutura com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas : avaliação da cicatrização e recuperação de fistulas enterocutâneas em ratos / Bruno Bosch Volpe. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Células tronco mesenquimais. 2. Fistula intestinal.
I. Luzo, Angela Cristina Malheiros. II. Bustorff-Silva, Joaquim Murray, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Attachment capacity of adipocyte tissue mesenchymal stem cells in suture filaments : new tool for the treatment of enterocutaneous fistula

Palavras-chave em inglês:

Mesenchymal stem cells

Intestinal fistula

Área de concentração: Fisiopatologia Cirurgica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Ângela Cristina Malheiros Luzo [Orientador]

Ana Cristina Aoun Tannuri

Antônio Gonçalves de Oliveira Filho

Data da defesa: 26-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

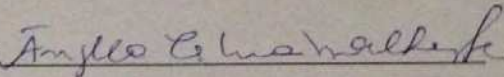
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BRUNO BOSCH VOLPE

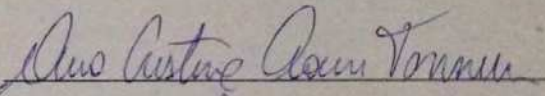
Orientador (a) PROF(A). DR(A). ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO

MEMBROS:

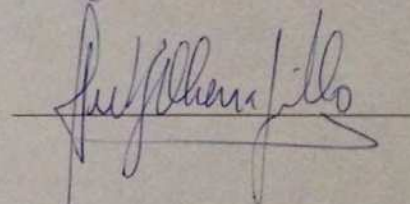
1. PROF(A). DR(A). ÂNGELA CRISTINA MALHEIROS LUZO



2. PROF(A). DR(A). ANA CRISTINA AOUN TANNURI



3. PROF(A). DR(A). ANTÔNIO GONÇALVES DE OLIVEIRA FILHO



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

Data: 26 de agosto de 2013

Agradecimentos

À toda minha família, à minha mãe Lúcia, ao meu pai César, ao meu irmão André pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão e amor. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

A minha namorada Natália, por todo o apoio, incentivo, amizade e amor. Agradeço pela compreensão e por compartilhar comigo todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Ângela Luzo, por sua orientação na realização deste trabalho. Agradeço a sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado. A finalização deste trabalho é fruto de sua orientação e uma conquista nossa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Joaquim Bustorff, pela orientação na realização deste trabalho. Agradeço pela oportunidade, confiança e por todo o aprendizado que o senhor me proporcionou. Esse trabalho é fruto de sua orientação e uma conquista nossa.

A minha amiga Dra. Adriana Duarte, que participou de todo o processo na minha formação. Obrigado pelo constante incentivo durante o trabalho, me guiando e ensinando. Obrigado pelos momentos de amizade.

Aos meus amigos de república, Guilherme, Thiago, Ricardo e Fabiano. Aos outros que já moraram comigo e fizeram parte desta conquista, Pablo, Luís, Luiz Felipe, Rodrigo, Gustavo e Matheus. A todos os meus amigos de Bebedouro, Thiago Rodrigues, Ricardo, Claudio, por sempre estarem presentes nos momentos de alegria e dificuldades.

Ao amigo de trabalho Raphael, que sempre esteve presente ajudando na minha formação. Obrigado por me ajudar nos experimentos e pelos momentos de amizade.

Aos alunos, funcionários e a toda a equipe de trabalho do laboratório que me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho. Agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e por todo o carinho.

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.

As fístulas enterocutâneas (FE) são de difícil cicatrização e seu tratamento cirúrgico frequentemente falha, fazendo com que a fistula volte a abrir. Estudos recentes têm demonstrado que a terapia celular pode ser uma nova forma de tratamento nesta área. As células tronco mesenquimais (MSCs) são capazes de se auto-renovar, têm alta capacidade proliferativa, podendo se diferenciar em várias linhagens celulares. Ainda apresentam capacidade imunomodulatória. A medula óssea, o sangue de cordão umbilical e o tecido adiposo são as principais fontes de MSCs. O tecido adiposo (TA) é de fácil acesso, sendo que o procedimento de lipoaspiração é um procedimento comum. O tratamento de fístulas enterocutâneas com AT-MSCs já foi testado algumas vezes, porém a fístula em sua grande maioria não se fecha totalmente. O objetivo deste estudo foi analisar o potencial terapêutico das MSCs aderidas a fios de sutura no intuito de melhorar a cicatrização e recuperação no tratamento de FE.

O TA foi obtido através do procedimento de lipoaspiração. O TA foi submetido ao processo de digestão com colagenase. As células ficaram em meio de cultura DMEM com baixa glicose e com SFB durante 3 dias. Quando atingiram 80% de confluência, as células aderentes foram tratadas com tripsina e ressuspendidas com o meio citado acima. Na 4ª passagem essas células foram caracterizadas com citometria de fluxo, microscopia confocal e diferenciadas nas três linhagens mesodérmicas para confirmação que realmente são MSCs. Após, a confirmação de que as células eram realmente células tronco mesenquimais, elas foram aderidas em fios de sutura de poliglactina (4-0 Poly Vicryl / Poliglactina 910). Foram gotejadas 10^6 MSCs em cima de cada fio de sutura e logo em seguida foi adicionada a cola de fibrina (20uL Fibrinogênio, 30uL Trombina e 10uL Cloreto de Cálcio) para ajudar na fixação das células. Os fios de sutura com MSCs aderidas ficaram em meio de cultura durante 24 horas para proliferação celular. As amostras foram analisadas por microscopia confocal de imunofluorescência e eletrônica de varredura. O experimento animal utilizou ratos Wistar com 10 semanas de vida que foram distribuídos em três grupos: Grupo Controle (GC) que incluiu 5 animais onde a formação da fístula foi através de cirurgia sem nenhum tipo de suporte. Grupo Injeção (GI) que incluiu 8 animais que receberam uma injeção de 10^6 AT-MSCs ao redor do local de formação da fístula. Grupo Sutura (GS) que

incluiu 9 animais que receberam sutura de 4-0 Vicryl (poliglactina) com 10^6 AT-MSCs aderidas com a ajuda de cola de fibrina. Após a exposição do ceco foi realizada enterotomia de 5mm, sendo então realizada a sutura da abertura à abertura da parede abdominal (superfície interna da pele) com 4 pontos separados com 4-0 Vicryl - Poly J-304 Polyglactin 910. No grupo GS, o fio para confecção da fístula, como descrita acima, continha 10^6 AT-MSCs aderidas. As fístulas foram fotografadas no dia da cirurgia e no 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 17°, 19° e 21° dias, onde foram anestesiados e sacrificados. O tamanho da área da fístula foi mensurado através do software ImageJ. Foram utilizados dois métodos estatísticos para analisar os dados do modelo animal. O primeiro método foi o Two-way Anova, fazendo a análise comparativa da cicatrização entre os três grupos, e o segundo o One-way analysis of variance, fazendo a análise comparativa da cicatrização entre os três grupos nos dias D0, D12 e D21.

As microscopias confocal de imunofluorescência e eletrônica de varredura demonstraram a presença de AT-MSCs aderidas aos fios de sutura. No experimento animal mostrou que a média de redução do tamanho da área da fístula no 21° dia foi de 46,54% no GC, 71,80% no GI e 90,34% no GS ($p < 0,05$), demonstrando que as MSCs foram eficazes na cicatrização das fístulas enterocutâneas tanto no grupo que recebeu a injeção de células quanto no grupo que utilizou as células aderidas ao fio de sutura.

As MSCs foram capazes de se fixarem nos fios de sutura. Quando as fístulas enterocutâneas receberam a sutura com MSCs aderidas, elas mostraram uma melhor recuperação e cicatrização da fístula. AT-MSCs aderidas a fios de sutura pode ser uma nova e efetiva forma no tratamento de fístulas enterocutâneas.

Enterocutaneous fistulas (EF) are difficult to resolve and surgical failure is frequent. Cell therapy could be a new approach in this area. Mesenchymal stem cells (MSCs) have high proliferative capacity, can differentiate into several lineages and have immunomodulatory capacity. Adipocyte tissue (AT) is an easy source of them. Enterocutaneous fistula (EF) treatment with MSCs was yet performed but sometimes, the fistula did not close completely. The aim of this study is to analyze if AT-MSCs could attached in the suture filament in order to be used for EF treatment. AT obtained from lipoaspirate procedure was submitted to collagenase digestion. Cells were cultured in DMEM low glucose medium, with FBS during 3 days. At the 4^a passages, cells were characterized by flow cytometry, confocal microscopy, differentiated to mesodermal lineages to confirm MSCs and telomerase enzyme activity and karyotype analysis. The experiments were performed with polyester suture filament. MSCs, 10⁶ cells, were fixed in the suture filament by adding fibrin glue. Filaments were led in the medium described above during 3 days. Samples were analyzed by confocal and scanning electron microscopy. The animal experiments were performed on 10 weeks old male Wistar rats divided into 3 groups. Control Group (CG): 5 animals undergoing fistula formation alone. Injection Group (IG): 8 animals receiving 10⁶ AT-MSCs injected around the suture line. Suture Filament Group (SG): 9 animals in which suture were performed using 4-0 Vicryl with 10⁶ MSCs attached in the filament with fibrin glue. The cecum was accessed through a standard 7mm stab incision on the lower left side of the abdomen. Upon exposure, a 5mm enterotomy was performed and sutured to the abdominal wall in order to produce the fistula. To ensure normal closure of the fistula the opening in the cecum wall was fixed to the internal surface of the skin, without maturation, using four separate 4-0 Vicryl stitches (Poly J-304 Polyglactin 910 Ethicon). The fistulas were photographed on the day of operation and on the 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 17°, 19° and 21° day, in which they were anesthetized and sacrificed. Measure of the size of the fistula was performed using ImageJ software. Statistic comparison between the groups was performed by ANOVA. Confocal and scanning electronic microscopy results demonstrated that the cells were able to attach to the suture filaments. Animal experiments showed that the

average size reduction of the fistula area at 21th day was: control group, 46.54%; injected group 71.80% and sutured group 90.34% ($p < 0,05$). MSCs were able to attach to the suture filaments. When the fistulas were sutured with filaments containing MSCs they showed better recovery and healing than the injected and control group. Adipocyte tissue MSCs adhered to suture filament might be a new and effective approach for enterocutaneous fistulas treatment.

Lista de Abreviaturas

MSCs	Células tronco mesenquimais
TA	Tecido adiposo
AT-MSCs	Células tronco mesenquimais de tecido adiposo
FE	Fístula enterocutânea
SFB	Soro fetal bovino
GC	Grupo controle
GI	Grupo injeção
GS	Grupo sutura
TC	Tomografia computadorizada
US	Ultra-sonografia
DP	Drenagem percutânea
FD	Fístula digestiva
CT	Células tronco
HLA	Sistema de histocompatibilidade
HSC	Célula tronco hematopoiética
SCU	Sangue de cordão umbilical
SVF	Fração celular do estroma vascular
USSC	Célula-tronco somática irrestrita
VSEL	Célula-tronco semelhante a embrionária

Lista de tabelas

TABELA 1. FATORES PROGNÓSTICOS E SIGNIFICADO QUANTO AO FECHAMENTO ESPONTÂNEO E MORTALIDADE	19
TABELA 2. MEIOS DE CULTURA E SUPLEMENTOS PARA INDUÇÃO DA LINHAGEM MESODÉRMICA.....	35
TABELA 3. GRUPO CONTROLE.....	52
TABELA 4. GRUPO INJEÇÃO.....	53
TABELA 5. GRUPO SUTURA.....	54

Lista de figuras

FIGURA 1. CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO.....	24
FIGURA 2. AÇÃO IMUNOSSUPRESSORA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS MEDIADAS PELO CONTATO CÉLULA-CÉLULA E POR FATORES SOLÚVEIS.....	29
FIGURA 3. DESENHO EXPERIMENTAL DO GRUPO ANIMAL.....	40
FIGURA 4. A: CÉLULAS ADERENTES OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO NA QUARTA PASSAGEM DE EXPANSÃO APRESENTANDO MORFOLOGIA FIBROBLASTÓIDE, AUMENTO DE 10X. B: MSCS DA QUARTA PASSAGEM, DIFERENCIADAS EM LINHAGEM ADIPOGÊNICA, 200 DIA DA CULTURA, CORADAS COM OIL RED O, EVIDENCIANDO VESÍCULAS DE LIPÍDIOS CORADAS EM VERMELHO EM SEU INTERIOR, AUMENTO DE 10X C: MSCS DA QUARTA PASSAGEM, DIFERENCIADAS EM LINHAGEM OSTEOGÊNICA, 200 DIA DA CULTURA, CORADAS COM ALIZARIN RED S, EVIDENCIANDO DEPÓSITOS DE CÁLCIO, AUMENTO DE 10X. D: MSCS DA QUARTA PASSAGEM, DIFERENCIADAS EM LINHAGEM CONDRÓGENICA, 200 DIA DA CULTURA, CORADAS COM SYRUS RED, RESORCINA E FUCCINA, AUMENTO DE 10X.....	44
FIGURA 5. A: DOT-PLOT DAS CÉLULAS E A REGIÃO NA QUAL AS MSC SE ENCONTRAM, MOSTRANDO CARACTERÍSTICA HOMOGÊNEA DESSA POPULAÇÃO. B: PAINEL DE HISTOGRAMAS DOS MARCADORES POSITIVOS (CD105, CD90, CD29 E CD73) E DE MARCADORES NEGATIVOS (HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 E CD34) EM VERMELHO INDICA O MARCADOR ESPECIFICO E EM BRANCO ESTA REPRESENTADO O CONTROLE (IGG COM FLUORO CROMO) C: TABELA COM AS MEDIAS DAS PORCENTAGEM DOS MARCADORES POSITIVOS E NEGATIVOS DAS MSC.....	45
FIGURA 6. MICROSCOPIA OPTICA E DE IMUNOFLOURESCÊNCIA DE AT-MSA NA QUARTA PASSAGEM. A) FOTO DE MICROSCOPIA OPTICA COM AUMENTO DE 10X. B-D) IMUNOCITOQUÍMICA DAS AT-MSA DOS MARCADORES CD73(VERDE), CD90 (ROXO), CD105 (VERMELHO) E NUCLEAR(DAPI) EM AUMENTO DE 40X.....	46
FIGURA 7. TA FOI TESTADO EM TRÊS DIFERENTES PASSAGENS, “ <i>IN VITRO</i> ” (P4, P8 E P12) EM RELAÇÃO A EXPRESSÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA TELOMERASE ATRAVÉS DE “ <i>TRAP ASSAY</i> ”. A ATIVIDADE DE TELOMERASE FOI DETECTADA UTILIZANDO DUAS BANDAS DE CONCENTRAÇÕES DIFERENTES. O ENSAIO TEM COMO CONTROLES POSITIVOS INTERNOS TSR8 E UMA LINHAGEM CELULAR COMO CONTROL +. O CONTROLE NEGATIVO FOI REALIZADO COM AMOSTRAS DO MESMO PERÍODO A SER ANALISADO, AQUECIDAS 85°C, NO INTUITO DE NEGATIVAR A ENZIMA TELOMERASE. O TAMPÃO DE LISE CHAPS TAMBÉM FOI UTILIZADO COMO CONTROLE NEGATIVO. AS MSCS NA P4 DEMONSTRARAM A PRESENÇA DE BANDAS COM 56 BP E 50 BP QUE SE RELACIONARAM COM UMA ATIVIDADE DE 100%. HOUVE DIMINUIÇÃO DAS BANDAS NO DECORRER DAS PASSAGENS, P8 E P12, COM RESPECTIVA DIMINUIÇÃO NA ATIVIDADE DE TELOMERASE.....	47
FIGURA 8. ANÁLISE DE CITOGENÉTICA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO. FIGURAS: A: CARIÓTIPO DAS MSCS DA P8. B: CARIÓTIPO DAS MSCS DA P10. AS ANÁLISES NÃO DEMONSTRARAM ANORMALIAS NOS CROMOSSOMOS.....	48
FIGURA 9. MARCAÇÃO DAS AT-MSA COM QDOT655(INVITROGEN), MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E CITÔMETRIA DE FLUXO. A) A MARCAÇÃO DE QDOT(VERMELHO) ESTA PRESENTE NO CITOPLASMA(ACTINA ESTA MARCADA COM FALOIDINA ALEXA FLÚOR 488 - VERDE) E PERTO DO	

NÚCLEO CELULAR(DAPI). PELA CITÔMETRO DE FLUXO, VERIFICOU-SE QUE 98,9% DAS CÉLULAS ESTAVAM MARCADAS COM QDOT655 (VERMELHO).....	49
FIGURA 10. MICROSCOPIA CONFOCAL DE IMUNOFLUORESCÊNCIA. A: FIO DE SUTURA CONTROLE, SEM COLORAÇÃO, DEMOSTRANDO A AUSÊNCIA DE CÉLULAS. B: CONTROLE DE CÉLULAS MARCADAS (VERDE). C: A SETA APONTA O FIO DE SUTURA ENVOLVIDO POR UM GRANDE NÚMERO DE CÉLULAS, AUMENTO 10X D: A SETA APONTA O FIO DE SUTURA ENVOLVIDO POR UM GRANDE NÚMERO DE CÉLULAS, AUMENTO 20X. E: CONTROLE POSITIVO DAS CÉLULAS MARCADAS (VERDE). A LUMINESCÊNCIA VERDE DEMONSTRA QUE AS CÉLULAS ESTÃO VIVAS E VIÁVEIS. F: CONTROLE NEGATIVO DAS CÉLULAS MARCADAS (VERMELHO). A POUCA LUMINESCÊNCIA VERMELHA DEMONSTRA QUE POUCAS CÉLULAS MORRERAM DURANTE O PROCEDIMENTO.....	50
FIGURA 11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA. A: AS SETAS AMARELAS MOSTRAM ALGUMAS CÉLULAS EM CIMA E ENTRE OS FILAMENTOS DO FIO DE SUTURA. B: AS SETAS E O ARCO VERMELHO MOSTRAM A AÇÃO DA COLA DE FIBRINA FORMANDO UMA CAMADA CELULAR AO LONGO DO FIO.....	51
FIGURA 12. GRUPO CONTROLE. ANIMAL 4. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. OBSERVA-SE A REGIÃO DE FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA.....	52
FIGURA 13. GRUPO CONTROLE. ANIMAL 3. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. OBSERVA-SE A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA. A CICATRIZAÇÃO DA FÍSTULA NÃO OCORREU. A REGIÃO ESTÁ COM ALTO DÉBITO DE FEZES.....	52
FIGURA 14. GRUPO COM CÉLULAS. ANIMAL 1. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA APÓS A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. NOTA-SE QUE HOUE CICATRIZAÇÃO NO LOCAL DA FÍSTULA.....	53
FIGURA 15. GRUPO COM CÉLULAS. ANIMAL 6. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA, COM BAIXO DÉBITO DE FEZES. B: 21º DIA. A CICATRIZAÇÃO DA FÍSTULA FOI PRATICAMENTE TOTAL.....	54
FIGURA 16. GRUPO SUTURA COM CÉLULAS. ANIMAL 9. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA APÓS A FORMAÇÃO DA FÍSTULA.....	55
FIGURA 17. GRUPO SUTURA COM CÉLULAS. ANIMAL 9. A: 1º DIA DA FORMAÇÃO DA FÍSTULA. B: 21º DIA APÓS A FORMAÇÃO DA FÍSTULA. A CICATRIZAÇÃO DA FÍSTULA FOI TOTAL. O CIRCULO DEMONSTRA A ÁREA ONDE ESTAVA A FÍSTULA.....	55

Lista de quadros

QUADRO 1. FASES DO TRATAMENTO DE FÍSTULAS.....	20
QUADRO 2. CLASSIFICAÇÃO DOS FIOS DE SUTURA ABSORVÍVEIS E NÃO ABSORVÍVEIS.....	22

Lista de gráficos

GRÁFICO 1. COMPARAÇÃO DA EVOLUÇÃO DA ÁREA DA FÍSTULA NOS 3 GRUPOS DURANTE 21 DIAS.....	56
GRAFICO 2. ANÁLISE COMPARANDO A ÁREA DA FÍSTULA ENTRE OS 3 GRUPOS NOS DIA 0, 12 E 21.....	56

Lista de esquemas

ESQUEMA 1. OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE TECIDO ADIPOSO.....	34
--	----

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de abreviaturas	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de figuras	xii
Lista de quadros	xiii
Lista de gráficos.....	xiii
Lista de esquemas	xiii
SUMÁRIO.....	xiv
1. Introdução.....	16
1.1 Fístulas digestivas.....	17
1.2 Fios de sutura (4-0 Poly Vicryl/Poliglactina 910).....	21
1.3 Células-tronco.....	23
1.4 Células-tronco Embrionárias.....	23
1.5 Células-tronco Adultas Pluripotentes e Totipotentes.....	24
1.6 Células-tronco Mesenquimais.....	26
1.7 Células-tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo.....	27
1.8 Ação Imunomodulatória das células-tronco mesenquimais.....	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivos gerais.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. Material e Métodos.....	33
3.1 Fontes de obtenção de células mesenquimais.....	34
3.2 Extração de células mesenquimais e cultura celular.....	34
3.3 Imunofenotipagem das células mesenquimais através de citometria de fluxo.....	35
3.4 Diferenciação mesodérmica “in vitro”.....	36
3.4.a Diferenciação condrogênica.....	36
3.4.b Diferenciação osteogênica.....	37
3.4.c Diferenciação adipogênica.....	37
3.5 Citoquímica das células mesenquimais diferenciadas.....	38
3.6 Citogenética.....	38

3.7	Atividade da enzima telomerase.....	39
3.8	Adesão das células nos fios de sutura.....	39
3.9	Tratamento de ratos com fístula cecal.....	40
3.10	ImageJ.....	40
3.11	Experimento animal.....	41
3.12	Análise das imagens.....	43
3.13	Análise estatística.....	43
4.	Resultados.....	44
4.1	Caracterização das células mesenquimais obtidas de tecido adiposo (AT-MSc).....	45
4.2	Capacidade de diferenciação das AT-MSCs em linhagens mesodérmicas.....	45
4.2.1	Diferenciação osteogênica.....	45
4.2.2	Diferenciação adipogênica.....	46
4.2.3	Diferenciação condrogênica.....	46
4.3	Caracterização das moléculas de superfície celular (Citometria de fluxo).....	47
4.4	Morfologia e aderência das AT-MSCs em placa de cultura.....	48
4.5	Atividade da enzima telomerase.....	49
4.6	Citogenética.....	50
4.7	Marcação das AT-MSc por Qtracker (Invitrogen).....	50
4.8	Microscopia confocal de imunofluorescência	52
4.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
4.10	Grupo animal (ratos com fístula).....	54
4.11	Análise estatística.....	60
5.	Discussão.....	61
6.	Conclusão	67
7.	Referências	69
8.	Anexos.....	78
8.1	Anexo 1 – Termo de consentimento.....	79
8.2	Anexo 2 – Comitê de ética animal.....	80

1. Introdução

1.1 Fístulas digestivas

A fístula digestiva é uma comunicação anormal entre duas superfícies epitelizadas, através do qual ocorre drenagem de secreção digestiva (débito). O seu aparecimento representa uma série de complicações para o paciente, sendo que existem poucos problemas cirúrgicos que necessitem de mais atenção do que as fístulas digestivas [1].

Vários fatores predis põem o aparecimento de fístulas digestivas, em 85% dos casos ocorrem por causa de complicações pós-operatórias, especialmente quando essas são em caráter de urgência [1]. Nesses casos podem ocorrer por fatores como má técnica cirúrgica; ou ainda, fatores sistêmicos como uso de corticoesteróides, desnutrição ou outros motivos não implicáveis. Podem aparecer de forma espontânea, como parte de evolução de doenças intestinais inflamatórias (doença de Crohn e a colite ulcerativa), tuberculose intestinal, traumas abdominais fechados, doenças pancreáticas, blastomicose, dentre outros. As fístulas geralmente aparecem entre o quinto e décimo dia do pós-operatório.

As fístulas digestivas podem ser classificadas do ponto de vista:

Anatômico:

São divididas em fístulas internas e externas. A interna é uma comunicação anômala entre órgãos intracavitários, temos como exemplo as fístulas colecistoentéricas. A fístula externa é formada a partir da comunicação entre um órgão intracavitário e a superfície cutânea, como por exemplo, as fístulas colocutâneas, que são frequentes em trauma. [2].

Fisiológico:

Essa classificação 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.

Etiológico:

A classificação etiológica levaria em conta a doença que determinou o aparecimento da fístula, sendo as principais Doença de Crohn, diverticulite, apendicite e trauma [2].

As fístulas digestivas podem acarretar uma série de transtornos como distúrbios hidroeletrólíticos, infecções, sepse, lesões cutâneas, desnutrição, hemorragia digestiva, obstrução intestinal, entre outras. A gravidade de todos esses transtornos depende de uma série de questões como etiologia, tipo de fístula, localização anatômica, débito da fístula (quantidade e qualidade do líquido perdido) e idade do paciente [3, 4].

A desnutrição, perdas hidroeletrólíticas e a sepse são os problemas mais sérios causados pelas fístulas digestivas. Elas provocam importante morbi-mortalidade, sendo que a mortalidade em fístulas digestivas situa-se em geral por volta de 6% a 21% [6]. A sepse e suas implicações sistêmicas podem ser a manifestação inicial em pacientes com fístulas digestivas [7]. A Tabela 1 demonstra os fatores favoráveis e desfavoráveis quanto ao fechamento espontâneo e a mortalidade das fístulas.

Nos últimos anos, a tomografia computadorizada (TC) e a ultra-sonografia (US) tiveram um grande valor no diagnóstico de lesões intra-abdominais. A investigação da fístula deve ser guiada de acordo com o sítio fistuloso em questão, utilizando-se ainda fistulografia e endoscopia em alguns casos [5, 6]. Após diagnosticada a fístula digestiva, deve se definir a opção de tratamento adequado.

A TC e a US tem um papel importante na drenagem percutânea (DP). A DP é aplicada em coleções simples, sem uma fístula digestiva conhecida. Hoje se sabe que muitas coleções simples estão associadas a lesões fistulosas, que em sua maioria fechavam com a utilização da DP [6].

Tabela 1. Fatores prognósticos e significado quanto ao fechamento espontâneo e mortalidade³.

<i>Fator</i>	<i>Favorável</i>	<i>Desfavorável</i>
Características da FD	Trato longo Continuidade intestinal mantida Ausência de obstrução	Trato curto Eversão de mucosa Intestino adjacente patológico Evisceração, íleo Obstrução distal Defeito da parede abdominal
Órgão de origem	Bileopancreático, colon	Gástrica, duodenal, jejunoileal
Sepse	Ausente	Presente
Etiologia	Deiscência anastomótica Doença inflamatória*	Neoplasia, doença inflamatória, radioterapia Deiscência anastomótica*
Idade	Sem influência < 50 anos*	Sem influência > 50 anos*
Origem do paciente	Do próprio hospital	Paciente transferido
Débito	< 500ml/dia	≥ 500ml/dia
Desnutrição	Ausente	Presente
Tempo de evolução	Aguda Crônica*	Crônica Aguda*

O tratamento da fístula pode ocorrer por intervenção cirúrgica, medicamentosa e nutricional (Quadro 1). A intervenção cirúrgica pode ocorrer com fator de urgência, para controlar complicações locais como hemorragias e peritonites difusas. As cirurgias eletivas são programadas após uma melhora do estado nutricional do paciente, tendo como ideal a espera de seis e oito semanas da primeira intervenção, fazendo com que processos inflamatórios e aderências causadas pela primeira operação se desfaçam. A re-intervenção desses pacientes apresenta grande morbi-mortalidade, sendo que esta opção deve ser escolhida somente após outras opções de tratamento menos invasivas serem descartadas [7]. A escolha de uma nova intervenção cirúrgica no abdômen de pacientes com fistulas digestivas é um grande desafio, pois o paciente já apresenta um quadro clínico com muitas deficiências [8].

O controle nutricional dos pacientes com fístulas digestivas foi introduzido a partir do trabalho de Chapman [9] na década de 60. Desde então o suporte nutricional adequado foi reconhecido como essencial e de suma importância para o tratamento de fístulas digestivas. Chapman *et al*, 2000 demonstrou que as taxas de fechamento espontâneo da

fístula eram de 89% e de mortalidade de 12%, comparadas com 37% de fechamento espontâneo e 55% de mortalidade quando esses pacientes não recebiam o suporte nutricional adequado. O controle nutricional deve ser iniciado logo após o diagnóstico da fístula, tendo como principal objetivo diminuir a deterioração do estado nutricional [10].

O tratamento medicamentoso geralmente é feito com inibidores de secreção gástrica, como a somatostatina, influenciando no débito da fístula, diminuindo a produção de ácido gástrico e pancreático, além de tamponar a mucosa gástrica. Para se iniciar a terapia nutricional o controle clínico do paciente tem que ser obtido, sendo que este tipo de terapia geralmente pode ter início no terceiro dia [3, 4].

No tratamento de fístulas com alto débito é de grande importância à correção dos distúrbios dos líquidos corporais. Os distúrbios ácidos-bases são decorrentes de perda de ácidos e bases, dependendo da altura da fístula no tubo digestivo. Para uma melhora é necessária à reposição através de via parenteral, com soluções cristalóides complementadas de colóides quando a pressão do plasma estiver muito baixa com perda relevante para o espaço intersticial [11].

Quadro 1. Fases de tratamento

1. Correção do desequilíbrio ácido-básico e hidroeletrolítico
2. Tratamento da sepse intra-abdominal
3. Suporte nutricional e metabólico
4. Proteção da pele e controle do débito
5. Localização e definição do trajeto fistuloso
6. Tratamento cirúrgico auxiliar (colostomia, jejunostomia, gastrostomia, drenagem de abscessos)
7. Tratamento cirúrgico definitivo (resseção com anastomose)

Adaptado de: Campos & Matias, 2001'

A variação, quanto às taxas de mortalidade, demonstraram a grande heterogeneidade dos pacientes com fístulas. Em intervenções eletivas em geral a taxa de mortalidade é de 2%, já a de pacientes com fístulas essa taxa pode variar de 6% a 48%, por existirem muitas variáveis que influenciam no tratamento e nos resultados. São exemplo, o valor do débito, a origem da fístula, a sepse local ou sistêmica, o grau de desnutrição inicial do paciente e outras doenças associadas [5, 6]. O fechamento espontâneo ocorre com maior frequência nas fístulas bileopancreáticas e é menos frequente nas duodenojejunais, sendo também mais comum nas lesões distais que nas proximais. Anos atrás os distúrbios hidroeletrólíticos eram apontados como a maior causa de mortalidade de pacientes com fístulas digestivas. Hoje, sabe-se que a sepse é a responsável por cerca de 80% dos óbitos desses pacientes.

O tratamento do quadro de sepse é importante, pois estes constituem a causa mais comum de morte de pacientes com fístulas digestivas. O diagnóstico de sepse abdominal deve ocorrer quando surgem sinais como, febre elevada no pós-operatório, aumento de frequência cardíaca, dor abdominal, elevação de uréia e creatinina no sangue. O tratamento da sepse geralmente pode vir associado a tratamento cirúrgico, com cirurgia para combater a sepse no local junto com a administração de antibióticos [11].

A tentativa de redução do débito fistuloso é de grande importância, pois a redução do débito diminui as perdas nutricionais e hidroeletrólíticas diminuindo as taxas de mortalidade e aumentando as taxas de fechamento espontâneo. Edmunds *et al*, 2000 comparou em seu trabalho a relação do volume de débito com as taxas de mortalidade, sendo que pacientes com baixo débito apresentaram taxas de 16% de mortalidade contra 54% dos pacientes com alto débito fistuloso [16].

1.2 Fios de sutura (4-0 Poly Vicryl / Poliglactina 910)

A designação, fios de sutura, refere-se a material utilizado para aproximar ou laquear qualquer tecido, ajudando no processo de cicatrização em primeira instância. Os

fios de sutura são utilizados há mais de 4000 mil anos, sendo que as técnicas e os materiais utilizados foram evoluindo com o passar dos anos [17].

Os fios de sutura podem ser classificados em diversas formas, podendo-se levar em consideração: a degradação pelo organismo (absorvíveis ou inabsorvíveis); origem (orgânicos, sintéticos ou mistos); número de filamentos (monofilamentados ou multifilamentados) e ainda pelo seu diâmetro [18]. São propriedades inerentes dos fios de sutura sua configuração, manuseabilidade, reação tecidual e força de tensão [17].

A configuração do fio se entende pelo número de camadas que o compõe. Os monofilamentados estão associados a menor traumatismo tissular e menor risco infeccioso, já os multifilamentados, apresentam maior força tênsil, são mais flexíveis e mais fáceis de manusear. A manuseabilidade do fio está associada a três propriedades; memória, elasticidade e tensão dos nós. A reação tecidual, processo inflamatório dos fios de sutura com o organismo, dura em média dois a sete dias dependendo do material utilizado. Por fim a força de tensão é relacionada com a espessura do fio, sendo a força necessária para romper a sutura [17].

A classificação dos fios de sutura absorvíveis e não absorvíveis está descrita no quadro 2 [18, 19].

Quadro 2. Classificação dos fios de sutura absorvíveis e não absorvíveis.

TIPO	ORIGEM	EXEMPLOS	
Absorvível	Animal	Catagute (torcido)	
	Sintético	Polímeros sintéticos (trançado, torcido ou monofilamentar)	
Não absorvível	Animal	Seda (trançado ou torcido)	
	Vegetal	Algodão puro ou misto (torcido) Linho (torcido)	
	Sintético		Poliéster (trançado ou monofilamentar)
			Polipropileno (monofilamentar)
			Poliamida (torcida ou trançada ou monofilamentar)
		Náilon (trançado ou monofilamentar)	
Mineral	Aço inoxidável (monofilamentar ou multifilamentar)		

O Vicryl foi um dos primeiros fios sintéticos e absorvíveis produzidos. É composto pela união de dois polímeros, ácido lático e ácido glicólico, revestido com poliglactina 370 e estearato de cálcio. É um fio multifilamentado na cor violeta trançada. O Vicryl é um fio de fácil manuseio, permitindo dar nós seguros e com pouca reação tecidual. Sua força tênsil dura de 28 a 35 dias e sua absorção ocorre em média entre 56 e 70 dias [17].

1.3 Células-Tronco

Por definição, as células tronco (CT) são células com capacidade de auto-geração, diferenciação 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 [20].

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 [23, 24].

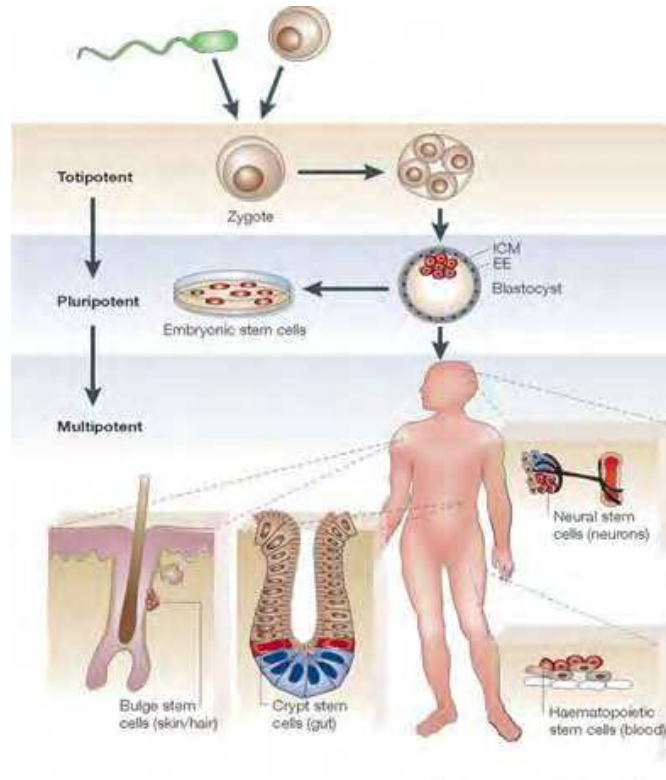
As CT podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As CT totipotentes são células que têm capacidade de se diferenciar em todos os tecidos do organismo humano, inclusive gametas (óvulo e espermatozoide) e os anexos embrionários. As CT pluripotentes apresentam capacidade de se diferenciar em todos os tecidos menos gametas e os anexos embrionários. As CT multipotentes são aquelas com capacidade de se diferenciar apenas em alguns tipos de tecidos [22].

1.4 Células-Tronco Embrionárias

As CT embrionárias podem se classificas em totipotentes e pluripotentes. Células-tronco totipotentes são células resultantes das primeiras divisões celulares após a fecundação (zigoto), chamadas também de CT embrionárias com capacidade de originar

gametas e anexos embrionários. Na fase de mórula (8 blastômeros) e blastocisto (100 células) são obtidas CT embrionárias, classificadas como pluripotentes, com capacidade de se diferenciarem em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma). [22].

Figure 1. Classificação das células-tronco [14]



1.5 Células-tronco Adultas Pluripotentes e Multipotentes

As principais fontes de células-tronco adultas são medula óssea, sangue de cordão umbilical e sangue periférico. As primeiras CT adultas amplamente utilizadas na terapia celular são as provenientes da medula óssea. O transplante de medula óssea já é utilizado como terapia celular a mais de 4 décadas [25]. A maior dificuldade com relação ao transplante de medula óssea é a detecção de doadores compatíveis ao sistema de

histocompatibilidade (HLA). Devido à diversidade de etnias, a chance de se achar um doador HLA compatível no âmbito familiar é de 25% e de 1 para 100.000 pessoas fora do âmbito familiar. 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 demais linhagens do sangue, como hemácias, linfócitos, plaquetas, granulócitos [26, 27]. Também apresentam células como USSC (Célula-tronco somática irrestrita), VSEL (Célula-tronco semelhante à embrionária), com plasticidades semelhantes às embrionárias; além de células tronco endoteliais e células tronco mesenquimais [28].

As células-tronco encontradas na medula óssea possuem alguns marcadores celulares, como, CD34, Sca-1, ckit, CD133 [26,27].

Outra fonte de CT é encontrada no sangue de cordão umbilical (SCU), que começou a ser utilizada a partir da década de 90. Esse sangue é rico em células precursoras hematopoiéticas, assim como as indiferenciadas já descritas (USSC, VSEL, endoteliais e mesenquimais). O SCU atualmente pode ser armazenado para uso futuro (criopreservação) em bancos públicos. A grande vantagem do SCU é a imaturidade de suas células linfóides, permitindo o transplante sem a total compatibilidade ao sistema HLA. Além disso, ainda apresenta um menor risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas [29], já que o recém nascido ainda não teve contato nenhum com o meio externo para apresentar algum tipo de doença infecto contagiosa; sendo realizado sorologia completa com técnicas de biologia molecular do sangue materno [12]. A literatura descreve a presença de células tronco com fenótipos diferentes, células hematopoiéticas CD34+ [30], e células tronco que expressam CD 133+ [31]. Alguns estudos demonstram que as CT provenientes do sangue de cordão umbilical se diferenciam em células endoteliais [32, 33], cardiomiócitos [32, 34, 35], células nervosas [32, 38, 39], entre muitas outras linhagens celulares.

1.6 Células-tronco Mesenquimais (MSCs)

As células-tronco mesenquimais (mesenchymal stem cell – MSCs), de um modo geral, possuem algumas principais características: são células aderentes que passaram por várias passagens em cultura obtendo uma população morfológicamente homogênea, devem, obrigatoriamente, se diferenciar na linhagem mesodérmica (adipogênica, condrogênica e osteogênica). Apresentam também grande capacidade de diferenciação para outras linhagens como cartilagem, ossos, tecido adiposo, músculo esquelético, tendões [21, 54, 55], hepatócitos, neurônios, cardiomiócitos [95], mioblastos [96], células endoteliais e vasculares, hepatócitos, células pancreáticas, progenitores hematopoiéticos, células neuronais e hepáticas [56-58], entre outros [100]. Apresentam as mesmas características moleculares, mesmo sendo de origem tecidual diferente.

As MSCs foram descritas na década de 70 por Friedenstein e colaboradores [53]. Essas células podem ser encontradas em todos os tecidos humanos como, líquido amniótico [52], placenta [40-44], tecido muscular [45-51], dentre outras fontes. As suas principais fontes são: medula óssea, sangue de cordão umbilical e tecido adiposo. O tecido adiposo é uma fonte promissora de CT.

As células-tronco mesenquimais apresentam algumas características como: efeito parácrino, efeito imunomodulador, são de fácil obtenção, grande capacidade de proliferação e diferenciação (Plasticidade celular) [59-63], fazendo com que essas células sejam cada vez mais utilizadas na terapia celular.

A primeira fonte de obtenção de células-tronco mesenquimais foi a medula óssea. Elas são células raras correspondendo somente a 1 célula a cada 10.000 células da medula óssea. Estudos mostram que existem outras fontes de obtenção de MSCs, tais como: tecido adiposo, polpa dentária, sangue de cordão umbilical, fígado fetal e líquido amniótico [64-69].

As CTs mesenquimais (mesenchymal stem cell - MSCs) Devem ser positivas para marcadores celulares CD90, CD105 e CD73 e negativas para marcadores de linhagem hematopoiética, como CD34, CD45, CD14 CD 13 CD 31; além de não expressam

antígenos de histocompatibilidade (HLA) classe II, podendo apresentar discreta presença de classe I [70, 71, 101, 102].

1.7 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 (PLA - processed lipoaspirate cells)[83], células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ATSC, AT-MSCs - adipose tissue-derived mesenchymal stem) [84, 85], células tronco multipotentes derivadas de gordura (MADS - multipotent adipose-derived stem cells) [86, 87], células tronco derivadas de tecido adiposo (ASC - adipose tissue-derived stem cells) [88, 89], células estromais derivadas de tecido adiposo (ADSC, ATSC - adipose tissue-derived stromal cells)[90, 91], células estromais de adulto derivado de tecido adiposo (ADAS - adipose tissue derived adult stem cells) [92, 93] ou células derivadas de tecido adiposo (ADC- adipose tissue-derived cells) [94]. Embora haja uma discordância quanto a nomenclatura, a população celular é a mesma. Nesta tese, usaremos o termo “células mesenquimais derivadas de tecido adiposo” (AT-MSCs - adipose tissue mesenchymal stem cell), pois esta nomenclatura vem sendo utilizada com maior frequência em trabalhos publicados recentemente.

O tecido adiposo é um tecido de organização complexa, formado basicamente de adipócitos maduros e imaturos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos, macrófagos e células da musculatura lisa vascular [72, 73, 74]. A fração celular do estroma vascular (*SVF: stromal-vascular cell fraction*) de tecido adiposo vem sendo foco de muitos estudos, sendo que este compartimento é uma fonte rica em células pluripotentes [75, 76].

Além de ser uma rica fonte de células, o tecido adiposo subcutâneo apresenta fácil acesso através de procedimentos cirúrgicos simples (lipoaspiração), tendo sua obtenção em grande quantidade e o isolamento de suas células de forma simples [77]. Desta forma as CT obtidas de tecido adiposo apresentam grande potencial para fins experimentais e no futuro como fontes de células tronco autólogas de fácil obtenção e manipulação serão muito

utilizadas na terapia celular e medicina regenerativa. Vale lembrar que o processo de lipoaspiração é um processo rotineiro na medicina para fins estéticos e propicia a obtenção de grande quantidade de tecido adiposo que seria descartado [78, 79].

Song, H.Y., et al. e Adegani, F.J., et al. [80, 81], fizeram a análise comparativa de células-tronco mesenquimais da medula óssea, de sangue de cordão umbilical e tecido adiposo, fontes mais utilizadas atualmente. Esses trabalhos demonstraram que as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo não apresentam diferenças em relação a morfologia, fenótipo imune, frequência na formação de colônias e capacidade de diferenciação [80]. Outro estudo comparativo analisou a expressão global dos genes de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo, medula óssea e sangue de cordão umbilical. Os resultados mostraram que a expressão dos genes envolvidos na produção de proteínas de matriz extracelular, morfogênese e desenvolvimento, foram muito semelhante entre os três grupos [81].

Rodriguez, *et al.* comparou a expressão gênica de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e medula óssea. Ele demonstrou que na avaliação por citometria de fluxo a expressão de marcadores como CD44, CD29, CD105, CD34, é igual em ambos os grupos. Mas quando as duas fontes foram analisadas quanto à capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica, as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo tiveram uma taxa de proliferação e a expressão gênica 2 a 3 vezes maior quando comparadas às das células-tronco mesenquimais de medula óssea [82].

Cho e col.[97] estudaram os mecanismos moleculares de diferenciação de AT-MSCs. Eles identificaram que a via Wnt, classicamente descrita como via envolvida na embriogênese, morfogênese e organogênese [92], está envolvida na proliferação das CTs obtidas de lipoaspirado em adultos. O bloqueio desta via com RNAi fez com que houvesse uma redução na osteogênese. Em outro estudo, Kim e colaboradores usaram alguns tipos de isoflavonas para inibir a adipogênese e observaram que a ação ocorre pela via Wnt [93]. Outros trabalhos também apontam o envolvimento desta via na proliferação de tecidos adultos e diferenciação de MSCs [95].

1.8 Ação imunomodulatória das Células-tronco Mesenquimais

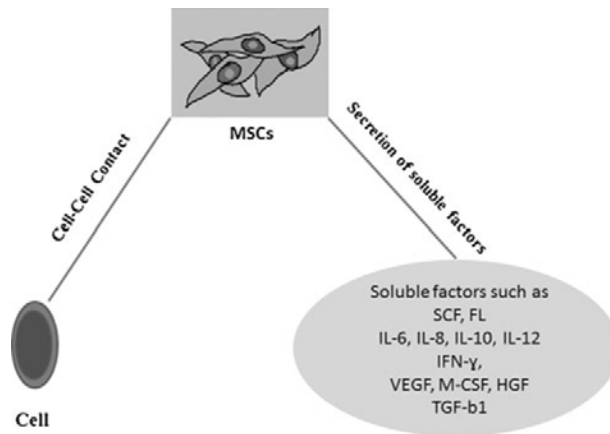
As células-tronco em geral e principalmente as células-tronco mesenquimais, possuem a grande capacidade de agir no sistema imunológico, modulando algumas respostas através do contato célula-célula e por meio da liberação de fatores solúveis [104, 105]. Essa capacidade de liberar moléculas com funções imunossupressoras tem grande importância na aplicação clínica.

Estudos demonstraram que as células mesenquimais apresentam capacidade de imunomodulação. Não expressam antígenos de histocompatibilidade (HLA), moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40.

Alguns estudos demonstraram essa ação. Em um deles AT-MSCs de humanos foram incubadas em meio de cultura, e após 48 horas, o meio de cultura foi retirado e uma solução de CD3/CD4 (FoxP3+ T Helper) foi adicionada a ela. Os pesquisadores observaram que os fatores presentes no meio de cultura e os que foram liberados pelas AT-MSC aumentaram o número da população de linfócitos CD4+FoxP3+ e aumentaram a secreção de IL-10 [106].

As AT-MSCs ainda expressam fatores como IL10, TGF- β 1 e HGF, que são imunossupressores, assim como a enzima IDO (indoleamine 2,3- Dioxygenase), que atua no catabolismo do triptofano, liberando quinurenina que regula a proliferação e a sobrevivência de linfócitos T [104, 105, 107].

Figure 2. Ação imunossupressora das células-tronco mesenquimais mediadas pelo contato célula-célula e por fatores solúveis [15].



Portanto, células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas a fios de sutura podem ter um efeito imunomodulador, ajudando na recuperação e cicatrização das fístulas.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este projeto tem como objetivo geral avaliar o uso dos fios de sutura com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas com ajuda de cola de fibrina, na recuperação e cicatrização de ratos Wistar com fístulas enterocutaneas pós-operatórias.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer culturas de células mesenquimais de tecido adiposo obtidas de lipoaspiração;
- Estabelecer um método para fixar as células mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura;
- Analisar a adesão das células tronco mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura através de microscopia;
- Analisar o potencial terapêutico do fio de sutura com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas na cicatrização e recuperação de ratos Wistar com fístulas enterocutaneas pós-operatórias.

3. Material e Métodos

3.1 Fontes de obtenção de células mesenquimais

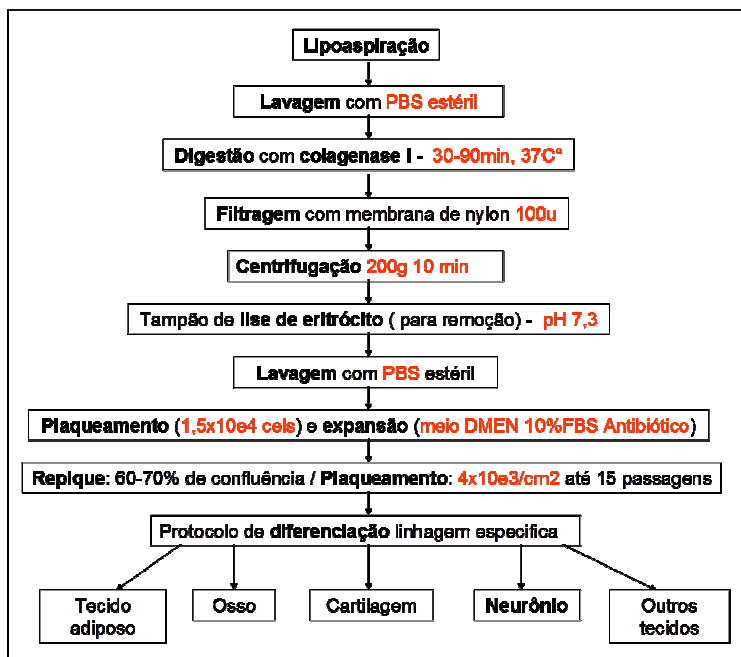
As células mesenquimais foram obtidas de tecido adiposo de pacientes hígidos submetidos à cirurgia de lipoaspiração. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 1 - processo CEP-Nº 839/2008) foi aplicado em todos os pacientes submetidos à lipoaspiração que concordaram com a doação. Foram selecionados pacientes com idade entre 25 e 50 anos e excluídos pacientes diabéticos e hipertensos.

3.2 Extração de células mesenquimais e cultura celular

O tecido lipoaspirado foi lavado exaustivamente com PBS (“phosphate-buffered saline”) para remover traves de tecido conjuntivo e hemácias. A digestão do tecido lipoaspirado foi realizada com solução tampão, contendo, 20mg de colagenase tipo 1A, 200mg de albumina sérica bovina (BSA), 20mL de D-MEM Low Glucose e 10µL de gentamicina para cada 10 g de tecido adiposo, em banho Maria , à 37 °C, por 30 minutos, submetido à agitação 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 re-suspenso em 10mL de D-MEM Low Glucose com 10% do volume de FBS. O meio de cultura, após 24 horas, foi trocado a cada 3 dias consecutivamente, e depois a cada 2 dias até que as células aderidas ao plástico atingiram a confluência de 70 a 80% da superfície da garrafa de cultura. As células foram então tripsinizadas (tripsina a 0,05% e 1mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) retiradas da garrafa e colocadas em outras duas, primeiras passagem, sendo expandidas até a 4ª passagem da cultura, quando foram caracterizadas como células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Esquema 1).

Esquema 1. Obtenção de células-tronco mesenquimais a partir de tecido adiposo



3.3 Imunofenotipagem das células mesenquimais através de citometria de fluxo

Após a purificação e expansão das células mesenquimais indiferenciadas estas foram caracterizadas fenotipicamente por meio de citometria de fluxo empregando um conjunto de anticorpos monoclonais específicos. Foram utilizados os anticorpos CD90 (Thy-1), CD105 (SH-2/endogлина), CD73 (SH3/SH4) e Stro-1 que correspondem aos antígenos de superfície expressos pelas células mesenquimais e os não expressos como CD34, CD45, CD14, CD31 e HLA-DR também foram utilizados.

Foram utilizadas 10^5 células diluídas em 100 μ L de PBS e 5 μ L de anticorpo específico em cada reação de marcação. Esta mistura foi mantida a 4°C por 30 minutos e protegida da luz. As células marcadas foram lavadas duas vezes com PBS por meio de centrifugação a 1500rpm por 5 minutos e fixadas em 500 μ L de paraformaldeído 1%. Foram mantidas em geladeira até o momento da aquisição.

Os controles foram realizados a partir de amostras de células sem marcação para verificação de auto-fluorescência e células marcadas com isotipos controles

correspondentes para verificação de marcação inespecífica. Foram adquiridos 10.000 eventos no citômetro de fluxo FACScalibur e a análise dos dados foi realizada utilizando o programa CellQuest.

3.4 Diferenciação Mesodérmica “in vitro”

Para comprovar a obtenção de células mesenquimais, as células obtidas pelos procedimentos acima foram diferenciadas em tecido ósseo, adiposo e cartilaginoso, utilizando protocolos e meios específicos conforme descrito na literatura (Chang et al, 2007; Hisanaga et al, 2008). Na Tabela 2 os meios de cultura e suplementos para indução de adipogênese, osteogênese e condrogênese são descritos.

Tabela 2. Meios de cultura e suplementos para indução da linhagem mesodérmica.

<i>Diferenciação</i>	<i>Meio</i>	<i>Suplementos</i>
<i>Adipogênese</i>	DMEM Alta Concentração de Glicose 10%FSB	Dexametasona – 5×10^{-8} M 3-isobutil- metilxantina – $4,5 \times 10^{-4}$ M Insulina – 5ug/ml Indometacina – 3×10^{-4} M
<i>Osteogênese</i>	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	Dexametasona – 5×10^{-8} M Ácido Ascórbico – $2,8 \times 10^{-4}$ M β -glicerol-fosfato – 10^{-2} M
<i>Condrogênese</i>	DMEM Baixa Concentração de Glicose 10%FSB	Acido Ascórbico – 50 ug/ml TGF β 3– 25ng/ml Insulina – 6,25ug/ml Dexametasona – 1mM Albumina Humana- L-prolina 0,4mM

a. Diferenciação condrogênica

Para a diferenciação em condrócitos, cerca de, 10^6 células mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram transferidas para um tubo Falcon de 15ml com o meio indutor e centrifugadas a 800rpm por 5 minutos para permitir a formação do botão celular. O meio indutor da diferenciação condrogênica consistiu em meio DMEM baixa glicose sem FBS, suplementado com 100ng/mL de transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3), 100nM de piruvato de sódio, 1mM de dexametasona, 50nM de ácido ascórbico, 0,5X insulina-transferrina-selenium A (ITSA) e 0,2% de albumina humana. A cada três dias metade do meio de cultivo foi trocado, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação condrogênica varia de 14 a 25 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

b. Diferenciação osteogênica

Para a diferenciação em osteócitos, 10^5 células/cm² mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 10% de FBS, suplementado com 0,1mM de dexametasona, 200 mM de ácido ascórbico e 10 mM de β -glicerolfosfato. A cada três dias foi trocado o meio de cultivo, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação osteogênica varia de 25 a 30 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

c. Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação em adipócitos, 10^5 células/cm² mesenquimais na 4ª passagem de expansão, foram colocadas em placas de cultura contendo meio indutor constituído de meio DMEM baixa glicose suplementado com 15% de FBS, suplementado com 1mM de dexametasona, 10mg/ml de insulina, 0,45mM de 3-isobutil-metilxantina (IBMX) e 100 mM

de indometacina. A cada três dias foi trocado o meio de cultivo, o qual foi utilizado para extração de proteína. O tempo necessário para a diferenciação adipogênica é de 14 dias. Durante este período foram coletadas amostras de células para extração de RNA total, análise de expressão de genes específicos, confecção de lâminas para análise morfológica e citoquímica com o objetivo de acompanhar o processo de diferenciação.

3.5 Citoquímica das Células Mesenquimais Diferenciadas

A análise citoquímica das células mesenquimais diferenciadas foi realizada por meio da marcação com corantes celulares específicos e observação por microscopia óptica convencional.

Para a diferenciação adipogênica, as células foram coletadas, fixadas com uma solução de formaldeído 1X durante 30 minutos e coradas com uma solução de Oil Red O a 0,3% durante 20 minutos e contracoradas com hematoxilina. O Oil Red O permite a visualização de acúmulo intracelular de lipídeos.

Para a diferenciação osteogênica, as células coletadas foram fixadas em etanol 50% durante 15 minutos a 4°C e coradas com uma solução de Alizarin Red S 1% sob agitação constante por 45 minutos. O corante permite observar a calcificação na matriz extracelular.

Células submetidas à diferenciação condrogênica foram coletadas e marcadas com Azul de Toluidina a 1%. Após a retirada do corante as células ficarão expostas à temperatura ambiente por 2 horas e fixadas durante 1 minuto em soluções de etanol 70%, 90% e 100% respectivamente. Este tipo de marcação permitiu a visualização de uma matriz extracelular rica em proteoglicanos.

3.6 Citogenética

A obtenção das metáfases cromossômicas foi obtida através de células em ativo processo de divisão celular, em culturas de ADSCs, as quais em cerca de 70% a 80% confluentes. Tratadas com colchicina (10µg/mL) em concentração de 100µL/mL,

adicionado diretamente à cultura e incubadas overnight a 37 °C. As células foram removidas da placa com uso de solução de tripsina/EDTA por 3 min a 37 °C, lavado com tampão PBS 1X, coletado em tubos cônicos de 15mL e agrupadas por centrifugação a 1200 g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensado em 5mL de solução de KCl 0,075 mol/L a 37 °C por 12 min. As células foram fixadas com em solução de ácido metanol/ácido acético (3:1) e analisadas pela técnica de bandeamento G.

As lâminas foram analisadas sob um microscópio ótico em objetivas de 10x e 100x. Imagens das metáfases individuais foram capturadas e cariotipadas utilizando um sistema automatizado de imagem de citogenética ASI (Applied Spectraltral Imaging, Printed - Israel), através do Software BAND VIEW® 5.5.

3.7 Atividade da enzima telomerase

A verificação da atividade da enzima telomerase foi realizada com células em 3 passagens distintas, 4^a, 8^a e 12^a. A metodologia adotada seguiu protocolo do kit TRAPeze® Telomerase Detection Kit, S7700 (Chemicon International, USA). O procedimento consiste em dois sistemas enzimáticos utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Na primeira etapa da reação, a telomerase adiciona um número de repetições teloméricas (GGTTAG) para a 3' final de um oligonucleotídeo de substrato (TS). Na segunda etapa, o material é amplificado por PCR usando o TS e (primer reverso) RP, gerando uma escada de produtos com base de 6 incrementos a partir de 50 nucleotídeos: 50, 56, 62, 68, etc. Utiliza-se um modelo (TSK1) para amplificação de um padrão interno de 36 pb positivo, o que torna possível quantificar a atividade da enzima telomerase com mais precisão e identificar amostras falso-negativas que contêm inibidores de Taq polimerase.

3.8 Adesão das células nos fios de sutura

Foram utilizados fios de sutura 4-0 Poly Vicryl J-304 Poliglactina 910 Ethicon®. Para ajudar a fixação de células tronco mesenquimais de tecido adiposo nos fios de sutura foi utilizado cola de fibrina. A preparação da cola de fibrina teve as seguintes proporções: 20uL de fibrinogênio, 30uL de trombina e 10uL de cloreto de cálcio. Após a preparação da cola de fibrina, os fios de sutura foram abertos dentro do fluxo laminar e colocados em placas de Petri. Em seguida gotejamos 1×10^6 células em cima de cada fio de sutura e logo

em seguida adicionamos 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 D-MEM Low Glucose + 10% soro fetal bovino (FBS) para o crescimento das células. Observamos o crescimento após 24 horas.

3.9 Microscopia confocal de imunofluorescência

A técnica usada para a marcação das células foi a Live and Dead®. Em cada amostra de células que foram gotejadas sobre os fios de sutura, foram adicionados 2,5uL de calceína e 10uL de iodeto de propídeo. Após a adição, as amostras foram gotejadas nos fios de sutura e deixadas por 30 minutos em temperatura ambiente para a ação dos reagentes. Após este procedimento cada amostra foi lavada com PBS (Phosphate-Buffered Saline) e levada para o microscópio confocal para a obtenção das fotografias.

3.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Antes de se fixar o material foram preparadas as soluções e reagentes de fixação. O reagente 1 (Cacodylate buffer 0.4M 100mL) foi composto pela adição de 8,56g de Sodium cacodylate trihydrate e 100mL de Água destilada. O reagente 2 (Cacodylate buffer 0.2M 100mL) foi composto pela adição de 50mL Cacodylate buffer 0.4M e 8mL Hydrochloric acid 0.2M; foi adicionada água destilada até completar 100mL e o controle do pH à 7,2 se faz necessário. A solução de fixação 1 (100mL) foi composta pela adição de 50mL Cacodylate buffer 0.2M e 10mL Glutaraldehyde 2,5%, completar 100mL com água destilada. A solução de fixação 2 (100mL) é composta por 50mL Cacodylate buffer 0.2M e 50mL de água destilada.

O procedimento de fixação se inicia com a inserção da amostra na solução de fixação 1 durante 30 minutos a 4°C. Após esse tempo a solução foi removida e a amostra foi lavada mais de uma vez na solução de fixação 2. Até esta etapa a amostra pode ser conservada na solução de fixação 2 por 15 dias a 4°C. Após a lavagem a solução de fixação 2 foi removida e a amostra foi introduzida em uma solução de etanol 70% durante 10 minutos. Depois de todo este procedimento a amostra foi removida da solução de etanol e foi deixada em temperatura ambiente para secar.

Antes da obtenção das micrografias as amostras foram colocadas no equipamento Spulter Coater Polaron SC7620 para o revestimento com metal.

As micrografias foram obtidas com microscópio eletrônico de varredura com detector de raio X dispersivo (Leo440i/ LEO Electron Microscopy – Oxford, Cambridge/ England). Todo o processo até a realização das micrografias foi realizado na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração (LRAC).

3.11 Experimento animal

Tratamento de fístula cecal com AT-MSCs em ratos

- **Ratos**

Foram utilizados ratos Wistar 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 descritas por Gilioli et al, 2000 e Gilioli et al, 2003 [111, 112]. Após a cirurgia e aplicação das células os animais foram mantidos sob condições assépticas pré-determinadas pelo Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP.

Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle (GC) com 5 animais, grupo injeção (GI) com 8 animais e grupo sutura (GS) com 9 animais.

As células mesenquimais, para os experimentos de cultura e diferenciação, foram obtidas de tecido adiposo de indivíduos submetidos a lipoaspiração do sexo feminino. No grupo animal onde foi utilizada a injeção de células, foram injetadas 1×10^6 células/rato ao redor da abertura da fístula cecal. No grupo onde foi utilizado fio com células aderidas, foram aderidas 1×10^6 células/fio, sendo que foi utilizado 1 fio de sutura para cada animal.

- **Anestesia**

Os animais foram anestesiados com Ketamina, 80mg/kg e Xylazina 10 mg/kg, diluídos em PBS, via intraperitoneal. Para retirada das fotos os animais foram anestesiados com Halotano de forma inalatória.

- **Procedimento cirúrgico**

O processo cirúrgico foi realizado da seguinte forma: após 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 4 pontos com fio de sutura (4-0 Poly Vicryl J-304 Poliglactina 910) da borda antimesentérica com a pele, formando a fístula.

O grupo controle (GC) não teve nenhum tipo de suporte. No segundo grupo (GI) foram somente injetadas células tronco mesenquimais de tecido adiposo ao redor da fístula formada. No último grupo (GS), o fio de sutura utilizado para formar a fístula continha células-tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas (Figura 3).

As fístulas dos animais foram fotografadas no dia da cirurgia para abertura da fístula e nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 17, 19 e 21, onde foram anestesiados e sacrificados.

Figura 3. Desenho experimental do grupo animal



3.12 Análise das imagens

ImageJ

O programa ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) foi utilizado para o levantamento das áreas das fístulas em mm^2 de cada animal. As fotos das fístulas foram tiradas no dia da cirurgia para a abertura da fístula e nos dias 3, 6, 9, 12, 15, 17, 19 e 21. As fotos foram tiradas com máquina digital Panasonic Lumix® com lente Leica® (DC VARIO-ELMARIT 1: 2.8-5.9/5.5-22 ASPH.). O levantamento das áreas dos animais foi realizada por duas pessoas distintas e que não sabiam quais os grupos dos animais. O resultado de ambos virou uma média que está representada na tabela dos resultados em mm^2 .

3.13 Análise estatística

Os dados do modelo animal foram analisados pelo teste estatístico Two-way Anova e One-way analysis of variance. O primeiro fazendo a análise comparativa entre os três grupos e o segundo analisando os grupos nos dias D0, D12 e D21.

4. Resultados

4.1 Caracterização morfológica das células mesenquimais obtidas de tecido adiposo (AT-MSc)

Após os procedimentos de digestão por colagenase e centrifugação, as células foram colocadas em cultura (DMEM/10%/SFB). Observou-se uma diversidade de populações celulares com predominância de hemácias e células pequenas, arredondadas, não aderidas ao frasco de cultivo. Nos três dias posteriores, realizou-se a lavagem da cultura com PBS com a finalidade de manter as células aderidas (primeira característica da população de células-tronco mesenquimais). A partir do terceiro dia, já era possível observar células aderidas na placa de cultura com morfologia fusiforme semelhante à de fibroblasto.

4.2 Capacidade de diferenciação das AT-MSc em linhagens mesodérmicas

As células tronco mesenquimais de tecido adiposo utilizadas neste trabalho apresentaram a capacidade de se diferenciarem nas três linhagens mesodérmicas (osteogênica, condrogênica e adipogênica), demonstrando sua multipotência celular e comprovando que realmente são células tronco mesenquimais (Figura 4).

4.2.1 Diferenciação Osteogênica

O processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais para a linhagem osteogênica foi evidenciado com a coloração Alzarin Red S. Como podemos observar na Figura 4C, encontram-se regiões avermelhadas em volta das células diferenciadas, as quais se supõem que sejam depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz extracelular mineralizada, semelhante a do tecido ósseo. Outra característica marcante é a mudança de morfologia, pois as células fibroblásticas alteraram seu formato para células alongadas e alinhadas, recobrando toda placa de cultura e em alguns lugares formando aglomerados celulares.

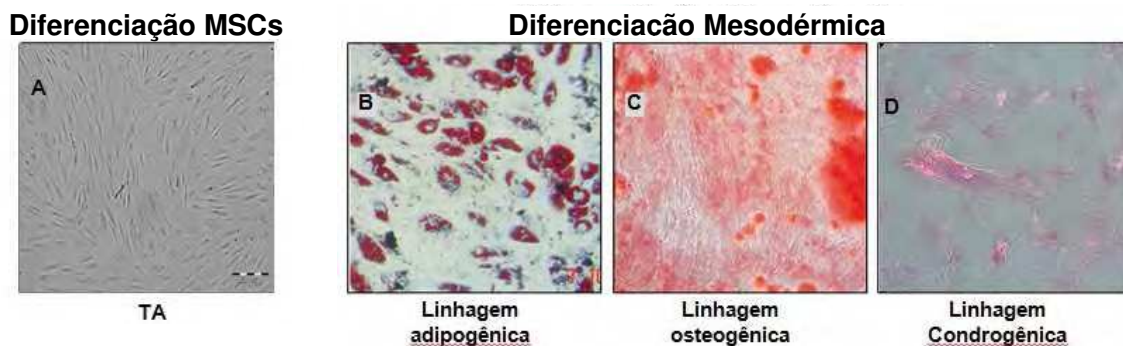
4.2.2 Diferenciação Adipogênica

Após a diferenciação adipogênica, as células-tronco mesenquimais apresentaram coloração vermelha citoplasmática em pequenas vesículas quando submetidas à coloração com Oil Red. Como podemos observar na Figura 4B as células-tronco mesenquimais perderam sua morfologia fibroblástica e adquiriram uma morfologia redonda e com inúmeras vesículas, caracterizando o acúmulo de lipídeos.

4.2.3 Diferenciação Condrogênica

Após três semanas, as células-tronco mesenquimais induzidas para diferenciação condrogênica foram coradas com Alcian blue (Figura 4D). As células apresentaram expansão no tamanho celular com significativo aumento do citoplasma, tornando-se arredondadas e achatadas. É possível observar uma coloração celular azulada.

Figura 4. Diferenciação para MSCs e para linhagem mesodérmica

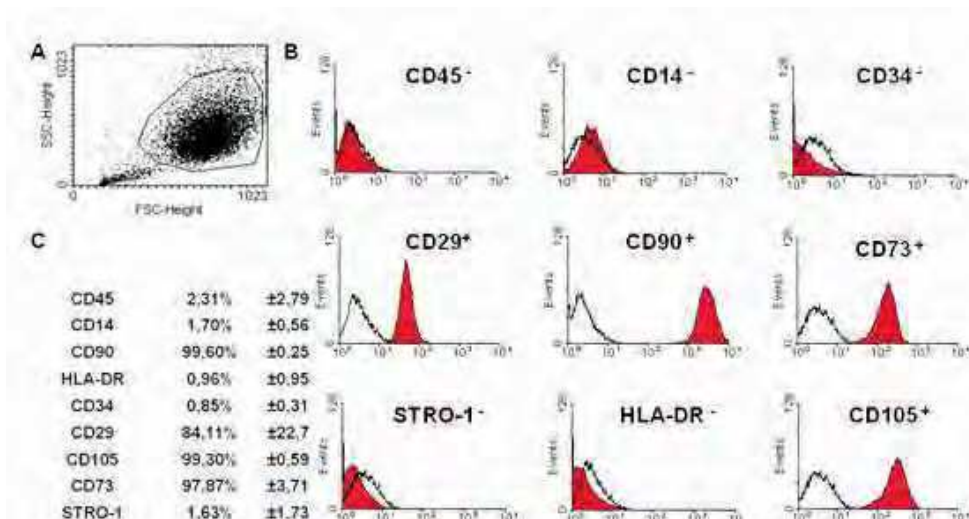


Legenda: **A:** Células aderentes obtidas de tecido adiposo na quarta passagem de expansão apresentando morfologia fibroblastóide, aumento de 10x. **B:** MSCs da quarta passagem, diferenciadas em linhagem adipogênica, 20^o dia da cultura, coradas com *oil red O*, evidenciando vesículas de lipídios coradas em vermelho em seu interior, aumento de 10x. **C:** MSCs da quarta passagem, diferenciadas em linhagem osteogênica, 20^o dia da cultura, coradas com *alizarin red s*, evidenciando depósitos de cálcio, aumento de 10x. **D:** MSCs da quarta passagem, diferenciadas em linhagem condrogênica, 20^o dia da cultura, coradas com *syrus red, resorcina e fuccina*, aumento de 10x.

4.3 Caracterização das moléculas de superfície celular (Citometria de fluxo)

A caracterização dos antígenos de superfície das AT-MSC obtidas é de fundamental importância e é realizada por citometria de fluxo utilizando um painel de anticorpos específicos para esta caracterização, já padronizados na literatura internacional. As células analisadas neste estudo apresentaram homogeneidade quanto ao seu tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e possuíam o mesmo perfil de expressão dos marcadores descritos; CD90 (99,60% ±0,25), CD105 (99,61%), CD73 (97,85%±3,71) e CD29 (99,52%±2,27), sendo que o marcador CD90 apresentou marcação mais intensa em todos os experimentos, enquanto os marcadores CD34 (0,85%±0,31), CD45 (2,31%±2,79) e HLA-DR (0,96%±0,95) mostraram baixa expressão (Figura 05). Portanto, a caracterização dessas células com os marcadores específicos definiu a população obtida do tecido adiposo como uma população de células-tronco mesenquimais.

Figura 5. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

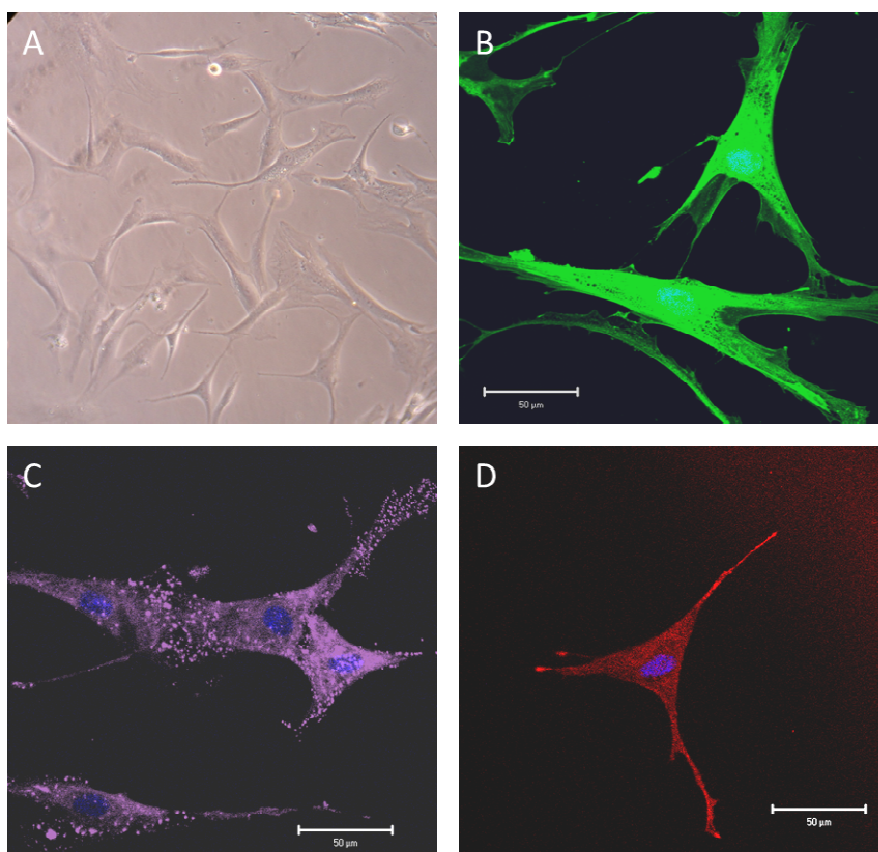


Legenda: **A:** Dot-Plot das células e a região na qual as MSC se encontram, mostrando característica homogênea dessa população. **B:** Painel de histogramas dos marcadores positivos (CD105, CD90, CD29 e CD73) e de marcadores negativos (HLA-DR, STRO-1, CD45, CD14 e CD34) em vermelho indica o marcador específico e em branco esta representado o controle (IgG com fluoro cromo) **C:** Tabela com as médias das porcentagem dos marcadores positivos e negativos das MSC.

4.4 Morfologia e aderência das AT-MSCs em placa de cultura

Na terceira passagem, foi possível observar uma população homogênea com morfologia fibroblástica, citoplasma extenso e achatado e prolongamentos não ramificados (Figura 6A). Essas células expressam, em suas membranas e em seu citoplasma, marcadores de células-tronco mesenquimais (CD105, CD90 e CD73), confirmados pela análise de microscopia de fluorescência (Figura 6 B, C e D). A expressão de CD90 foi confirmada na membrana celular e em vesículas citoplasmáticas, enquanto CD105 e CD73 estavam expressos na superfície celular.

Figura 6. Microscopia óptica e de imunofluorescência

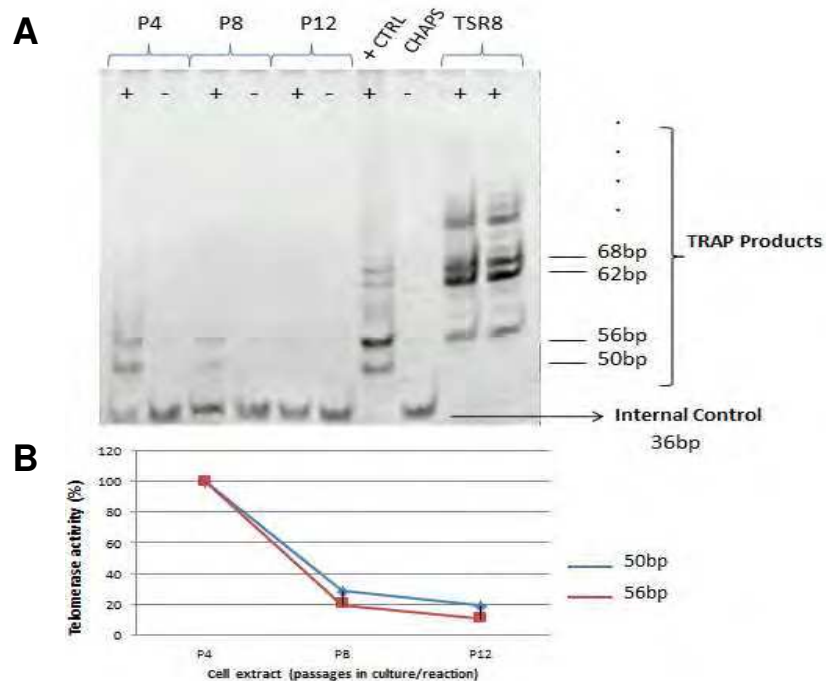


Legenda: Microscopia óptica e de imunofluorescência de AT-MSC na quarta passagem. **A)** foto de microscopia optica com aumento de 10x. **B-D)** Imunocitoquímica das AT-MSC dos marcadores CD73(verde), CD90 (roxo), CD105 (vermelho) e nuclear(DAPI) em aumento de 40x.

4.5 Atividade da enzima Telomerase

Na verificação da atividade da enzima telomerase realizada com TA foi possível observar o padrão de normalidade com 100% de atividade da telomerase em P4 e o decréscimo de atividade nas passagens mais tardias, P8 e P12 (Figura 7 A e B). Estes resultados demonstram que as MSCs utilizadas no presente estudo não apresentaram potencial tumorigênico.

Figura 7. Atividade da enzima telomerase



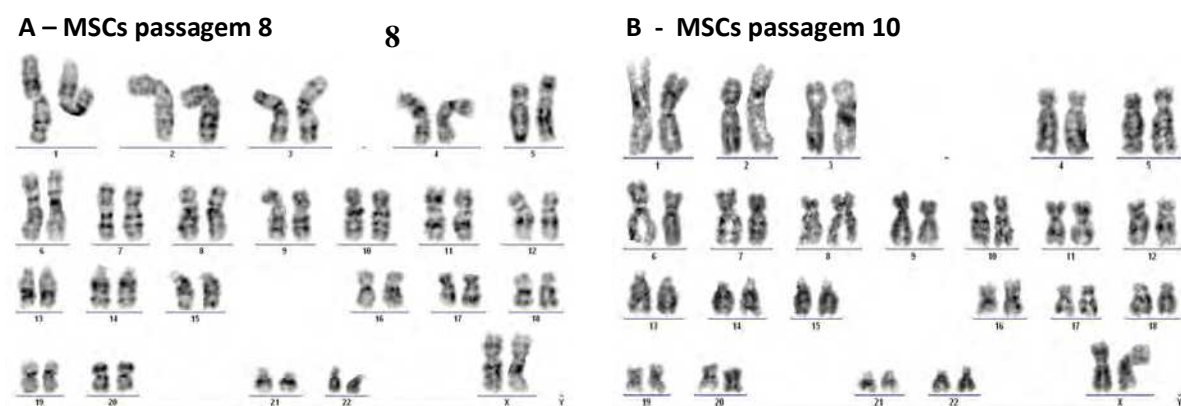
Legenda: TA foi testado em três diferentes passagens, “*in vitro*” (P4, P8 e P12) em relação a expressão da atividade da enzima telomerase através de “*TRAP assay*”. A atividade de telomerase foi detectada utilizando duas bandas de concentrações diferentes. O ensaio tem como controles positivos internos TSR8 e uma linhagem celular como control +. O controle negativo foi realizado com amostras do mesmo período a ser analisado, aquecidas 85°C, no intuito de negativar a enzima telomerase. O tampão de lise CHAPS também foi utilizado como controle negativo. As MSCs na P4 demonstraram a presença de bandas com 56 bp e 50 bp que se relacionaram com uma

atividade de 100%. Houve diminuição das bandas no decorrer das passagens, P8 e P12, com respectiva diminuição na atividade de telomerase.

4.6 Citogenética

A verificação da estabilidade cromossômica das MSCs derivadas de tecido adiposo foi avaliada por análise do cariótipo, pela técnica de coloração longitudinal da Banda G, analisando 10 metáfases com MSCs da oitava e da décima passagens. Não foram encontradas anormalidades e os cromossomas se mantiveram estáveis (Figura 8).

Figura 8. Cariótipo



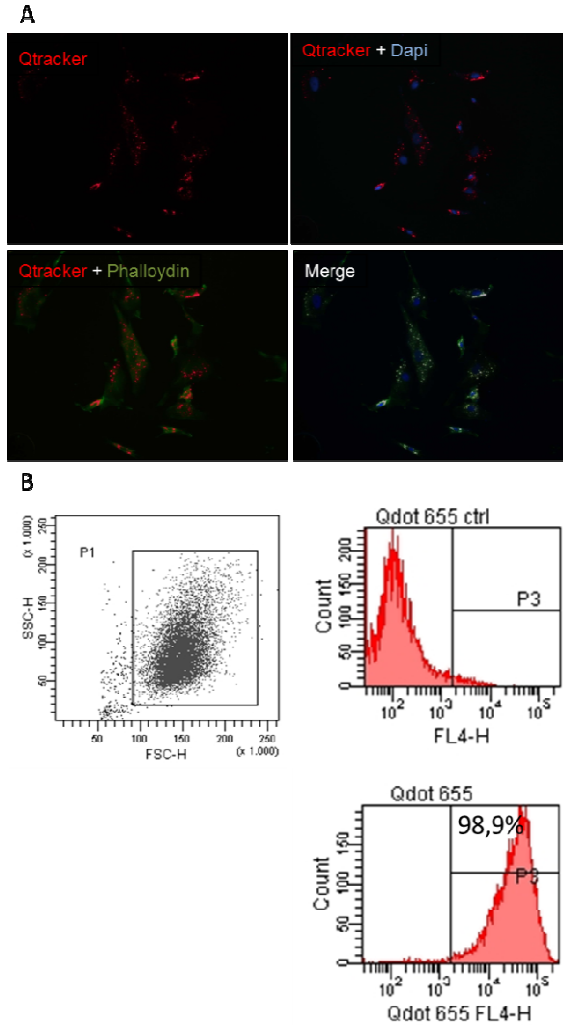
Legenda: Análise de citogenética das células mesenquimais obtidas de tecido adiposo. Figuras: **A:** Cariótipo das MSCs da P8. **B:** Cariótipo das MSCs da P10. As análises não demonstraram anormalias nos cromossomos.

4.7 Marcação das AT-MSCs por Qtracker (Invitrogen)

Na Figura 9, observa-se que o qdot655 (vermelha) são pontos que emitem fluorescência na faixa 655. Em algumas células, é possível notar a concentração destas partículas, perto do núcleo (DAPI), mas na grande maioria estão presentes em todo o citoplasma (Actina marcada em verde). A citometria de fluxo mostra que 98,9% das células submetidas a marcação possuem qdot655 no citoplasma, demonstrando que as células se

encontravam marcadas antes da injeção das AT-MSCs no modelo, possibilitando posterior rastreamento.

Figura 9. Microscopia confocal e viabilidade celular

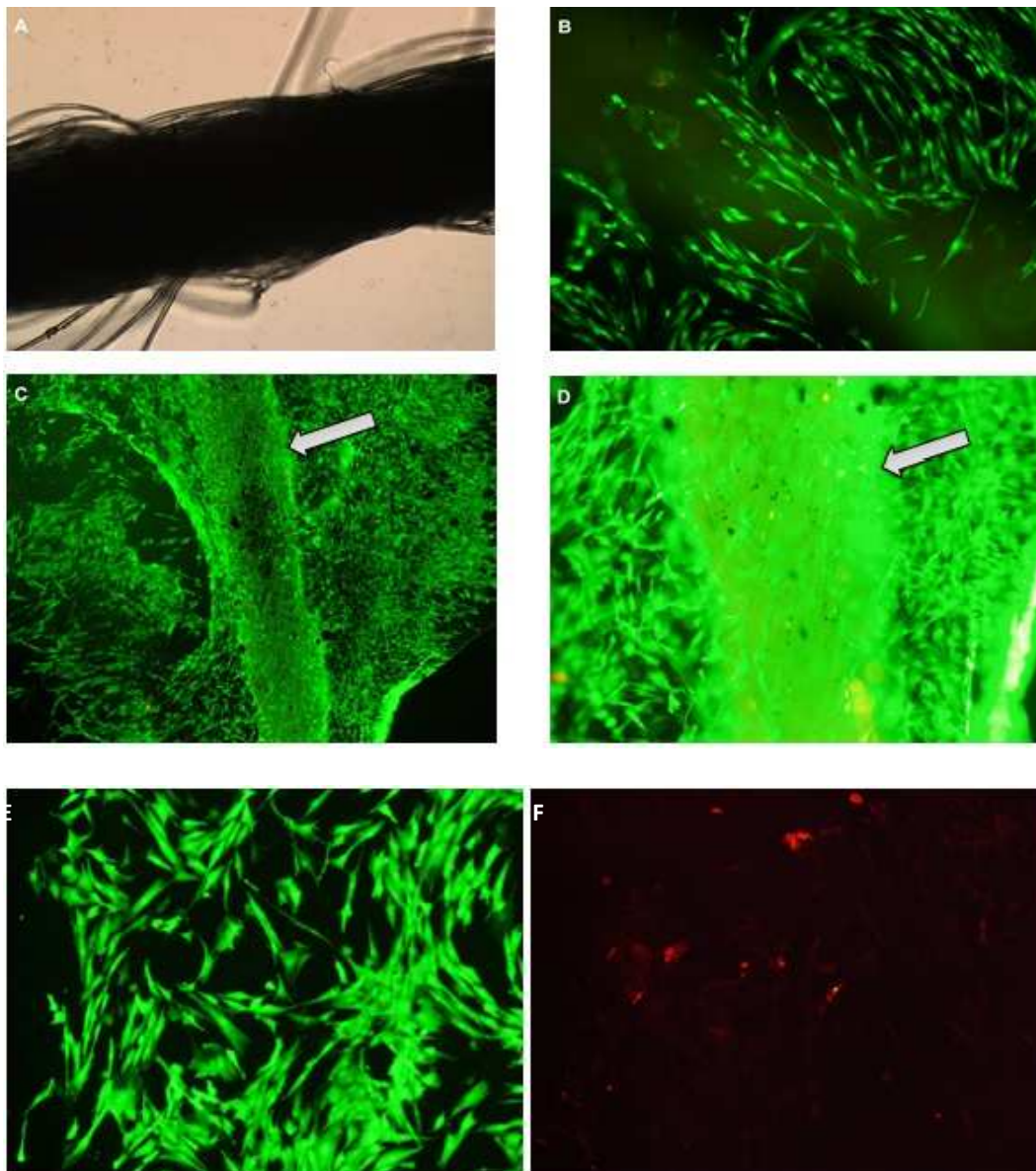


Legenda: Marcação das AT-MSC com qdot655(invitrogen), microscopia de fluorescência e citômetria de fluxo. A) A marcação de qdot(vermelho) esta presente no citoplasma(actina esta marcada com faloidina alexa flúor 488 - verde) e perto do núcleo celular(DAPI). Pela citômetro de fluxo, verificou-se que 98,9% das células estavam marcadas com qdot655 (vermelho).

4.8 Microscopia confocal de imunofluorescência

A microscopia confocal de imunofluorescência comprovou que grande quantidade de células tronco mesenquimais ficaram aderidas na superfície do fio de sutura (Figura 10). Observamos que as células estão marcadas em verde, demonstrando que essas células estão vivas e viáveis e não sofreram nenhuma alteração morfológica e fisiológica decorrentes ao uso da cola de fibrina. A Figura 10 F demonstra que um número muito pequeno de células morreu durante o procedimento.

Figura 10. Microscopia confocal de imunofluorescência.

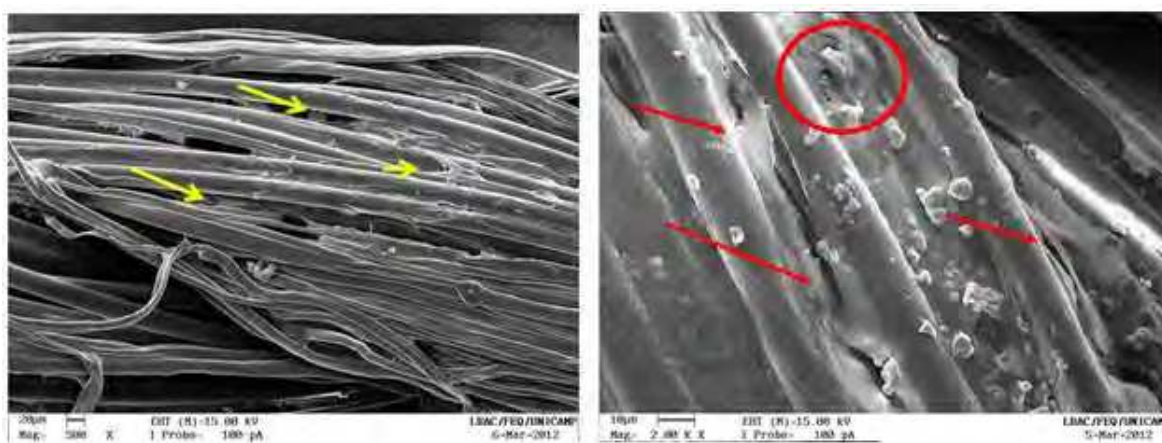


Legenda: **A:** Fio de sutura controle, sem coloração, demonstrando a ausência de células. **B:** Controle de células marcadas (verde). **C:** A seta aponta o fio de sutura envolvido por um grande número de células, aumento 10x **D:** A seta aponta o fio de sutura envolvido por um grande número de células, aumento 20x. **E:** Controle positivo das células marcadas (verde). A luminescência verde demonstra que as células estão vivas e viáveis. **F:** Controle negativo das células marcadas (vermelho). A pouca luminescência vermelha demonstra que poucas células morreram durante o procedimento.

4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) comprovou que algumas células se aderiram na superfície dos fios de sutura e outras ficaram entre os filamentos dos fios. A cola de fibrina formou uma “camada” celular entre os filamentos dos fios de sutura (Figura 11).

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura.



Legenda: **A:** As setas amarelas mostram algumas células em cima e entre os filamentos do fio de sutura. **B:** As setas e o arco vermelho mostram a ação da cola de fibrina formando uma camada celular ao longo do fio.

4.10 Grupo animal (ratos com fístula)

Grupo Controle

Dos 5 animais apenas um deles não sobreviveu, morrendo 5 dias após a cirurgia para a formação da fístula por suposta infecção generalizada.

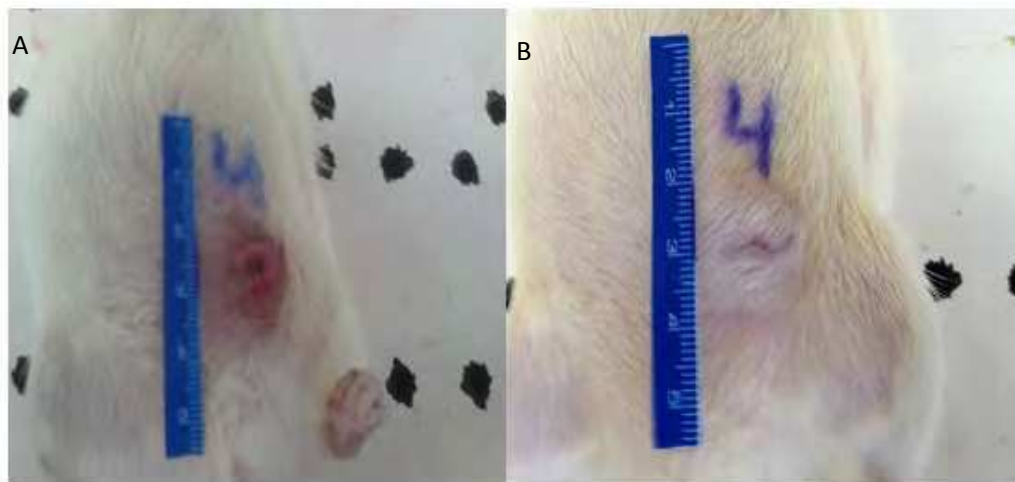
Nenhum dos animais teve o fechamento por completo da fístula. Houve infecção no local da fístula, em todos os animais, com débito médio de fezes (entre 200mL e 500mL/dia). No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm²) menos a área final (mm²), foi de 46,54%. Nenhum tipo de tratamento foi realizado com o grupo controle.

Tabela 3. Grupo controle. Esse grupo não recebeu nenhum tipo de suporte. Área da fístula medida em mm².

	AI	AF	PR	Média
Rato 1	0,606	Morreu	-	46,54%
Rato 2	0,399	0,247	38,09%	
Rato 3	0,355	0,304	14,36%	
Rato 4	0,201	0,045	77,61%	
Rato 5	0,777	0,341	56,11%	

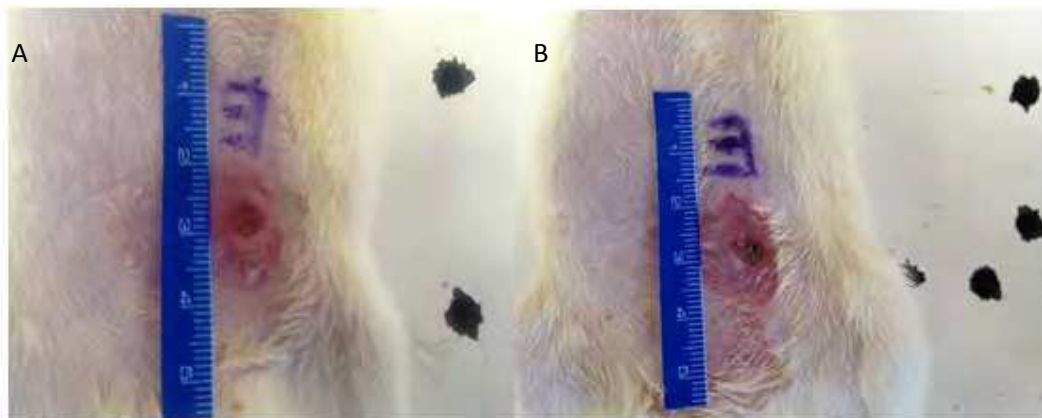
Legenda: **AI:** Área inicial da fístula. **AF:** Área final da fístula. **PR:** Porcentagem de redução da área total da fístula. A área inicial foi medida no dia da formação da fístula e a área final no 21º dia após a sua formação.

Figura 12. Grupo controle. Animal 4.



Legenda: **A:** 1º dia da formação da fístula. Observa-se a região de formação da fístula. **B:** 21º dia da formação da fístula.

Figura 13. Grupo controle. Animal 3.



Legenda: **A:** 1º dia da formação da fístula. Observa-se a formação da fístula. **B:** 21º dia. A cicatrização da fístula não ocorreu. A região está com alto débito de fezes.

Grupo Injeção

Dois deles morreram (2 e 8), o primeiro no segundo dia e o nono no quinto dia após a formação da fístula.

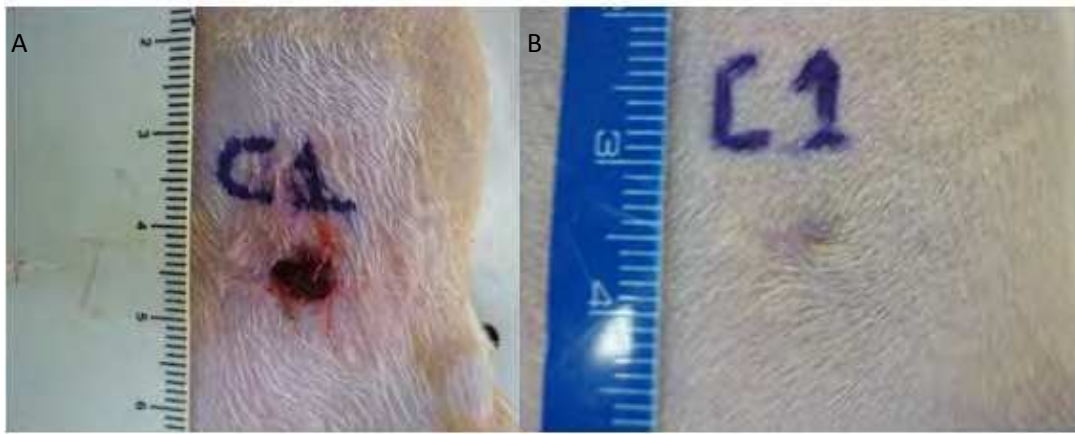
Todos os animais tiveram uma recuperação e um tempo de fechamento da área da fístula (mm^2) melhor comparados ao grupo controle. Já no terceiro dia após a formação da fístula a infecção no local diminuiu e o débito de fezes também. No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm^2) menos a área final (mm^2), foi de 71,80%.

Tabela 4. Grupo Injeção. Este grupo recebeu a injeção de 1×10^6 células tronco mesenquimais de tecido adiposo ao redor do local da fístula. Área da fístula medida em mm^2 .

	AI	AF	PR	Média
Rato 1	0,311	0,021	93,25%	71,80%
Rato 2	0,348	Morreu	-	
Rato 3	0,296	0,207	30,17%	
Rato 4	0,424	0,135	68,17%	
Rato 5	0,333	0,184	44,75%	
Rato 6	0,403	0,002	99,51%	
Rato 7	0,311	0,011	94,96%	
Rato 8	0,362	Morreu	-	

Legenda: **AI:** Área inicial da fístula. **AF:** Área final da fístula. **PR:** Porcentagem de redução da área total da fístula. A área inicial foi medida no dia da formação da fístula e a área final no 21º dia após a sua formação.

Figura 14. Grupo com células. Animal 1.



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 15. Grupo com células. Animal 6.



Legenda: **A:** 1º dia da formação da fístula, com baixo débito de fezes. **B:** 21º dia. A cicatrização da fístula foi praticamente total.

Grupo Sutura

Apenas o animal 5 morreu, no oitavo dia pós-cirurgia, devido a uma suposta infecção generalizada.

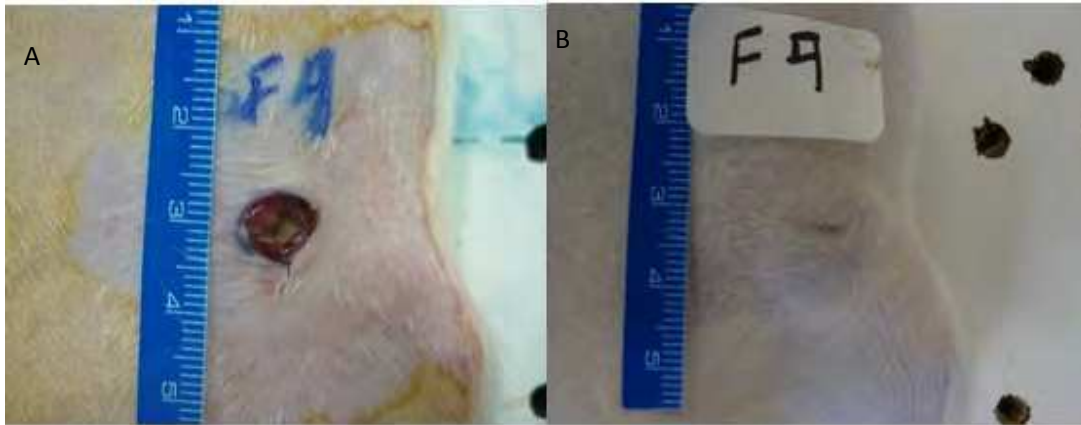
No 15º dia a maioria dos animais já não tinha débito de fezes e estavam com a cicatrização bem avançada. No 21º dia a média de fechamento e recuperação da fístula, avaliando-se a área inicial (mm²) menos a área final (mm²), foi de 90,34%.

Tabela 5. Grupo Sutura. Este grupo recebeu um fio de sutura contendo 1×10^6 células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas. Área da fístula medida em mm².

	AI	AF	PR	Média
Rato 1	0,332	0,115	65,36%	90,34%
Rato 2	0,333	0,0	100%	
Rato 3	0,495	0,171	65,45%	
Rato 4	0,395	0,005	98,73%	
Rato 5	0,437	Morreu	-	
Rato 6	0,268	0,0	100%	
Rato 7	0,506	0,011	97,82%	
Rato 8	0,388	0,0	100%	
Rato 9	0,518	0,024	95,36%	

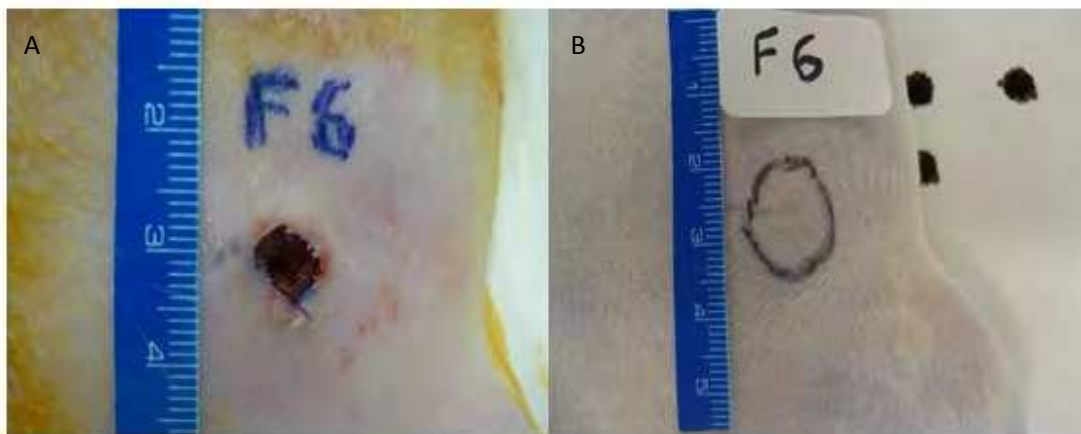
Legenda: AI: Área inicial da fístula. AF: Área final da fístula. PR: Porcentagem de redução da área total da fístula. A área inicial foi medida no dia da formação da fístula e a área final no 21º dia após a sua formação.

Figura 16. Grupo sutura com células. Animal 9.



Legenda: **A:** 1º dia da formação da fístula. **B:** 21º dia após a formação da fístula.

Figura 17. Grupo sutura com células. Animal 9.



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.

4.11. Análise estatística

A análise estatística comprovou que os grupos injeção e sutura 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.

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

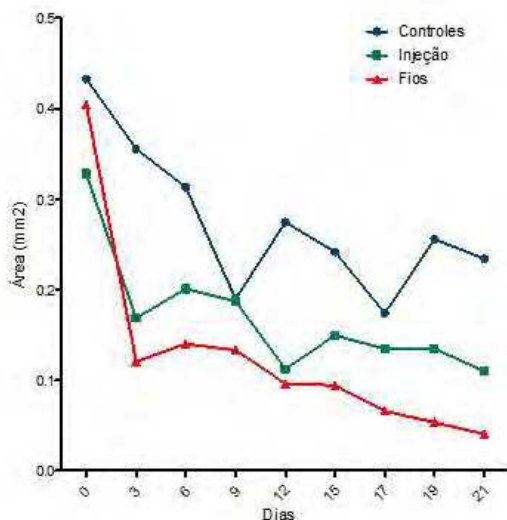
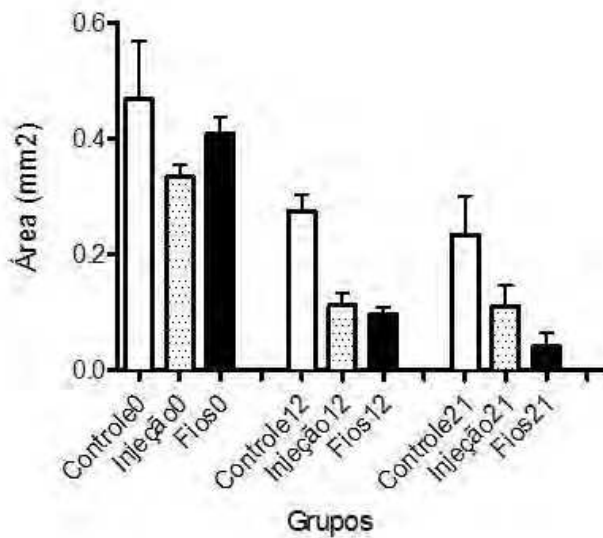


Gráfico 2. Análise comparando a área da fístula entre os 3 grupos nos dias 0, 12 e 21.



5. Discussão

As fístulas causam muitas complicações aos pacientes, como sepse, desnutrição, infecção, lesões cutâneas, entre outros fatores que aumentam a complexidade e dificultam a recuperação e tratamento do paciente. O tratamento da fístula se inicia com controle nutricional e medicamentoso e após o controle nutricional do paciente é realizada uma cirurgia para fechamento da fístula. Em muitos casos a fístula volta a abrir e uma nova fase de tratamento é necessária. Desta forma o paciente demanda um alto custo para o hospital por ter que ficar internado por um período de tempo que varia entre 3 a 8 semanas. A utilização de fios de sutura com células tronco mesenquimais aderidas, objeto de estudo deste trabalho, poderia ser uma nova forma de tratamento das fistulas gastrointestinais, propiciando uma melhor cicatrização e regeneração do local da lesão, diminuindo o tempo de internação do paciente.

As células aderentes obtidas de tecido adiposo, na quarta passagem, foram caracterizadas como células tronco mesenquimais. Após alguns tempo em cultura houve alteração da morfologia dessas células, tornando-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos. Quando submetidas aos protocolos de diferenciação para as três linhagens mesodérmicas foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos. A análise realizada através de citometria de fluxo apresentou marcadores positivos para os anticorpos designados como específicos para células mesenquimais. Os estudos de atividade da enzima telomerase e a análise de citogenética realizados para detectar se as células mesenquimais apresentariam, quando submetidas à expansão, capacidade tumorigênica, demonstraram que nas passagens analisadas, não apresentaram persistência de alta atividade da enzima telomerase e não apresentaram instabilidade cromossômica. Desta forma as células utilizadas neste trabalho são células seguras para a terapia celular. As AT-MSCs foram caracterizadas com base na definição do “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the Internacional Society for Cellular Therapy*”.

Um dos atributos fundamentais para definir a população de células-tronco mesenquimais é a capacidade de diferenciação dessas células em pelo menos três tipos celulares mesodérmicas ou a verificação da multipotência. Protocolos de diferenciação foram padronizados no laboratório para este tipo de confirmação.

Na diferenciação osteogênica a coloração Alzarin Red S cora em vermelho os depósitos de cálcio e outros minerais. Essa coloração evidencia a formação de uma matriz extracelular semelhante a que ocorre no tecido ósseo. Na diferenciação adipogênica a coloração Oil Red tem propriedade de interagir com lipídeos e triglicerídeos neutros, demonstrando uma coloração vermelha que evidencia o acúmulo dessas substâncias em vesículas citoplasmáticas das células diferenciadas. Na diferenciação condrogênica a coloração utilizada é a Alcian Blue, corando as células com um tom azulado devido a interação do corante com as glicosaminoglicanas expressas durante a diferenciação.

O experimento onde avaliamos a capacidade de adesão das células tronco mesenquimais de tecido adiposo demonstrou que as células aderiram aos fios de sutura em grande quantidade. A cola de fibrina ajudou na fixação de um grande número de células, fazendo com que ficassem aderidas em toda a extensão do fio de sutura, quanto na placa de cultura ao seu redor. A microscopia confocal de imunofluorescência demonstrou pela técnica Live and Dead® (células marcadas em verde são consideradas células vivas e viáveis; e células marcadas em vermelho são consideradas células mortas) que as células após a adesão estavam viáveis, com crescimento normal e não sofreram nenhum tipo de contaminação.

A microscopia eletrônica de varredura confirmou que essas células realmente ficaram aderidas aos fios de sutura. As células ficaram aderidas em cima do fio e dentro dos filamentos que formam o fio. A cola de fibrina formou uma camada celular por toda a extensão do fio de sutura. Para a realização das imagens do MEV as amostras passaram por um processo de fixação e um processo de retirada de toda a água existente no material (procedimento padrão para realização de imagens em MEV).

Em um estudo comparativo, Guyette, *et al.* (2012) aderiram células tronco mesenquimais humanas em suturas biológicas. Os fios de sutura utilizados eram de 4 cm e foram colocados dentro de um tubo de Silastic® onde foram adicionadas 1×10^6 células em suspensão. O crescimento e adesão das células foram observados depois de 24 horas. A comprovação da adesão das células nas suturas biológicas foi através de imagens de microscopia confocal de imunofluorescência com coloração Hoechst e Phalloidin. Os resultados demonstraram que, em média, 11.806 células tronco mesenquimais, ficaram

aderidas em cada fio de sutura de 4 cm. Os fios enriquecidos com células tronco mesenquimais foram testados em coração de ratos. O grupo comparou a eficiência do fio enriquecido junto com um grupo de injeção das células diretamente no local. Como resultado o grupo animal onde foi utilizado o fio com células teve uma maior transferência de células para o local da lesão [109].

Em comparação com o estudo acima percebemos nas imagens de microscopias que há um número maior de células aderidas nos fios de sutura quando utilizamos a cola de fibrina. O fio de sutura de 4 cm foi eficaz no tipo de tratamento que o grupo propôs, porém para suturas e lesões de maior tamanho, como no caso das fístulas enterocutaneas, um fio de sutura de maior tamanho se faz necessário. O fio de sutura no qual aderimos às células tronco mesenquimais de tecido adiposo tinham 30 cm de tamanho, sendo considerado um fio de sutura longo. Após a utilização dos fios de sutura na cirurgia da fístula nos ratos, estes fios foram analisados em microscópio confocal, onde se observou que mesmo após a utilização do fio de sutura na cirurgia, ainda existiam células-tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas.

As recentes descobertas nas propriedades e na utilização de células-tronco mesenquimais, propiciaram um novo tipo de tratamento na forma de terapia celular e medicina regenerativa.

Damian Garcia-Olmo *et al.* (2005) procurando uma nova abordagem realizou vários estudos em pacientes com fístulas e Doença de Crohn utilizando células tronco. Os pacientes recebiam a injeção de células tronco mesenquimais no local da fístula e logo em seguida a fístula era suturada. O grupo espanhol não padronizou o número de células injetadas, nem o tempo da cultura em dias. Essa falta de padronização demonstra que o crescimento das células não foi igual de um paciente para o outro, já que as células utilizadas eram autólogas (do próprio paciente). A recuperação e cicatrização das fístulas foram melhores que nos tratamentos convencionais, porém muitos pacientes sofreram recidiva da fístula. A média de fístulas consideradas curadas em 8 semanas de tratamento foi de 66% [108]. Essa média é considerada alta perto das médias de fístulas curadas através do tratamento convencional. Tratadas com células-tronco mesenquimais, as fístulas

apresentam um tempo de recuperação e cicatrização melhores que comparados ao tratamento convencional.

Os resultados obtidos neste estudo foram fundamentais para a comparação dos resultados. Como uma nova forma de tratamento testamos a adesão das células tronco mesenquimais em fios de sutura para cicatrização e recuperação de fístulas gastrointestinais em ratos.

Essa nova forma de terapia foi testada em um grupo animal, que contou com um grupo controle, com um grupo de injeção de células ao redor do local da fístula (comparativo aos resultados do grupo espanhol) e um grupo onde os animais receberam fios de sutura com células tronco mesenquimais aderidas. Na comparação com o grupo controle, ambos os outros dois grupos apresentaram uma recuperação e cicatrização da fístula melhor e de forma mais rápida. O grupo onde as células foram injetadas teve uma média de cicatrização de 71,80% da área da fístula. Esse resultado se aproximou das porcentagens de cura das fístulas do grupo espanhol. Já o grupo onde utilizamos os fios de sutura com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas, essa média foi de 90,34%, demonstrando que houve a transferência de um grande número de células do fio de sutura para o local da lesão e que esta forma de tratamento pode ser sim efetiva como forma de tratamento para fístulas enterocutâneas e outras doenças.

Os resultados da análise estatística comprovaram que em ambos os grupos onde AT-MSCs foram utilizadas houve uma melhor recuperação da fístula em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Há uma queda considerada da área da fístula (mm^2), em ambos os grupos onde as células foram utilizadas, já no terceiro dia após o surgimento da fístula. O grupo sutura foi o que apresentou melhores resultados quando a diminuição da área das fístulas (mm^2) ao longo dos 21 dias.

Outra vantagem do tratamento com AT-MSCs é a imunomodulação que estas células produzem, devido a liberação, durante a fase inflamatória de mediadores pró-inflamatórios como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina- 1β (IL 1β). Esses mediadores ativam as funções regulatórias das MSCs permitindo que estas

modulem a resposta imune [110]. Esta capacidade de liberar moléculas com funções imunossupressoras tem grande importância na aplicação clínica.

A utilização de células-tronco, juntamente com fio de sutura pode ser uma nova forma de terapia para diversas doenças, ajudando na cicatrização e diminuindo o tempo de internação dos pacientes, assim como os gastos hospitalares; e favorecendo o atendimento de um número maior de pacientes em menor espaço de tempo.

6. Conclusão

A microscopia confocal de imunofluorescência e a microscopia eletrônica de varredura comprovaram que as AT-MSCs aderiram em grande quantidade ao fio de sutura devido a utilização de cola de fibrina. Elas formaram uma “camada” celular em cima dos filamentos do fio de sutura.

Em ambos os grupos animais onde foram utilizadas AT-MSCs no tratamento das fístulas (grupo injeção de células e grupo células + fio) a cicatrização e recuperação da fístula e dos animais foi melhor quando comparadas ao grupo controle.

Possivelmente a ação imunomodulatória das AT-MSCs fez com que a cicatrização das fístulas fosse melhor e mais rápida que no grupo controle.

7. Referências

1. Souza, H.P., Gabiatti, G., Dotta, F., *Fístulas digestivas no trauma*. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 2000. **28**(2).
2. Berry S.M., Fischer J.E., *Classification and pathophysiology of enterocutaneous fistulas*. Surg Clin North Am, 1996. **76**(5): 1009-18.
3. Gomes, C.H.R., Almeida, M.F.A., Silva e, D.V., Serpa, G.M.T., *Fístulas digestivas*. Unimontes científica. Montes Claros, 2004. **6**(2).
4. Luft, C.V., Beghetto, M.G., Gazal, C.H.A., Mello E.D., *Fístulas do trato gastrointestinal*. Rev. Bras. Med., 2005. **62**: 372-7.
5. Foster, C.E., Lefor, A.T., *General management of gastrointestinal fistulas*. Surg Clin North Am., 1996. **76**(5): 1019-33.
6. Gerzof, S.G., Robbins, A.H., Johnson, W.C. et al., *Percutaneous catheter drainage of abdominal abscesses*. N Engl J Med, 1981. **305**(12): 653-7.
7. Rolandelli, R., Roslyn, J.J., *Surgical management and treatment of sepsis associated with gastrointestinal fistulas*. Surg Clin North Am, 1996. **76**(5): 1111-22.
8. Fry, D.E., Osler, T., *Abdominal wall considerations and complications in reoperative surgery*. Surg Clin North Am, 1991. **71**: 1-11.
9. Chapman, R., Foram, R., Dunphy, J.E., *Management of intestinal fistulas*. Am J Surg, 1964. **108**: 157-64.
10. Meguid, M.M., Campos, A.C.L., *Nutritional management of patients with gastrointestinal fistulas*. Surg Clin North Am, 1996. **76**(5): 1035-80.
11. Filho, I.J. *O papel da u.t.ino tratamento das fístulas entéricas*. Medicina, Ribeirão Preto, 1998. **31**: 568-576.
12. Campos, A.C.L., Meguid, M.M., Coelho, J.C.U., *Factors influencing outcome in patients with gastrointestinal fistula*. Surg Clin North Am, 1990. **76**(5): 1191-98.
13. Campos, A.C.L. e Matias, J.E.F., *Terapia Nutricional nas Fístulas Digestivas*. Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 2001. **1**: 241-255.
14. Eckfeldt, C.E., E.M. Mendenhall, and C.M. Verfaillie, *The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(9): 726-37.
15. Abumaree, M., et al., *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Rev, 2012. **8**(2): 375-92.
16. Edmunds, L.H., Willians, G.M., Welch, C.E., *External fistulas arising from the gastrointestinal tract*. Ann Surg, 1960. **152**: 445-71.

17. Barros, M., Gorgal, R., Machado, A.P., Correia, A., Montenegro, N., Princípios básicos em cirurgia: Fios de sutura. *Acta Med Port*, 2011. **24**(4): 1051-1056.
18. Brasil. ABNT NBR 13904, 30 de junho de 2003. Fios para sutura cirúrgica. 2003.
19. Dunn, D.L., *Wound Closure Manual*. Ethicon, inc. Johnson & Johnson Company.
20. Bydlowski, S.P., Debes, A.A., Maselli, L.M.F., Janz, F.L., *Características biológicas das células tronco mesenquimais*. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2009. **31**(1): 25-35.
21. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): 143-7.
22. Eckfeldt, C.E., E.M. Mendenhall, and C.M. Verfaillie, *The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(9): 726-37.
23. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. *Science*, 1999. **284**(5411): 143-147.
24. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P.G., *Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications*. *Stem Cells*, 2001. **19**: 180-192.
25. Perry, A.R. and D.C. Linch, *The history of bone-marrow transplantation*. *Blood Rev*, 1996. **10**(4): 215-9.
26. Krause, D.S., et al., *CD34: structure, biology, and clinical utility*. *Blood*, 1996. **87**(1): 1-13.
27. Lange, C., et al., *CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo*. *Stem Cells Dev*, 2007. **16**(2): 297-304.
28. Tracey, A., O'Brien, Tiedemann, K., Vowels, M.R., *From Bench To Bedside: No longer a biological waste product: umbilical cord blood*. *MJA*, 2006. **184**(8): 407-410.
29. O'Brien, T.A., K. Tiedemann, and M.R. Vowels, *No longer a biological waste product: umbilical cord blood*. *Med J Aust*, 2006. **184**(8): 407-10.
30. Miraglia, S., et al., *A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning*. *Blood*, 1997. **90**(12): 5013-21.
31. Hao, H.N., et al., *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.
32. Harris, D.T., *Cord blood stem cells: a review of potential neurological applications*. *Stem Cell Rev*, 2008. **4**(4): 269-74.

33. Ahrens, I., 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): 23210.
34. Nishiyama, N., et al., *The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.* Stem Cells, 2007. **25**(8): 2017-24.
35. Ende, N. and R. Chen, *Parkinson's disease mice and human umbilical cord blood.* J Med, 2002. **33**(1-4): 173-80.
36. Jang, Y.K., 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.
37. 15. Zwart, I., 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.
38. Ende, N., Chen, R., *Parkinson's disease mice and human umbilical cordblood.* J Med., 2002. **33**: 173-180.
39. Yen, B.L., et al., *Isolation of multipotent cells from human term placenta.* Stem Cells, 2005. **23**(1): 3-9.
40. Huang, H.I., *Isolation of human placenta-derived multipotent cells and in vitro differentiation into hepatocyte-like cells.* Curr Protoc Stem Cell Biol, 2007. **Chapter 1**: Unit 1E 1.
41. Chien, C.C., et al., *In vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells.* Stem Cells, 2006. **24**(7): 1759-68.
42. Li, D., et al., *Biological characteristics of human placental mesenchymal stem cells and their proliferative response to various cytokines.* Cells Tissues Organs, 2007. **186**(3): 169-79.
43. Kanematsu, D., et al., *Isolation and cellular properties of mesenchymal cells derived from the decidua of human term placenta.* Differentiation, 2011. **82**(2): 77-88.
44. Partridge, T.A., et al., *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts.* Nature, 1989. **337**(6203): 176-9.
45. Geng, J., et al., *Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.* Cytotherapy, 2009. **11**(7): 849-63.
46. Cossu, G. and F. Mavilio, *Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective?* J Clin Invest, 2000. **105**(12): 1669-74.

47. Tarnowski, M. and A.L. Sieron, *Adult stem cells and their ability to differentiate*. Med Sci Monit, 2006. **12**(8): RA154-63.
48. Tajbakhsh, S., *Losing stem cells in the aged skeletal muscle niche*. Cell Res, 2013.
49. Asakura, A., M. Komaki, and M. Rudnicki, *Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation*. Differentiation, 2001. **68**(4-5): 245-53.
50. Huang, S., et al., *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**(5 Suppl): S32-40.
51. Zhou, Y., et al., *Genetic Modification of Primate Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Produces Pancreatic Progenitor Cells in vitro*. Cells Tissues Organs, 2013.
52. Zipori, D., et al., *Cultured mouse marrow stromal cell lines. II. Distinct subtypes differing in morphology, collagen types, myelopoietic factors, and leukemic cell growth modulating activities*. J Cell Physiol, 1985. **122**(1): 81-90.
53. Castro-Malaspina, H., et al., *Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny*. Blood, 1980. **56**(2): 289-301.
54. Barry, F.P. and J.M. Murphy, *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): 568-84.
55. Anghileri, E., et al., *Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2008. **17**(5): 909-16.
56. Banas, A., et al., *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. J Gastroenterol Hepatol, 2009. **24**(1): 70-7.
57. Franchini, M., *[Mesenchymal stem cells: from biology to clinical applications]*. Recent Prog Med, 2003. **94**(11): 478-83.
58. Nasef, A., N. Ashammakhi, and L. Fouillard, *Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms*. Regen Med, 2008. **3**(4): 531-46.
59. Gneocchi, M., et al., *Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement*. Faseb J, 2006. **20**(6): 661-9.
60. Chamberlain, G., et al., *Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing*. Stem Cells, 2007. **25**(11): 2739-49.

61. Keating, A., *Mesenchymal stromal cells: new directions*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(6): 709-16.
62. Jackson, W.M., L.J. Nesti, and R.S. Tuan, *Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells*. Stem Cells Transl Med, 2012. **1**(1): 44-50.
63. Campagnoli, C., et al., *Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow*. Blood, 2001. **98**(8): 2396-402.
64. Erices, A., P. Conget, and J.J. Minguell, *Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood*. Br J Haematol, 2000. **109**(1): 235-42.
65. In 't Anker, P.S., et al., *Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta*. Stem Cells, 2004. **22**(7): 1338-45.
66. Lee, O.K., et al., *Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood*. Blood, 2004. **103**(5): 1669-75.
67. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): 1330-7.
68. Yoshimura, K., 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.
69. Weisberg, S.P., et al., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): 1796-808.
70. Zipori, D., J. Toledo, and K. von der Mark, *Phenotypic heterogeneity among stromal cell lines from mouse bone marrow disclosed in their extracellular matrix composition and interactions with normal and leukemic cells*. Blood, 1985. **66**(2): 447-55.
71. Friedenstein, A.J., *Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Haematol Blood Transfus, 1980. **25**: 19-29.
72. Xu, H., et al., *Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): 1821-30.
73. Schaffler, A. and C. Buchler, *Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies*. Stem Cells, 2007. **25**(4): 818-27.
74. Casteilla, L., et al., *Plasticity of adipose tissue: a promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases?* Arch Mal Coeur Vaiss, 2005. **98**(9): 922-6.

75. Oedayrajsingh-Varma, M.J., 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.
76. Kern, S., et al., *Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue*. *Stem Cells*, 2006. **24**(5): 1294-301.
77. Wagner, W., et al., *Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(11): 1402-16.
78. Lee, R.H., 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.
79. Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies*. *Tissue Eng*, 2001. **7**(2): 211-28.
80. Song, H.Y., et al., *Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(11): 2357-65.
81. Adegani, F.J., et al., *A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells*. *Mol Biol Rep*, 2012.
82. Rodriguez, A.M., et al., *The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Biochimie*, 2005. **87**(1): 125-8.
83. Mohsen-Kanson, T., et al., *Expression of cell surface markers during self-renewal and differentiation of human adipose-derived stem cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012.
84. Fujimura, J., et al., *Neural differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **333**(1): 116-21.
85. Guidotti, S., et al., *Enhanced osteoblastogenesis of adipose derived stem cells upon spermine delivery via beta-catenin activation*. *Stem Cells Dev*, 2013.
86. Hattori, H., 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.
87. Guasti, L., et al., *High plasticity of pediatric adipose tissue-derived stem cells: too much for selective skeletogenic differentiation?* *Stem Cells Transl Med*, 2012. **1**(5): 384-95.

88. Cowan, C.M., et al., *Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): 560-7.
89. Chang, J.C., S.H. Hsu, and D.C. Chen, *The promotion of chondrogenesis in adipose-derived adult stem cells by an RGD-chimeric protein in 3D alginate culture*. Biomaterials, 2009. **30**(31): 6265-75.
90. Strem, B.M., et al., *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells*. Keio J Med, 2005. **54**(3): 132-41.
91. Cossu, G. and F. Mavilio, *Myogenic stem cells for the therapy of primary myopathies: wishful thinking or therapeutic perspective?* J Clin Invest, 2000. **105**(12): 1669-74.
92. Geng, J., et al., *Inhibition of myostatin promotes myogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*. Cytotherapy, 2009. **11**(7): 849-63.
93. Planat-Benard, V., Silvestre, J.S., Cousin, B., et al., *Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiologic perspectives*. Circulation, 2004, **109**: 656-663.
94. Seo, M.J. , Suh, S.Y., Bae, Y.C., et al., *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**: 258-264.
95. Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., et al., *Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**: 1135-1140.
96. Corre, J., Barreau, C., Cousin, B., et al., *Human subcutaneous adipose cells support complete differentiation but not self-renewal of hematopoietic progenitors*. J Cell Physiol, 2006. **208**: 282-288.
97. Cho, H.H., et al., *Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells*. Tissue Eng, 2006. **12**(1): 111-21.
98. Akiyama, T., *Wnt/beta-catenin signaling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2000. **11**(4): 273-82.
99. Kim, M.H., et al., *Genistein and daidzein repress adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells via Wnt/beta-catenin signalling or lipolysis*. Cell Prolif, 2010. **43**(6): 594-605.
100. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): 409-14.

101. Kim, Y.J., et al., *ICAT participates in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell*. Life Sci, 2008. **83**(25-26): 851-8.
102. Brandon, C., L.M. Eisenberg, and C.A. Eisenberg, *WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells*. Blood, 2000. **96**(13): 4132-41.
103. Zhao, Y., S.D. Waldman, and L.E. Flynn, *Multilineage co-culture of adipose-derived stem cells for tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2012.
104. Abumaree, M., et al., *Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells*. Stem Cell Rev, 2012. **8**(2): 375-92.
105. Soleymaninejadian, E., K. Pramanik, and E. Samadian, *Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors*. Am J Reprod Immunol, 2012. **67**(1): 1-8.
106. Ivanova-Todorova, E., et al., *Conditioned Medium from Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces CD4+FOXP3+ Cells and Increases IL-10 Secretion*. J Biomed Biotechnol, 2012.: 295167.
107. Karussis, D., et al., *Immunomodulation and neuroprotection with mesenchymal bone marrow stem cells (MSCs): a proposed treatment for multiple sclerosis and other neuroimmunological/neurodegenerative diseases*. J Neurol Sci, 2008. **265**(1-2): 131-5.
108. Garcia-Olmo, D., et al., *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.
109. Guyette, J.P., et al., *A novel suture-based method for efficient transplantation of stem cell*. Journal of Biomedical Materials Research A, 2013. **101A**(3): 809-18.
110. Jackson, W.M., Nesti, L.J., Tuan, R.S., *Concise review: Clinical transplantation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells*. Stem cell translational medicine, 2012. **1**: 44-50.
111. Gilioli, R.; Andrade, L.A.G.; Passos, L.A.C. et al., *Parasite survey in mouse and rat colonies of Brazilian laboratory animal houses kept under different sanitary barrier conditions*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.52, 33-37, 2000.
112. 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. Tese (Doutorado) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

8. Anexos

8.1 Anexo1- Termo de consentimento

- TERMO DE CONSENTIMENTO -

Tecido adiposo

Eu, _____, registro hospitalar: _____, RG: _____, autorizo a doação de 20 ml de tecido adiposo, coletados durante a cirurgia de lipoaspiração a que serei submetida em ____/____/____. Este material será utilizado para pesquisa a serem realizadas na UNICAMP. Informo que fui devidamente esclarecido (a) sobre todas as possíveis intercorrências que possam decorrer deste procedimento, já descritas no termo de consentimento livre esclarecido de autorização para cirurgia. Fui informado(a) que se não quiser autorizar esta doação, não haverá nenhum prejuízo ao meu atendimento nestes hospitais (Complexo Hospitalar HC, CAISM, Hemocentro da UNICAMP).

Informaram-me de que o material coletado será utilizado na pesquisa "Cultura de Células Mesenquimais obtidas de tecido adiposo (ADSC), diferenciação neuronal e marcação com nanopartícula super-paramagnética" e será conduzido pelo aluno de mestrado Thiago Borsoi Ribeiro sob orientação da Profa. Dra. Sara Terezinha Olalla Saad. O projeto consiste na extração de células do material coletado de tecido adiposo (lipoaspiração) e o estudo destas células no processo de diferenciação neuronal e marcação por partículas magnéticas.

Todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas e minhas dúvidas esclarecidas. A opção de doação foi tomada de modo consciente, livre e voluntário.

Doador



Campinas, ____/____/____

Telefone para contato

Pesquisador (Hemocentro): (19) 35218734

Comitê de Ética da Unicamp: (19) 3521-8942

8.2 Anexo2 – Comitê de ética animal



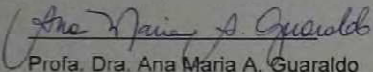
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO,

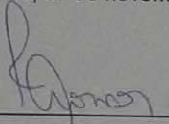
Certificamos que o projeto "Utilização de fio de sutura de náilon e poliéster com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas na avaliação na melhora de fistulas gastrointestinais em ratos" (protocolo nº 2545-1), sob a responsabilidade de Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo / Bruno Bosch Volpe, 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**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 07 de novembro de 2011.

Campinas, 07 de novembro de 2011.



Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>