

ISA DIETRICH

**Influência da composição de carreador biodegradável
na viabilidade do implante de células mesenquimais
indiferenciadas do tecido adiposo humano**

Tese apresentada ao Departamento de Córdio-
Pneumologia da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Cardiologia

Orientadora: Profa. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues

SÃO PAULO

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Dietrich, Isa

Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano / Isa Dietrich. -- São Paulo, 2004.

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

Departamento de Cardio-Pneumologia.

Área de concentração: Cardiologia.

Orientadora: Consuelo Junqueira Rodrigues.

Descritores: 1.LESÕES DOS TECIDOS MOLES/terapia 2.PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS RECONSTRUTIVOS 3.TRANSPLANTE DE TECIDOS 4.TRANSPLANTES 5.TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO 6.CÉLULAS DO TECIDO CONJUNTIVO 7.CÉLULAS ESTROMAIS/transplante 8.CÉLULAS PRIMITIVAS/classificação 9.CÉLULAS PRIMITIVAS/transplante 9.NEOVASCULARIZAÇÃO FISIOLÓGICA 11.SOBREVIVÊNCIA DE TECIDOS 12.ENGENHARIA BIOMÉDICA

USP/FM/SBD-308/04

A meus amados pais, Ivo e Rosa;

abrigo de dedicação incansável,
sábios mestres na arte de enfrentar desafios.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Consuelo Junqueira Rodrigues, dedicada orientadora, pelos ensinamentos e pela condução sempre segura e precisa. Agradeço sua solicitude, compreensão e generosidade.

Aos Professores Aldo Junqueira Rodrigues Jr. e José Antonio Franchini Ramires, cujo incentivo e apoio foram determinantes para a realização deste projeto.

Ao Dr. Christian Dani, pela carinhosa acolhida em Nice, pelos ensinamentos e pelo suporte irrestrito ao nosso trabalho.

Ao Dr. Gerard Ailhaud, pela orientação e receptividade.

Aos doutores EZ-Zoubir Amri e Pascal Peraldi, pela disponibilidade infatigável e pelos ensinamentos.

A Anne Spadafora, pela contribuição inestimável e genuína dedicação no processamento dos implantes para análise.

A Genevieve Oillaux, pelo carinho e ajuda incansáveis.

A Olivia Cochet, Phi Villageois, Anne Marie Rodrigues, Frederic Delteil, WendyCousin, Anissa Abderrahin, Olivier Bezy, Christian Erlabd, Valerie Navarro, Cecile Vernochet, Brigitte Wdziekonski e Laure-Emmanuelle Zaragosi, por toda ajuda, ensinamentos e carinho nos caminhos percorridos nos laboratórios em Nice.

Aos Doutores Yves Laudoyer, Evelyne Bourgeon, Jorge Delas e Maria Cláudia Sanchez Giometti, por terem permitido o acesso a seus pacientes.

Às pacientes que doaram o tecido para a realização da pesquisa.

Ao Dr. José Eduardo Krieger, pela ajuda e receptividade no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. Durvanei Augusto Maria, pelo auxílio na interpretação dos resultados e pelas sugestões.

Aos Doutores Célia Maria Cassaro Struntz e Roberto Rocha Corrêa Veiga Giraldez, pelas valiosas sugestões.

A Alexandre Queiroz Silva, Gina Camilo Rocha Silvestre, Maria das Graças Ribeiro Batista e Leide Santos, integrantes do Laboratório de Investigação Médica 02 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela importante contribuição.

Aos amigos Yves Laudoyer e Giuliana Sampogna, pela amizade e apoio em Nice.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão de bolsa do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela contribuição na análise das células por meio da citometria de fluxo.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado,
mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.”

Albert Einstein

Este projeto foi agraciado com a concessão de bolsa da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), sob processo BEX1125/02-8, junto ao Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE).

Na França, o trabalho esteve sob a supervisão do Dr. Christian Dani, diretor do Laboratório de Células Tronco e Diferenciação do Centro de Bioquímica da Universidade de Nice-Sophia-Antipolis.

Esta tese está de acordo com:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.

São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos títulos de periódico de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas	
Lista de símbolos	
Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Resumo	
Summary	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Obtenção das células mesenquimais indiferenciadas humanas	20
3.2 Preparação dos carreadores biodegradáveis e incorporação das células	22
3.3 Implante dos carreadores.....	24
3.4 Sacrifício dos animais e recuperação dos implantes.....	26
3.5. Análise dos implantes	27
3.5.1 Análise macroscópica a fresco	27
3.5.2 Análise histológica e por imunofluorescência indireta	27
3.5.3 Extração, quantificação e amplificação do DNA genômico....	30
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Caracterização citológica das células mesenquimais indiferenciadas humanas.....	36
4.2 Análise macroscópica dos implantes a fresco.....	37
4.2.1 Carreador 1: membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno	37
4.2.2 Carreador 2 - Gel de Ácido Hialurônico	38
4.3 Análise histológica e por imunofluorescência indireta	40
4.3.1 Carreador 1 : membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno	40
4.3.2 Carreador 2: Gel de ácido hialurônico reticulado.....	44
4.4 Verificação da presença de DNA humano nos Implantes	48
5. DISCUSSÃO.....	51
6. CONCLUSÕES.....	62
7. REFERÊNCIAS	64
Apêndice.....	84

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BDIS	Bencton Dickinson Immunodiagnostic Systems
BEAT	BioEngineered Autologus Tissue
bFGF	fator básico de crescimento de fibroblasto
CD	grupo de diferenciação
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CPH	complexo principal de histocompatibilidade
DAPI	4'-6'-Diamino-2-phenylindole
DMEM	meio de Dubelcco modificado por Eagle
DNA	ácido deoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfato
dATP	deoxiadenosina 5'trifosfato
dCTP	deoxicitosina 5'trifosfato
dGTP	deoxiguanosina 5'trifosfato
dTTP	deoxitimidina 5'trifosfato
DO	densidade ótica
FACS	classificador de células por ativação da fluorescência
FDA	US Food and Drug Adminstration
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSC	dispersão frontal
HLA	antígeno leucocitário humano
VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular
IgG	imunoglobulina G

INCOR	Instituto do Coração
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Medicale
KDR	receptor de domínio para quinase
LIM	Laboratório de Investigação Médica
MOM	camundongo sobre camundongo
NK	citotóxicas naturais
PBS	solução tampão fosfato
PC	computador pessoal
PCR	reação em cadeia da polimerase
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	ficoeriterina
SIDA	síndrome do vírus da imunodeficiência adquirida
SSC	dispersão lateral
U	unidade
UMR	Unidade Mista de Pesquisa
UV	ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
cm	centímetro
cm^2	centímetro quadrado
CO_2	gás carbônico
g	unidade de força centrífuga relativa
gr	grama
kg	kilograma
ml	mililitro
mm	milímetro
μm	micrômetro
m^2	metro quadrado
μg	micrograma
ng	nanograma
pmol	picomol
%	por cento
:	para
V	volt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática das células tronco quanto à origem.....	7
Figura 2.	Representação esquemática das linhagens celulares derivadas da célula tronco mesenquimal do organismo adulto...10	
Figura 3.	Aspectos macro e microscópico da membrana biodegradável. ...23	
Figura 4.	Células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano em cultura.	37
Figura 5.	Aspecto macroscópico do implante do Carreador 1.....	38
Figura 6.	Aspecto macroscópico do implante do carreador 2.	39
Figura 7.	Aspecto histológico do implante do carreador 1 com 3 semanas.....	41
Figura 8.	Aspecto histológico do implante do carreador 1.....	41
Figura 9.	Imunofluorescência indireta + DAPI do implante do carreador 1, com 3 semanas.....	43
Figura 10.	Aspecto histológico do implante do carreador 2 com 3 semanas.....	45
Figura 11.	Aspecto histológico do implante do carreador 2, com 8 semanas.....	45
Figura 12.	Imunofluorescência indireta + DAPI do implante do carreador 2, com 8 semanas.....	47
Figura 13.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR do DNA extraído dos implantes, com 3 semanas	49
Figura 14.	Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR do DNA extraído dos implantes de membrana biodegradável, com 8 semanas.....	50

LISTA LDE TABELAS

TABELA 1 - Filtro empregado para cada marcador fluorescente e cor resultante na imunofluorescência.	30
TABELA 2 - Programa dos ciclos utilizados no termociclador para PCR	33
TABELA 3 - Número dos implantes analisados segundo os grupos experimentais. c/ cels hu - implantados com células humanas.	36

RESUMO

Dietrich, I. *Influência da composição de carreador biodegradável na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 83p.

Perda de tecidos e falência de órgãos constituem, universalmente, os mais freqüentes, devastadores e custosos problemas de saúde pública. O advento da engenharia de tecidos, alicerçada no tripé células de reserva-carreador biodegradável-fatores bioativos, trouxe nova perspectiva para reparação e regeneração tecidual. O objetivo deste estudo foi comparar dois materiais biodegradáveis, já de uso corrente na prática clínica, quanto à propriedade de servirem como carreadores para assegurar a viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano no tecido subcutâneo de camundongos atímicos. Três pacientes submetidas à lipoaspiração doaram, cada uma, 100ml de tecido adiposo, após consentimento informado. As células mesenquimais indiferenciadas foram obtidas por digestão enzimática do tecido adiposo e expandidas em cultura. Células da segunda passagem foram utilizadas nos implantes. Vinte e quatro fêmeas de camundongos atímicos de 10 semanas de vida foram divididas em dois grupos: o grupo I (12 animais) recebeu no tecido subcutâneo da região subescapular direita, implante de membrana de 0,25cm² de ácido glicólico e carbonato de trimetileno semeada com 1 x 10⁶ células; e o grupo II (12 animais) recebeu injeção de 0,2ml de gel de ácido hialurônico reticulado contendo a mesma quantidade de células mesenquimais humanas. Como controle, cada animal recebeu na região contralateral o implante do carreador sem células. Duas horas antes do implante, todos os carreadores, com e sem células, receberam a adição 10ng/ml de fator básico de crescimento fibroblasto (bFGF). Metade de cada grupo de animais foi aleatoriamente escolhida para o sacrifício após 3 semanas de implante, sendo a outra metade sacrificada após 8 semanas. Cinco animais morreram antes da data prevista para o sacrifício e seus implantes foram excluídos do estudo. Após o sacrifício, os implantes foram recuperados e analisados nos seus aspectos macroscópico e histológico. A pesquisa de células humanas com anticorpo anti vimentina humana, e de vasos, com anti corpo anti fator de von Willebrand, foi realizada por meio da imunofluorescência indireta e a pesquisa do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), amplificando um fragmento específico do cromossomo humano 17. Com três semanas de implante, os dois carreadores apresentaram intensa vascularização e a presença de células mesenquimais humanas, foi confirmada pela imunofluorescência e pela PCR. Com 8 semanas, somente no carreador de gel de ácido hialurônico foi possível identificar a presença de células humanas que se encontravam organizadas em cordões, formando um bloco de tecido com rico suprimento vascular. Todos os implantes controles mostraram-se avasculares. No modelo experimental estudado, verificamos que a composição do carreador

influiu na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano, sendo que o gel de ácido hialurônico mostrou ser melhor carreador do que a membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno.

SUMMARY

Dietrich, I. *Influence of scaffold composition in the viability of implantation of human adipose derived undifferentiated mesenchymal cells*. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 83p.

Loss of tissues and organs failure are worldwide the most common, devastating and expensive problems in public health. The advent of tissue engineering, based upon the three-component system reserve cells-biodegradable scaffold-bioactive factors, has brought new prospects to tissue repairing and regeneration. The aim of this study was to compare two biodegradable materials, which have currently been used in clinical practice, to serve as carrier in order to assure the viability of adipose derived undifferentiated mesenchymal cells implanted subcutaneously in athymic mice. Three patients who had undergone liposuction donated, each one, 100ml of adipose tissue, after informed consent. Cells were obtained through enzymatic digestion and tissue centrifugation and then expanded in culture. Cells from the second passage were trypsinized for the implant preparation. Twenty-four ten-weeks old female athymic mice were divided into two groups. In group one, twelve animals received an implant of a 0,25 cm² glycolic acid and trimethylene carbonate membrane which was seeded with 1×10^6 cells. In group two, other twelve animals received an injection of cross-linked hyaluronic acid gel containing the same amount of cells. After anesthesia implants were performed in the subcutaneous tissue of the right subscapular area and, as a control, each animal received the scaffold alone, with no cells, in the contralateral area. Two hours before implant, all scaffolds, including the control ones, received the addition of 10 ng/ml of basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). Half of each animal group was randomized for sacrifice after three weeks and the other half after eight weeks. Five animals died before the settled date for the sacrifice and were excluded. Retaken after sacrifice, implants were studied through macroscopic observation, histological study (hematoxylin-eosin), immunofluorescence (using human antivimentine antibody to identify human cells and anti von Willebrand factor antibody to visualize vessels) and through genomic DNA extraction, amplifying a specific fragment of the 17 human chromosome by polymerase chain reaction (PCR). All the controls showed themselves avascular and negative for human cells identification. After three weeks of implantation the two scaffolds presented intense vascularization and the identification of human cells, not only through immunofluorescence but also by PCR, was positive in both of them. After eight weeks, however, only in the hyaluronic acid gel scaffold human cells could be identified, organized in cords, making up a tissue mass with rich vascular supply. In this model, the scaffold composition influenced the viability of adipose derived undifferentiated mesenchymal cells and hyaluronic acid gel proved to be a better carrier than polyglycolic acid and trimethylene carbonate membrane.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Perda de tecidos e falência de órgãos decorrentes de trauma, ressecções oncológicas, mal formações congênitas, doenças metabólicas, doenças cardiovasculares ou doenças infecciosas, são os mais freqüentes, devastadores e custosos problemas para a administração da saúde pública. Segundo Langer e Vacanti¹, a cada ano, aproximadamente 8 milhões de procedimentos cirúrgicos são realizados nos Estados Unidos para tratar estas afecções, demandando 40 a 90 milhões de diárias hospitalares.

No Brasil, no ano de 2000, as doenças cardiovasculares representaram a primeira causa de óbito² e a terceira de permanência hospitalar prolongada, tendo sido responsáveis pela principal alocação de recursos públicos em hospitalizações, demandando aproximadamente 821 milhões de dólares³.

As doenças cardiovasculares representam, universalmente, um grave problema de saúde pública e estima-se que, em 2001, um terço dos óbitos no mundo, ou seja, 16,6 milhões de mortes, resultaram das várias formas dessa doença. Embora pelo menos 20 milhões de pessoas, felizmente, sobrevivam a infartos e acidentes vasculares cerebrais, a cada ano, muitas delas continuam a depender de atenção clínica dispendiosa, resultante das seqüelas decorrentes da perda tecidual⁴.

A morbi-mortalidade devida a causas externas (quedas, agressões, lesões autoprovocadas, eventos relacionados com transportes e demais

causas) também vem se tornando significativo ônus para as populações de todo o mundo. No Brasil, em 2000, foram realizadas 652.249 internações por causas externas, que representaram 5,2% do total de internações do SUS. No mesmo ano, a reparação das seqüelas e o tratamento das complicações dos acidentes foram responsáveis por 32.855 destas internações⁵.

De acordo com Vacanti e Vacanti⁶, em sua revisão histórica dos avanços da medicina, que culminam com o advento da engenharia de tecidos, a prioridade no tratamento da lesão ou perda tecidual fundamentou-se, inicialmente, na criação de técnicas para salvar a vida. Com o advento da anestesia, em meados do século XIX, passaram a ser realizadas intervenções extirpativas para ressecção de tumores, de segmentos intestinais e amputação de extremidades infectadas, visando a salvar a vida em situações extremas. Contudo, a manutenção da vida sem considerar o impacto psicossocial causado pelo comprometimento da imagem corporal, decorrente de ressecções e amputações, não contempla o conceito abrangente de saúde, como bem estar físico e mental. Assim sendo, como bem observam estes autores, técnicas visando à restauração da função e a reparação tecidual passaram a ser parte integrante da medicina moderna.

As ressecções de tumores da face, pescoço, mamas, ossos, bem como a perda de tecidos por traumas, anomalias congênitas ou alterações decorrentes do envelhecimento levam à deformidades, que alteram o contorno corporal. A reparação destes defeitos ainda constitui grande desafio para os cirurgiões plásticos⁷. As reconstruções com tecido autólogo, utilizando enxertos de pele, retalhos pediculados ou livres, podem implicar

em seqüela estética e/ou funcional da área doadora⁸. Além disso, a viabilidade dos retalhos pode ser afetada por fatores como diabetes e tabagismo, que comprometem o suprimento vascular, podendo levar ao insucesso do procedimento⁹.

Os aloenxertos têm como desvantagem o potencial de desencadear reações imunogênicas e alergênicas e, juntamente com os homoenxertos, representam risco de transmissão viral¹⁰.

Ao longo da história da cirurgia plástica¹¹⁻¹⁴, com o advento da lipoaspiração, a enxertia de tecido adiposo vem sendo tentada para o preenchimento de depressões e o aumento de partes moles. Todavia, os enxertos de gordura autóloga produzem resultados imprevisíveis, dada a alta taxa de absorção do tecido enxertado e a formação de cistos oleosos. Isto ocorre porque os adipócitos são facilmente danificados pelo trauma da lipoaspiração, liberando o conteúdo de seu citoplasma, que é constituído em 80 a 90% por lípidos. Assim sendo, o produto da lipoaspiração contém adipócitos danificados, inviabilizando o método para aplicação clínica¹⁵.

Alternativamente, materiais sintéticos têm sido empregados, a exemplo das próteses de silicone para reconstrução mamária. Entretanto, estes podem promover reação do tipo corpo estranho, infecção, extrusão, ruptura e contratatura capsular, causando dor e deformidade, obrigando, às vezes, à remoção do implante¹⁶⁻¹⁸. Outras substâncias inabsorvíveis como politetrafluoretileno, polietileno e polimetilmetacrilato vêm sendo utilizadas para preencher pequenos volumes, com incidência variável de migração e de complicações acima citadas^{19, 20}. Substâncias absorvíveis, como ácido

hialurônico e colágeno bovino são apenas temporárias, requerendo a repetição periódica do procedimento para a manutenção do resultado. As substâncias alogênicas, como a última citada, podem causar reação alérgica^{21, 22}.

Os avanços da biologia molecular e celular trouxeram conhecimentos sobre o processo de diferenciação celular, a interação entre diferentes tipos celulares, a conexão entre estas e a matriz extracelular e a atuação de fatores bioativos. Estas conquistas permitiram o advento da Engenharia de Tecidos, uma especialidade interdisciplinar, que aplica princípios da engenharia e da biologia para criar substitutos biológicos com a finalidade de restaurar, manter, substituir ou melhorar tecidos ou órgãos danificados¹. Basicamente, a estratégia consiste em implantar uma estrutura constituída por um carreador biodegradável tridimensional contendo células específicas, com capacidade de reconstruir, *in vivo*, o tecido em questão.

O primeiro relato a vislumbrar a aplicação terapêutica da engenharia de tecidos, data de 1975, quando Chick et al²³ reportaram seus resultados com implantes de ilhotas pancreáticas encapsuladas em membranas semipermeáveis, visando a melhorar o controle da glicemia em camundongos diabéticos. Yannas et al²⁴, em 1980, criaram matriz de colágeno e glicosaminoglicanos para auxiliar na regeneração da derme de pacientes queimados. Bell et al²⁵, um ano após, semearam fibroblastos em gel de colágeno para a mesma finalidade.

Young e Lucas²⁶ propuseram um modelo para engenharia de tecidos. Este modelo é baseado num sistema de três componentes estruturais e interdependentes, a saber :

- 1- células de reserva,
- 2- fatores bioativos e
- 3- matrizes ou carreadores biocompatíveis.

Neste modelo, as células e os fatores bioativos podem ser recrutados do próprio receptor, *in vivo*, ou podem ser fornecidos exogenamente. As células podem ainda ser pré-tratadas, *ex vivo*, com fatores bioativos ou modificadas geneticamente. Exemplos de fatores bioativos incluem:

- agentes proliferativos: fator de crescimento derivado de plaquetas;
- agentes que induzem o comprometimento da célula com determinada linhagem: proteína morfogenética de osso, proteína morfogenética de cartilagem, fator de crescimento de queratinócito, fator de crescimento de hepatócito;
- fatores angiogênicos: VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular), bFGF (fator básico de crescimento de fibroblasto);
- fatores indutores da diferenciação celular: insulina, fator de crescimento insulina-like (IGF);
- fatores inibidores da diferenciação celular: fator inibidor de leucemia, fator inibidor de cicatriz.

As células e os fatores bioativos devem ser incorporados à matriz protetora ou carreadora, especialmente se o implante for destinado a um

local com processo inflamatório ativo. O carreador é necessário para evitar que as células e os fatores bioativos sejam destruídos e eliminados da área do implante, antes de exercerem sua ação na reparação tecidual^{26, 27}.

A célula tronco, dada sua pluripotencialidade e ilimitada capacidade de autorenovação, surge como candidata ideal à estratégia da engenharia de tecidos^{28, 29}. Quanto à origem, as células tronco podem ser embrionárias ou provir de tecidos adultos, aqui definidos como pós nascimento (Figura 1).

CÉLULAS TRONCO - ORIGEM

- EMBRIOLÓGICA

- DE TECIDOS ADULTOS {
MEDULA ÓSSEA
OUTROS: tecido muscular, nervoso,
adiposo, etc.

Figura 1. Representação esquemática das células tronco quanto à origem. No organismo adulto, outros tecidos além da medula óssea possuem um reservatório de células tronco.

Segundo Rosenthal et al³⁰, a célula tronco, para assim ser considerada, deve atender aos seguintes critérios:

- exibir ilimitada capacidade de renovação por divisão simétrica;

- possuir capacidade de divisão assimétrica, ou seja, uma das células filhas deve ser capaz de originar células representativas dos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma);
- ser originária de outra célula tronco, seja embrionária ou do organismo adulto.

Células tronco embrionárias, de indubitável pluripotencialidade atestada por vários estudos³¹⁻³³, estão sujeitas a regulamentações éticas que inviabilizam ou em muito dificultam sua obtenção e aplicação clínica.

Células tronco provenientes de organismo adulto, não estão sujeitas a esta restrição e, portanto, permitem estudos de seu potencial terapêutico.

Células tronco da medula óssea de organismo adulto tiveram sua pluripotencialidade demonstrada *in vitro*³⁴⁻³⁶ e *in vivo*. Orlic et al³⁷ sugeriram que, células tronco derivadas da medula óssea, eram capazes de substituir células do músculo cardíaco lesadas após infarto, demonstrando, em camundongos, a melhora da função cardíaca com este procedimento. Embora estes resultados preliminares sejam encorajadores, a aplicação clínica das células tronco da medula óssea apresenta limitações. O processo de obtenção destas células é um método doloroso, com certo grau de morbidade, resultando, a punção medular, em baixo rendimento de células tronco³⁸. Estas limitações levaram à busca de fontes alternativas de células tronco.

Williams et al³⁹ demonstraram que células indiferenciadas isoladas do músculo esquelético também possuem capacidade de diferenciação em osteócitos, condrócitos, adipócitos, além da linhagem muscular. A primeira

tentativa de implante de mioblastos data de 1978, para o tratamento de distrofia muscular de Duchene e, embora os resultados tenham sido promissores, o sucesso da terapêutica foi limitado pela exígua disponibilidade de mioblastos saudáveis⁴⁰⁻⁴².

Rodbell⁴³ foi o primeiro a relatar, em 1964, a separação de células indiferenciadas do tecido adiposo dos adipócitos maduros, utilizando o método enzimático. Em 2001, Zuk et al³⁸ publicaram importante trabalho demonstrando que, *in vitro*, células indiferenciadas provenientes do produto de lipoaspiração eram capazes de se diferenciar na linhagem condrogênica, osteogênica, adipogênica e miogênica, identificando o tecido adiposo como um reservatório de células tronco mesenquimais. Os autores observaram, ainda, que em comparação às células tronco da medula óssea, cujo potencial adipogênico decresce após a terceira passagem, as células pluripotentes do tecido adiposo mantêm seu potencial adipogênico por longo tempo em cultura, ou seja, 15 passagens, o que equivale a 175 dias de cultura. Planat-Bernard⁴⁴ et al, em recente estudo, demonstraram a diferenciação espontânea destas células em cardiomiócitos, expressando marcadores específicos do músculo cardíaco. Safford et al⁴⁵ mostraram a capacidade de diferenciação neurogênica destas células. Rodriguez⁴⁶ et al relataram a diferenciação adipocitária destas células, *in vitro*.

A figura 2 ilustra esquematicamente as linhagens celulares derivadas da célula tronco mesenquimal do organismo adulto.

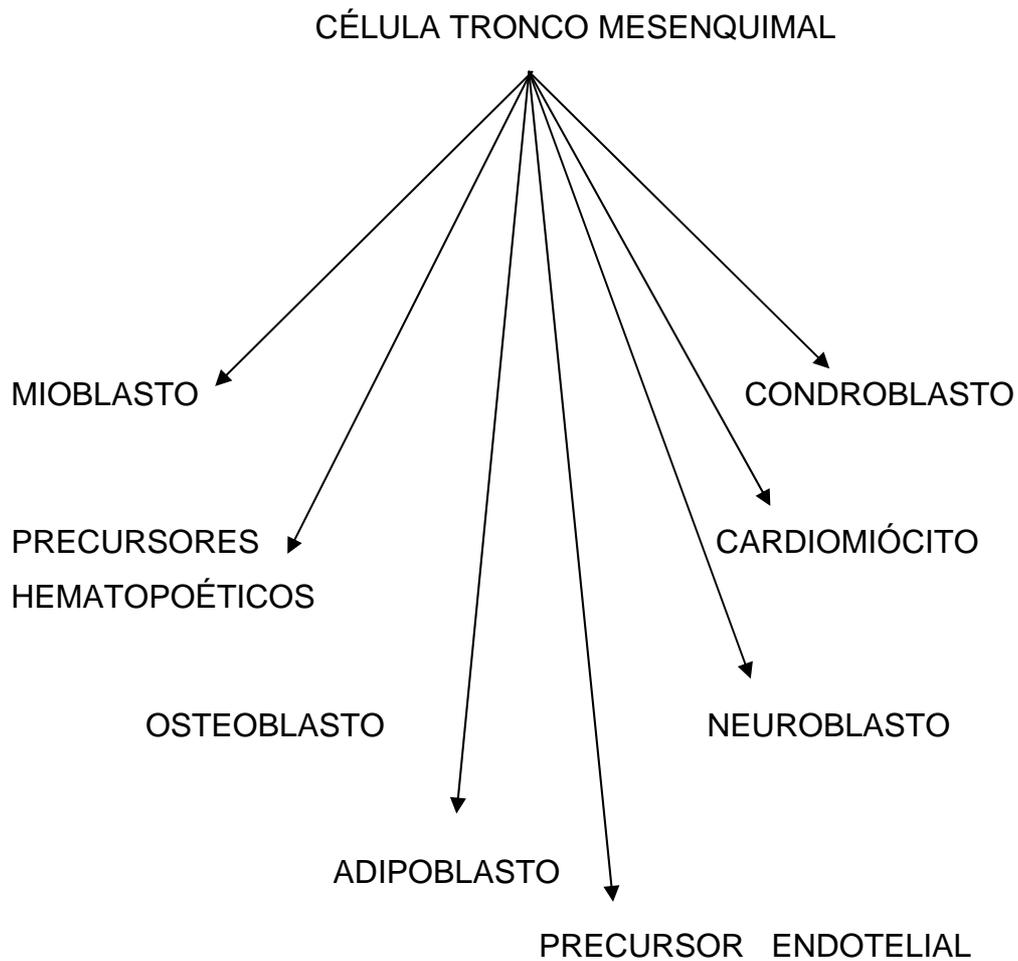


Figura 2. Representação esquemática das linhagens celulares derivadas da célula tronco mesenquimal do organismo adulto.

Embora outros tecidos também contenham células tronco⁴⁷⁻⁴⁹, o tecido adiposo apresenta indiscutíveis vantagens como fonte destas células, pela facilidade de obtenção, baixa morbidade e elevado rendimento^{38,50}. A lipoaspiração de depósitos de gordura subcutânea é técnica largamente utilizada e em pequenos volumes pode ser realizada ambulatoriamente com anestesia local. Mostra-se um procedimento de risco e custo baixos, sendo que a aspiração de pequenos volumes de tecido adiposo subcutâneo, com

técnica adequada, tem baixa morbidade, podendo acrescentar benefício estético. Para obtenção de células indiferenciadas do tecido adiposo, o produto da lipoaspiração é submetido a digestão enzimática e posterior centrifugação, permitindo a separação de uma fração adipocitária sobrenadante e de um precipitado correspondente à fração estroma vascular do tecido adiposo, de acordo com metodologia estabelecida em estudos prévios⁵¹⁻⁵². Esta fração estroma vascular é constituída por uma população heterogênea de células que inclui células endoteliais, células sanguíneas circulantes, células de músculo liso e uma população de células, semelhantes ao fibroblasto, com capacidade pluripotente^{45,53-55}. Enquanto na medula óssea o rendimento é de uma célula tronco para cada 10^5 células estromais⁵⁶, no tecido adiposo é possível se obter de 2 a 3×10^8 células pluripotentes a partir de 300 ml de produto de lipoaspiração, segundo Zuk et al³⁸.

Estudos *in vivo* têm demonstrado a funcionalidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo, revertendo diabetes em camundongos lipoatróficos⁵⁷, melhorando déficits neurológicos quando implantadas no cérebro de ratos com isquemia cerebral⁵⁸ e promovendo a reparação óssea de defeitos da calota craniana de camundongos⁵⁹. O trabalho de Planat-Bernard⁶⁰, publicado este ano, demonstrou a capacidade destas células de se diferenciarem em célula endotelial, melhorando a perfusão tecidual, quando implantadas em área isquêmica de modelo experimental animal. Estes estudos acenam com a perspectiva da aplicação terapêutica destas células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo, no futuro.

Apesar dos resultados encorajadores, o exato mecanismo pelo qual estas células, *in vivo*, promovem a reparação tecidual ainda é controverso. A suposta diferenciação destas células tronco mesenquimais, no tipo celular específico do tecido que se pretende regenerar, foi questionada em dois recentes trabalhos. Murry et al⁶¹ injetaram células tronco da medula óssea de camundongo, portando marcador genético, diretamente no músculo cardíaco lesado do camundongo, não sendo capazes de detectar este marcador após este procedimento. Balsan et al⁶² utilizaram células tronco da medula óssea de camundongo transgênicos, que expressavam proteína fluorescente verde. Os autores observaram raras células fluorescentes 30 dias após a injeção das mesmas no músculo cardíaco lesado de camundongos. Estes dois trabalhos, empregando marcadores genéticos, puderam facilmente rastrear as células injetadas, dispensando a marcação com anticorpos. A utilização de anticorpos para identificação das células injetadas está sujeita à ligação inespecífica dos anticorpos, como sugere Chien⁶³. Este método de identificação gera erro na interpretação dos resultados, apontando a transformação das células tronco da medula óssea em cardiomiócitos, como referido por e Orlic et al³⁷. Chien⁶³ atribuiu a indiscutível melhora na função cardíaca observada após injeção de células tronco no músculo cardíaco lesado, não à diferenciação destas células em cardiomiócitos, mas à capacidade destas células de promoverem a formação de novos vasos na área lesada.

Ao pretendermos reconstruir ou reparar tecidos a partir de células isoladas e expandidas *in vitro*, seria aconselhável implantar estas células

numa estrutura carreadora tridimensional, como propuseram Young e Lucas²⁶. Nesta estrutura as células podem se ancorar e, ao mesmo tempo, se expandir, migrar, interagir e secretar componentes da matriz celular e fatores angiogênicos, que propiciem a organização tecidual e formação de rede vascular.

Vários materiais vêm sendo testados como carreadores para promoção da diferenciação celular e organização tridimensional de tecidos. Entre eles: politerafluoretileno⁶⁴, colágeno⁶⁵⁻⁶⁷, fibrina⁶⁸, polímeros de ácido glicólico^{69, 70}, co-polímeros de ácido polilático e ácido glicólico⁷¹, ácido hialurônico^{72,73} e Matrigel^{74,75}. Os três últimos, brevemente descritos a seguir, são largamente estudados na engenharia de tecidos, sendo o ácido hialurônico e os polímeros ácido glicólico de particular interesse, porque já são empregados cotidianamente na prática médica⁷⁶⁻⁷⁸.

De acordo com Midleton e Tipton⁷⁹, polímeros derivados dos ácidos glicólico e láctico são utilizados em materiais biodegradáveis de uso médico desde a década de 60. Poliglicolídeo é um polímero sintético e constituinte da primeira sutura sintética totalmente biodegradável (Dexon). A fabricação de co-polímeros, utilizando diferentes proporções entre eles permite a manipulação do tempo de absorção, resistência, porosidade e flexibilidade do material. Co-polímeros de glicolídeo e carbonato de trimetileno têm maior flexibilidade e são absorvidos em aproximadamente 7 meses.

Ácido hialurônico é um glicosaminoglicano constituído de unidades alternantes de ácido glicurônico e N-acetilglucosamina. É abundante em todos os tecidos mesodérmicos, no humor vítreo e na gelatina de Wharton do

cordão umbilical. O ácido hialurônico tende a ocupar um volume grande devido à repulsão eletrostática entre os grupos carboxila, formando malhas que retêm uma grande quantidade de água⁸⁰. Na sua forma natural, as longas cadeias de dissacarídeo são altamente solúveis e rapidamente metabolizadas por ação enzimática. A fim de possibilitar a utilização em forma de gel, para preenchimento temporário de sulcos e depressões, as longas moléculas de ácido hialurônico são interligadas, originando o ácido hialurônico reticulado (cross-linked), que possui maior viscosidade e estabilidade⁷⁶.

Matrigel é uma mistura de proteínas de matriz extracelular comercialmente disponível. É obtida de um extrato de membrana basal de sarcoma de Engelbreth-Holm-Swarm de rato e inclui tanto colágeno tipo IV como laminina⁷⁴. Estudos demonstram que Matrigel levou à diferenciação celular⁸¹, induziu a angiogênese⁸² e permitiu a organização tecidual⁸³. Kawaguchi et al⁷⁴, mostraram que a injeção de Matrigel, sem pré adipócitos, suplementado com fator básico de crescimento de fibroblasto (*bFGF*), que é um potente angiogênico, levou a neoformação vascular e subsequente recrutamento de pré adipócitos do animal receptor, gerando blocos de tecido adiposo, que se mantiveram por 10 semanas, no subcutâneo do abdome, tórax e cabeça, na cartilagem auricular e no músculo da perna de ratos. Embora estas propriedades tornem atraente as pesquisas com Matrigel, este produto é um concentrado de proteínas de camundongo, sem possibilidade de aplicação clínica como observam Kimura et al⁸⁴.

Dentre os fatores bioativos, destaca-se o *bFGF*, objeto de vários estudos que investigam sua participação nos processos de reparação tecidual e de

proliferação, migração e diferenciação celular⁸⁵⁻⁸⁷. A atividade biológica do bFGF é mediada pelo proteoglicano heparan sulfato localizado na superfície das células. A ligação de bFGF aos heparan sulfatos estabiliza este componente e impede a sua degradação⁸⁸. Pieper et al⁸⁹ associaram heparan sulfato a matrizes de colágeno que foram supridas com bFGF e demonstraram que quando implantadas no subcutâneo de ratos, estas matrizes mostraram maior vascularização em relação a matrizes contendo apenas heparan sulfato ou apenas bFGF. As matrizes contendo heparan sulfato e bFGF atraíram outras células, gerando novo tecido no local do implante. Esta reação tecidual aos implantes, entretanto, decaiu após 10 semanas.

Akimoto e Hammerman⁹⁰ demonstraram a que adição de bFGF ao meio de cultura, levou a formação de microvasos a partir da aorta de embrião de camundongos, mantida em cultura em condição de hipóxia.

A neorganogênese, definida por Matapurkar et al⁹¹ como a formação de um órgão a partir da proliferação e diferenciação de células tronco mantidas em cultura, representa ainda um enorme desafio para engenharia de tecidos. A reconstrução integral de órgãos complexos como o coração, por exemplo, é limitada pela intrincada arquitetura tridimensional e alta especialização dos diferentes tipos celulares que o compõem. A reconstrução de segmentos lesados deste órgão, entretanto, poderia se beneficiar da estratégia da engenharia de tecidos, apresentando vantagens sobre a terapia celular, como pontua Yannas⁹². Os implantes celulares em carreadores tridimensionais nas áreas do músculo cardíaco lesado poderiam fornecer suporte temporário tanto aos eventuais progenitores locais como às

células implantadas. Além disso, através da engenharia é possível controlar o tamanho, forma, composição e resistência do implante preparado *in vitro*. Por meio da engenharia de tecidos seria possível corrigir defeitos congênitos ou adquiridos, construindo ou reparando partes defeituosas como valvas e grandes vasos da base, como sugerem Leor e Cohen⁹³.

A despeito das atuais limitações, de acordo com Zandonella⁹⁴, a engenharia de tecidos tem um futuro promissor na aplicação clínica. Substitutos dermoepidérmicos concebidos pela engenharia de tecidos (Dermagraft e Allograft) obtiveram a aprovação do FDA (Food and Drug Administration) e são hoje comercializados e cartilagem construída em laboratório esta em fase de testes em ensaios clínicos. Fauza⁹⁵ relata que mais de 70 companhias estão desenvolvendo produtos que aplicam os princípios da engenharia de tecidos. Na área da cardiologia, um dos maiores projetos é o BEAT (BioEngineered Autologous Tissue), desenvolvido na Universidade de Washington, que receberá 10 milhões de dólares durante cinco anos, a partir de 2000, do Instituto Nacional de Saúde, para desenvolver, em laboratório, "patches" de músculo cardíaco para o tratamento da lesão causada no miocárdio pela doença coronariana⁹⁴. As pesquisas que, eventualmente, levarão ao sucesso desta empreitada estarão fundadas na combinação ideal do trinômio que embasa a engenharia de tecidos: células de reserva-carreador biodegradável-fatores bioativos.

A pluripotencialidade das células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo, nos levou a estudar a capacidade de fixação e manutenção destas células no sítio do implante utilizando carreador biodegradável.

2. OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi analisar e comparar dois diferentes carreadores biodegradáveis:

- a membrana de polímero de ácido poliglicólico e carbonato de trimetileno e
- o gel de ácido hialurônico reticulado;

quanto a capacidade de assegurar a viabilidade de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano, implantadas no tecido subcutâneo de camundongos atímicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção das células mesenquimais indiferenciadas humanas

O procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo número 537/01.

As células mesenquimais foram extraídas do tecido adiposo de três pacientes do sexo feminino com idades respectivamente de 43, 33 e 30 anos, todas com índice massa corpórea normal (18,5 a 25 kg/m²), submetidas a lipoaspiração na Clínica Meyerbeer, na cidade de Nice, na França. Todas as doadoras apresentavam provas sorológicas negativas para hepatite tipo B, C e para o vírus da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Foram informadas sobre a metodologia e as finalidades do presente estudo, tendo sido assegurados seus direitos à obtenção, a qualquer momento, de informações pertinentes ao mesmo. Estando esclarecidas e de acordo, as pacientes doaram, cada uma, 100ml do tecido adiposo aspirado.

A lipoaspiração do tecido subcutâneo foi realizada a vácuo, com auxílio de lipoaspirador ou de seringa, após anestesia local, com infiltração de solução de lidocaína a 33% e adrenalina na concentração de 1:200.000.

O tecido aspirado foi assepticamente transferido para recipiente contendo 400ml de solução tampão fosfato refrigerada a 4°C. Imediatamente após, o tecido foi transportado para o Centro de Bioquímica da Universidade de Nice e processado de acordo com método empregado neste Centro - Unité Mixte de Recherche (UMR) 6543⁹⁶.

Na câmara de fluxo laminar, em condições assépticas, o tecido foi, exaustivamente, lavado com solução tampão fosfato até a eliminação do conteúdo sanguíneo visível. O tecido foi, então, submetido à digestão enzimática, em agitação constante, durante 50 minutos, a 37°C, em solução contendo 2ml por grama de tecido de meio de Dubelcco modificado por Eagle (DMEM- Gibco- Cergy Pontoise, França), 2mg/ml de colagenase tipo A (Boehringer), 20mg/ml de albumina sérica bovina, fração 5 (Sigma), penicilina 124µg/ml e streptomcina 100µg/ml (Gibco). Decorrido o tempo de digestão, esta foi interrompida pela adição de volume igual a 10% do total de Soro Fetal Bovino (PAN Biotech Dominique Dutscher Distribution - Brumath, França) previamente inativado por aquecimento em banho-maria a 56 ° C, durante 20 minutos.

A suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos a 200g. O sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado e o precipitado contendo a fração estroma vascular foi ressuspenso em DMEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino. As células presentes na suspensão foram contadas sob microscopio de luz invertido com auxílio de câmara de Thoma. As células foram, então, e semeadas em placas de cultura de 100 mm de diâmetro (CellStar), à razão de $2,5 \times 10^5$ células por placa e cultivadas em

meio DMEM contendo 10 % de Soro Fetal Bovino, suplementado com penicilina 62µg/ml e estreptomicina 50µg/ml e 2,5ng/ml de bFGF recombinante humano (Sigma).

Nos dois dias subseqüentes, cada placa foi cuidadosamente lavada várias vezes com solução tampão fosfato para remover hemácias e outras células não aderentes, antes da substituição do meio. A partir destas primeiras 48 horas, o meio foi trocado a cada dois dias até que as células alcançassem aproximadamente 70% de confluência, quando foram submetidas a tripsinização com 1 ml de solução de tripsina a 0,2% (Gibco). As placas foram mantidas a 37°C por 2 a 3 minutos até que as células se soltassem completamente. A ação da tripsina foi neutralizada pela adição de 10 ml de meio DMEN contendo 10% de Soro Fetal Bovino. As células das placas, re-suspensas e contadas, foram novamente semeadas à razão de $2,5 \times 10^5$ células por placa de 100 mm de diâmetro.

3.2 Preparação dos carreadores biodegradáveis e incorporação das células

Ao alcançarem 70% de confluência, células da segunda passagem foram novamente tripsinizadas, contadas na câmara de Thoma, e incorporadas aos carreadores biodegradáveis, preparados como segue:

Carreador 1 – (Figura 3). Membrana estéril de ácido poliglicólico e carbonato de trimetileno (Gore Resolut Adapt RA 2530).

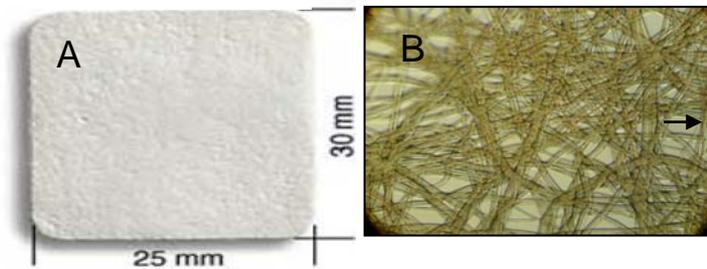


Figura 3. Aspectos macro e microscópico da membrana biodegradável.

A - Macroscopia .**B** - Microscopia. A seta, correspondente a 250μm, marca a distância entre duas fibras.

Em condições estéreis, uma membrana foi cortada em 16 peças de 0,25 cm² cada, que foram embebidas em soro fetal bovino e mantidas por 24 hs em compartimentos individuais de placas de cultura (CellStar). Após 24 horas, o soro fetal bovino foi aspirado de cada compartimento contendo as membranas. A metade delas recebeu 1X10⁶ células mesenquimais da segunda passagem, conforme descrito, suspensas em meio DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino, antibióticos e bFGF nas mesmas concentrações utilizadas para o cultivo. A outra metade, a servir de controle, recebeu apenas o meio de cultura suplementado, sem as células humanas. As membranas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 10% de CO² por 24 horas e, 2 horas antes do implante, todas, inclusive as membranas controles, receberam a adição de 10ng/ml de bFGF.

Carreador 2 – O gel de ácido hialurônico reticulado (Juvederm 30 – Lea Derm Laboratories), rotineiramente utilizado para o preenchimento de rugas e depressões⁸³, é fornecido em seringas de 1ml, contendo 0,6 ml do produto estéril, pronto para injeção subdérmica. Na própria seringa, fornecida pelo fabricante, sob condições estéreis, foi adicionado ao gel, uma suspensão de 0,2ml do meio de cultura suplementado como descrito acima, contendo 4×10^6 de células mesenquimais humanas, de forma que cada 0,2 ml do produto contivesse aproximadamente 1×10^6 células. Noutra seringa contendo 0,6 ml do mesmo gel foi adicionado 0,2ml do meio de cultura, sem células humanas, para servir de controle.

Ambas as seringas foram mantidas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 10% de CO_2 e, 2 horas antes do implante, as duas receberam a adição de 10ng/ml de bFGF.

3.3 Implante dos carreadores

Os experimentos animais foram conduzidos nos Laboratórios do Centro de Bioquímica – CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique) UMR (Unité Mixte de Recherche) 6543- da Universidade de Nice Sophia-Antipolis, na França, atendendo às normas de segurança vigentes no laboratório e às regulamentações da lei francesa de proteção aos animais.

Para o implante dos carreadores utilizamos camundongos atímicos que, dada esta característica, sabidamente não rejeitam xenoimplantes.

Três séries de implantes foram realizadas, condicionadas à disponibilidade de doadores para obtenção e preparação das células humanas. A cada série, foram utilizadas oito fêmeas de camundongos atímicos (Swiss nu/nu) de 10 semanas de vida, perfazendo um total de 24 camundongos.

Em cada série de oito, os camundongos foram divididos em dois grupos e anestesiados, através da injeção intraperitoneal de uma solução contendo ketamina (Imalgene, Merial; 90mg/kg) e xylazina (Rompum, Bayer; 4,5mg/kg).

Em condições assépticas, 30 minutos após anestesia, quatro camundongos receberam o implante subcutâneo da membrana contendo as células humanas na região subescapular direita e o controle, ou seja a membrana sem células, no subcutâneo da região sub escapular esquerda. As membranas foram implantadas através de incisão de 1 cm, interessando pele e subcutâneo, na região subescapular. Após a incisão com bisturi de lâmina 15, foi descolada uma loja subcutânea em direção caudal, através da divulsão com tesoura, suficiente para acomodar o implante. Após inserido o implante, as bordas da incisão foram suturadas com pontos separados, de Vicryl 4-0(Ethicon).

Ainda em condições assépticas, os outros quatro camundongos receberam a injeção de 0,2 ml de gel contendo células humanas no

subcutâneo da região escapular direita e 0,2ml de gel contendo apenas meio de cultura sem células humanas, na região subescapular esquerda.

Após o procedimento, os animais foram mantidos aquecidos até que recuperassem plenamente a mobilidade. Até a data do sacrifício, os animais foram mantidos em alojamentos individuais, em ciclos dia/noite de 12 hs recebendo dieta e água *ad libitum*.

3.4 Sacrifício dos animais e recuperação dos implantes

Aleatoriamente, a metade de cada grupo de animais foi pré-determinada ao sacrifício três semanas após a data do implante e a outra metade foi sacrificada 8 semanas após.

Os animais foram sacrificados por deslocamento vertebral. Na região do dorso foi realizada uma incisão, interessando pele e o tecido subcutâneo, desde a emergência dos membros inferiores até a região cervical. A elevação deste amplo retalho retangular com base inferior permitiu a identificação, dissecação e recuperação dos implantes.

3.5. Análise dos implantes

3.5.1 Análise macroscópica a fresco

Os implantes recuperados foram observados macroscopicamente quanto a coloração, consistência e presença, ou não, de vasos .

Após observação macroscópica, os implantes foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e conservados a -80° C para posterior análise.

3.5.2 Análise histológica e por imunofluorescência indireta

O processamento dos implantes para estudo por meio da histologia e da imunofluorescência indireta e a análise dos mesmos foram realizados no laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de Nice – Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité (U) 597 e no Laboratório de Anatomia Médico-Cirúrgica da Disciplina de Topografia Estrutural Humana da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo - Laboratório de Investigação Médica (LIM) 02.

Os implantes, conservados a -80° C, foram incluídos em tissueTek (Bayer Corporation) e submetidos a cortes de congelação de espessura de $6\mu\text{m}$. Cortes representativos dos implantes foram submetidos a :

- 1- coloração por hematoxilina-eosina e
- 2- imunofluorescência indireta, utilizando como anticorpos primários:

- anticorpo anti vimentina humana para identificar a presença de células humanas nos implantes;
- anticorpo anti fator de von Willebrandt para identificar células endoteliais, avaliando a neovascularização dos implantes.

Para imunofluorescência indireta com anti vimentina humana utilizou-se o anticorpo anti vimentina humana monoclonal de camundongo, clone V9 (Novo Castra Laboratories), porque ele não reage com vimentina de células de camundongo⁹⁷, embora exiba reatividade com várias espécies de mamíferos. Os cortes foram fixados com acetona por 10 minutos a temperatura ambiente e depois incubados por 1 hora, a temperatura ambiente, com bloqueador de IgG do Kit Mouse on Mouse (Kit Vector MOM - AbCys), para atenuar a ligação inespecífica do anticorpo, visto que este e o animal utilizado para os implantes pertenciam à mesma espécie. Na seqüência, os cortes foram incubados por 5 minutos no diluente do Kit MOM por 5 minutos e depois incubados com o anticorpo anti vimentina humana por 30 minutos, na diluição de 1 : 100 . Após lavagem com PBS, os cortes foram incubados com anti mouse IgG ligado a biotina, do kit MOM, por 10 minutos. Lavados novamente, os cortes foram incubados com fluoresceína Avidina DCS (FITC- Vector), na diluição de 1:100, por 15 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, após lavagem, os cortes foram montados com gel (Biomeda) e DAPI (4'-6- Diamino-2-phenylindole – Vectashield, Vector), sendo, o último, utilizado para identificação dos núcleos celulares.

Como controle positivo e negativo da especificidade do anticorpo anti-vimentina humana submetemos, respectivamente, cortes de prepúcio

humano e pele de camundongo ao mesmo processo acima descrito. Ainda, como controle negativo, cortes destes dois tecidos foram submetidos ao protocolo descrito, excluindo o anticorpo primário.

Para Imunofluorescência indireta com anti fator de von Willebrant, utilizamos o anticorpo policlonal de coelho anti fator de von Willebrant humano (Clotimmun – Boehring Institute) na diluição de 1:100. Os cortes foram fixados com acetona e depois de lavados com PBS, incubados por 1 hora à temperatura ambiente, com o anticorpo anti fator de von Willebrant. Depois de lavados, os cortes foram incubados por 1 hora com anticorpo secundário, policlonal de porco anti- coelho, conjugado ao FITC (Polyclonal Swain Anti Rabbit Immunoglobulins/FITC - Dako), na diluição de 1:30, a temperatura ambiente. Seguidos de nova lavagem, os cortes foram, finalmente, montados com gel e DAPI.

Como controle positivo, submetemos cortes de prepúcio humano e pele de camundongo ao protocolo descrito acima e como controle negativo, realizamos o mesmo procedimento excluindo o anticorpo primário.

Nos implantes de gel de ácido hialurônico, por 8 semanas, contendo células humanas, assim como no respectivo controle, realizamos ainda, dupla marcação dos cortes para identificação, concomitante, de células humanas e vasos. Para tanto, seguimos os passos já descritos para marcação com anti vimentina humana e, antes da montagem, realizamos a mesma seqüência descrita para incorporação do anticorpo anti fator de von Willebrant, apenas substituindo o anticorpo secundário por outro, ligado a

um marcador fluorescente vermelho, o Texas Red (Goat Anti Rabbit Immunoglobulin-Texas Red – Molecular Probes), na diluição de 1: 1000.

Os cortes foram examinados sob microscópio Zeiss Axiophot, equipado com lâmpada de mercúrio, com filtros para diferentes comprimentos de onda, câmera de vídeo para aquisição da imagem e processador de imagem LEICA Q55CW Cytogenetics Workstation.

A tabela 1 enumera os filtros utilizados para os respectivos marcadores fluorescentes.

TABELA 1 -Filtro empregado para cada marcador fluorescente e cor resultante na imunofluorescência.

FLUORÓFORO	FILTRO	BANDA DE EXCITAÇÃO	COR
DAPI	A	340-380 UV	Azul
FITC	L4	450-490 Azul	Verde
TEXAS RED	TX	530-595 vermelho	Vermelho

3.5.3 Extração, quantificação e amplificação do DNA genômico

Exemplares da segunda série foram destinados a extração do DNA genômico, utilizando o kit TRI-REAGENT (Euromedex, França), de acordo com o protocolo especificado no produto, descrito a seguir.

Os implantes foram homogeneizados, utilizando a proporção de um 1ml de TRI reagente para 50 a 100 mg de tecido, com o auxílio de homogeneizador elétrico. O homogeneizado foi mantido, por 5 minutos, à

temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo protéicos. A seguir foram adicionados 0.2ml de clorofórmio para cada ml de TRI Reagent e a mistura foi vigorosamente agitada por 15 segundos. A mistura resultante ficou em repouso por 15 minutos e a seguir foi centrifugada a 12000g, por 15 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, a mistura encontrou-se separada numa fase inferior avermelhada, correspondente ao fenol-clorofórmio, numa fase intermediária e numa fase aquosa, superior e incolor. O DNA e proteínas estavam contidos nas duas fases inferiores.

A fase aquosa foi removida e o DNA das fases intermediária e inferior foi precipitado pela adição de 0,3ml de etanol a 100%, para cada 1 ml de TRI REAGENT usado na fase inicial de homogeneização. Após 3 minutos a temperatura ambiente, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 2000 g por 5 minutos, a 4°C.

O sobrenadante correspondente ao etanol-fenol contendo as proteínas foi removido e o DNA foi lavado, por 30 minutos, em uma solução 0,1M de citrato de sódio em etanol a 10%, em agitação periódica, seguido de centrifugação a 2000g, por 5 minutos, a 25°C. O procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido uma segunda vez. O DNA precipitado resultante foi ressuspenso em etanol a 75% (2ml de etanol 75% para cada ml de TRI REAGENT), mantido por 20 minutos à temperatura ambiente, com agitação periódica e finalmente centrifugado a 2000g, por 5 minutos, a 25°C. Este processo de lavagem removeu a coloração rosada do DNA precipitado.

O etanol sobrenadante foi removido e os tubos com DNA precipitado foram mantidos abertos por 5 minutos, à temperatura ambiente, para permitir a secagem. O DNA precipitado foi então dissolvido em uma solução 8mM de NaOH (0.6ml para cada 50 a 70 gr de tecido inicial). A utilização desta solução alcalina garantiu a total solubilização do DNA obtido. Para remover o material insolúvel ainda contido na preparação (fragmentos de membrana, por exemplo), o material foi centrifugado novamente e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para novos tubos e guardado em geladeira a 8 – 10 °C.

Células humanas mantidas em cultura e tecido de camundongo serviram como controle positivo e negativo, respectivamente, e foram submetidos a extração do DNA genômico, com o mesmo kit TRI REAGENT, seguindo o protocolo recomendado pelo produto, descrito acima.

Após a extração, alíquotas do material genômico foram diluídas em água ultrapura na razão de 1:1000 e quantificadas através de Densidade Ótica(OD) em espectrofotômetro BIO-TEK (Scientific Instruments), sob comprimento de onda de 260nm a 280nm. A razão entre os valores obtidos da leitura nos comprimentos 260nm e 280nm (OD_{260} / OD_{280}) forneceu uma estimativa da pureza do DNA, variando entre 1,8 e 2,0.

A seguir, foi realizada a amplificação de um fragmento de 850 pares de bases da região alfa, satélite do centrômero do cromossomo 17, específico humano, através da Reação em Cadeia da Polimerase. Para tanto, utilizou-se os seguintes Iniciadores (Invitrogen) :

- Senso(Forward) : GGA TAA TTT CAG CTG ACT AAA CAG;
- Anti-Senso (Reverse): T TCC GTT TAG TTA GGT GCA GTT GTT ATC.

As posições destes nucleotídeos correspondem à seqüência HSSATA17 (Gen Bank No. M13882).

Para cada reação da PCR preparamos, sobre gelo, a seguinte solução de dNTPs (deoxirribonucleotídeos trifosfato - Invitrogen): 0,4U dATP(deoxiadenosina 5'trifosfato); 0,4U dCTP (deoxicitosina 5'trifosfato); 0,4U dGTP (deoxiguanosina 5'trifosfato); 0,4U dTTP (deoxitimidina 5'trifosfato); tampão (Invitrogen) 10X, iniciador sense (forward) 10pmol, iniciador anti sense (reverse) 10pmol, 5U de Taq polimerase (DNA polimerase da bactéria aquática *Thermus aquaticus*), 100ng/ml de DNA template (DNA a ser amplificado) e água destilada ultra pura completar 25µl.

A seguir, o microtubo contendo a mistura foi inserido no aparelho termociclador BIOMETRA T3 THERMOCYCLER (BIOLABO Scientific Instruments), programado de acordo com a tabela 2.

TABELA 2 - Programa dos ciclos utilizados no termociclador para PCR

TEMPERATURA	TEMPO	NÚMERO DE CICLOS
94°C	10 MINUTOS	1
94°C	20 SEGUNDOS	35
60°C	30 SEGUNDOS	35
72°C	50 SEGUNDOS	35
72°C	10 MINUTOS	1

Após os ciclos seriados, o termociclador foi resfriado e mantido a 4° C. Em seguida o produto da amplificação pela PCR foi armazenado em geladeira entre 8° e 10° C.

A efetividade da PCR foi avaliada visualmente pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Para tanto, uma amostra do produto de PCR de DNA obtido de controles, ou seja, células humanas e tecido de camundongo, foi aplicado em gel de agarose a 2% e submetida a eletroforese por 40 minutos em corrente de 80V. Após o tempo de corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas foram evidenciadas sob luz ultravioleta, através do transiluminador (EDAS 290 – Kodak), visando a verificar o sucesso da reação. Uma vez constatado o padrão técnico necessário, as demais amostras foram submetidas ao mesmo método.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

Do total de 24 animais, 5 morreram. Esta mortalidade foi atribuída a maior suscetibilidade desta espécie não só a infecções, mas também a variações de temperatura, o que reduz a sua sobrevivência⁹⁸. Estes animais foram excluídos do estudo, resultando num total de 19 implantes e seus respectivos controles analisados, pertencentes aos grupos experimentais, conforme indicado na Tabela 3.

TABELA 3 - Número dos implantes analisados segundo os grupos experimentais. c/ cels hu - implantados com células humanas.

TIPO DE CARREADOR	MEMBRANA DE ÁCIDO GLICÓLICO E CARBONATO DE TRIMETILENO		GEL DE ÁCIDO HIALURÔNICO RETICULADO	
	3 SEMANAS	8 SEMANAS	3 SEMANAS	8 SEMANAS
TEMPO DE IMPLANTE	3 SEMANAS	8 SEMANAS	3 SEMANAS	8 SEMANAS
NÚMERO DE IMPLANTES ANALISADOS	5 c/cels hu 5 controles	5 c/ cels hu 5 controles	5 c/ cels hu 5 controles	4 c/cels hu 4 controles

4.1 Caracterização citológica das células mesenquimais indiferenciadas humanas

Obtivemos $15 \text{ a } 20 \times 10^6$ células a partir da digestão enzimática seguida de centrifugação de 100 ml de tecido adiposo. As células

apresentaram, em cultura, morfologia semelhante a do fibroblasto, característica de célula mesenquimal.(Figura 4)

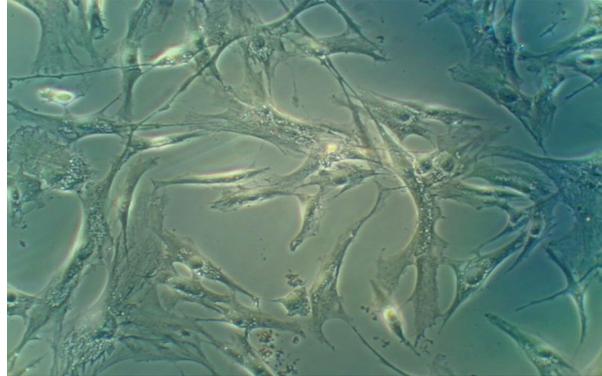


Figura 4. Células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano em cultura. Microscopia de contraste de fase. Magnificação 200 X. Observar o aspecto alongado das células, característico das células mesenquimais.

4.2 Análise macroscópica dos implantes a fresco

4.2.1 Carreador 1: membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno

Com três semanas de implante, as membranas de ácido glicólico e carbonato de trimetileno semeadas com as células humanas mostraram-se ricamente vascularizadas (Figuras 5A e 5B), enquanto que os controles, tanto com 3 como com 8 semanas, mostraram-se avasculares (Figura 5C). Com 8 semanas, os implantes contendo células humanas não mais exibiram a exuberante neovascularização e apenas alguns vasos na periferia foram observados (Figura 5D). Estes implantes apresentaram aspecto semelhante aos implantes controles.

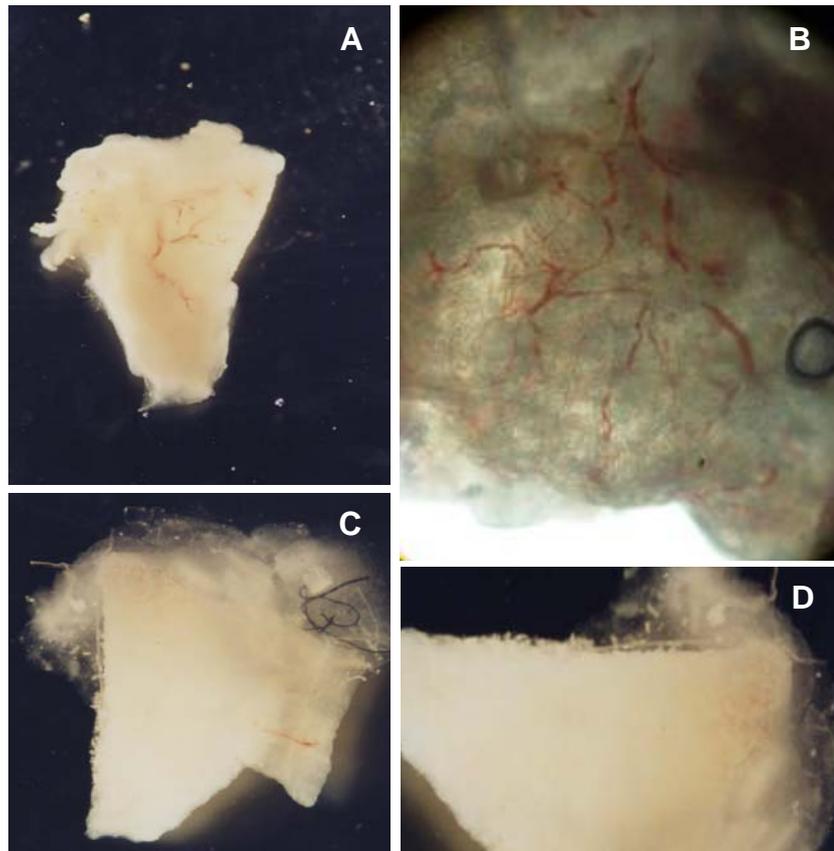


Figura 5. Aspecto macroscópico do implante do Carreador 1.

A. Carreador com células humanas com 3 semanas de implante. **B.** Detalhe da vascularização do carreador 1 com células humanas com 3 semanas de implante. Magnificação 20X. **C.** Carreador 1 com células humanas com 8 semanas de implante. Notar ausência de vascularização. **D.** Controle: Carreador 1 sem células humanas, com 3 semanas de implante.

4.2.2 Carreador 2 - Gel de Ácido Hialurônico

Os implantes de gel contendo células humanas, tanto após 3 (Figura 6A) como após 8 semanas, mostraram-se vascularizados, enquanto os controles permaneceram transparentes e avasculares (Figuras 6B e 6D). Com 8 semanas, os implantes de ácido hialurônico puderam ser facilmente identificados como um tumor sob o tecido subcutâneo dos camundongos,

apresentando consistência fibroelástica, enquanto os controles não eram palpáveis nem tão pouco visíveis (Figura 6C).

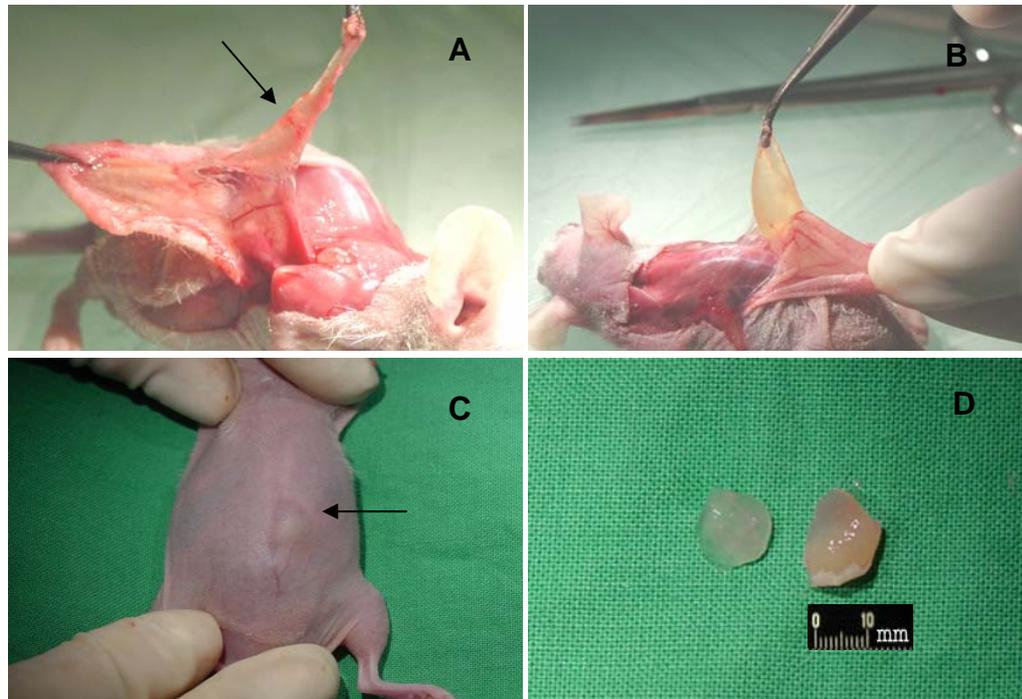


Figura 6. Aspecto macroscópico do implante do carreador 2.

A. Gel de ácido hialurônico com células humanas com 3 semanas de implante. Observar vasos no centro do implante (seta). **B.** Gel de ácido hialurônico sem células humanas, transparente e avascular com 3 semanas de implante. **C.** A seta indica tumor subcutâneo correspondente ao gel de ácido hialurônico com células humanas com 8 semanas de implante. **D.** Implantes com 8 semanas. À direita o gel de ácido hialurônico com células humanas, mostrando-se mais denso e opacificado e à esquerda o controle, gel sem células humanas, totalmente transparente.

4.3 Análise histológica e por imunofluorescência indireta

4.3.1 Carreador 1: membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno

Com 3 semanas após implante, o estudo dos cortes corados pela hematoxilina-eosina mostrou, no tecido subcutâneo, a membrana envolvida e entremeada por células (Figura 7). Nos controles, as fibras da membrana estavam envolvidas por células de núcleo volumoso, com variação da forma e citoplasma claro, sugestivo de macrófagos (Figura 8A). Nos implantes contendo células humanas, além das células descritas acima, notamos a presença de células alongadas, e morfologia semelhante ao fibroblasto, podendo constituir células mesenquimais indiferenciadas (Figura 8B).

Com 8 semanas de implante, foi possível notar o início da desintegração da membrana. As fibras da membrana, embora ainda presentes, se apresentavam rompidas e por vezes distribuídas desordenadamente. Nos controles (Figura 8C) observamos pequena quantidade de células alongadas entre as fibras da membrana, principalmente junto à fáscia muscular, representando, provavelmente, fibroblastos do camundongo. Na membrana que recebeu células humanas, também notamos pequena celularidade, que se concentrou junto à fáscia muscular (Figura 8D).

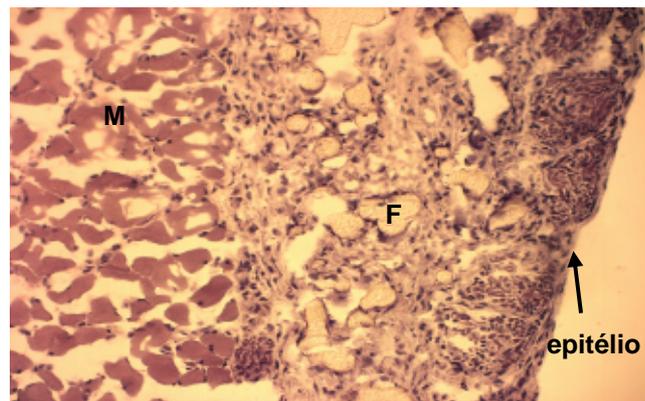


Figura 7. Aspecto histológico do implante do carreador 1 com 3 semanas.

Notar as fibras da membrana (F), implantadas abaixo do epitélio e sobre o músculo (M). Coloração por hematoxilina-eosina. Magnificação: 100X.

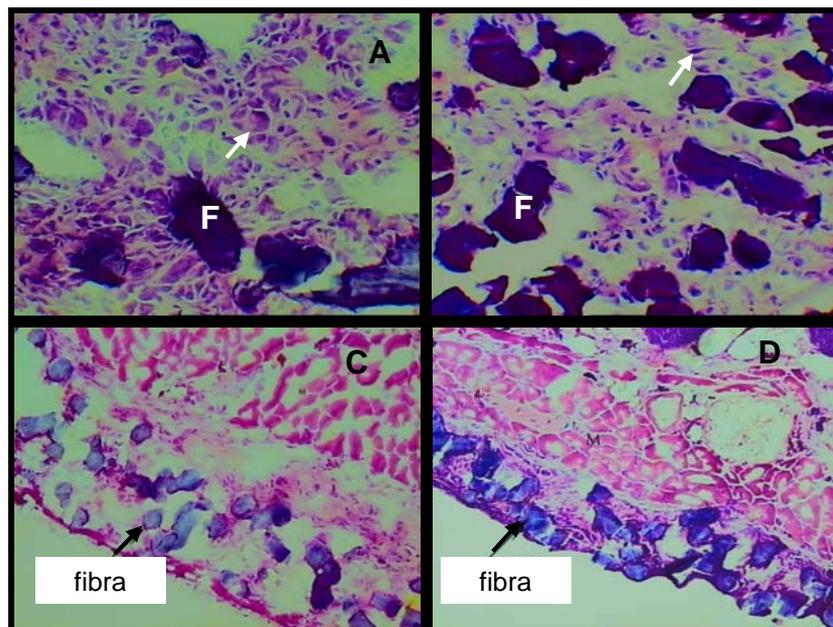


Figura 8. Aspecto histológico do implante do carreador 1.

A. Controle, membrana sem células humanas com 3 semanas de implante. A seta indica células de núcleo volumoso, sugestivas de macrófagos. **B.** Membrana com células humanas com 3 semanas de implante. A seta indica células alongadas sugestivas de células mesenquimais. **C.** Controle, membrana sem células humanas com 8 semanas de implante. **D.** Membrana com células humanas com 8 semanas de implante. Hematoxilina-eosina. F- fibra da membrana. A e B magnificação: 200X. C e D: magnificação 100X. M= músculo.

A análise das membranas com células humanas com 3 semanas de implante, através da imunofluorescência com anticorpo anti fator de von Willbrant, mostrou a presença de células endoteliais constituindo numerosos vasos entre as fibras da membrana (Figura 9A). Nos controles, observou-se esparsas células endoteliais na periferia do implante (Figura 9B), correspondendo aos vasos observados à macroscopia.

Nos implantes com três semanas, semeados com células humanas, o estudo dos cortes por imunofluorescência com os anticorpos anti vimentina humana revelou um padrão de marcação filamentar, característico da vimentina, confirmando a presença de células humanas entre as fibras da membrana (Figura 9C). Nos controles, o padrão filamentar estava ausente, e observou-se uma marcação inespecífica, principalmente em torno das fibras da membrana (Figura 9D).

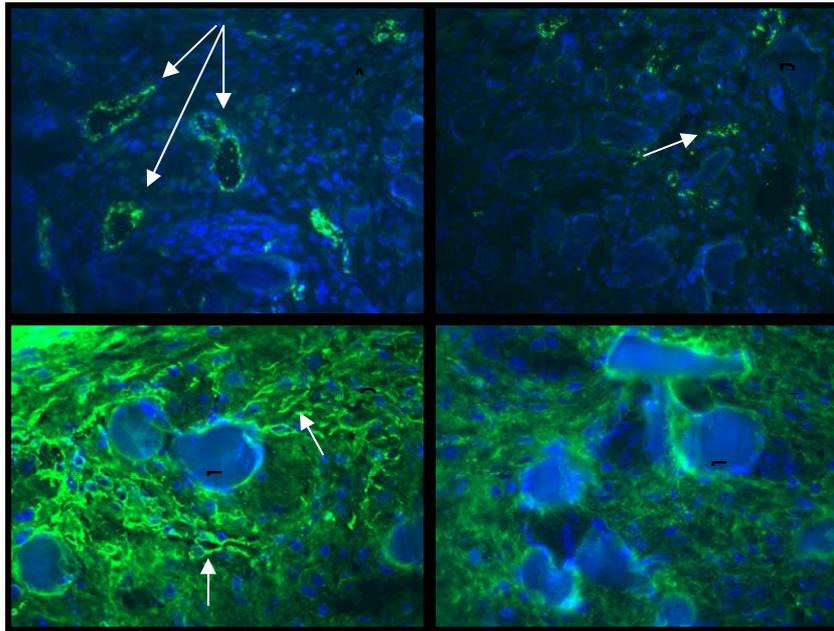


Figura 9. Imunofluorescência indireta + DAPI do implante do carreador 1, com 3 semanas.

A. Membrana com células humanas. Notar numerosos vasos (flechas) identificados pelo anticorpo anti fator de von Willebrant-FITC. **B.** Controle: membrana sem células humanas .Notar células endoteliais em agrupamentos menores (flecha), identificadas pelo anticorpo anti fator de von Willebrant-FITC, na periferia do implante, que está representada no quadrante superior direito. **C.** Membrana com células humanas. Notar o padrão filamental característico da vimentina (flechas), identificada pelo anticorpo anti vimentina humana-FITC. F- fibra da membrana. **D.** Controle: membrana sem células humanas. Notar a ausência do padrão filamental característico da vimentina. A e B magnificação: 200X. C e D magnificação: 400X

Após 8 semanas, tanto nos controles como nas membranas com células humanas, o padrão filamental característico da vimentina não foi identificado através da imunofluorescência com anticorpo anti vimentina humana. Os implantes examinados mostraram o mesmo padrão ilustrado na figura 9D, indicando que as células humanas não mais estavam presentes nos implantes. A imunofluorescência com anticorpo anti fator de von Willebrant identificou apenas raros e pequenos vasos, gerando resultados semelhantes ao ilustrado pela Figura 9B.

4.3.2 Carreador 2: Gel de ácido hialurônico reticulado

A análise dos cortes dos implantes corados pela hematoxilina-eosina mostrou resultados semelhantes tanto com 3 como com 8 semanas.

O gel implantado ficou localizado abaixo da derme e acima do tecido muscular, apresentando uma fina pseudocápsula fibrosa na sua periferia.

Nos implantes controle foi possível identificar células fusiformes invadindo o material amorfo do gel, sendo esta celularidade mais evidente próxima à pseudocápsula que envolvia o gel, diminuindo em direção ao centro do implante (Figuras 10 e 11A).

Nos implantes de ácido hialurônico contendo células humanas, observamos uma distribuição uniforme de cordões celulares em toda extensão do implante (Figura 11B), circundado pela mesma pseudocápsula.

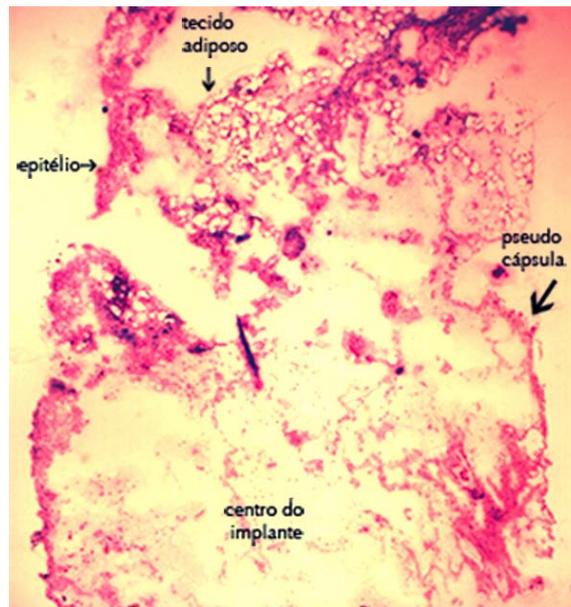


Figura 10. Aspecto histológico do implante do carreador 2 com 3 semanas.

Controle, gel de ácido hialurônico sem células humanas. Notar pseudocápsula que separa o gel de ácido hialurônico dos tecidos do camundongo. Observar a diminuição da celularidade em direção ao centro do implante. Hematoxiliana-eosina. Magnificação: 40 X.

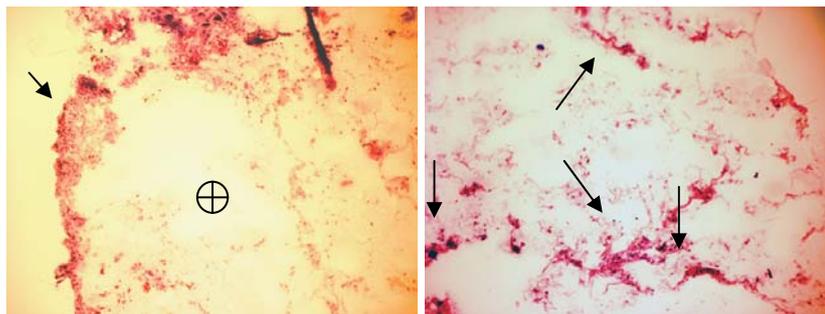


Figura 11. Aspecto histológico do implante do carreador 2, com 8 semanas.

Hematoxilina-eosina **A.** Controle, gel de ácido hialurônico sem células humanas. Notar a região central do gel, identificada pelo símbolo \oplus , ocupada por material amorfo. A seta indica o epitélio. Magnificação 100X. **B.** Gel de ácido hialurônico com células humanas. Região central do implante. Notar os cordões de células indicados pelas setas. Magnificação 200X.

A imunofluorescência para o anticorpo anti-vimentina humana foi positiva nos implantes de gel (carreador 2) com células humanas tanto com 3 quanto com 8 semanas de implante e negativa em todos os controles. O padrão de marcação foi intenso e nitidamente filamentar nos implantes que continham células humanas e absolutamente ausente nos controles, como ilustram as figuras 12A e 12B.

Nos implantes contendo células humanas com 3 e também com 8 semanas, o anticorpo anti fator von Willebrant mostrou, através da imunofluorescência, a presença de células endoteliais constituintes de vasos maiores na periferia (Figura 12C) e de vasos menores na região central do implante (Figura 12E). Este quadro corresponde à rica rede vascular observada à macroscopia. Nos implantes controle observamos raras células endoteliais marcadas (Figura 12D).

A dupla marcação dos cortes dos implantes com 8 semanas contendo células humanas, com anticorpo anti-vimentina humana-FITC e anti Fator de von Willebrant- Texas Red, revelou, através da superposição das imagens obtidas pela imunofluorescência, a presença de células endoteliais no mesmo sítio marcado pela vimentina, como ilustra a Figura 12F.

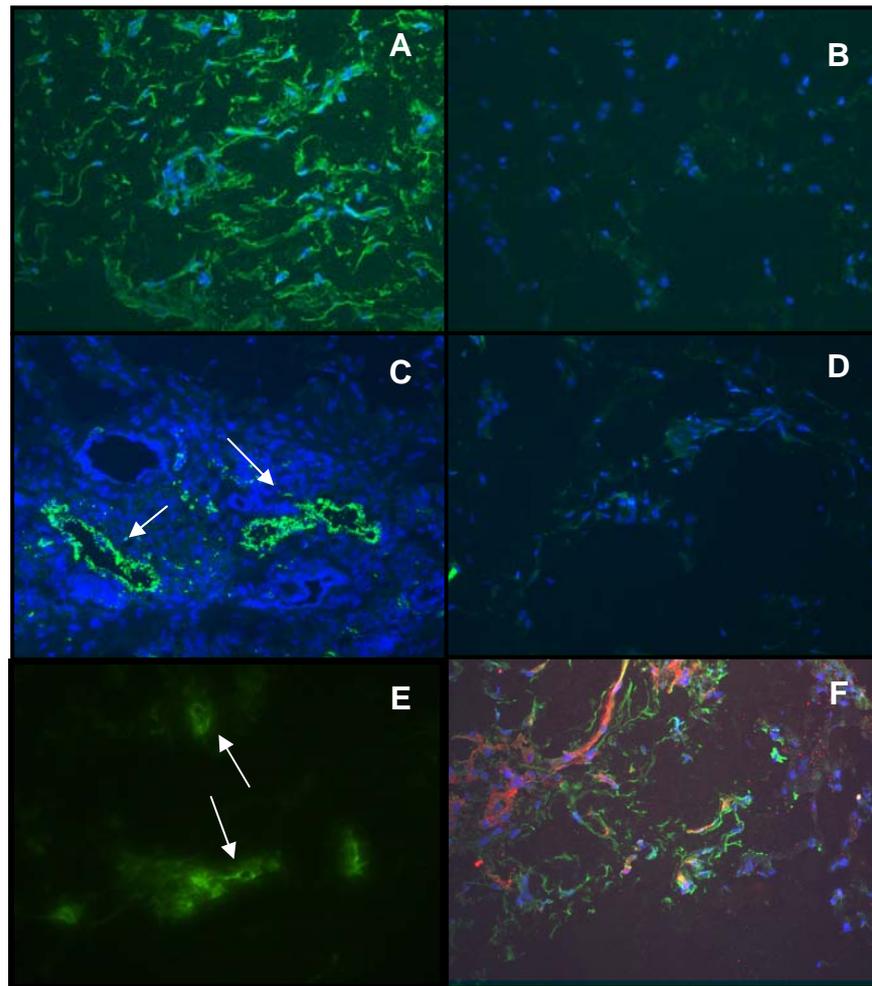


Figura 12. Imunofluorescência indireta + DAPI do implante do carreador 2, com 8 semanas.

A. Gel de ácido hialurônico com células humanas .Notar a rica distribuição do padrão filamentar identificando células humanas pelo anticorpo anti-vimentina humana FITC e ausência de marcação no controle (gel de ácido hialurônico sem células humanas) ilustrado em **B.** A e B magnificação: 400 X. **C.** Gel de ácido hialurônico com células humanas. Periferia do implante. Notar vasos de maior calibre, evidenciados pelo anticorpo anti fator de von Willebrant-FITC .**D.** Controle, gel de ácido hialurônico sem células humanas. Notar a ausência de vasos. **E.** Gel de ácido hialurônico com células humanas. Região central do implante. Notar vasos de menor calibre evidenciados pelo anticorpo anti fator de von Willebrant-FITC, sem DAPI. C, D e E: magnificação 200X. **F.** Gel de ácido hialurônico com células humanas. Dupla marcação: anticorpo anti-vimentina-FITC e anticorpo anti fator de von Willebrant-Texas Red. Notar a presença de células endoteliais, em vermelho, nas mesmas regiões positivas para células humanas, em verde. Magnificação: 400X.

4.4 Verificação da presença de DNA humano nos Implantes

A marcação inespecífica observada na análise dos implantes do carreador 1, marcados com o anticorpo anti vimentina humana, nos levou a destinar exemplares da segunda série destes implantes, um com 3 e outro com 8 semanas, bem como seus respectivos controles, para extração do DNA genômico. Incluímos um exemplar do carreador 2 com 3 semanas de implante e seu respectivo controle, para reforçar o resultado obtido pela imunofluorescência.

A extração do DNA dos implantes com três semanas resultou nas seguintes quantidades de DNA:

- carreador 1 - membrana biodegradável com células humanas: 24 μ g
- controle 1 - membrana biodegradável sem células humanas: 90 μ g
- carreador 2 – gel de ácido hialurônico com células humanas: 35 μ g
- controle 2 – gel de ácido hialurônico sem células humanas: 28 μ g

A amplificação de um fragmento de 850 pares de base, específico do cromossomo humano 17, a partir de DNA genômico extraído dos implantes, confirmou a presença do material genético humano em ambos carreadores com células humanas com 3 semanas de implante. Nos implantes de ambos os carreadores sem células humanas observou-se a ausência de material genético humano.

A eletroforese do material amplificado, em gel de agarose, revelou a presença de uma banda correspondente ao fragmento de 850 pares de

bases, semelhante à banda expressa pelo controle positivo, ou seja, células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano cultivadas, *in vitro*, como ilustra a Figura 13.

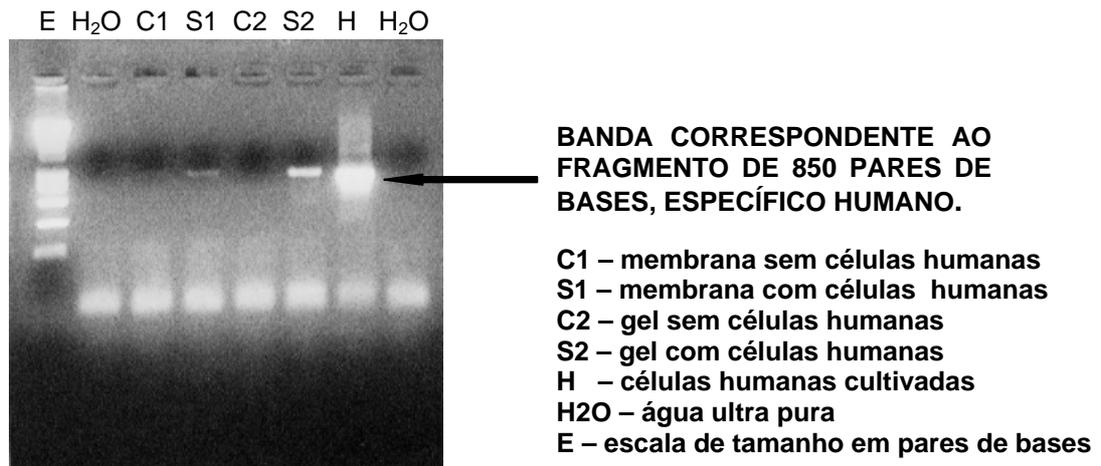


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR do DNA extraído dos implantes, com 3 semanas.

Notar bandas correspondentes ao fragmento de 850 pares de bases, nos dois carreadores, S1 e S2 e nas células humanas cultivadas (H).

Dos implantes com 8 semanas de membrana biodegradável, com e sem células humanas, foram extraídos, respectivamente, 130ng e 150ng de DNA.

A amplificação do mesmo fragmento do cromossomo humano 17, seguida da eletroforese em gel de agarose, não mostrou material genético humano nos implantes de membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno com 8 semanas, confirmando os achados da imunofluorescência que, revelou marcação inespecífica, ou seja, não revelou o padrão filamentar característico da vimentina nestes implantes (Figura 14).

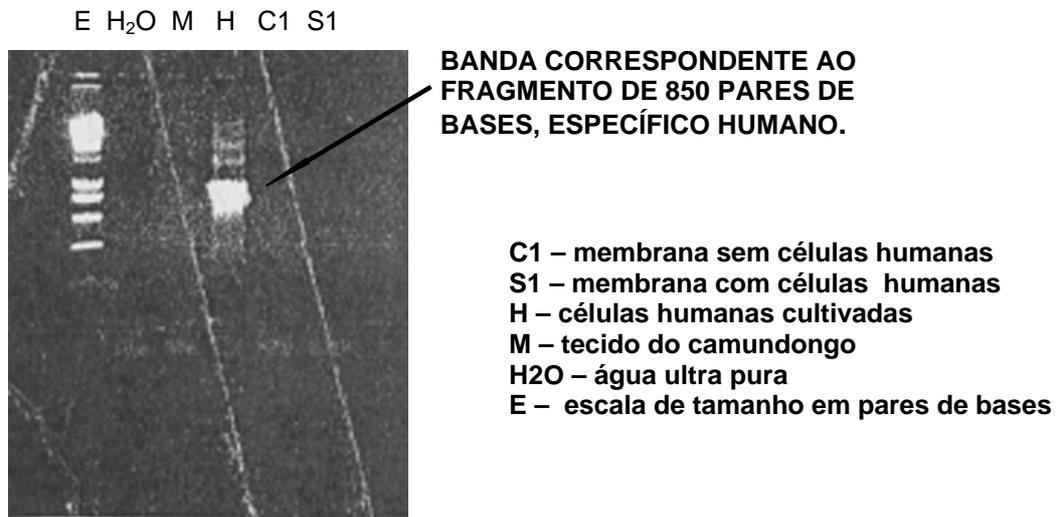


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR do DNA extraído dos implantes de membrana biodegradável, com 8 semanas.

Notar ausência das bandas correspondentes ao fragmento de 850 pares de bases, na membrana com células (S1), na membrana controle (C1) bem como no tecido do camundongo (M). Presença da banda com 850 pares de bases no produto da PCR de DNA genômico de células humanas cultivadas (H).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O processo de digestão enzimática e centrifugação do produto da lipoaspiração do tecido adiposo humano mostrou-se adequado para obtenção de células mesenquimais indiferenciadas. Em nosso estudo, obtivemos um rendimento de 15 a 20×10^6 células mesenquimais indiferenciadas a partir de 100 ml de tecido adiposo lipoaspirado. Zuk et al³⁸ relataram a obtenção de 6,6 a 10×10^7 células mesenquimais indiferenciadas a partir de 100 ml de tecido adiposo. Variações metodológicas podem influir no rendimento e devem ser ponderadas. Assim, consideramos o tempo de digestão enzimática bem como a variação individual relativa à diversidade biológica, como possíveis determinantes desta diferença, em concordância com Aust et al⁹⁹ e Sen et al¹⁰⁰. Estes autores relataram diferenças no rendimento e no potencial adipogênico de células indiferenciadas do tecido adiposo, oriundas de múltiplos doadores.

As células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo se assemelham às células tronco da medula óssea, pelo perfil de marcadores de superfície, pela manutenção da taxa de duplicação após inúmeras passagens *in vitro* e por conservar seu potencial de diferenciação em diversos tipos celulares¹⁰¹. Entretanto, elas não preenchem plenamente todos os critérios de definição das células tronco, enumerados por Rosenthal et al³⁰. Entre eles, a ilimitada capacidade de renovação. Por esta razão, preferimos nomear estas células de *células indiferenciadas do tecido*

adiposo em contraposição a denominação de *células tronco do tecido adiposo*, ainda que esta última seja utilizada em diversas publicações que versam sobre o tema^{38,53,102}. Segundo de Ugarte et al¹⁰³⁻¹⁰⁴, as células originárias do tecido adiposo representam uma população diferenciada de células tronco mesenquimais, quanto à expressão de marcadores de superfície.

Chiu¹⁰⁵ pontua que não existem marcadores universalmente aceitos para células tronco. A classificação das subpopulações celulares depende das condições experimentais empregadas, dos marcadores selecionados, assim como do método utilizado para separação das células. Em decorrência deste fato, é muito difícil comparar resultados de um investigador para outro. Ainda assim, a nosso ver, a contribuição de cada autor permite construir um painel de marcadores de superfície para estas células, fornecendo valiosas informações sobre a capacidade de interação destas com o meio extracelular e com outros tipos celulares.

Assim sendo, em estudo recente, não publicado, analisamos por citometria de fluxo o perfil de expressão de alguns marcadores de superfície de células mesenquimais indiferenciadas, extraídas de produto de lipoaspiração do tecido adiposo (Apêndice). Os resultados preliminares deste estudo revelam que estas células são de origem mesenquimal (CD90/+) e não pertencem à linhagem hematopoiética (HLADR/-, CD14/-, CD34/-, CD45/-, CD51/61/-, KDR/-). Elas têm capacidade de interação com a matriz extracelular por expressarem moléculas para mediação da ação de metaloproteases (CD 13/+), de adesão à fibronectina (CD29/+, CD49e/+) e

ao ácido hialurônico (CD 44/+). Estas células expressaram ainda moléculas de superfície responsáveis pela adesão célula-célula (CD54/+) e moléculas de interação com células endoteliais (CD29/+), mas não apresentam marcadores específicos destas, como receptor para quinase (KDR/-), para atuação de VEGF.

Estes resultados preliminares vem auxiliar na compreensão de alguns aspectos do “comportamento” destas células, quando foram implantadas juntamente com carreadores biodegradáveis, objeto do presente estudo.

Hansbrough et al¹⁰⁶ e Boyce et al¹⁰⁷ também empregaram os polímeros de ácido poliglicólico em modelos experimentais, porém utilizando outros tipos celulares para o desenvolvimento de substitutos de pele. Patrick et al⁶⁹, empregando o mesmo tipo de células por nós estudado, tentaram criar de “blocos” de tecido adiposo, utilizando estes polímeros como carreadores. Entretanto, no modelo experimental utilizado por estes autores, o tecido adiposo neoformado não se manteve ao longo do tempo.

Testamos o polímero de ácido poliglicólico associado ao carbonato de trimetileno, porque este material é preconizado para uso clínico, sendo indicado para correção de defeitos ósseos alveolares¹⁰⁸, fazendo-nos, inicialmente, supor que este carreador poderia fornecer suporte biocompatível para as células indiferenciadas do tecido adiposo. Entretanto, verificamos que as membranas de ácido glicólico e carbonato de trimetileno, semeadas com células mesenquimais indiferenciadas humanas, continham estas células apenas até 3 semanas de implante. Nos implantes com 8 semanas não foi detectada a presença de células mesenquimais humanas,

sugerindo que tenha ocorrido morte celular, no intervalo entre a 3^a e 8^a semanas, a despeito da vascularização observada nestes implantes com 3 semanas. Estes dados indicam que este carreador parece constituir um meio hostil para as células humanas.

Uma hipótese para explicar este fato seria a liberação de produtos de degradação do carreador que seriam tóxicos para estas células. De fato, Pachence e Kohn¹⁰⁹ relatam reações inflamatórias decorrentes da utilização de materiais de fixação biodegradáveis, compostos de ácido poliglicólico, utilizados em ortopedia. Esta ocorrência, segundo os autores, levou a suspensão do uso de materiais de fixação biodegradáveis em crescente número de centros de trauma nos Estados Unidos. Os autores sugerem que a liberação de produtos ácidos, decorrentes da degradação dos polímeros de ácido glicólico, estaria implicada na reação inflamatória, que tem início após 12 semanas do implante.

Neste modelo, a avaliação da resposta inflamatória foi dificultada por tratar-se de animais atímicos que apresentam a imunidade mediada por linfócitos T muito reduzida. Apesar disso, foi possível observar células com morfologia sugestiva de macrófagos em torno das fibras da membrana de ácido poliglicólico e carbonato de trimetileno, como ilustram as figuras 8A e 8B. O mesmo não foi observado nos implantes de ácido hialurônico com ou sem células, o que faz crer que a presença dos macrófagos foi promovida pela presença de corpo estranho, ou seja, as fibras da membrana e não pelas células humanas. Cabe salientar que, segundo Le Blanc et al¹¹⁰, células tronco mesenquimais exercem papel imunomodulatório e são

inibidoras da proliferação de leucócitos. Estes autores estudaram a expressão de marcadores de superfície e secreção de citocinas em linfócitos ativados na presença de células tronco da medula óssea. Os autores concluíram que células tronco mesenquimais suprimem tanto a ativação quanto a proliferação de linfócitos estimulados e sugerem que este efeito inibitório é mediado por um fator solúvel.

O desenvolvimento de capilares nas membranas carreadoras com 3 semanas após implante, tem bases na hipótese levantada por Tille e Pepper¹¹¹. Estes autores referem que a angiogênese é um processo de formação de novos capilares a partir de capilares pré existentes, ocorrendo em processos fisiológicos, como na reparação tecidual, bem como em processos patológicos, como o crescimento tumoral. Várias citocinas estão implicadas na regulação deste processo, entre elas VEGF, bFGF, PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), TGFb1 (fator de crescimento e transformação) e angiopoetinas. Estes autores demonstraram que quando células endoteliais foram co-cultivadas com células mesenquimais indiferenciadas, a angiogênese, induzida por VEGF, foi significativamente potencializada. Os autores formulam a hipótese da existência de uma interação do tipo parácrina entre as células mesenquimais e as células endoteliais e concluem que, em seu estado indiferenciado, as células mesenquimais potencializam a angiogênese.

Outros estudos também relatam a indução da angiogênese mediada por VEGF, tendo bFGF como co- fator ^{112,113}. Segundo Tonnensen et al¹¹⁴ o bFGF age no estabelecimento da angiogênese, nos três primeiros dias da

reparação tecidual, enquanto VEGF exerce papel crítico para angiogênese, durante a formação de tecido de granulação, entre o quarto e sétimo dias.

Em nosso estudo, parece que bFGF foi capaz de induzir angiogênese, quando implantado juntamente com as células mesenquimais indiferenciadas, evidenciada pela presença de vasos nas membranas com 3 semanas após implante. Com 8 semanas, as células mesenquimais não estavam mais presentes na membrana de ácido glicólico e carbonato de trimetileno, o que explicaria a ausência de suprimento vascular nesta fase do processo. O mesmo se aplica aos controles: apesar de terem recebido a adição de bFGF antes do serem implantados, mostraram-se completamente avasculares, nos momentos da observação, já que não continham as células mesenquimais indiferenciadas humanas.

Tem sido demonstrado que as células da linhagem adipocitária são capazes de secretar potentes fatores angiogênicos, entre eles monobutiril e fator de crescimento vascular endotelial¹¹⁵⁻¹¹⁶. Desta forma, o aumento do tecido adiposo no indivíduo adulto é resultado não só da hipertrofia dos adipócitos pré existentes, como também da diferenciação de precursores destas células, cujo suporte é garantido pelo desenvolvimento de nova rede capilar, como observaram Castellot et al¹¹⁷ e Boulomieu et al¹¹⁸.

Em nosso estudo, células indiferenciadas do tecido adiposo, quando implantadas em gel de ácido hialurônico, foram capazes de gerar um “bloco” de tecido humano no tecido subcutâneo de camundongos atímicos, garantindo sua viabilidade por até 8 semanas. Este carreador biodegradável é disponível também na forma de esponjas, com porosidade variável⁷² e vem

sendo utilizado como carreador, em estudos para engenharia de pele¹¹⁹, cartilagem¹²⁰, osso¹²¹ e tecido adiposo⁷³.

A capacidade deste carreador de assegurar a manutenção da viabilidade das células implantadas deveu-se a alguns fatores como: desenvolvimento de neovascularização e características fenotípicas das células mesenquimais humanas. Como já referido acima, em estudo preliminar com citometria de fluxo para analisar a expressão de marcadores de superfície, verificamos que estas células tem capacidade de interação com a matriz extracelular por expressarem moléculas para mediação da adesão ao ácido hialurônico (CD 44/+), que foi o carreador mais adequado, no presente estudo. Estas células expressaram ainda moléculas de superfície responsáveis pela adesão célula-célula (CD54/+), o que poderia justificar a organização em cordões, observada nos implantes do gel.

Kuri-Harcuch et al¹²² e Kawaguchi et al⁷⁴ reportaram que células indiferenciadas do tecido adiposo produzem matriz extracelular, que parece ser um potente indutor da neovascularização. Estes relatos associados aos nossos resultados fazem supor que as células mesenquimais indiferenciadas presentes nos implantes de gel de ácido hialurônico com até 8 semanas, produziram matriz extracelular e citocinas que contribuíram para a indução e manutenção da angiogênese. A dupla marcação por imunofluorescência, para células humanas e para células endoteliais, nos implantes com 8 semanas de gel de ácido hialurônico, contendo células mesenquimais indiferenciadas humanas do tecido adiposo, mostrou uma sobreposição das

áreas marcadas pelos dois anticorpos. Este resultado reforça os relatos da interação entre estes dois tipos celulares.

De acordo com Dennis e Caplan¹²³ as células tronco mesenquimais, oriundas de diferentes sítios anatômicos, têm uma capacidade trófica. Os autores postulam que os fatores de crescimento e citoquinas secretados pelas células tronco mesenquimais injetadas em locais de lesão tecidual levariam a uma resposta reparadora de melhor qualidade com diminuição da fibrose.

Há um crescente interesse pelo uso terapêutico das células indiferenciadas do tecido adiposo, com finalidades terapêuticas. De Almeida et al¹²⁴ injetaram células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano na parede da bexiga de camundongos imunodeficientes. As células humanas foram obtidas pelo mesmo método enzimático aqui descrito e identificadas por três diferentes marcadores, para permitir seu rastreamento após injeção. O exame da bexiga dos animais revelou a presença de células humanas na parede da bexiga 3, 4, 6 e 8 semanas após o implante. Os autores aventam a possibilidade da injeção destas células no tecido peri-uretral, a fim de gerar um coxim tecidual, que promova suporte e resistência ao fluxo.

Na Espanha, Garcia-Olmo et al¹²⁵ implantaram células mesenquimais indiferenciadas autólogas, derivadas do tecido adiposo e expandidas *in vitro*, utilizando a mesma metodologia descrita neste estudo, para o tratamento de fístula retovaginal na Doença de Crohn. Os autores reportam que embora os casos de fístula na Doença de Crohn sejam de difícil resolução, três meses

após o procedimento a paciente não mais apresentava flatulência ou eliminação de conteúdo fecal através da vagina. Concluem que esta estratégia pode ser uma nova ferramenta para solucionar feridas e lesões de difícil cicatrização.

A nosso ver, o tratamento proposto pelos dois grupos de autores acima mencionados se beneficiaria com a incorporação das células a um carreador biodegradável permitindo assegurar sua localização na região que necessita de reforço tecidual e fornecendo suporte para organização tridimensional, e atração de vasos, gerando novo tecido no local do implante. A necessidade de fixar as células injetadas no sítio do implante, através de um carreador biocompatível é reforçada pelos resultados do trabalho de Susuki et al¹²⁶. Estes autores injetaram precursores da linhagem muscular marcados no músculo cardíaco íntegro de camundongos imunocompatíveis com a linhagem celular selecionada e relataram que 55% das células enxertadas, desapareceram do músculo cardíaco, 10 minutos após a injeção. Os autores aventam a hipótese da participação da própria contração miocárdica neste mecanismo, “expulsando” as células injetadas.

Em nosso estudo, demonstramos que os implantes de células indiferenciadas do tecido adiposo em gel de ácido hialurônico, foram capazes de gerar um “bloco” de tecido humano. Estes resultados foram reprodutíveis em três séries diferentes de implantes usando a mesma metodologia já descrita, com células provenientes de três diferentes doadores. Estas células foram facilmente obtidas do produto de lipoaspiração, não deixando seqüelas nas áreas doadoras. Pelo contrário,

resultaram em benefício estético. Estas constatações tornam viável considerar o método, no futuro, como alternativa para obtenção de células mesenquimais indiferenciadas autólogas com capacidade trófica, visando a reparação tecidual.

Embora exista aqui ainda a indagação quanto a viabilidade das células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo implantadas por períodos superiores a 8 semanas, estimulando-nos a conduzir novos projetos que testem estes implantes a longo prazo; o presente estudo experimental demonstrou a importância da seleção do carreador para engenharia de tecidos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente estudo permitiu a elaboração das seguintes conclusões:

1- O tecido adiposo humano abriga células mesenquimais indiferenciadas, passíveis de serem obtidas por um processo de digestão enzimática.

2- Células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano são potentes estimuladores da angiogênese quando semeadas em membranas de ácido poliglicólico e carbonato de trimetileno ou misturadas ao gel de ácido hialurônico reticulado e implantadas no subcutâneo de camundongos atímicos.

3- A composição da matriz carreadora interferiu na viabilidade do implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano. Neste modelo experimental, verificamos que :

- a membrana biodegradável de ácido glicólico e trimetileno carbonato não foi um carreador viável para o implante de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano, no subcutâneo de camundongos atímicos, por mais de três semanas;

- o gel de ácido hialurônico reticulado permitiu a viabilidade das células mesenquimais humanas, por até 8 semanas, que se organizaram de forma tridimensional e desenvolveram rica rede vascular.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Langer R, Vacanti J P. Tissue engineering. *Science*. 1993;14:9206.
2. Brasil. Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. DATASUS. Morbidade e informações epidemiológicas. Disponível em <http://www.datasus.gov.br>.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. *Saúde Brasil 2004- uma análise da situação de saúde*. Brasília: MS; 2004. p 87-111: Evolução da Mortalidade no Brasil.
4. Organização Pan-Americana de Saúde. Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde. Brasília; 2003.p 53-8: Doenças cardiovasculares.
5. Gawryszewski VP, Koizumi MS, Mello-Jorge MHP. As causas externas no Brasil no ano 2000: comparando a mortalidade e a morbidade. *Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro*. 2004: 995-1103.
6. Vacanti JP, Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. In Lanza PR, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press 2000. p.3-7
7. Patel PN, Robb GL, Patrick CW Jr. Soft tissue restoration using tissue engineering. *Semin in Plast Surg*. 2003;17:99-105

8. Bostwick J. I choose autologous tissue in breast reconstruction. *Clin Plast Surg.*1994; 21:1569
9. Nahabedian MY, Momen B, Manson PN. Factors associated with anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:74-82
10. Eastlund T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant.* 1995 ;4:455-77
11. Billings E Jr, May JW Jr. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1989;83:368-81.
12. Bircoll M. Injectable technique of autologous fat transplantation.*Plast Reconstr Surg.* 1990;85:149.
13. Novaes F, dos Reis N, Baroudi R Counting method of live fat cells used in lipoinjection procedures. *Aesthetic Plast Surg.*1998;22:12-5.
14. Patrick CW Jr. Adipose tissue engineering :the future of breast and soft tissue reconstruction. *Semin Surg Oncol.* 2000;19:302-11.
15. Henriksen TF, Holmich LR, Fryzek JP, Friis S, McLaughlin JK, Hoyer AP, Kjoller K, Olsen JH. Incidence and severity of short-term complications after breast augmentation: results from a nationwide breast implant registry.*Ann Plast Surg.* 2003;51:531-9.

16. Hart D. Overcoming complications of breast implants. Review. *Plast Surg Nurs.* 2003;23:55-63, 72.
17. Wyatt JP. Reporting breast implant complications. *Plast Surg Nurs.* 2003;23:49-54.
18. Maas CS, Papel ID, Greene D, Stoker DA. Complications of injectable synthetic polymers in facial augmentation. *Dermatol Surg.* 1997;23:871-7.
19. Hotta T. Dermal fillers. The next generation. Review. *Plast Surg Nurs.* 2004;24:14-9.
20. Siegle RJ, McCoy JP Jr, Schade W, Swanson NA. Intradermal implantation of bovine collagen. Humoral immune responses associated with clinical reactions. *Arch Dermatol.* 1984;120:183-7.
21. Stegman SJ, Chu S, Armstrong RC. Adverse reactions to bovine collagen implants: clinical and histologic features.. *J Dermatol Surg Oncol.*1988;14:39-48
22. Chick WL, Like AA, Lauris V. Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science.* 1975 ;187(4179):847-924
23. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res.*1980;14:107-32.

-
24. Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science*. 1981;211(4486):1052-4.
 25. Young HE, Lucas PA. *Pluripotent mesenchymal stem cells and methods of use thereof*. US Patent. No.5,827,735,1998.
 26. Lucas PA, Laurencin C, Syftestad GT, Domb A, GoldbergVM, Caplan AI, Langer R. Ectopic induction of cartilage and bone by water-soluble proteins from bovine bone using a polyanhydride delivery vehicle. *Biomed Mater Res*. 1990;24:901-11.
 27. Dushnik-Levinson M, Benvenisty N. Embryogenesis in vitro: study of differentiation of embryonic stem cells. Review. *Biol Neonate*. 1995;67:77-83.
 28. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*. 2000 Nov 15;227:271-8
 30. Rosenthal N. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med*. 2003 17;349:267-74.
 31. Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci . USA*. 2003 28;100:12741-6.

32. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 2001;19:193-204.
33. Katayama R, Wakitani S, Tsumaki N, Morita Y, Matsushita I, Gejo R, Kimura T. Repair of articular cartilage defects in rabbits using CDMP1 gene-transfected autologous. *Rheumatology*.2004;43:980-5.
34. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-3
35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR . Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells *Science*. 1999; 284(5411):143-7.
36. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol*. 1988 Jun;106:2139-51.
37. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 ;410(6829):701-5.
38. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.

-
39. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg.* 1999;65:22-6.
 40. Partridge TA, Grounds M, Sloper JC. Evidence of fusion between host and donor myoblasts in skeletal muscle grafts. *Nature.* 1978;273(5660):306-8.
 41. Schultz E, Lipton BH. Skeletal muscle satellite cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1982;20:377-83.
 42. Rando TA, Blau HM. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J Cell Biol.* 1994;125:1275-87.
 43. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964;239:375-80.
 44. Planat-Benard V, Menard C., Andre M, Puceat M. Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004; 94:223-9.
 45. Safford KM, Safford SD, Gimble JM, Shetty AK, Rice HE. Characterization of neuronal/glial differentiation of murine adipose-derived adult stromal cells. *Exp Neurol.* 2004;187:319-28.

-
46. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, Ailhaud G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 ;315:255-63.
 47. Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, Lucas PA. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993;29^A:723-36.
 48. Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC Jr, Reagan CR, Lucas PA. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn.* 1995;202:137-44.
 49. Warejcka DJ, Harvey R, Taylor BJ, Young HE, Lucas PA. A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *J Surg Res.* 1996;62:233-42.
 50. von Heimburg D, Kuberka M, Rendchen R, Hemmrich K, Rau G, Pallua N. Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 2003;26:1064-76.
 51. Hauner H, Skurk T, Wabitsch M. Cultures of human adipose precursor cells. *Methods Mol Biol.* 2001;155:239-47.
 52. Katz AJ, Llull R, Hedrick MH, Futrell JW. Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plast Surg.* 1999;26:587-603.

-
53. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizubo H, Alfonso CZ, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue Is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13:4279-95.
54. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 18;290:763-9.
55. Cousin B, Andre M, Arnaud E, Penicaud L, Casteilla L. Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 21;301:1016-22.
56. Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Sarkar G, Spelsberg TC, Riggs B. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1996;11:312-24.
57. Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipodystrophy. *Diabetes*. 2002;51:2727-33.
58. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol*. 2003;183:355-66.

-
59. Cowan MC, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, Mari C, Thomas R, Quarto N, Contag CH, Wu B, Longaker MT. Adipose derived adult stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *Nat Biotech.* 2004; 10: 1-8.
60. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B.,Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C.,Duriez M, Tedgui A, Levy B, Penicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004. 109:656-63,
61. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428(6983):664-8
62. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004 ;428(6983):668-73.
63. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature.* 2004;428(6983):607-8.
64. Kral JG, Crandall DL. Development of a human adipocyte synthetic polymer scaffold. *Plast Reconstr Surg.* 1999;104:1732-8.
65. Huss FR, Kratz G.Mammary epithelial cell and adipocyte co-culture in a 3-D matrix: the first step towards tissue-engineered human breast tissue. *Cells Tissues Organs.* 2001;169:361-7.

-
66. von Heimburg D, Kuberka M, Rendchen R, Hemmrich K, Rau G, Pallua N. Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs*. 2003;26:1064-76.
67. von Heimburg D, Zachariah S, Heschel I, Kuhling H, Schoof H, Hafemann B, Pallua N. Human preadipocytes seeded on freeze-dried collagen scaffolds investigated in vitro and in vivo. *Biomaterials*. 2001;22:429-38.
68. Wechselberger G, Russell RC, Neumeister MW, Schoeller T, Piza-Katzer H, Rainer C. Successful transplantation of three tissue-engineered cell types using capsule induction technique and fibrin glue as a delivery vehicle. *Plast Reconstr Surg*. 2002;110:123-9.
69. Patrick CW Jr, Zheng B, Johnston C, Reece GP. Long-term implantation of preadipocyte-seeded PLGA scaffolds. *Tissue Eng*. 2002 ;8:283-93.
70. Zund G, Ye Q, Hoerstrup SP, Schoeberlein A, Schmid AC, Grunenfelder J, Vogt P, Turina M. Tissue engineering in cardiovascular surgery: MTT, a rapid and reliable quantitative method to assess the optimal human cell seeding on polymeric meshes. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999;15:519-24.
71. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T. Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*. 2003;24:2303-8.

-
72. Halbleib M, Skurk T, de Luca C, von Heimburg D, Hauner H. Tissue engineering of white adipose tissue using hyaluronic acid-based scaffolds. I: in vitro differentiation of human adipocyte precursor cells on scaffolds. *Biomaterials*. 2003;24:3125-32.
73. von Heimburg D, Zachariah S, Low A, Pallua N Influence of different biodegradable carriers on the in vivo behavior of human adipose precursor cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108:411-20.
74. Kawaguchi N, Toriyama K, Nicodemou-Lena E, Inou K, Torii S, Kitagawa Y. De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:1062-6.
75. Viravaidya K, Shuler ML. The effect of various substrates on cell attachment and differentiation of 3T3-F442A preadipocytes. *Biotechnol Bioeng*. 2002;78:454-8.
76. Duranti F, Salti G, Bovani B, Calandra M, Rosati ML. Injectable hyaluronic acid gel for soft tissue augmentation. A clinical and histological study. *Dermatol Surg*. 1998;24:1317-25.
77. Pihlajamaki H, Bostman O, Rokkanen P. Related absorbable polyglycolide and polylactide devices for fracture fixation. *Surg Technol Int*. 1998;7:395-401

-
78. Rokkanen PU, Bostman O, Hirvensalo E, Makela EA, Partio EK, Patiala H, Vainionpaa SI, Vihtonen K, Tormala P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*. 2000;21:2607-13.
79. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as medical devices. *MPB*. 1998; 30-43
80. McDonald JA, Camenisch TD. Hyaluronan: genetic insights into the complex biology of a simple polysaccharide. *Glycoconj J*. 2002;19(4-5):331-9. Review.
81. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. Time course of de novo adipogenesis in matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*. 2002;8:603-13.
82. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest*. 1992;67:519-28.
83. Hazen SA, Rowe WA, Lynch CJ. Monolayer cell culture of freshly isolated adipocytes using extracellular basement membrane components. *J Lipid Res*. 1995 ;36:868-75.
84. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y. Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*. 2003;24:2513-21.

-
85. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin DB. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev.* 1997;18:26-45.
86. Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J, Fujii DK. Effect of fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex, brain cortex, and corpus luteum capillaries. *J Cell Physiol.* 1986;127:121-36.
87. Spivak-Kroizman T, Lemmon MA, Dikic I, Ladbury JE, Pinchasi D, Huang J, Jaye M, Crumley G, Schlessinger J, Lax I. Heparin-induced oligomerization of FGF molecules is responsible for FGF receptor dimerization, activation, and cell proliferation. *Cell.* 1994;79:1015-24.
88. Klein-Soyer C, Beretz A, Cazenave JP, Wittendorp-Rechenmann E, Vonesch JL, Rechenmann RV, Driot F, Maffrand JP. Sulfated polysaccharides modulate effects of acidic and basic fibroblast growth factors on repair of injured confluent human vascular endothelium. *Arteriosclerosis.* 1989;9:147-53.
89. Pieper JS, Hafmans T, Van Wachem PB, Van Luyn MJ, Brouwer LA, Veerkamp JH, Van Kuppevelt TH. Loading of collagen-heparan sulfate matrices with bFGF promotes angiogenesis and tissue generation in rats. *J Biomed Mater Res.* 2002;62:185-94.
90. Akimoto T, Hammerman MR. Fibroblast growth factor 2 promotes microvessel formation from mouse embryonic aorta. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C371-7

-
91. Matapurkar BG, Bharve A, Koratkar H, Koratkar S. Neorganogenesis and neohistogenesis by desired metaplasia of autogenous tissue stem cells in vivo: a critical and scientific evaluation with 125 years of review literature. *ASAIO J.* 2003;49:53-62.
 92. Yannas IV. *In vivo* synthesis of tissues and organs. In Lanza PR, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering*. 2nd Ed. San Diego. Academic Press; 2000. p 67-178.
 93. Leor J, Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. Review. *Ann N Y Acad Sci*. USA. 2004;1015:312-9.
 94. Zandonella C. The beat goes on. *Nature*. 2003;421(6926):884-6.
 95. Fauza DO. Tissue engineering: Current state of clinical application. *Curr Opin Pediatr*. 2003; 15:267-271
 96. Negrel R, Dani C. Cultures of adipose precursor cells and cells of clonal lines from animal white adipose tissue. *Methods Mol Biol*. 2001;155:225-37.
 97. Bohn W, Wieggers W, Beuttenmuller M, Traub P. Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin. *Exp Cell Res*. 1992 ;201:1-7
 98. Kuhara T, Fujiwara M, Sudo K, Suzuki K, Kawamura A Jr. Immunological properties of athymic nude mice born from homozygous (nu/nu) parents. *Lab Anim*. 1980 ;14:167-72.

-
99. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*. 2004;6:7-14.
 100. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, Gimble JM. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem*. 2001;81:312-9.
 101. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-9.
 102. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongo A, Wei ES. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:775-9.
 103. De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, Hedrick MH. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg*. 2003;50:215-9.
 104. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003 Oct 31;89:267-70.
 105. Chiu RC. Bone-marrow stem cells as a source for cell therapy. *Heart Fail Rev*. 2003 ;8:247-51

-
106. Hansbrough JF, Cooper ML, Cohen R, Spielvogel R, Greenleaf G, Bartel RL, Naughton G. Evaluation of a biodegradable matrix containing cultured human fibroblasts as a dermal replacement beneath meshed skin grafts on athymic mice. *Surgery*. 1992;111:438-46.
 107. Boyce ST, Foreman TJ, English KB, Stayner N, Cooper ML, Sakabu S, Hansbrough JF. Skin wound closure in athymic mice with cultured human cells, biopolymers, and growth factors. *Surgery*. 1991;110:866-76.
 108. Stravopoulos F, Dahlin C, Ruskin JD, Johansson C. A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects. An experimental study in a canine model. *Clin Oral Impl Res*. 2004;15:435-442.
 109. Pachence JM, Kohn J. Biodegradable materials. In Lanza PR, Langer R, Vacanti J. Principles of tissue engineering. 2nd Ed. San Diego. Academic Press; 2000.269-77.
 110. Le Blanc K, Rasmusson I, Gotherstrom C, Seidel C, Sundberg B, Sundin M, Rosendahl K, Tammik C, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 (interleukin-2 receptor) and CD38 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Scand J Immunol*. 2004;60:307-15.
 111. Tille JC, Pepper MS. Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro. *Exp Cell Res*. 2002 1;280:179-91.

-
112. Pepper MS, Mandriota SJ, Jeltsch M, Kumar V, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C synergizes with basic fibroblast growth factor and VEGF in the induction of angiogenesis in vitro and alters endothelial cell extracellular proteolytic activity. *J Cell Physiol.* 1998;177:439-52.
113. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem.* 1992;267:16317-22.
114. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. Review. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 2000;5:40-6.
115. Dobson DE, Kambe A, Block E, Dion T, Lu H, Castellot JJ Jr, Spiegelman BM. 1-Butyryl-glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell.* 1990;61:223-30.
116. Castellot JJ Jr, Karnovsky MJ, Spiegelman BM. Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1980;77:6007-11.
117. Castellot JJ Jr, Karnovsky MJ, Spiegelman BM. Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1982;79:5597-601.
118. Bouloumie A, Lolmede K, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M. Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris).* 2002;63:91-5.

-
119. Zoltan-Jones A, Huang L, Ghatak S, Toole BP. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003 14;278:45801-10.
120. Cohen M, Klein E, Geiger B, Addadi L. Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophys J*. 2003;85:1996-2005.
121. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, Kumta SM. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res*. 2003 ;15:880-4.
122. Kuri-Harcuch W, Arguello C, Marsch-Moreno M. Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. *Differentiation*. 1984;28:173-8.
123. Dennis JE, Caplan HI. Advances in mesenchymal stem cell biology. *Curr Opin Orthop*. 2004;15:341-346.
124. De Almeida F, Alfonso Z, Strem B, Rodriguez LV. Adult adipose derived stem cells for reconstruction of the atrophic female urethra. Tissue Engineering techniques for treatment of SUI. (Abstract 482). *J Urol*. 2003;169:482.
125. Garcia-Olmo D, Garcia-Arranz M, Garcia LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, Garcia-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula

in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis.* 2003;18:451-4

126. Suzuki K, Murtuza B, Beauchamp JR, Brand NJ, Barton PJ, Carver A, Fukushima S, Coppen SR, Partridge TA, Yacoub MH Varela. Role of interleukin-1beta in acute inflammation and graft death after cell transplantation to the heart. *Circulation.* 2004;14:219-24.

Apêndice

APÊNDICE

ESTUDO PRELIMINAR: Caracterização das células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo por citometria de fluxo

Estudamos a expressão de marcadores de superfície em células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo, extraídas do produto de lipoaspiração doado, após consentimento informado, por duas pacientes do sexo feminino, com idade de 48 e 34 anos. Ambas apresentavam índice de massa corpórea normal e provas sorológicas negativas para hepatite tipos B e C e para o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Este estudo foi realizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR) em colaboração com o Centro de Terapia Celular - Fundação Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Os marcadores usados no estudo estão abaixo relacionados, seguidos dos tipos celulares em que se expressam e das suas funções, conhecidas ou postuladas, de acordo com Abbas et al*:

- **HLA classe I.** As moléculas de classe I são expressas em praticamente todas as células nucleadas e consistem de duas cadeias polipeptídicas: uma cadeia pesada, codificada no complexo principal de histocompatibilidade

* Abbas K, Lichtman AH, Jordan S. Pober. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro. Editora Revinter Ltda.2003.Apêndice II,500-514: Características Principais das Moléculas CD.

(CPH), uma cadeia menor de proteína não polimórfica, $\beta 2$ microglobulina, codificada no cromossomo 15 e por um peptídeo antigênico.

- **HLA-DR.** As moléculas de classe II são compostas por duas cadeias polipetídicas, uma α e uma β , ambas codificadas no CPH, e por um peptídeo antigênico. Estes genes (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) são agrupados como genes de classe II. As moléculas de classe II são expressas apenas por um subgrupo de células hematopoiéticas, denominadas células apresentadoras de antígenos, como por exemplo células B, macrófagos, células de Langherhans, células dentríticas e células do epitélio tímico. A molécula HLA-DR participa da rejeição aguda a enxertos mediada por linfócitos T CD8/+.

- **CD 13.** Monócitos e granulócitos. É uma aminopeptidase envolvida na oxidação de peptídeos ligados à moléculas da classe II e possui estrutura idêntica à da metaloproteinase ligante ao zinco, que degrada peptídeos produzido por diversos tipos celulares.

- **CD 29.** Leucócitos. Participa da adesão dos leucócitos às proteínas da matriz extracelular e do endotélio.

- **CD 44.** Leucócitos e eritrócitos. Liga-se ao ácido hialurônico e está envolvida na adesão de leucócitos às células endoteliais e à matriz extracelular.

- **CD 49e.** Células T, algumas células B e monócitos. Participa da adesão à matriz extracelular. Liga-se à fibronectina.

- **CD 54.** (ICAM-1). Células endoteliais, células T, células B, monócitos, tumores sólidos. Participa na adesão célula-célula. Sua forma solúvel age

como um inibidor da resposta imune de células NK(natural killer) a células tumorais. Pode ter papel na prevenção da rejeição de aloenxertos.

- **CD 90.** Timócitos, células T periféricas, Células CD34+, células tronco hematopoiéticas, neurônios e células da linhagem estromal. A função em humanos é desconhecida. Postula-se que ele pode interagir na adesão e migração de leucócitos durante a inflamação, na modulação da permeabilidade endotelial e na diferenciação neuronal.

- **CD 45.** Células hematopoiéticas. Exerce papel crítico na sinalização mediada pelo receptor de antígenos das células T e B.

- **CD 14.** Monócitos, macrófagos e granulócitos. Participa da ativação de macrófagos.

- **CD 34.** Precursores hematopoiéticos e células endoteliais. Participa na adesão célula a célula.

- **CD 51.** Plaquetas e megacariócitos. É uma molécula de adesão, possui receptor para vitronectina, fibrinogênio e fator de von Willebrant.

- **CD 61.** Plaquetas e megacariócitos. É uma integrina (subunidade 3) e junto com CD51 forma o receptor para vitronectina que está presente em plaquetas, osteoclastos e células endoteliais.

- **KDR .** Células hematopoiéticas imaturas e precursores endoteliais. É um receptor para VEGF(fator de crescimento de endotélio vascular) e um marcador de células tronco da linhagem hematopoiética.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Fluorescence Activated Cell Sorting) BDIS (Bencton Dickinson Immunodiagnostic Systems). O citômetro utilizado estava acoplado a um

microcomputador Macintosh PowerPC, modelo 7200 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA, EUA) que permitiu análise e detecção dos marcadores fluorescentes acoplados aos anticorpos monoclonais. A aquisição dos dados e a análise dos resultados foram realizadas com o programa CellQuest (BDIS). A aquisição inicial de eventos (cada evento correspondendo a uma célula) foi realizada através das dispersões frontal (FSC) e lateral de luz (SSC), que avalia o tamanho das células e a complexidade ou granulosidade das mesmas, respectivamente. Em cada aquisição foram mensurados 10.000 eventos. Como controles negativos foram utilizados anticorpos do mesmo isotipo dos anticorpos monoclonais sem especificidade antigênica.

A análise das células indiferenciadas do tecido adiposo, por citometria de fluxo, mostrou uma população celular homogênea (Figura 1A). As figuras 1B e 1C ilustram a aquisição da fluorescência com anticorpo inespecífico conjugado aos fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) e ficoeriterina (PE), respectivamente, determinado assim o quadrante negativo (M1). As figuras 1D e 1E ilustram a aquisição da fluorescência com os marcadores CD90-PE e CD44-FITC, demonstrando que a fluorescência adquirida com estes marcadores excedeu o quadrante negativo. A figura 1F ilustra a aquisição da fluorescência com o marcador HLADR-FITC, compreendida no quadrante negativo de expressão.

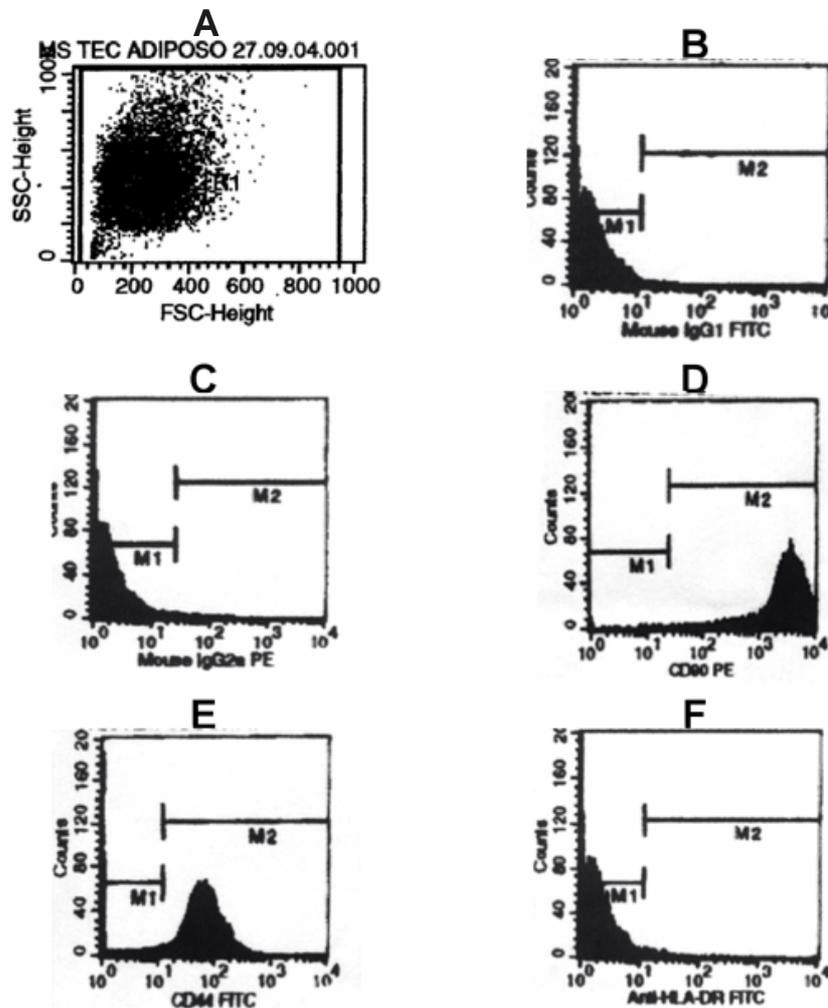


Figura 1. Ilustração gráfica de resultados da análise de células mesenquimais indiferenciadas do tecido adiposo humano por citometria de fluxo.

A. Análise bivariada da população celular, quanto ao tamanho e à granulosidade. Notar a distribuição das células, constituindo uma população homogênea. **B.** Controle negativo para o fluorocromo FITC. Histograma da aquisição da fluorescência com IgG inespecífica ligada ao FITC determinando o quadrante negativo M1. **C.** Controle negativo para o fluorocromo PE. Histograma da aquisição da fluorescência com IgG inespecífica ligada ao PE, determinando o quadrante negativo M1. **D.** Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti CD90-PE. **E.** Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti CD44-FITC. Notar que em D e E a aquisição excede o quadrante negativo M1. **F.** Histograma da aquisição da fluorescência com anticorpo anti HLA-DR. A aquisição está compreendida no quadrante negativo. Ba F: resultados em escala logarítmica.

Tabela 1. Médias e desvios padrões da expressão diferencial dos diferentes receptores expressos pela célula mesenquimal indiferenciada do tecido adiposo humano.

Marcador (CD)	Média ± Desvio Padrão
CD-90	99.38±0.05
CD-13	98.23±1.44
CD-29	96.56±0.46
CD-49e	93.64±2.94
CD-44	60.18±48.9
HLA-1	46.40±26.7
CD-54	34.78±10.1
CD-51/61	4.0±4.2
CD-34	3.64±3.84
KDR	1.66±1.35
HLA/DR	1.54±1.33
CD-45/14	0.39±0.45