

LUCAS DA PONTE MELO

Avaliação do perfil fenotípico, proliferativo e secretório de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo captadas por lipoaspiração assistida por laser

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Marco Kawamura Demange

**São Paulo
2023**

LUCAS DA PONTE MELO

Avaliação do perfil fenotípico, proliferativo e secretório de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo captadas por lipoaspiração assistida por laser

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

Programa de Ciências do Sistema
Musculoesquelético

Orientador: Prof. Dr. Marco Kawamura Demange

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Melo, Lucas da Ponte

Avaliação do perfil fenotípico, proliferativo e secretório de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo captadas por lipoaspiração assistida por laser / Lucas da Ponte Melo. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Ciências do Sistema Musculoesquelético.

Orientador: Marco Kawamura Demange.

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimais
2.Lipectomia 3.Terapia baseada em transplante de células e tecidos 4.Plasticidade celular
5.Expressão gênica 6.Ciclo celular 7.Citocinas
8.Cartilagem articular

USP/FM/DBD-014/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais **Ivan Melo Ibiapina** e **Verônica Linhares da Ponte Melo**, pelo amor, empenho e dedicação durante toda a minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível, muito obrigado por tudo.

À minha esposa **Flávia Freitas Campos Melo**, pelo incondicional apoio, confiança, companheirismo e amor nessa vida que decidimos construir juntos. Por ser a mãe maravilhosa que você é. Tenho muita sorte de ter você ao meu lado.

À minha filha **Giovana Campos Melo**, por ter me ensinado qual o verdadeiro significado da palavra amor e trazer um sorriso que serve de combustível diário.

Aos meus irmãos **Ivana da Ponte Melo** e **Artur da Ponte Melo**, pela amizade mais sincera, abraços, brigas de criança e, principalmente, o amor durante toda uma vida.

À minha avó **Maria do Socorro Linhares da Ponte**, por ter sido a maior incentivadora para que eu seguisse a carreira de médico e ter dedicado tanto cuidado e amor durante a sua vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor **Marco Kawamura Demange**, meu orientador, por todo apoio e confiança nesta jornada e por aprendizados que transcendem a vida acadêmica.

À **Débora Levy**, pela amizade, companheirismo, dedicação e apoio contínuo durante a realização deste trabalho.

Aos Professores **Gilberto Luis Camanho**, **Olavo Pires de Camargo** e **Tarcísio E. P. De Barros**, pela oportunidade de realizar pós-graduação no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Professor **Francisco Airton Castro da Rocha**, pelos ensinamentos desde o período de iniciação científica na graduação, inúmeras sugestões para esta tese e, principalmente, pela crescente amizade.

Ao Professor **Manuel Bomfim Braga Júnior**, a quem devo o incentivo e os primeiros ensinamentos sobre pesquisa em ortopedia e que foram aplicados na confecção desta tese.

Aos Drs. **Riccardo Gomes Gobbi** e **Adriano Marques de Almeida**, pelos valiosos conselhos para melhoria desta tese.

A todos os meus amigos de turma de residência, pelos anos em que pudemos conviver e aprender juntos, cada um de vocês faz parte desta tese.

A todos os membros do Grupo de Joelho do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos práticos e suporte indispensáveis na minha formação e pelos conselhos durante a realização desta tese.

Ao Professor **Sérgio Paulo Bydlowski**, pelos valiosos ensinamentos.

Ao Dr. **Patricio Centurión Rivas**, pela ajuda fundamental na coleta do material que foi estudado nesta tese.

Aos amigos **Pedro Nogueira Giglio, Thiago de Angelis Dotta, Bruno Butturi Varone, Chilan Bou Ghosson Leite e Marcel Faraco Sobrado**, pela amizade, convívio nas disciplinas da pós-graduação, pelo constante apoio e por terem ao longo dos anos contribuído muito para a confecção desta tese.

A todos os colegas médicos e residentes que passaram pelo grupo de joelho e de alguma forma contribuíram de alguma forma em alguma parte deste estudo.

A todos os membros do LIM 19, pelo apoio, paciência, dedicação e suporte para a execução deste trabalho.

À **Maria Helena Vargas**, pelo apoio e suporte durante a revisão desta tese.

À **Tânia Fernanda Cardoso, Maria do Carmo e Gustavo Bispo**, pelo apoio indispensável durante a realização deste trabalho.

Às secretarias **Tânia Borges e Rosana Moreno** do programa de pós-graduação, pelo suporte durante esta jornada.

A todos os doadores que participaram deste estudo e contribuíram para compreensão mais profunda das células tronco mesenquimais do tecido adiposo. Meu sincero agradecimento, sem vocês esta tese não seria possível.

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de gráficos

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	7
3	REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1	Lesão da cartilagem articular do joelho	10
3.1.1	Perspectivas históricas	10
3.1.2	Perspectivas atuais e novas opções terapêuticas	14
3.2	Células tronco-mesenquimais	16
3.2.1	Descrição inicial, definição e nomenclatura	16
3.2.2	Diferenciação e plasticidade celular das células-tronco mesenquimais	19
3.2.3	Potencial secretório e imunomodulatório das células-tronco mesenquimais	24
3.2.4	Diferentes origens das células-tronco mesenquimais	27
3.2.5	Uso de células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho	30
3.3	Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA)	34
3.3.1	Utilização inicial e vantagens das CTM-TA	34
3.3.2	Extração celular: métodos enzimáticos e mecânicos	37
3.3.3	Potencial do laser na otimização da extração celular	40
3.3.4	Uso de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho	43
4	MÉTODOS	48
4.1	Captação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	49
4.1.1	Doadores	49
4.1.2	Procedimento cirúrgico: técnica de infiltração	51
4.1.3	Procedimento cirúrgico: captação de CTM-TA pela técnica convencional (lipoaspiração convencional)	52
4.1.4	Procedimento cirúrgico: captação de CTM-TA através da lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo (lipoaspiração laser)	52
4.2	Processamento para obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	53

4.3	Imunofenotipagem.....	54
4.4	Plasticidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	57
4.4.1	Diferenciação osteogênica	57
4.4.2	Diferenciação adipogênica	58
4.4.3	Diferenciação condrogênica.....	59
4.5	Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular e de progressão do ciclo celular	60
4.5.1	Extração do RNA total.....	60
4.5.2	Tratamento com DNase	61
4.5.3	Síntese do DNA complementar (cDNA)	61
4.5.4	Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação e no ciclo celular.....	62
4.6	Análise do ciclo celular das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	63
4.6.1	Curva de crescimento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	64
4.7	Array de citocinas	64
4.7.1	Cultura de células-tronco mesenquimais	64
4.7.2	Análise das citocinas.....	65
4.8	Análise dos dados	66
5	RESULTADOS.....	67
5.1	Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo	68
5.2	Diferenciação das células-tronco mesenquimais em adipócitos, osteoblastos e condroblastos	69
5.3	Análise da expressão de genes envolvidos na diferenciação e plasticidade celular	71
5.3.1	Avaliação da expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina).....	72
5.3.2	Avaliação da expressão do gene RUNX2	73
5.3.3	Avaliação da expressão do gene osteocalcina	74
5.3.4	Avaliação da expressão do gene osteopontina	75
5.3.5	Avaliação da expressão do gene PPAR γ	76
5.3.6	Avaliação da expressão do gene CEBP α	77
5.3.7	Avaliação da expressão do gene sidercano	78
5.3.8	Avaliação da expressão do gene perlecano.....	79
5.4	Análise do ciclo celular das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo	80
5.5	Análise da expressão de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular	82
5.6	Array de citocinas	86
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÃO	118
8	ANEXOS	120
9	REFERÊNCIAS.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	- Tridimensional
ALPL	- <i>Alkaline phosphatase</i>
ATJ	- Artroplastia total de joelho
ATV	- Associação de tripsina e versene
BCL2	- <i>Transcription factor B cell lymphoma 2</i>
BCL6	- <i>Transcription factor B cell lymphoma 6</i>
BGLAP	- <i>Bone gamma-carboxyglutamate protein</i>
BMP	- <i>Bone morphogenetic protein</i>
CAPESQ	- Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CCL1/I-309	- <i>Chemokine (C-C motif) ligand 1</i>
CCL2/MCP-1	- <i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
CCL5/RANTES	- <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
CDK	- <i>Cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	- DNA complementar
CEBP α	- <i>CCAAT/enhancer-binding protein α</i>
CO ₂	- Dióxido de carbono
COL1	- Colágeno tipo 1
CS	- Sulfato de condroitina
CT	- <i>Cycle of threshold</i>
CTE	- Células-tronco embrionárias
CTM	- Células-tronco mesenquimais
CTM-MO	- Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea
CTM-TA	- Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
CXCL1/GRO α	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
CXCL10/IP-10	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
CXCL11/I-TAC	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
CXCL12/SDF-1	- <i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>

DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DP	- Desvio padrão
DT	- Tempo de duplicação (<i>Doubling time</i>)
EAV	- Escala analógica visual de dor
FGF	- <i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	- <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FOP	- Fibrodisplasia ossificante progressiva
FVE	- Fração vascular do estroma
GAGs	- Glicosaminoglicanos
G-CFS	- <i>Granulocyte colony-stimulating-factor</i>
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HS	- Sulfato de heparano
IAC	- Implante autólogo de condrócitos
ICAM-1/CD54	- <i>Intercellular adhesion molecule</i>
ICRS	- <i>International Cartilage Repair Society</i>
IFATS	- <i>International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences</i>
IFN- γ	- Interferon γ
IKBKB	- <i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta</i>
IKDC	- <i>International Knee Documentation Committee</i>
IL	- Interleucina
IMC	- Índice de massa corporal
IOT-HCFMUSP	- Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ISCT	- <i>International Society for Cellular Therapy</i>
KL	- Kellgren-Lawrence
KOOS	- <i>Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score</i>
LIM 19	- Laboratório de Investigações Médicas 19
MEC	- Matriz extracelular
MIF	- <i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MIP-1 α /MIP-1 β	- <i>Macrophage inflammatory protein</i>
MOCART	- <i>Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue</i>

mRNA	- RNA mensageiro
MSC	- Células-tronco mesenquimais (<i>mesenchymal stem cell</i>)
NF-KB	- <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO	- Óxido nítrico
OA	- Osteoartrite
OC	- Osteocalcina
ON	- Osteopontina
P4	- Passagem 4
PAI-1	- <i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PBS	- <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	- <i>Phycoeritin</i>
PGE2	- Prostaglandina E2
PLA	- <i>Processed lipoaspirate</i>
PPAR	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPAR γ	- Peroxisome proliferator-activated receptor gama
RM	- Ressonância magnética
RNA	- Ácido ribonucleico
RUNX2	- <i>Runt related gene 2</i>
SDF	- <i>Stromal cell-derived factor</i>
SFB	- Soro fetal bovino
SPP1	- <i>Gene secreted phosphoprotein 1</i>
TCLE	- Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	- <i>Transforming growth factor beta</i>
TNFSF	- <i>Tumor necrosis factor superfamily</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral α
TREM-1	- <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 1</i>
UFC	- Unidades formadoras de colônias
WOMAC	- <i>Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index</i>

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Histograma representativo da imunofenotipagem das CTM-TA através do método de citometria de fluxo.....	56
Gráfico 2 -	Expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina) nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	72
Gráfico 3 -	Expressão do gene RUNX2 nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	73
Gráfico 4 -	Expressão do gene osteocalcina nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	74
Gráfico 5 -	Expressão do gene osteopontina nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	75
Gráfico 6 -	Expressão do gene PPAR γ nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	76
Gráfico 7 -	Expressão do gene CEBP α nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	77
Gráfico 8 -	Expressão do gene sidercano nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	78
Gráfico 9 -	Expressão do gene perlecano nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional.....	79
Gráfico 10 -	Análise das fases do ciclo celular das CTM-TA. Os dados são representados pela porcentagem de fluorescência dos núcleos marcados com Hoechst 33342 nas diferentes fases do ciclo celular	81
Gráfico 11 -	Comparação do <i>doubling time</i> (DT) das CTM-TA originadas da lipoaspiração convencional e da lipoaspiração laser	82

Gráfico 12 - Expressão de BCL-2 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	83
Gráfico 13 - Expressão de BCL-6 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	83
Gráfico 14 - Expressão de Ciclina D1 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	84
Gráfico 15 - Expressão de Ciclina A2 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	84
Gráfico 16 - Expressão de NF-KB das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	85
Gráfico 17 - Expressão de IKBKB das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	85
Gráfico 18 - Comparação da quantidade de IL-6 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional.....	88
Gráfico 19 - Comparação da quantidade de SDF-1/CXCL-12 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional	88
Gráfico 20 - Comparação da quantidade de Serpin E1/PAI-1 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de citometria de fluxo para expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais das CTM-TA obtidas através de lipoaspiração convencional ou pela lipoaspiração laser	68
Tabela 2 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais das CTM-TA obtidas através de lipoaspiração convencional ou pela lipoaspiração laser	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia representativa da diferenciação adipogênica das CTM-TA	70
Figura 2 - Fotomicrografia representativa da diferenciação osteogênica das CTM-TA	70
Figura 3 - Fotomicrografia representativa da diferenciação condrogênica das CTM-TA	71
Figura 4 - Avaliação semiquantitativa da expressão das citocinas expressas pelas CTM (<i>array</i> de citocinas).....	87

RESUMO

Melo LP. *Avaliação do perfil fenotípico, proliferativo e secretório de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo captadas por lipoaspiração assistida por laser* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: as dificuldades relacionadas ao processo de reparo/cicatrização de lesões da cartilagem articular são um desafio terapêutico. A aplicação de técnicas de terapia celular vem ganhando espaço nos processos de reparo da cartilagem. Nesse contexto, as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) são uma promissora fonte de células para fins de terapia celular. A fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, decorrente da aplicação de um laser com comprimento de onda específico para o tecido adiposo (1210 nm) durante o procedimento de lipoaspiração, pode permitir a captação de CTM-TA sem a utilização de digestão enzimática, diminuindo o tempo e a manipulação durante o processamento. O objetivo deste trabalho é caracterizar as células captadas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo como CTM-TA e comparar o seu potencial de diferenciação/plasticidade, proliferação celular e expressão de citocinas com as CTM-TA obtidas por lipoaspiração convencional. **Métodos:** foi realizada a captação de tecido adiposo em oito (n = 8) doadores voluntários, seguido de processamento para obtenção de CTM-TA. As amostras foram obtidas e processadas seguindo as técnicas de lipoaspiração convencional (n = 4) e lipoaspiração assistida por laser (n = 4). As células foram caracterizadas como CTM-TA através da imunofenotipagem por citometria de fluxo e diferenciação em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Foi realizada a análise da expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular e de progressão do ciclo celular através da reação em cadeia de polimerase em tempo real, além do estudo do ciclo celular destas CTM-TA. O *array* de citocinas foi aplicado para análise semiquantitativa do perfil secretório destas CTM-TA. **Resultados:** na imunofenotipagem, as CTM-TA de ambos os grupos expressaram (positividade > 95%) os marcadores mesenquimais CD29, CD90 e CD105, além da expressão abaixo de 5% dos marcadores hematopoiéticos CD14, CD34, CD45, CD80, CD117 e HLA-DR. Verificou-se a capacidade de diferenciação multipotente das CTM-TA em três tipos

celulares: adipócitos, osteoblastos e condroblastos. Na expressão dos genes ALPL (fosfatase alcalina), RUNX2, osteocalcina, osteopontina, PPAR γ , CEBP α , sidercano e perlecano, envolvidos na diferenciação e plasticidade celular, houve aumento de expressão significativo apenas do ALPL ($p = 0,004$) no grupo lipoaspiração convencional. Na análise do ciclo celular, o grupo lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo apresentou menor atividade celular na fase G0/G1 ($p = 0,0078$) e aumento de atividade na fase S ($p = 0,0045$), sem diferença no tempo de duplicação entre os grupos. Não houve diferença significativa na expressão de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular entre os grupos. No *array* de citocinas, houve a expressão das citocinas IL-6 ($p = 0,07$), SDF-1/CXCL-12 ($p = 0,49$) e Serpin E1/PAI-1 ($p = 0,22$) em ambos os grupos, sem diferença na análise semiquantitativa de expressão entre os grupos. **Conclusão:** de acordo com os resultados, pode-se concluir que as CTM-TA obtidas através da lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são, de fato, CTM. Através da comparação do potencial de diferenciação/plasticidade, da proliferação celular e da expressão de citocinas, concluímos também que as CTM-TA captadas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são tão boas e de baixo risco tumorigênico, para fins de aplicação em terapia celular, quanto as obtidas por lipoaspiração convencional.

Descritores: Células-tronco mesenquimais; Lipectomia; Terapia baseada em transplante de células e tecidos; Plasticidade celular; Expressão gênica; Ciclo celular; Citocinas; Cartilagem articular.

ABSTRACT

Melo LP. *Evaluation of the phenotypic, proliferative and secretory profile of mesenchymal stem cells from adipose tissue captured by laser-assisted liposuction* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Introduction: the difficulties related to the process of repairing cartilage injuries are a therapeutic challenge. The application of cell therapy techniques has been gaining ground in cartilage repair processes. In this context, mesenchymal stem cells from adipose tissue (AT-MSC) are a promising source of cells for cell therapy fins. Selective photostimulation of adipose tissue, resulting from the application of a laser with a specific wavelength for adipose tissue (1210 nm) during the liposuction procedure, may allow the capture of AT-MSC without the use of enzymatic digestion, reducing the time and handling during processing. The objective of this work is to characterize cells captured by laser-assisted liposuction with selective photostimulation of adipose tissue as AT-MSC and compare their potential for differentiation/plasticity, cell proliferation and expression of cytokines with AT-MSC obtained by conventional liposuction. **Methods:** adipose tissue was collected from eight (n = 8) volunteer donors, followed by processing to obtain AT-MSC. Samples were obtained and processed following conventional liposuction (n = 4) and laser-assisted liposuction (n = 4) techniques. The cells were characterized as AT-MSC through immunophenotyping by flow cytometry and differentiation into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. We performed the analysis of gene expression of cell differentiation and cell cycle progression markers through real-time polymerase chain reaction, in addition to studying the cell cycle of these AT-MSC. The cytokine array was applied for semi-quantitative analysis of the secretory profile of these AT-MSC. **Results:** in immunophenotyping, the AT-MSC of both groups expressed (positivity > 95%) the mesenchymal markers CD29, CD90 and CD105, in addition to the expression below 5% of the hematopoietic markers CD14, CD34, CD45, CD80, CD117 and HLA-DR. We verified the capacity of multipotent differentiation of MSC-TA in three cell types: adipocytes, osteoblasts and chondroblasts. In the expression of genes ALPL (alkaline phosphatase), RUNX2, osteocalcin, osteopontin, PPAR γ , CEBP α , sidercan and perlecan, involved in cell differentiation and plasticity,

there was a significant increase in expression only of ALPL ($p = 0.004$) in the conventional liposuction group. In the cell cycle analysis, the laser-assisted liposuction group with selective photostimulation of adipose tissue showed lower cell activity in the G0/G1 phase ($p = 0.0078$) and increased activity in the S phase ($p = 0.0045$), without difference in doubling time between groups. There was no significant difference in the expression of proteins involved in cell cycle progression between groups. In the cytokine array, there was expression of the cytokines IL-6 ($p = 0.07$), SDF-1/CXCL-12 ($p = 0.49$) and Serpin E1/PAI-1 ($p = 0.22$) in both groups, with no difference in the semiquantitative analysis of expression between groups. **Conclusion:** according to the results, we can conclude that AT-MSC obtained through laser-assisted liposuction with selective photostimulation of adipose tissue are, in fact, MSC. By comparing the differentiation/plasticity potential, cell proliferation and cytokine expression, we also concluded that AT-MSC captured by laser-assisted liposuction with selective photostimulation of adipose tissue are as good and of low tumorigenic risk, for the purposes of application in cellular therapy, as well as those obtained by conventional liposuction.

Descriptors: Mesenchymal stem cells; Lipectomy; Cell- and tissue-based therapy; Cell plasticity; Gene expression; Cell cycle; Cytokines; Cartilage, articular.

1 INTRODUÇÃO

O tratamento adequado das lesões da cartilagem é um grande desafio terapêutico. As lesões da cartilagem articular são muito comuns, podendo ter prevalência em até 63% das artroscopias do joelho¹. Por tratar-se de um tecido hipocelular e avascular², apresenta um limitado potencial de reparo intrínseco, levando à progressão para osteoartrite (OA)^{3,4}, uma importante causa de dor e incapacidade na população contemporânea⁵. Técnicas cirúrgicas envolvendo a perfuração do osso subcondral, microfraturas e transplantes osteocondrais são aplicadas no tratamento das lesões condrais do joelho, entretanto, apresentam limitações no seu uso clínico⁶⁻¹³. Desde a primeira série de casos utilizando o implante autólogo de condrócitos (IAC) no tratamento da lesão condral do joelho, publicada em 1994¹⁴, a aplicação de técnicas de terapia celular como opção terapêutica vem ganhando cada vez mais espaço nos processos de reparo da cartilagem. Nesse contexto, as células-tronco mesenquimais (CTM) são uma promissora fonte de células que podem ser aplicadas no tratamento da lesão condral¹⁵⁻¹⁸.

As CTM são células com capacidade de diferenciação multipotente, envolvidas nos processos de autorrenovação e que podem ser extraídas de diferentes fontes do tecido conjuntivo, como medula óssea, tecido adiposo, sinóvia, periósteo, placenta, dentre outros. Tais características facilitam o possível uso clínico das CTM, transpassando os entraves éticos e de

teratogenicidade relacionados com as células-tronco embrionárias (CTE), com capacidade de diferenciação pluripotentes¹⁹. Para serem consideradas CTM, três critérios devem ser seguidos: aderência plástica, expressão de antígenos de superfície específicos e diferenciação multipotente²⁰.

Com o aumento do interesse nas aplicações clínicas das CTM, tornam-se relevantes os estudos para avaliar qual a melhor fonte para captação destas CTM, além de otimização dos processos para obtenção das CTM, visando um processamento mais rápido e com menor manipulação laboratorial. As células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo (CTM-TA) apresentam algumas vantagens, como a possibilidade de obtenção de grandes amostras e com mínima morbidade do sítio doador (a lipoaspiração é um procedimento consagrado na cirurgia plástica estética). Além disso, as técnicas de extração enzimáticas no processamento das CTM-TA permitem um isolamento de uma quantidade até 500 vezes maior de CTM no tecido adiposo, quando comparado com o mesmo volume de medula óssea²¹. Desde os trabalhos de Zuk *et al.*²², que em 2001 descreveram a metodologia clássica para extração enzimática de CTM-TA, várias alternativas para otimizar o processo de extração destas CTM-TA vêm sendo estudadas. Nesse contexto, técnicas sem uma etapa enzimática para isolamento das CTM-TA são interessantes^{23,24}, pois permitiriam uma redução no tempo de processamento²⁵, além de reduzir a manipulação, o que se torna relevante para adequação com as regulações impostas pelas agências de saúde^{26,27}.

Entretanto, um dos desafios é que a quantidade de CTM-TA extraídas por métodos mecânicos (não-enzimáticos) seja equivalente à obtida por digestão enzimática. Existem evidências de que, para um mesmo volume de tecido adiposo processado, a quantidade CTM-TA acaba sendo maior com a utilização de enzimas, quando comparada com o processamento mecânico isolado (agitação e centrifugação)²⁷. Visando otimizar os processos mecânicos, a utilização do laser para liberar estas CTM-TA do tecido conjuntivo da gordura é uma opção interessante e que merece ser melhor estudada.

O laser é amplamente utilizado na cirurgia plástica de lipoaspiração para fins estéticos, sendo os efeitos do laser no tecido adiposo estudados desde o início da década de 1990²⁸. Apfelberg²⁹, em 1992, foi o primeiro a descrever a ação direta do laser durante a lipoaspiração, reduzindo os danos neurovasculares traumáticos com as cânulas convencionais, além de ajudar na retração do tecido subcutâneo, melhorando os resultados estéticos. A energia fototérmica liberada pelo laser é convertida em calor, levando a uma lipólise e facilitando o processo de sucção, além de liberar as CTM-TA do tecido conjuntivo (matriz extracelular) adjacente. Entretanto, no contexto do uso do tecido adiposo para fins de terapia celular, a lipólise térmica ocasionada pelo laser convencional (comprimento de onda de 1064 nm) ocasiona alterações das características celulares, levando a prejuízos para possíveis aplicações terapêuticas destas CTM-TA.

A fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, decorrente da aplicação de um laser com comprimento de onda específico para o tecido adiposo (1210 nm), é empregada na cirurgia plástica para fins estéticos desde 2010,

sendo utilizada em mais de 800 casos até 2018³⁰. A lipoespecificidade do laser proporciona uma alta taxa de absorção da luz pelo tecido adiposo, com consequente minimização da energia requerida para liberação das CTM-TA, permitindo uma ruptura das estruturas do tecido conjuntivo com menor trauma mecânico no processo de lipoaspiração, preservando a integridade dos adipócitos e melhorando a viabilidade celular. No âmbito da terapia celular, esta técnica tem o potencial de otimizar a extração de CTM-TA, transpassando a etapa enzimática e com a vantagem de não ocasionar dano térmico nas células^{30,31}.

Pensando nas vantagens associadas à possibilidade de extração de CTM-TA sem necessidade da etapa de ativação enzimática, é importante estudar e mostrar que as CTM-TA obtidas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são tão boas quanto as CTM-TA obtidas por lipoaspiração convencional, considerando o seu potencial uso na terapia celular. Primeiramente, é fundamental comprovar que essas células obtidas através do processamento pela fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são, de fato, CTM-TA. Para isso, é necessário demonstrar a capacidade de aderência ao plástico em condições de cultura, imunofenotipagem específica e capacidade de diferenciação nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica³².

Além disso, comparar o potencial de diferenciação e plasticidade celular, análise do ciclo celular e perfil da expressão de citocinas entre as CTM-TA obtidas pela lipoaspiração convencional e lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo é uma etapa

fundamental na compreensão das possíveis diferenças na capacidade de diferenciação, proliferação e secreção destas CTM-TA, servindo como alicerce para uma linha de pesquisa com estudos em modelos animais e ensaios clínicos.

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- a) Demonstrar que as células captadas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, após processamento, são caracterizadas como células-tronco mesenquimais.
- b) Comparar o potencial de diferenciação/plasticidade, proliferação celular e expressão de citocinas entre as células-tronco mesenquimais de tecido adiposo obtidas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo e pela lipoaspiração convencional.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Lesão da cartilagem articular do joelho

3.1.1 Perspectivas históricas

Hunter³³, em 1743, por meio de esforços consideráveis, realiza estudos para entendimento da estrutura da cartilagem articular. Retirado da sua publicação original, o seguinte trecho ainda pode ser aplicado nos dias de hoje:

[...] se consultarmos os escritores cirúrgicos de Hipócrates até a era atual, descobriremos que uma cartilagem ulcerada é, universalmente, entendida como uma doença muito problemática; que ela admite uma cura com mais dificuldade do que um osso danificado; e que, quando destruída, nunca é recuperada

Gardner *et al.*³⁴, em 1971, publicam uma revisão, realizando um apanhado histórico dos estudos que avaliaram a estrutura da cartilagem articular. Os autores concluem o seu texto com um questionamento que permanece sem uma resposta precisa: qual a mudança no mecanismo da homeostase da cartilagem articular que leva ao desenvolvimento de doenças, como a osteoartrite?

Fuller *et al.*³⁵, em 1972, apresentam dados de interesse clínico. Em um modelo de lesão condral superficial no joelho de coelho, não houve ativação do processo de reparo condral, mesmo quando pequenas e em animais jovens. Lesões superficiais da cartilagem levam apenas a uma discreta ativação enzimática e metabólica, insuficiente para alcançar o

número adequado de condrócitos e matriz extracelular necessários para o processo de reparo condral. Este conhecimento enfatiza a necessidade do desenvolvimento de técnicas para otimização do reparo das lesões da cartilagem.

Pridie *et al.*⁶, em 1959, publicam dados utilizando perfurações do osso subcondral para estimulação da medula óssea em pacientes com OA de joelho, alcançando a formação de um tecido de reparo fibrocartilaginoso nas áreas de defeito da cartilagem. Em seu trabalho original, os autores utilizam perfurações de 6,35 mm, tamanho superior ao preconizado nos dias de hoje.

Steadman *et al.*⁷, em 2001, descrevem a técnica da microfratura, procedimento utilizado há, aproximadamente, 20 anos desta publicação. A microfratura surgiu como uma forma de otimização dos procedimentos de perfuração subcondral, já que não há necrose térmica óssea associada com as perfurações convencionais utilizando fios de Kirschner e motores, reduzindo o dano à placa subcondral. As perfurações também são realizadas de maneira mais controlada, iniciando na periferia da lesão, em direção ao centro, respeitando uma distância de 3 mm a 4 mm entre os furos, com uma profundidade de 2 mm a 4 mm. Seguir um rigoroso protocolo de reabilitação no pós-operatório é crucial para que os resultados adequados sejam alcançados. Steadman *et al.*¹³, em 2003, mostram resultados de melhora da dor e função em 95% dos casos de lesões condrais isoladas do joelho em pacientes jovens (idade menor que 45 anos) tratadas com microfratura e reabilitação adequada, com um seguimento médio de 11 anos.

Buckwalter *et al.*⁸, em 1998, publicam uma revisão da literatura, demonstrando a capacidade de reparo de lesões condrais com técnicas de perfuração subcondral, associadas com a formação de um tecido fibrocartilaginoso. Um ponto interessante deste trabalho é debater a diferença entre reparo e regeneração da cartilagem articular. No reparo, há a formação de um tecido que se assemelha à cartilagem original, entretanto, com diferenças na microestrutura e composição, quando comparado com a cartilagem original. Nas técnicas de regeneração, o tecido neoformado seria igual à cartilagem original, reproduzindo todas as suas características. O fato de os métodos de perfuração subcondral estarem associados com a formação de um tecido de reparo fibrocartilaginoso, que apresenta uma composição de proteoglicanos e colágenos diferentes da cartilagem natural, pode estar associado com a deterioração dos resultados obtidos com o passar do tempo. Tal debate leva ao estímulo do desenvolvimento de novas técnicas que possam reproduzir a cartilagem hialina original.

Hangody *et al.*⁹, em 1997, descrevem uma técnica de transplante osteocondral autólogo (mosaicoplastia), utilizada desde 1992, para o tratamento de lesões osteocondrais ou condrais de espessura total na área de carga do joelho e tálus. Os cilindros osteocondrais são retirados de áreas doadoras do côndilo femoral que não suportam carga. Os autores relatam a obtenção de 60% a 70% de cartilagem hialina com esta técnica. Hangody *et al.*¹⁰, em 2003, publicam a sua experiência de 10 anos com o uso desta técnica. Foram realizadas 831 mosaicoplastias entre 1992 e 2002, com escores clínicos bons ou excelentes obtidos em 92% das lesões do côndilo femoral, 87% das lesões tibiais, 79% das lesões da patela e 94% das lesões

do tálus. A vantagem desta técnica é a obtenção de um tecido de reparo mais similar à cartilagem hialina, em um procedimento de tempo único e que não envolve etapas laboratoriais, reduzindo os custos do tratamento. Os fatores limitantes desta técnica são o tamanho da lesão, em virtude da reduzida área doadora autóloga para o tratamento de lesões maiores e o grau de precisão técnica exigido para o adequado posicionamentos dos enxertos.

Gross *et al.*¹¹, em 1975, são pioneiros no uso do aloenxerto osteocondral para o tratamento da OA de joelhos. Foram realizados nove transplantes em oito pacientes, com um seguimento pós-operatório de até 2 anos. Os autores relatam uma boa incorporação do enxerto em todos os casos, sem nenhuma rejeição e com boa função obtida, estimulando o uso desta técnica para casos de lesões avançadas, mas que não tenham um acometimento difuso da articulação.

Sherman *et al.*¹², em 2014, apresentam uma visão mais contemporânea do procedimento de aloenxerto osteocondral para o tratamento das lesões da cartilagem do joelho. As vantagens da utilização de um procedimento em tempo único que permite o adequado tratamento de lesões maiores, inclusive daquelas com acometimento do osso subcondral. Tal técnica permite o transplante de cartilagem hialina madura para a área da lesão. Algumas desvantagens estão associadas, como o custo para o processamento, risco de transmissão de doenças infecciosas e potenciais reações imunológicas. Além disso, em muitos países, há barreiras regulatórias e legais que reduzem a disponibilidade de doadores, dificultando, ou até mesmo impossibilitando, o acesso a esta técnica.

Brittberg *et al.*¹⁴, em 1994, publicam uma série de 23 casos de IAC, utilizando periósteo para cobertura do defeito condral. Com dois anos de seguimento, os autores relatam resultados excelentes ou bons em 14 dos 16 casos de IAC para tratamento de lesões do côndilo femoral. Biópsia foi realizada em 15 dos 16 pacientes, com formação de cartilagem similar à cartilagem normal, com abundância de colágeno tipo II. Desde o primeiro caso, realizado em 1987, o IAC vem ganhando popularidade mundial, passando por aprimoramentos e estimulando o emprego de terapia celular no tratamento das lesões condrais do joelho.

3.1.2 Perspectivas atuais e novas opções terapêuticas

Behrens *et al.*³⁶, em 1999, já entendendo as limitações da cultura de condrócitos convencional para o uso do IAC, realizam o primeiro implante de condrócitos utilizando uma matriz de colágeno tipo I/III (Chondro-Gide®) como *scaffold* para o procedimento (*scaffolds* são suportes nos quais células, como por exemplo, as CTM, podem ser cultivadas com o propósito de construir um tecido *in vitro*). Desde então, novas pesquisas são desenvolvidas na busca de matrizes biomecanicamente estáveis, usadas como *scaffolds*, que possam permitir uma melhor maturação e integração do tecido neoformado, levando a uma maior estabilidade do enxerto.

Caron *et al.*³⁷, em 2012, realizam um trabalho avaliando a capacidade de rediferenciação dos condrócitos quando utiliza-se um meio de cultura tridimensional (3D). A análise do perfil de expressão de proteínas, proliferação condrocitária e quantificação de glicosaminoglicanos (GAGs)

demonstra que a cultura 3D apresenta uma maior capacidade condrogênica, possibilitando a formação de um tecido de reparo mais similar à cartilagem hialina. A engenharia tecidual vem ampliando cada vez mais o seu potencial de ação no âmbito do tratamento das lesões da cartilagem.

Bianchi *et al.*³⁸, em 2017, isolam condrócitos de 26 pacientes submetidos à artroplastia total de joelho (ATJ) por OA. Visando melhorar a expressão fenotípica dos condrócitos em cultura, os autores utilizam o *transforming growth factor beta* (TGF- β) no meio de cultura para otimizar o processo de rediferenciação dos condrócitos, visto que há uma tendência de perda da diferenciação dos condrócitos quando estes são expandidos em cultura. Obteve-se um tecido semelhante à cartilagem articular hialina, rico em colágeno tipo II e agrecano, quando comparado com o controle, sem TGF- β .

Eftekhari *et al.*³⁹, em 2020, destacam o uso da nanotecnologia (que utiliza elementos com estrutura menores de 100 nm). Quando combinados com biomateriais, nanopartículas podem otimizar o estímulo do microambiente extracelular nos processos de reparo da cartilagem, levando a uma melhor interação das células com o *scaffold* utilizado. Biomateriais, manipulação genética, uso de fatores de crescimento e diferentes origens celulares vêm sendo objetos de estudos nos últimos anos.

Nazempour *et al.*⁴⁰, em 2016, descrevem alguns inconvenientes relacionados com o uso de condrócitos como fonte celular nos processos de reparação da cartilagem: necessidade de um procedimento invasivo para obtenção dos condrócitos e morbidade do sítio doador, queda do potencial de proliferação do condrócito autólogo com o avançar da idade do paciente, perda

do fenótipo de diferenciação e menor produção de matriz extracelular (MEC) associados com a proliferação *in vitro* dos condrócitos. Desta forma, além do desenvolvimento e otimização dos *scaffolds*, é necessário o estudo de novas origens celulares para o emprego no tratamento das lesões condrais. Nesse contexto, as CTMs emergem como uma excelente opção terapêutica.

3.2 Células tronco-mesenquimais

3.2.1 Descrição inicial, definição e nomenclatura

Friedenstein *et al.*^{41,42}, em 1974, descrevem, pela primeira vez, uma população de células derivadas da medula óssea, de origem não-hematopoiética, com aparência de fibroblastos e capacidade de gerar, além de fibroblastos, adipócitos, condrócitos e osteócitos. Essas células cresciam como colônias, sendo denominadas unidades formadoras de colônia (UFC) de fibroblastos.

Caplan⁴³, em 1991, cria o termo CTM. Interpretadas como células residentes envolvidas no reparo tecidual, de forma análoga às células-tronco hematopoiéticas no processo de renovação dos glóbulos vermelhos e brancos, o autor já levanta a possibilidade do isolamento e expansão *in vitro* das CTM como ferramenta de terapia celular.

Dominici *et al.*²⁰, em 2006, padronizam critérios mínimos da *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) que definem as CTM humanas. Para serem consideradas CTM, três critérios devem ser seguidos: aderência plástica, expressão de antígenos de superfície específicos e diferenciação multipotente. Primeiramente, as CTM devem apresentar

aderência plástica ao frasco quando mantidas em condição padrão de cultura. Além disso, a citometria de fluxo deve apresentar expressão maior que 95% de *cluster of differentiation* (CD) CD105, CD73 e CD90, associado a expressão menor que 5% de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e HLA classe II. Para completar, as CTM devem diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando em condições padrão de diferenciação *in vitro*. O objetivo dos autores é incentivar que, através destes critérios mínimos, os cientistas envolvidos com pesquisa na área possam padronizar os estudos, permitindo comparação entre a produção científica de diferentes laboratórios.

Ma *et al.*¹⁹, em 2018, conseguem explicar, de forma simplificada, o que seria uma CTM. As CTM são células com capacidade de diferenciação multipotente, capazes de autorrenovação e que podem ser extraídas de diferentes fontes do tecido conjuntivo, como medula óssea, tecido adiposo, sinóvia, periósteo, placenta, dentre outros. Tais características facilitam o possível uso clínico das CTM, transpassando os entraves éticos e de teratogenicidade relacionados com as CTEs, de capacidade de diferenciação pluripotentes. A distinção entre CTM e CTE deve ficar bem clara, evitando confusões comuns quando o tema células-tronco é colocado em debate.

Evans *et al.*⁴⁴, em 1981, de forma pioneira, observam essas CTE em embriões de ratos. Thomson *et al.*⁴⁵, em 1998, foram os primeiros a isolar CTE humana. As CTE originam-se da porção interna do blastocisto, durante o estágio embrionário. Estas células são pluripotentes, com capacidade de diferenciação em todos os tipos de células do organismo. Entretanto,

questões éticas e de segurança acabam sendo barreiras para o uso de CTE na terapia celular.

Caplan⁴⁶, em 2010, sugere uma revisão do nome de células-tronco mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stem cell*, MSC) para células sinalizadoras medicinais (do inglês, *medicinal signaling cells*, MSC). O autor acredita que o uso terapêutico das CTM é devido muito mais à secreção de agentes bioativos com potencial imunomodulatório, trófico e anti-inflamatório do que, propriamente, à sua capacidade de ser uma "célula-tronco" com diferenciação multilinhagem^{47,48}. Estas células sinalizadoras medicinais funcionam como "farmácias ambulantes", capazes de entregar estes fatores bioativos que estão envolvidos nos processos de reparo e regeneração após lesão tecidual. Interessante ressaltar que o potencial de diferenciação multilinhagem permanece sendo uma característica que pode ser explorada, principalmente, no âmbito da engenharia tecidual. A mudança na nomenclatura proposta mantém a sigla MSC, já consagrada na língua inglesa. O importante é a ênfase na mudança conceitual do entendimento de como essas células atuam *in vivo*.

Caplan⁴⁹, em 2017, publica o texto "*Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!*", demonstrando várias evidências científicas de que as CTM, tanto autólogas como alogênicas, não exercem o seu potencial terapêutico devido ao fato de serem células progenitoras do tecido lesado. *In vivo*, os benefícios estão relacionados a fatores tróficos e imunomodulação, não se cabendo mais a explicação simplista de que as células infundidas irão regenerar e substituir, diretamente, a área doente.

3.2.2 Diferenciação e plasticidade celular das células-tronco mesenquimais

Bydlowski *et al.*⁵⁰, em 2009, revisam as características biológicas das CTM. O potencial de diferenciação multipotente em osteoblastos, adipócitos e condroblastos é um dos critérios mínimos padronizados pela ISCT²⁰ para caracterizar uma célula como CTM. Vários processos estão envolvidos na diferenciação celular, sendo três principais: interação célula-célula, divisão celular e regulação gênica. Células diferentes expressam diferentes proteínas, o que as tornam distintas umas das outras. Vários fatores, como métodos de isolamento, tipo de superfície da cultura, meio de cultura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos afetam, não somente a expansão e propriedades imunogênicas das CTM, mas também a sua diferenciação.

Li *et al.*⁵¹, em 2018, publicam uma revisão comparando a caracterização e diferenciação entre as CTM de medula óssea e CTM de tecido adiposo. O potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e osteogênica é influenciado por uma série de variáveis, como as condições de cultura, estágio da cultura, fonte da CTM, idade do doador, dentre outros. Em relação à expressão gênica, os autores apresentam uma série de marcadores utilizados para avaliar o perfil de diferenciação. Na diferenciação osteogênica, pode ser feita a análise da expressão gênica de COL1A1, osteopontina (ON), osteocalcina (OC), RUNX2, PGK1 e UBC, além dos ensaios de atividade da fosfatase alcalina (ALPL). Na adipogênica, os genes mais estudados são: PPAR γ , LPL, ADIPOQ, GAPDH, FABP4, PLIN e IPO8. Por fim, alguns dos genes expressos na diferenciação condrogênica são o SOX9, COLL2, COMP, AGG e RPL13A.

Vimalraj *et al.*⁵², em 2015, revisam a conceitos relacionados à diferenciação osteoblástica. O mecanismo molecular da formação óssea envolve três fases principais: proliferação, maturação da matriz extracelular e mineralização, tendo um refinado sistema molecular de regulação entre essas fases. Marcadores relacionados com a diferenciação osteoblástica, como o colágeno tipo 1 (COL1), ALPL, OC e ON podem ser expressos em diferentes estágios do processo de diferenciação. Nesse contexto, o *runt related gene 2* (RUNX2) está entre os fatores de transcrição mais importantes na osteogênese, sendo responsável por ativar os genes relacionados à diferenciação osteogênica⁵³.

Narayanan *et al.*⁵⁴, em 2019, descrevem o RUNX2 como o principal fator de transcrição da via osteogênica, aumentando a expressão dos genes COL1, ALPL e ON. A regulação positiva e negativa de RUNX2 é fundamental nos fenômenos de formação óssea. Além disso, o RUNX1 e RUNX3, outros membros da família *runt*, também estão envolvidos na estimulação de genes osteogênicos⁵⁵. Importante destacar também o papel do RUNX2 em uma CTM multipotente, na qual o mesmo pode diminuir a expressão de marcadores adipogênicos, como o *peroxisome proliferator-activated receptor gama* (PPAR γ)⁵⁶, sendo fundamental nessa balança de diferenciação osteogênica/adipogênica.

Liu *et al.*⁵⁷, em 2018, detalham o gene ALPL, responsável pela expressão da proteína fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina, inicialmente identificada em 1912, é um marcador osteoblástico bem caracterizado, sendo utilizado como um índice para avaliar a capacidade de formação

óssea. Os autores sugerem que a deficiência de ALPL resulta em envelhecimento ósseo prematuro, caracterizado por perda de massa óssea e substituição gordurosa, sendo a envelhecimento ósseo parcialmente orquestrado pelo gene ALPL, que regula a diferenciação e senescência das CTM. Estudos genéticos investigando o gene ALPL em humanos e camundongos sugerem, fortemente, que o gene ALPL é necessário para a formação óssea pós-natal e que o surgimento de deformidades ósseas está relacionado ao grau de deficiência de ALPL^{58,59}.

Komori⁶⁰, em 2020, traz importantes conceitos relacionados à OC, uma proteína expressa, especificamente, em osteoblastos, sendo a proteína não-colágeno mais abundante do osso. O gene, em humanos, responsável pela expressão de OC é o *bone gamma-carboxyglutamate protein* (BGLAP). A expressão de OC é regulada pelo RUNX2, fator de transcrição essencial para a diferenciação de osteoblastos. A OC desempenha um papel essencial na formação óssea, regulando o alinhamento dos cristais biológicos de apatita paralelos às fibrilas de colágeno, o que é necessário para a resistência óssea longitudinal em ossos longos⁶¹.

Franzén *et al.*⁶², em 1985, descrevem a ON, uma glicoproteína fosforilada, originalmente secretada pelo tecido ósseo. A ON é, amplamente, expressa osteoclastos e osteoblastos. Entretanto, sabe-se que células epiteliais da mama, rim e pele; células nervosas, células do músculo liso vascular, células endoteliais e fibroblastos também expressam ON^{63,64}. Em humanos, a ON é codificada pelo gene *secreted phosphoprotein 1* (*SPP1*) localizado no braço longo do cromossomo 4. A ON é um componente

importante da matriz extracelular mineralizada dos ossos⁶⁵. Apresenta um papel importante na formação e reabsorção óssea. Existem vários mecanismos descritos para a regulação da reabsorção via ON, como atividade quimiotática em precursores de osteoclastos, além de mecanismos de sinalização intracelular que estimulam a reabsorção pelos osteoclastos⁶⁶.

Levy *et al.*⁶⁷, em 2017, explicam a diferenciação adipogênica em seu trabalho sobre oxiesteróis e a biologia das CTM, é um processo importante para o armazenamento de lipídios e metabolismo no corpo humano. Vários fatores de transcrição foram identificados como relevantes para a diferenciação de CTM em adipócitos. O *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) é parte de uma família de receptores hormonais nucleares, ativando fatores de transcrição que promovem a adipogênese e inibem a osteogênese⁶⁸. São descritos três tipos de receptores PPAR: PPAR- α , PPAR- γ e PPAR- δ . PPAR- α é expresso no fígado, o PPAR- γ no tecido adiposo e o PPAR- δ em todos os tecidos, embora tenha menos expressão no tecido hepático⁶⁹.

Chawla *et al.*⁷⁰, em 2001, estudam o PPAR- γ , mostrando que o PPAR- γ é induzido durante a diferenciação de adipócitos e a expressão forçada de PPAR- γ em linhagem de células não-adipogênicas, efetivamente, converte essa linhagem em adipócitos maduros. O PPAR- γ é o principal regulador da adipogênese⁷¹, sendo fundamental no processo de diferenciação adipogênica, pois atua inibindo a osteogênese⁷². A balança regulatória PPAR- γ e RUNX2 é essencial para o comprometimento das linhagens multipotentes de CTM na diferenciação adipogênica e/ou osteogênica⁷³.

Moseti *et al.*⁶⁸, revisando a regulação molecular da adipogênese, discorrem sobre o CCAAT/enhancer-binding protein (CEBP), um complexo de proteínas de ligação envolvido no processo de expressão gênica da adipogênese e que, junto com o PPAR- γ , são considerados os principais reguladores iniciais da adipogênese. A família CEBP é composta por seis isoformas (CEBP α , CEBP β , CEBP γ , CEBP δ , CEBP ϵ e CEBP ζ)⁷⁴, sendo a CEBP α envolvida na diferenciação terminal dos adipócitos. Células deficientes em CEBP α apresentam uma diferenciação adipogênica defeituosa, pois acumulam menos gotículas de lipídios e não induzem a expressão adequada de PPAR γ , demonstrando que a regulação cruzada entre CEBP α e PPAR γ é importante para a manutenção do processo de diferenciação adipogênico.

Knox e Whitelock⁷⁵, em 2006, publicam uma revisão sobre o perlecano, um proteoglicano de matriz extracelular multidomínio, com um título bem provocativo: “Perlecano: como uma molécula faz tantas coisas?”. Em vertebrados, o perlecano atua em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a condrogênese, angiogênese, ossificação endocondral e cicatrização de feridas. Os autores atribuem esse papel multimodal do perlecano à forma com que ele interage com fatores de crescimento, proteínas de matriz e fatores morfogenéticos em cada um dos ambientes ao redor da célula de determinado tecido. O papel do perlecano no processo de condrogênese é associado à diversos mecanismos e interações, como nas ligações das cadeias de sulfato de heparano (HS)/sulfato de condroitina (CS)⁷⁶, regulação da atividade do *fibroblast growth factor* (FGF)⁷⁷ e regulação da atividade condrogênica do *bone morphogenetic protein* (BMP)⁷⁸.

Rapraeger⁷⁹, em 2000, avalia a sinalização de receptores celulares regulada por sidercano (do inglês, *syndecan*), um proteoglicano HS transmembrana expresso em todas as células aderentes. Apresentam diversas funções, que vão desde a participação na adesão celular, regulação da sinalização dos fatores de crescimento ligados ao HS e a organização da adesão e sinalização da matriz celular. Acredita-se que o sidercano tenha um papel na regulação da atividade da BMP durante a condrogênese, podendo a hiperexpressão de sidercano modular positivamente a diferenciação condrogênica de CTM⁸⁰.

3.2.3 Potencial secretório e imunomodulatório das células-tronco mesenquimais

Compreender a função das CTM *in vivo* é fundamental para explorar, por completo, o seu potencial terapêutico. Meirelles *et al.*⁸¹ defendem que a secreção de um amplo espectro de fatores bioativos, como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas é a condição biológica que mais influência no potencial de reparo das CTM. O entendimento dessa complexa atividade secretória *in vivo* é peça-chave para a otimizar o uso clínico das CTM.

As CTM secretam diversos fatores e mediadores solúveis, como o óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2), interleucina (IL) 6, IL-10, antígeno leucocitário humano (HLA), dentre outros. Foi determinado que esses mediadores regulam a função e proliferação de várias células imunes e a estimulação de células T reguladoras⁸². Além disso, as CTM, através dos fatores bioativos, são capazes também de regular a inflamação,

angiogênese, morte celular, regeneração de tecidos e fibrose, migrando em direção ao tecido lesionado através de quimiotaxia^{83,84}.

Samsonraj *et al.*⁸⁵, em 2017, enfatizam que a função trófica das CTM refere-se a sua capacidade funcional de gerar um meio reparador através do contato célula-célula, associado com a sua ação parácrina secretória de uma ampla gama de macromoléculas bioativas que promovem a imunomodulação de células inflamatórias que participam do reparo tecidual (por exemplo: células T, macrófagos e mastócitos) e a diferenciação de células progenitoras endógenas (por exemplo: osteoprogenitores e condroprogenitores). O espectro atual de fatores tróficos inclui quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, vesículas extracelulares (como os exossomos) e GAGs.

Bernardo *et al.*⁸⁶, em 2013, destacam que as CTM podem secretar citocinas tanto espontaneamente como após estímulo por outras citocinas, sendo IL-1 β , fator de necrose tumoral α (do inglês, *tumor necrosis factor α* , TNF- α) e o interferon γ (IFN- γ) as mais envolvidas nesse processo. Os autores enfatizam que as CTM nem sempre são imunossupressoras, tendo os seus efeitos determinados pelas condições locais do microambiente, podendo as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IFN- γ induzir a secreção de fatores imunossupressores anti-inflamatórios.

Kyurkchiev *et al.*⁸⁷, em 2014, publicam uma revisão em que colocam a IL-10 como a citocina mais discutida quando o assunto é efeito imunorregulatório das CTM. Entretanto, os dados relacionados à secreção de IL-10 na literatura são bastante contraditórios. Quase metade dos artigos

discutidos na presente revisão relatam secreção positiva de IL-10 por CTM, enquanto a outra metade (incluindo os estudos dos próprios autores) rejeitam esta possibilidade. Interessante debater o conceito proposto por alguns autores que afirmam que as CTM secretam IL-10 sob condições específicas, com o ambiente inflamatório e a presença de citocinas (IFN γ , IL-1 β e TNF- α) ativando receptores específicos das CTM.

Hirano *et al.*⁸⁸, em 1986, identificam a IL-6 como um fator estimulante dos linfócitos B. Hoje, já se tem o conhecimento do papel fundamental da IL-6 em diversos processos, como regulação da resposta imune, hematopoiese, inflamação, sobrevivência celular, apoptose, proliferação celular e oncogênese. Classicamente, é descrita como uma citocina pró-inflamatória que, em conjunto com a IL-1 e o TNF- α , induz a secreção de proteínas de fase aguda, causa o recrutamento de neutrófilos, a expressão de moléculas adesivas celulares e uma mudança de inflamação induzida por neutrófilos para macrófagos. Opal *et al.*⁸⁹ em 2000 e Scheller *et al.*⁹⁰ em 2011, publicam dados bastante convincentes do papel anti-inflamatório da IL-6, exercendo esse papel dual, considerando a sua clássica atuação pró-inflamatória.

Kyurkchiev *et al.*⁸⁷, na sua revisão de 2014, enfatizam que, diferentemente da IL-10, não há dúvida de que a IL-6 é secretada pelas CTM e quase todos os autores concordam com essa afirmação. Quando as CTM foram testadas para 120 citocinas foi estabelecido que a IL-6 tem a expressão mais alta e a conclusão foi que a IL-6 era a citocina básica responsável pelos efeitos imunorregulatórios das CTM⁹¹.

Yoshimura *et al.*⁹², em 2011, publicam sobre o TGF- β , um dos principais mediadores da regulação imunológica, desempenhando um papel essencial na orquestração da iniciação e resolução das respostas inflamatórias, bem como na indução e manutenção da tolerância imunológica, influenciando a proliferação, diferenciação, ativação e sobrevivência de leucócitos. Como o TGF- β é produzido, constitutivamente, pelas CTM e a maioria dos seus efeitos nas células imunes mencionadas acima também foram demonstrados como características intrínsecas às CTM, é razoável assumir o suposto envolvimento do TGF- β como um mediador das amplas propriedades imunorreguladoras das CTM.

3.2.4 Diferentes origens das células-tronco mesenquimais

Strioga *et al.*⁹³, em 2012, revisam e trazem conceitos interessantes da literatura. A medula óssea, por ser o primeiro local de onde as CTM foram extraídas, constitui a fonte de CTM mais estudada e, conseqüentemente, a mais bem caracterizada. Entretanto, alguns inconvenientes estão relacionados com o uso, extração e proliferação de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTM-MO).

Pittenger *et al.*⁹⁴, em 1999, isolam e caracterizam CTM-MO da crista ilíaca de doadores saudáveis. Os autores estimam que apenas de 0,001% a 0,01% do total de células nucleadas obtidas nas amostras apresentam um padrão de crescimento e formação de colônias, quando em cultura, compatível com CTM.

Zuk *et al.*²², em 2001, isolam e caracterizam CTM obtidas de lipoaspiração com anestesia local. As análises por imunofluorescência indireta, citometria de fluxo ensaios de senescência e diferenciação multilinhagem (adipogênica, condrogênica, osteogênica e miogênica), respaldam o tecido adiposo como uma fonte alternativa de CTM. Trabalhos posteriores demonstram que pode haver uma quantidade, aproximadamente, 500 vezes maior de CTM quando extraídas do tecido adiposo, comparando-se com medula óssea^{21,95}.

In't Anker *et al.*⁹⁶, em 2004, estudam a placenta e o líquido amniótico de 20 doadoras voluntárias após o segundo trimestre gestacional, colocando a placenta como uma fonte potencial de CTM. Um dos grandes benefícios do uso da placenta é a grande disponibilidade, contrapondo uma limitação da medula óssea. Apesar dos autores relatarem uma abundância de CTM obtidas no líquido amniótico no segundo trimestre, a necessidade de amniocentese torna esse procedimento proibitivo para uso clínico rotineiro.

Erices *et al.*⁹⁷, em 2000, processam o sangue obtido do cordão umbilical de doadoras após o parto, com o total de 31 amostras analisadas neste estudo. Os autores demonstram que as células mononucleadas obtidas do sangue do cordão umbilical apresentam capacidade de aderência, expansão *in vitro* e potencial de diferenciação que permitem colocá-las como uma fonte de CTM atraente para terapia celular.

De Bari *et al.*⁹⁸, em 2001, são os primeiros a caracterizar as CTM obtidas da membrana sinovial humana. Através de biópsias de 10 mg a 50 mg obtidas de joelhos de doadores, com idade média de 41 anos, obteve-se uma adequada expansão celular *in vitro* e diferenciação multilinhagem,

independentemente da idade do doador. Devido a facilidade para obtenção através de uma artroscopia de joelho, a membrana sinovial coloca-se como uma fonte de CTM promissora para o emprego da terapia celular, principalmente no contexto da ortopedia.

Gronthos *et al.*⁹⁹, em 2000, isolam células com capacidade clonogênica e de rápida proliferação da polpa dentária do terceiro molar extraído de adultos, caracterizando-as como mesenquimais. Quando comparado com CTM-MO, as CTM da polpa dentária apresentam um maior índice de proliferação celular. Além disso, utilizando um modelo *in vivo* em camundongos, essas células têm a capacidade de levar a formação de um tecido mais similar à dentina, diferente do osso lamelar obtido com CTM-MO. Abre-se a possibilidade para isolamento e expansão de células da polpa dentária para uso clínico nos processos regenerativos odontológicos.

Meirelles *et al.*¹⁰⁰, em 2006, através de um trabalho animal com camundongos, demonstram o isolamento, proliferação e caracterização de células CTM em múltiplos órgãos e tecidos (fígado, baço, pâncreas, pulmão, rim, aorta, veia cava, cérebro e músculo), usando os mesmos parâmetros estabelecidos para a cultura de CTM-MO murinas. Além disso, relatam que não há extração de CTM do sangue periférico. Os dados apresentam uma ampla distribuição das CTM pelo organismo e atentam para a íntima relação que estas CTM apresentam com o nicho perivascular, podendo as mesmas serem residentes nas paredes dos vasos (pericitos). As diversas formas para obtenção de CTM abrem um amplo horizonte de possibilidades, algo que vem fomentando cada vez mais trabalhos e publicações científicas.

3.2.5 Uso de células-tronco mesenquimais no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho

Wakitani *et al.*¹⁰¹, em 1994, utilizam, de forma pioneira e inovadora, células progenitoras osteocondrais extraídas da medula óssea e do perióstio em um gel de colágeno tipo I como um novo método biológico no tratamento de lesões da cartilagem articular. Um defeito de espessura total é criado, com 3 mm de profundidade, na área de carga do côndilo femoral medial em 136 joelhos de coelhos. Realiza-se avaliação macroscópica e histológica com 2, 4, 12 e 24 semanas após a implantação das células. Os benefícios encontrados neste trabalho são bastante relevantes, pois abrem uma janela de oportunidades para o uso da terapia de células progenitoras osteocondrais nos processos de reparo das lesões complexas da cartilagem.

Wakitani *et al.*¹⁰², em 2002, extraem e cultivam CTM do aspirado de medula óssea da crista ilíaca em pacientes submetidos à osteotomia valgzante para tratamento de OA medial. Um total de 24 pacientes são randomizados (12 por grupo) para receber um gel de colágeno tipo I com CTM ou o mesmo gel sem células (controle). Todos seguiram o mesmo protocolo de reabilitação no pós-operatório. A avaliação histológica e das imagens da artroscopia são realizadas por três examinadores independentes e sem conhecimento dos grupos tratamento e controle. Embora os resultados clínicos e funcionais não tenham demonstrado diferença estatística, os escores artroscópicos e histológicos são melhores no grupo tratado com CTM, comparado com o controle.

Wakitani *et al.*¹⁰³, em 2007, tratam lesões condrais patelofemorais, incluindo "lesões em espelho" (quando há acometimento da patela e da

tróclea) em cinco joelhos com implante de CTM extraídas da crista ilíaca. Os pacientes apresentam melhora significativa dos sintomas, mantendo a boa resposta durante o seguimento (17-27 meses). Houve também um adequado preenchimento do defeito nas análises por artroscopia e ressonância magnética (RM). Apesar de ser necessário um seguimento de maior prazo, o uso de CTM-MO mostra-se como uma opção promissora no tratamento destes casos complexos de lesão da cartilagem.

Nejadnik *et al.*¹⁰⁴, em 2010, publicam um estudo coorte observacional não-randomizado no qual compara-se o resultado de IAC de primeira geração e CTM-MO no tratamento de lesões condrais do joelho em 72 pacientes (36 pacientes pareados em cada grupo). Os pacientes são acompanhados até 24 meses após a cirurgia. Comparado com os escores pré-operatórios, ambos os grupos obtiveram uma melhora significativa na qualidade de vida, entretanto, sem apresentar nenhuma diferença estatisticamente significativa na avaliação subjetiva da *International Knee Documentation Committee* (IKDC) ou nos escores de Lysholm e Tegner. As CTM apresentam-se como uma opção tão efetiva quanto o IAC, sendo que com a realização de apenas uma cirurgia no joelho, apresentando uma redução de custos e menor morbidade doadora no joelho.

Buda *et al.*¹⁰⁵, em 2010, processam, na sala de cirurgia, a medula óssea obtida da crista ilíaca para concentração de CTM-MO em tempo único, ou seja, sem necessidade de cultivo e expansão em laboratório. Os autores utilizam uma membrana de ácido hialurônico como *scaffold*. Um total de 20 pacientes são tratados e seguidos por até 24 meses no pós-

operatório. Há melhora estatisticamente significativa nos escores IKDC e *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score* (KOOS) no pós-operatório. A avaliação por RM com 12 e 24 meses demonstrou reparo do osso subcondral e tecido cartilaginoso em diferentes parâmetros do escore *Magnetic Resonance Observation of Cartilage Repair Tissue* (MOCART)¹⁰⁶. No presente estudo, os resultados desta técnica em tempo único são similares àqueles obtidos com IAC em lesões semelhantes, sem a necessidade da etapa laboratorial, que eleva os custos e as dificuldades regulatórias para utilização.

Wakitani *et al.*¹⁰⁷, em 2011, avaliam o implante de CTM-MO em 41 pacientes entre os anos de 1998 e 2008, com seguimento médio de 75 meses pós-operatório. Com o objetivo de avaliar complicações associadas ao método, os autores mostram a segurança do procedimento, sem episódios de infecção ou teratogenicidade em até 11 anos de seguimento. Desta forma, estimulam que estudos sejam ampliados pelo mundo, incentivando a aplicação clínica de CTM no processo de reparo da cartilagem articular.

Gobbi *et al.*¹⁰⁸, em 2015, publicam os resultados de um ensaio clínico prospectivo não-randomizado comparando o concentrado de medula óssea e o IAC, utilizando a mesma membrana de colágeno como *scaffold* no tratamento de lesões condrais patelofemorais grandes. Em relação aos escores pré-operatórios, os dois grupos apresentam melhoras nos desfechos clínicos no seguimento final (mínimo de três anos). Além disso, esses resultados clínicos são condizentes com os achados de RM, artroscopia e histologia realizados. As duas técnicas mostram-se viáveis e efetivas no

tratamento de grandes lesões condrais patelofemorais, entretanto, o concentrado de medula óssea apresenta a vantagem de ser uma única cirurgia, sem etapa de cultivo laboratorial, levando a uma redução dos custos.

Akgun *et al.*¹⁰⁹, em 2015, apresentam os dados de um ensaio clínico prospectivo e randomizado, com seguimento pós-operatório de 24 meses. Um total de 14 pacientes com lesão condral isolada no côndilo femoral do joelho são randomizados em dois grupos, com o implante de CTM obtidas da sinóvia suprapatelar ou IAC, ambos utilizando uma membrana de colágeno tipo I e III como *scaffold*. Os dois grupos apresentam uma melhora significativa nos parâmetros clínicos com 24 meses de seguimento, quando comparados com os escores pré-operatórios. Durante todo o seguimento, o grupo tratado com CTM da sinóvia apresenta um melhor desfecho nos resultados funcionais, estatisticamente significativo, comparado com IAC. Na avaliação por RM, não houve falha do enxerto em nenhum dos pacientes com 24 meses, com melhora de parâmetros como edema ósseo, derrame articular e integração das bordas em ambos os grupos, sem diferença estatística entre eles. Apesar das limitações do pequeno número de pacientes e do curto prazo de seguimento, os resultados colocam as CTM derivadas da sinóvia como promissoras na terapia celular para tratamentos de lesões da cartilagem do joelho.

Gobbi *et al.*¹¹⁰, em 2019, publicam os resultados de um seguimento de longo prazo (média de 8 anos) no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho de espessura total com concentrado de medula óssea associado com membrana de ácido hialurônico. O processamento das

células é realizado em tempo único na sala de cirurgia, sem a fase de expansão no laboratório. Um total de 23 pacientes são acompanhados por um período de 6 a 10 anos. O tamanho médio das lesões tratadas foi de 6,5 cm² (2 cm² a 27 cm²). Os escores IKDC subjetivo e KOOS apresentam um desfecho clínico final satisfatório, comparável com outras formas de terapia celular com IAC no mesmo tempo de seguimento. A grande vantagem da utilização de células multipotentes em um procedimento de tempo único é a significativa redução dos custos, comparando-se com o IAC.

3.3 Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA)

3.3.1 Utilização inicial e vantagens das CTM-TA

Rodbell *et al.*¹¹¹⁻¹¹³, em 1966 e 1967, desenvolvem um método para isolar células do tecido adiposo. Os autores utilizam tecido adiposo fragmentado de ratos, que passa por um processo de incubação para digestão enzimática por collagenase. Após centrifugação e processamento, há formação de um botão celular composto de hemácias, células endoteliais, fibroblastos e células progenitoras de adipócitos, compreendidas hoje como CTM.

Young *et al.*¹¹⁴, em 1992, criam um modelo porcino para extração e cultura de células endoteliais derivadas de gordura após digestão enzimática com collagenase e centrifugação. Os autores utilizam a nomenclatura "células endoteliais microvasculares" para se referir a tais células obtidas, que apresentam uma morfologia similar ao que hoje é chamado de CTM.

Zuk *et al.*²², em 2001, após processamento do lipoaspirado humano obtido de cirurgias estéticas, isolam uma população celular heterogênea denominada de *processed lipoaspirate* (PLA), com capacidade de expansão clonal *in vitro* e baixos níveis de senescência, quando em condições de cultura. A análise por imunofluorescência e citometria de fluxo aponta para um perfil compatível com CTM multipotentes, além da sua capacidade de diferenciação multilinhagem (adipogênica, osteogênica, condrogênica e miogênica). Os resultados das análises de diferenciação do PLA foram consistentes com os obtidos pela diferenciação de CTM-MO. Os autores acreditam que tais células obtidas pelo processamento do lipoaspirado humano emergem como uma promissora opção de CTM, com menor morbidade do sítio doador e possibilidade de extração de maiores volumes, quando comparado com a medula óssea, que é a fonte de CTM classicamente mais estudada. Tal metodologia, utilizando digestão enzimática com colagenase, é referência na literatura para obtenção de CTM-TA.

Fraser *et al.*²¹, em 2006, enfatizam algumas vantagens do uso do tecido adiposo como fonte de CTM. Primeiramente, a possibilidade de obtenção de grandes amostras e com mínima morbidade do sítio doador (a lipoaspiração é um procedimento consagrado na cirurgia plástica estética). Além da maior disponibilidade, as técnicas de extração enzimáticas permitem um isolamento de uma quantidade até 500 vezes maior de CTM no tecido adiposo, quando comparado com o mesmo volume de medula óssea.

Kern *et al.*¹¹⁵, em 2006, comparam as CTM obtidas do tecido adiposo, medula óssea e cordão umbilical. A taxa de sucesso para o isolamento das CTM-TA é de 100%, contra 63% do cordão umbilical. Além disso, as CTM-TA apresentam as menores taxas de senescência e a maior presença de UFC. A capacidade de diferenciação nas três linhagens (adipogênica, condrogênica e osteogênica) foi evidenciada nas CTM-TA e CTM-MO, não se obtendo diferenciação adipogênica das CTM do cordão umbilical. Os autores colocam o tecido adiposo como um potencial substituto da medula óssea como fonte de CTM no contexto da terapia celular.

Mohamed-Ahmed *et al.*¹¹⁶, em 2018, realizam a comparação entre CTM-TA e CTM-MO obtidas dos mesmos doadores (total de nove doadores, jovens entre 8-14 anos), evitando assim o viés da variação individual. Todas as amostras apresentam características morfológicas e imunofenotípicas que permitiam caracterizá-las com CTM. As CTM-TA mantêm proliferação até o dia 21, enquanto as CTM-MO atingem um platô no dia 14. Uma maior atividade metabólica celular entre 14 e 21 dias é encontrada nas CTM-TA, indicando um maior número de células.

Bourin *et al.*³², em 2013, publicam um guia para a comunidade científica, com suporte da *International Federation of Adipose Therapeutics and Sciences* (IFATS) e ISCT, visando padronizar o processo de caracterização das CTM-TA. Devido ao crescente interesse pelas CTM-TA, tal esforço de padronização é fundamental para o avanço da pesquisa científica, visando uma reprodutibilidade e possível comparação de resultados entre os trabalhos de diferentes centros de pesquisa. Para serem

caracterizadas como CTM-TA, tais células devem apresentar viabilidade > 90%, apresentar um perfil de imunofenotipagem na citometria de fluxo com marcadores positivos (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90 e CD105) e negativos (CD31, CD45 e CD235a), além do potencial de diferenciação multilinhagem (adipogênica, condrogênica e osteogênica). Adicionalmente, a expressão positiva de CD34 pode estar presente nas primeiras fases da cultura, perdendo essa característica com a progressão das passagens. Para diferenciação entre CTM-TA e CTM-MO, os autores sugerem os marcadores CD36 e CD106, já que o perfil das CTM-TA (CD36+/CD106-) é diferente das CTM-MO (CD36-/CD106+).

3.3.2 Extração celular: métodos enzimáticos e mecânicos

Baer e Geiger¹¹⁷, em 2012, publicam um artigo de revisão que avalia a localização destas CTM no tecido adiposo. A análise por técnicas de imunofluorescência e imunohistoquímica sugere que as CTM-TA residem em uma localização perivascular, coexistindo com pericitos e células endoteliais. Durante o processo de extração das CTM do tecido gorduroso, é necessário a utilização de meios para que tais células sejam separadas da MEC, liberando-as deste espaço perivascular, permitindo assim que as mesmas sejam isoladas para possíveis aplicações terapêuticas. Existem dois métodos utilizados na extração de CTM-TA: enzimático e mecânico.

Zuk *et al.*^{22,118}, em 2001 e 2002, demonstram, de forma pioneira, a técnica de isolamento e cultura, além das características multipotentes das CTM-TA humanas. A técnica empregada por este grupo é, até hoje,

considerada como metodologia padrão na obtenção de CTM-TA. Neste trabalho, utiliza-se uma técnica de digestão enzimática, no qual a MEC é incubada com colagenase 0,075% a 37°C por 30 minutos, com desativação química da atividade enzimática após este tempo.

Lockhart *et al.*¹¹⁹, em 2015, analisam diversas enzimas utilizadas para digestão tecidual da MEC na extração de CTM-TA. Uma mistura de colagenase tipo I/II é a técnica enzimática mais comumente utilizada na prática. Além da colagenase, pode ser feita a associação com alguma enzima proteolítica (como a dispase). A associação enzimática permitiria a obtenção de um maior número de CTM, em virtude do sinergismo de ação na digestão da MEC.

Aronowitz *et al.*¹²⁰, em 2013, comparam quatro diferentes sistemas comercializados para extração de CTM do tecido adiposo, através de processo enzimático. Obteve-se uma fração de até 15% do SVF constituída por CTM, número superior aos 5% obtido com técnica mecânica através da utilização de agitador e centrífuga, publicada por Raposio *et al.*²³.

Aronowitz *et al.*¹²¹, em 2015, publicam uma revisão comparando os métodos enzimáticos e mecânicos no processo de obtenção de CTM-TA. Mesmo que os métodos enzimáticos permitam extração de uma maior quantidade de CTM, já que a utilização de enzimas otimiza a liberação de células das camadas endoteliais, métodos mecânicos também apresentam as suas vantagens. A digestão do tecido gorduroso com enzimas prolonga o tempo de processamento da amostra (necessário para ação enzimática), além de aumentar, substancialmente, os custos laboratoriais (estima-se um custo de

até cinco dólares por grama de tecido adiposo no processamento enzimático). A otimização da técnica mecânica de extração de CTM, que transpasse a etapa enzimática, pode trazer algumas vantagens na aplicação clínica.

Bianchi *et al.*²⁴, em 2013, apresentam os resultados do Lipogems®, um sistema de processamento do lipoaspirado para extração de CTM-TA completamente fechado, com utilização apenas de força mecânica, sem aplicação de enzimas ou qualquer reagente. Trata-se de um produto que pode ser comercializado de forma isolada, sem necessidade de nenhum aparelho específico. Pelo fato de o processamento ser realizado de maneira estéril dentro do campo cirúrgico, com utilização autóloga em tempo único e sem reagentes, abre-se a possibilidade do desenvolvimento de novas estratégias na busca de terapias celulares com manipulação mínima.

Shah *et al.*¹²², em 2013, descrevem uma técnica de extração de CTM-TA utilizando apenas um processo de agitação manual associado com centrifugação. Um total de 13 doadores submetidos à lipoaspiração abdominal rotineira são usados para comparar tal técnica com o método enzimático padrão utilizado pelo grupo. O tempo necessário para o processamento enzimático é de três horas, enquanto a técnica mecânica leva apenas uma hora. Independentemente da técnica utilizada, o perfil de imunofenotipagem e o potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica é similar entre os grupos. Apesar de um maior número inicial de células extraídas pelo processo enzimático, a técnica mecânica apresentada coloca-se como uma opção viável, mais econômica e rápida, principalmente quando considera-se trabalhar com grandes volumes.

Raposio *et al.*²³, em 2014, publicam uma técnica para extração mecânica de CTM-TA em, aproximadamente, 15 minutos e sem utilização de enzimas ou reagentes químicos. O processamento acontece dentro da sala de cirurgia, utilizando uma cabine de fluxo laminar, dentro da qual um tubo com 10 ml do lipoaspirado é colocado em um vibrador programado em 6.000 vibrações por minuto durante 6 minutos. Na sequência, há uma centrifugação do material em 1.600 rotações por minuto (rpm) durante 6 minutos, separando-se então um *pellet* no fundo do tubo. Através da citometria de fluxo, os autores mostram a presença de células com um perfil compatível com CTM, correspondendo a 5% do total de células. Esta metodologia permite uma extração em apenas 15 minutos, de forma segura (baixo risco de infecção, pois todo o processo é realizado em cabine de fluxo laminar) e sem uso de reagente, o que diminui o custo e as chances de reações adversas. Desta forma, há uma maior facilidade para aplicação clínica e aprovação em agências regulatórias.

3.3.3 Potencial do laser na otimização da extração celular

Parlette *et al.*²⁸, em 2008, apresentam as aplicações do uso do laser em procedimentos de lipoaspiração, no contexto da cirurgia plástica estética. A energia fototérmica liberada pelo laser é convertida em calor, levando a uma lipólise e facilitando o processo de sucção, permitindo uma maior retração tecidual por aquecimento das fibras de colágeno adjacentes. Diferentes comprimentos de onda podem ser aplicados, variando o coeficiente de absorção para gordura, água e hemoglobina. O dano tecidual

direcionado ao tecido adiposo poderia levar a uma lipoaspiração mais segura, diminuindo as complicações hemorrágicas. Entretanto, estes autores não avaliaram o impacto que este laser poderia ocasionar na qualidade do tecido adiposo no âmbito de aplicações clínicas de terapia celular.

Chung *et al.*¹²³, em 2013, comparam as CTM-TA obtidas através de lipoaspiração convencional ou lipoaspiração associada com laser (comprimento de onda de 1.064 nm) em 12 doadores (seis em cada grupo, pareados pela idade). A quantidade, proliferação e viabilidade celular das CTM-TA obtidas da fração vascular do estroma (FVE) é significativamente menor no grupo utilizando laser, além de um prejuízo no potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica. A associação do laser em procedimentos de lipoaspiração traz as vantagens de diminuir o trauma tecidual mecânico, facilitando a remoção de gordura e melhorando a retração tecidual. Entretanto, no contexto do uso do tecido adiposo para fins de terapia celular, a lipólise térmica ocasionada pelo laser com comprimento de onda de 1.064 nm leva a alterações das características celulares, ocasionando prejuízos para possíveis aplicações terapêuticas destas CTM-TA.

Centurion *et al.*³¹, em 2013, publicam um interessante conceito, a fotoestimulação seletiva. A aplicação de laser com um comprimento de onda de 1210 nm apresentaria lipoespecificidade, com afinidade pelo tecido adiposo, permitindo uma ruptura das estruturas do tecido conjuntivo com menor trauma mecânico no processo de lipoaspiração e preservando a integridade dos adipócitos. Desta forma, o tecido extraído apresentaria melhor viabilidade celular, permitindo o seu uso em procedimentos de auto enxertia, como reconstruções mamárias, lipoescultura e lipoenxertia. A

medição da atividade mitocondrial 12 horas após a obtenção da amostra é duas vezes maior no grupo com laser, demonstrando uma maior viabilidade celular. No âmbito da terapia celular, esta técnica tem o potencial de otimizar a extração mecânica da FVE e CTM-TA, transpassando a etapa enzimática.

Pereira-Netto *et al.*¹²⁴, em 2018, fazem uma revisão sistemática da literatura avaliando a eficácia e segurança da lipoaspiração associada ao laser, comparando-a com a técnica convencional. Um total de sete trabalhos são estudados, sendo que cinco deles apresentavam algum benefício relacionado à aplicação do laser. Foram levados em consideração critérios estéticos, satisfação do paciente, retração tecidual e equimose, sem análises no âmbito da terapia celular e das CTM obtidas.

Centurion *et al.*³⁰, em 2018, escrevem uma carta ao editor comentando o artigo de Pereira-Netto *et al.*¹²⁴. Apresentam sua experiência pessoal com o uso de lipoaspiração associada ao laser desde 2007, sendo que, a partir de 2010, utilizando um comprimento de onda associado à lipoespecificidade (1210 nm). Tal técnica levaria à fotoestimulação seletiva dos adipócitos, liberando-os do tecido conjuntivo presente no subcutâneo, sem lesão térmica destas células, preservando até 98% dos adipócitos. Análises laboratoriais mostram uma preservação e estimulação das CTM-TA extraídas com laser. Os autores concluem com uma indagação: será que, mesmo após tanto tempo da introdução do seu uso, a liberação traumática por meios mecânicos do tecido adiposo ainda é a melhor técnica de lipoaspiração? Esta pergunta fica ainda mais desafiadora se for considerado que o tecido adiposo obtido é uma fonte em potencial de CTM com múltiplas aplicações clínicas.

3.3.4 Uso de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no tratamento de lesões da cartilagem articular do joelho

Jo *et al.*¹⁵, em 2014, publicam os resultados de uma coorte prospectiva envolvendo o uso de CTM-TA no tratamento da OA de joelho em 18 pacientes. Na fase I, os indivíduos são pareados em três grupos ($n = 3$ por grupo), que receberam doses diferentes de CTM-TA. Nenhum paciente apresentou reação adversa relacionada ao procedimento. Em seis meses, o grupo que recebeu uma alta dose de CTM-TA (1×10^8 células) apresentava uma melhora sustentada na Escala Analógica Visual de Dor (EAV) e no escore *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index* (WOMAC)¹²⁵, diferentemente dos grupos com doses baixa e média (1×10^7 e 5×10^7 células, respectivamente). Em uma fase II, é feito o tratamento em nove pacientes com alta dose, observando-se, além da melhora clínica, mudanças positivas na artroscopia e RM de 6 meses que sugerem processo de reparo da cartilagem. O trabalho mostra a injeção de CTM-TA como uma opção eficaz e segura na OA de joelho.

Koh *et al.*¹²⁶, em 2014, apresentam um trabalho retrospectivo envolvendo o uso da FVE do tecido adiposo contendo CTM-TA no tratamento da OA de joelho. Após debridamento artroscópico das lesões e do tecido osteocondral instável, é realizada a injeção intra-articular da FVE obtida, no mesmo tempo cirúrgico, em 37 pacientes. Há melhora significativa nas escalas de Tegner e IKDC. Em uma nova avaliação artroscópica após a intervenção, 76% dos pacientes apresentaram alterações no tecido de reparo grau III e IV na escala da *International Cartilage Repair Society* (ICRS). De forma interessante, os autores relacionam a presença de lesões

maiores ($>5,4 \text{ cm}^2$) e índice de massa corporal (IMC) maior que $27,5 \text{ kg/m}^2$ com piores resultados clínicos e artroscópicos.

Koh *et al.*¹²⁷, em 2016, publicam um estudo clínico prospectivo comparando microfratura associada à FVE contendo CTM-TA usando cola de fibrina como *scaffold* ($n = 40$) e microfratura isolada ($n = 40$) no tratamento de lesões condrais focais ($> 3 \text{ cm}^2$) no côndilo femoral. Devido à necessidade de lipoaspiração, não é possível realizar o cegamento dos pacientes. Na avaliação qualitativa e quantitativa realizada por RM com 24 meses após a intervenção, o grupo que utiliza CTM-TA apresenta uma melhora significativa no escore de MOCART. O seguimento clínico médio foi de 27,4 meses. Há uma melhora significativa nos subitens "sintomas" e "dor" do escore de KOOS¹²⁵, entretanto, sem diferença estatística nos demais quesitos. Dos 80 pacientes, realiza-se uma nova avaliação artroscópica em 57. Observa-se um adequado tecido de reparo (avaliação macroscópica e entre aqueles que realizam uma biópsia), sem diferença estatística entre os grupos. Os autores utilizaram FVE do tecido adiposo. Por tratar-se de um estudo envolvendo lesões condrais focais grandes, questiona-se a possibilidade da utilização de CTM-TA expandidas em laboratório e algum *scaffold* com maior estabilidade mecânica como forma de otimizar os resultados.

Pers *et al.*¹²⁸, em 2016, apresentam um ensaio clínico fase I avaliando doses escalonadas de CTM-TA expandidas em laboratório no tratamento da OA de joelho. Um total de 18 pacientes foram pareados em 3 grupos de acordo com a dose recebida: baixa (2×10^6 células), média (10×10^6 células) e alta (50×10^6 células). Não há relatos de eventos adversos. Todos

os pacientes apresentaram melhora nos parâmetros de função e dor em 6 meses, entretanto, apenas aqueles tratados com dose baixa tiveram significância estatística no resultado. Por ter se mostrado seguro, bem tolerado e com uma promissora eficácia, o desenvolvimento de um estudo fase II é interessante para melhor compreensão da técnica, permitindo assim uma futura incorporação na prática clínica.

Ranmuthu *et al.*¹²⁹, em 2018, publicam uma revisão sistemática incluindo 12 artigos que utilizam CTM-TA no tratamento da OA de joelho. Destes, oito são prospectivos e quatro retrospectivos, sendo que nenhum é um ensaio clínico controlado e randomizado. A FVE do tecido adiposo (quatro), CTM-TA após expansão em cultura (cinco) e microfragmentos do tecido adiposo (três) são as diferentes terapias com CTM-TA empregadas. Não houve nenhum relato de evento adverso grave. Todos os trabalhos relatam algum tipo de melhora clínica dos pacientes. Entretanto, este resultado não foi necessariamente refletido nas avaliações por imagem e nem sempre essa melhora clínica conseguiu ser mantida. Apesar das CTM-TA apresentarem-se com eficácia promissora e segurança no tratamento da OA de joelho, a heterogeneidade nos métodos de processamento, o viés metodológico dos estudos e o seguimento de curto prazo precisam ser otimizados através de trabalhos com rigor científico. Desta forma, pode-se viabilizar o uso clínico de CTM-TA em maior escala.

Yokota *et al.*¹⁷, em 2019, apresentam os resultados de uma coorte retrospectiva, com seguimento de 6 meses, comparando a injeção intra-articular de CTM-TA após expansão em laboratório (59 joelhos) e FVE do

tecido adiposo obtida em tempo único (69 joelhos). Nenhum dos grupos apresenta complicações relevantes. Os pacientes são avaliados com um, 3 e 6 meses após a intervenção. Há uma melhora significativa nos escores de KOOS e EAV nos dois grupos. Entretanto, os pacientes que recebem CTM-TA expandidas apresentam uma melhora mais rápida no quesito “sintoma” do KOOS e uma redução maior e mais precoce na EAV. Esta discreta superioridade favorecendo as CTM-TA também é observada em um trabalho com ovelhas deste mesmo grupo de pesquisa. Esta comparação clínica do uso de CTM-TA expandidas e da FVE é interessante, visto que a maioria dos trabalhos experimentais em animais utiliza CTM-TA expandidas, enquanto os ensaios clínicos são, em sua maior parte, com uso da FVE. O aprofundamento dos trabalhos, incluindo a randomização entre os grupos, deve ser incentivada, visando assim uma maior capacidade de uso da terapia celular na prática clínica.

Kyriakidis *et al.*¹³⁰, em 2020, publicam os resultados do seguimento (3 anos) de 25 pacientes que tem lesões condrais no joelho (tamanho médio de 3,5 cm²) tratadas com CTM-TA expandidas em laboratório e utilizando uma matriz 3D como *scaffold*. Os pacientes apresentam uma melhora significativa em todos os parâmetros clínicos (objetivos e subjetivos) utilizados no seguimento final. Além disso, a avaliação por RM (12 e 24 meses após a intervenção) apresenta uma completa cobertura da lesão e integração das bordas em 65% dos pacientes. Na avaliação histológica de duas biópsias artroscópicas da área de reparo, encontra-se um tecido de características similares à cartilagem hialina. O estudo demonstra a efetividade e segurança

em um seguimento de médio prazo do uso de CTM-TA em um procedimento de tempo único no joelho (sem necessidade de biópsia para captação de condrócitos, como no IAC), no tratamento de lesões condrais de espessura total.

4 MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HCFMUSP), em parceria com o Laboratório de Investigações Médicas 19 (LIM 19). Foi obtida aprovação pela Comissão Científica do IOT-HCFMUSP (Anexo A) e pela Comissão de Ética para análise de projetos de pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) sob o número: 96541218.3.0000.006 (Anexo B).

4.1 Captação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

4.1.1 Doadores

Para obtenção das CTM-TA, foi utilizado o lipoaspirado de indivíduos doadores humanos saudáveis submetidos a lipoaspiração isolada para fins estéticos, por indicação clínica rotineira. Os doadores foram consultados, previamente à cirurgia, quanto ao interesse da doação do material. Ainda antes do procedimento cirúrgico, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado (Anexo C). O material lipoaspirado é, rotineiramente, descartado e o seu uso para pesquisa não implicou em nenhum risco adicional ao paciente.

A lipoaspiração é um procedimento consagrado na cirurgia plástica estética. No Brasil, estima-se que foram realizadas 182.765 lipoaspirações no ano de 2016¹²⁴. As complicações relacionadas à lipoaspiração são, relativamente, incomuns, com uma taxa geral de 2,4%, sendo equimose, edema, infecção de sítio cirúrgico e trombose venosa profunda as complicações mais comuns¹³¹. Esse número aumenta quando a lipoaspiração é associada a outros procedimentos (3,5%), tendo baixos índices de complicações quando realizada de forma isolada no ato cirúrgico (0,7%)¹³².

Todos os doadores eram do sexo feminino (n = 8), tamanho amostral adequado e validado na literatura quando o objetivo é realizar uma prova de conceito para caracterização CTM-TA obtidas por lipoaspiração assistida por laser ou ultrassonografia^{123,133-135}. Quatro amostras foram obtidas por lipoaspiração convencional e quatro amostras por lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo (protocolo *One S.T.E.P - Selective Tissue Engineering Photostimulation technique*®)³⁰. Os doadores foram todos do sexo feminino, reduzindo o viés relacionado às influências hormonais e imunomodulatórias por variação do sexo biológico na caracterização destas CTM-TA¹³⁶. As CTM-TA obtidas de indivíduos obesos podem predispor a uma resposta pró-inflamatória local maior do que CTM-TA obtidas de indivíduos magros^{137,138}, desta forma, optou-se por definir o IMC dentro da faixa de normalidade (20-25 kg/m²) como um critério de inclusão. Além disso, o envelhecimento e a presença de comorbidades (câncer, tabagismo e cirurgias prévias no local) podem influenciar nas

características das CTM-TA¹³⁹⁻¹⁴¹. Sendo assim, foram incluídos apenas indivíduos jovens (idade variando entre 27 e 44 anos), sem qualquer comorbidade ou procedimentos cirúrgicos prévios.

4.1.2 Procedimento cirúrgico: técnica de infiltração

Solução salina fria (4 °C) + adrenalina 1:500.000 foram infiltradas na região abdominal antes de iniciar o procedimento de lipoaspiração. Aplicou-se a solução salina na camada mais profunda do tecido adiposo, logo acima da fáscia superficial, usando uma agulha de Klein de 2 mm. A técnica de infiltração foi executada com movimentos lentos, utilizando uma bolsa de infusão com pressão de 200 mmHg. Uma vez aplicada, a solução fria produz uma vasoconstrição em toda a espessura da camada de gordura. Desta forma, preserva-se o tecido adiposo e a arquitetura do tecido subcutâneo não é alterada, permitindo a extração de um maior volume de tecido adiposo com redução do sangramento associado¹⁴². Após isso, realizou-se uma incisão de 2 mm com lâmina de bisturi número 11 no local da aplicação das cânulas e aspiração do tecido adiposo (determinado no pré-operatório), de acordo com a melhor indicação estética.

4.1.3 Procedimento cirúrgico: captação de CTM-TA pela técnica convencional (lipoaspiração convencional)

Este método estabelecido foi realizado conforme descrito por Coleman¹⁴³.

Os lipoaspirados foram coletados usando um sistema de lipoaspiração com seringa de baixa pressão. A cânula de coleta tinha 3 mm de diâmetro e uma ponta romba com orifício, sendo conectada a uma seringa de 50 mL. Após encher a seringa com o tecido coletado, a cânula foi removida da seringa.

4.1.4 Procedimento cirúrgico: captação de CTM-TA através da lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo (lipoaspiração laser)

Foi utilizado um laser com comprimento de onda de 1210 nm (MediLaser S 1210, DMC Group, Brasil) com kit introdutório de cânulas descartáveis (Anexo D). O equipamento é composto por uma fibra óptica de 600 µm através de uma cânula de 25 cm de comprimento. Foram usadas cânulas retas com fibra óptica de 3 mm na sua ponta, necessárias para permitir uma emissão de laser em 360°. Foram empregados os parâmetros de pré-configuração para coleta da FVE. O laser foi aplicado através de movimentos consecutivos para frente e para trás. Iniciou-se pela camada de tecido adiposo mais profunda, onde a solução fria é infiltrada, seguido da camada intermediária e, finalmente, a camada superficial.

Após a conclusão da aplicação do laser, a aspiração foi realizada com seringas de 50 mL, acopladas à mesma cânula utilizada para aplicar o laser, através de movimentos lentos. A gordura liquefeita permitiu fácil aspiração. A aspiração do tecido adiposo foi realizada na mesma sequência da aplicação do laser: começa na camada profunda e termina na superficial.

4.2 Processamento para obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

As amostras foram submetidas à lavagem com *phosphate-buffered saline* (PBS), para retirar o excesso de sangue do tecido gorduroso.

Lipoaspiração convencional: após as lavagens, o lipoaspirado (aproximadamente, 40 mL por amostra) foi digerido em 30 mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Sigma-Aldrich®, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco®, Brasil), penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL com 30 mg de collagenase tipo I (30 mg/50 mL), em agitação suave a 37 °C por 45 minutos. Após esta etapa, foi adicionado o mesmo meio de cultura para inativação da enzima e a amostra foi centrifugada a 200 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS e centrifugadas novamente a 200 x g por 10 minutos.

Lipoaspiração assistida por laser: a amostra (aproximadamente, 40 mL) foi centrifugada a 200 x g por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS e centrifugadas novamente a 200 x g por 10 minutos.

Obtenção das CTM-TA¹⁴⁴: as amostras provenientes de ambos os grupos (convencional e laser) foram ressuspensas em 12 mL de meio de cultura DMEM, suplementado com 20% de SFB, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL. Estas substâncias foram adicionadas na garrafa de cultivo celular, que é mantida em estufa na temperatura de 37 °C, com atmosfera úmida na presença de 5% de dióxido de carbono (CO₂). As

culturas foram acompanhadas, diariamente, para observar e registrar a morfologia das células. O meio de cultura é substituído a cada 2 dias. Quando as células atingem a confluência de 80%, as CTM-TA são dissociadas com solução que contém a associação de tripsina e versene (ATV - Instituto Adolfo Lutz, Brasil). Inicialmente as células são lavadas com 5 mL de PBS, para que a cultura fique isenta de meio suplementado, e é adicionado 0,04 mL de ATV por cm² de área de cultivo e a garrafa de cultivo é mantida a 37 °C por, aproximadamente, 4 minutos ou até as células se soltarem. Após o destacamento, as células são lavadas com meio de cultura suplementado com SFB 20% para inativar a ação do ATV e centrifugadas em tubo cônico de 15 mL a 700 x g por 5 minutos. Após esse procedimento as células foram expandidas em novas garrafas de cultivo celular e criopreservadas para uso futuro ou utilizadas para os experimentos descritos abaixo.

4.3 Imunofenotipagem

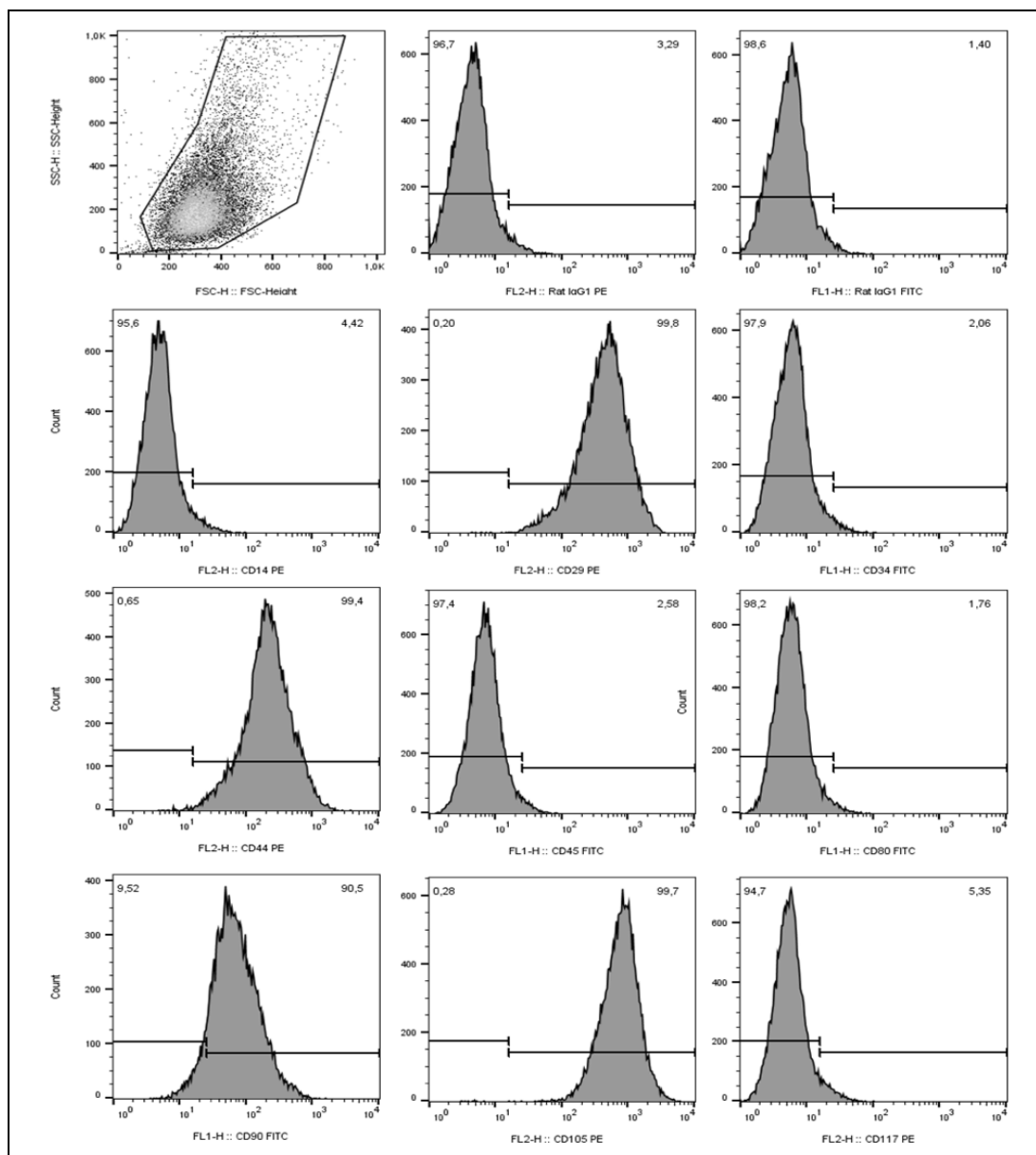
A caracterização da população das CTM-TA foi determinada pela análise de proteínas de membrana através do método de citometria de fluxo. A identificação dos antígenos foi realizada através da utilização de diferentes anticorpos monoclonais conjugados com diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e ficoeritina (PE, do inglês *phycoeritin*). Controles de marcações inespecíficas foram utilizados para adequada calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra.

Após a dissociação celular por ATV, as células foram quantificadas, e foram distribuídas 5×10^5 células em tubos específicos para citometria (Becton Dickinson®, EUA). Em cada tubo foi adicionado 1 mL de PBS para retirar o meio e, posteriormente, foi feita centrifugação por 7 minutos a 300 x g em temperatura ambiente. Após isso, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais CD29 (CD2004-RPE), CD105 (MHCD10504-RPE), CD34 (CD34-581-01), CD117 (CD11704-RPE), CD90 (12-0909-42-PE), CD45 (MHCD4504R-RPE), CD14 (MHCD1404-RPE), CD80 (MHCD8001-FITC) e HLA-DR (11-9956-42-FITC) (Invitrogen®, USA) na diluição 1:100, seguida por um período de 60 minutos em campo escuro a temperatura ambiente.

Em seguida, foram acrescentados 1 mL de PBS e feita centrifugação a 300 x g por 7 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado. O precipitado celular foi homogeneizado e ressuspenso em 500 µL de solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído a 1% em PBS.

As células foram adquiridas e a intensidade de fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FACSCanto II (Becton Dickinson®, EUA). Os dados foram analisados no FlowJo V.10 (Becton Dickinson®, EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 10.000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histogramas (Gráfico 1) e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

Gráfico 1 - Histograma representativo da imunofenotipagem das CTM-TA através do método de citometria de fluxo. Para cada amostra foi realizada aquisição de 10.000 eventos



4.4 Plasticidade das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

4.4.1 Diferenciação osteogênica

Foi utilizado meio indutor de diferenciação osteogênica (Stem Cell Technologies®, EUA). Foram transferidas $0,5 \times 10^3$ células para placas de 96 poços para realização da diferenciação osteogênica. O protocolo teve início no momento em que as culturas atingiram, aproximadamente, 70% a 80% de confluência e, nesta ocasião, todo o meio de cultura foi substituído por um meio de indução próprio para diferenciação osteogênica.

Os controles de indiferenciação tinham, somente, meio de cultura completo. A placa foi mantida em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ por 21 dias, sendo o meio trocado três vezes por semana. Após 21 dias de incubação, o meio de diferenciação osteogênica foi removido e as células foram submetidas a duas lavagens com PBS. Em seguida foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% por duas horas. Após esta etapa, foram realizadas duas lavagens com PBS e, posteriormente, as células foram coradas com 100 µL da solução de vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich®, EUA) por três minutos para visualizar a produção de íons cálcio (depósito de cálcio fixado) pelas células tratadas e confirmar o protocolo de diferenciação óssea. Posteriormente, as células foram lavadas por três vezes com PBS para posterior visualização e captura de imagens em microscópio invertido com contraste de fase (Zeiss®, EUA). A solução de vermelho de Alizarina foi preparada com a dissolução de 2 g de corante em 100 mL de água ultrapura utilizando o sistema Milli-Q® (Merck®, EUA). O pH da solução foi ajustado a 4,2 com a solução de 1% de hidróxido de amônio.

4.4.2 Diferenciação adipogênica

Foi utilizado meio indutor de diferenciação adipogênica (Stem Cell Technologies®). As células foram transferidas na concentração de $0,5 \times 10^3$ células por poço para placas de 96 poços e cultivadas até atingirem, aproximadamente, de 70% a 80% de confluência. Após este período foram incubadas por 14 dias em meio indutor próprio para diferenciação adipogênica. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana. A diferenciação adipogênica foi confirmada pelo acúmulo de vacúolos lipídicos citoplasmáticos neutros através da coloração *Oil Red O* (Sigma-Aldrich®, EUA).

Após o período de diferenciação, o meio indutor foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram coradas com 100 µL da solução de *Oil Red O* por 15 minutos em temperatura ambiente. Dado o tempo de incubação, foi feita a lavagem das culturas com PBS por duas vezes a fim retirar o excesso de coloração. Em seguida, as placas de cultura foram visualizadas em microscópio invertido com contraste de fase. A solução estoque do corante foi preparada com 0,5 g de *Oil Red O* dissolvido em 100 mL de isopropanol, seguido de filtração. No momento das colorações, foi preparada a solução de trabalho que consiste na mistura de 20 mL da solução estoque mais 30 mL de água Milli-Q®, seguido de filtração.

4.4.3 Diferenciação condrogênica

Foi utilizado meio indutor de diferenciação condrogênica (Stem Cell Technologies®). As células foram transferidas na concentração de 1×10^5 células para um tubo de polipropileno de 2 mL. As células foram centrifugadas a $200 \times g$ por 10 minutos e o meio de cultura foi trocado cuidadosamente para não desfazer o botão celular. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana. O tubo cônico foi mantido em estufa úmida a 37°C com 5% de CO_2 por 21 dias, sendo o meio trocado três vezes por semana.

A diferenciação condrogênica foi confirmada pela coloração de Safranina O (Sigma-Aldrich®, EUA). Após o período de diferenciação o meio indutor foi descartado, as células foram lavadas por duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4%. Em seguida, as células foram coradas com a solução de Safranina O 0,1% por 3 minutos em temperatura ambiente. Dado o tempo de incubação, foi feita a lavagem das culturas com PBS por duas vezes a fim de retirar o excesso de coloração. Em seguida, as placas de culturas foram visualizadas em microscópio invertido com contraste de fase.

4.5 Análise de expressão gênica dos marcadores de diferenciação celular e de progressão do ciclo celular

4.5.1 Extração do RNA total

Após o crescimento celular e dissociação enzimática, as células foram contadas para obter 1×10^6 células. As células foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante (meio de cultura) foi descartado e adicionado 1 mL de trizol (Invitrogen®, EUA). A mistura foi homogeneizada e coletada com o auxílio de uma pipeta e transferida para um microtubo de 1,7 mL. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Gibco®, EUA) às amostras, seguido de agitação vigorosa e incubação por 3 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $12000 \times g$ a 4 °C. Na etapa seguinte à extração, foi realizada a precipitação do ácido ribonucleico (RNA), utilizando-se para cada tubo 500 µl de álcool isopropílico (Sigma®, EUA) gelado. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, foi feita a centrifugação a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, sendo acrescentado ao RNA precipitado 1 mL de etanol a 75%, diluído em água livre de RNase. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a $7500 \times g$ por 5 minutos a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi descartado, e em cada amostra foi acrescentado 20 µL de água livre de RNase.

4.5.2 Tratamento com DNase

As amostras de RNA foram diluídas em água livre de RNase, com o cuidado de obter como volume final a quantidade de 8 µL contendo 1 µg de RNA. Este material foi incubado com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1U/µL e com RQ1 DNase Reaction Buffer 1X, a 37 °C durante 30 minutos, para a digestão do DNA genômico. Após o término do tempo de incubação foi adicionado o tampão de parada da reação RQ1 DNase Stop (Promega®, EUA), para ocorrer a inativação da enzima, seguido de incubação a 65 °C por 10 minutos.

4.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Com o RNA tratado com DNase, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®, EUA) com os seguintes componentes: as bases nitrogenadas (dNTPs - 4 mM de cada), *primers* (20 pmol), a enzima transcriptase reversa (1 µL) e 1 x buffer (2 x), possuindo como condições ideais para as reações a temperatura de 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos, respectivamente. Para as incubações foi utilizado o termociclador XP cycler (Bioer technology®, China).

4.5.4 Avaliação dos genes envolvidos na diferenciação e no ciclo celular

A reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real foi utilizada para a análise da expressão gênica dos genes envolvidos na diferenciação celular. A expressão de RNA mensageiro (mRNA) foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH (ThermoFisher®, EUA). Os ensaios foram realizados em duplicata e a variação no valor de *cycle of threshold* (CT) entre as duplicatas não ultrapassaram 0,5. Todos os ensaios utilizaram uma amostra referência e um controle de amplificação ao qual não foi adicionado amostras. As condições de programação dos ciclos foram 95 °C por cinco minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos. Foi utilizado o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies®, EUA).

Os *primers* utilizados foram adquiridos do DNA *Integrated Technologies*, sendo adquiridos os ensaios pré-desenhados para sondas hidrolisáveis, conforme Quadro 1, utilizando Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®, EUA).

Quadro 1 - Primers utilizados para análise de expressão gênica

Genes	SEQ REF	Assay ID
RUNX2	NM_001024630(3)	Hs.PT.56a.19568141
ALPL	NM_001127501(3)	Hs.PT.56a.40555206
Osteocalcina	NM_199173(1)	Hs.PT.56a.39318706.g
Osteopontina	NM_001251829	Hs.PT.58.192522426
CEBP α	NM_004364(1)	Hs.PT.58.4022335.g
PPAR γ	NM_005037(4)	Hs.PT.58.25464465
Sidercano	NM_002997	Hs.PT.58.1366577
Perlecano	NM_005529	Hs.PT.58.18698732
BCL2	NM_000633.2	Hs00608023_m1
BCL6	NM_001130845.1	Hs00153368_m1
Ciclina D1	NM_053056.2	Hs00765553_m1
Ciclina A2	NM_001237.3	Hs00996788_m1
NF-KB	NM_001165412.1	Hs00765730_m1
IKBKB	NM_001190720.2	Hs00233287_m1

4.6 Análise do ciclo celular das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

A análise do ciclo celular foi investigada pela intensidade de fluorescência dos núcleos marcados com Hoechst 33342 0,1 mg/mL (ThermoFisher®, EUA). Este corante é um intercalante do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a intensidade de fluorescência é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA. O Hoechst 33342 foi incubado nas células por duas horas antes da realização da leitura no *ImageXPress Micro High Content System*. Cinco sítios por poço e dois poços por linhagem celular foram adquiridos. O *software* Cell Cycle MetaExpress (Molecular Devices®, EUA) foi utilizado para analisar as diferentes fases do ciclo celular.

4.6.1 Curva de crescimento das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

A curva de crescimento foi feita para investigar a capacidade de proliferação e tempo de duplicação das células. As células foram transferidas em triplicata com um inóculo inicial de 1×10^4 por poço, em placa de seis poços, com meio de cultura DMEM *low glucose* suplementado com 20% SFB e 1% penicilina/estreptomicina. A cada dia as células foram lavadas com PBS, dissociadas enzimaticamente com ATV e contadas em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Ao final desse período, os pontos (número de células) foram extrapolados para um gráfico linear (dias x número de células), e o valor do tempo de duplicação (do inglês, *doubling time*) foi obtido através do programa estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad®, EUA).

4.7 Array de citocinas

4.7.1 Cultura de células-tronco mesenquimais

Em placas de seis poços, foram semeadas 1×10^5 CTM por poço em 2 mL de meio DMEM suplementado com 20% de SFB e antibióticos. As placas foram incubadas por 24 horas em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e 5% de CO₂, para a adesão celular. Após essa incubação inicial, o meio de cultura dos poços foi totalmente aspirado e descartado, sendo adicionados 2 mL do meio DMEM, suplementado com 20% de SFB e antibióticos, sendo as placas incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente por 24 horas. Ao término da incubação, o meio de cultura foi aspirado, filtrado em filtro Millex de 0,22 µm (Millipore®, EUA), aliquotado e armazenado em ultrafreezer a -80 °C para a realização do *array* de citocinas.

4.7.2 Análise das citocinas

Foram avaliadas, semiquantitativamente, a produção de 36 citocinas: CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, MIP-1 α /MIP-1 β , CCL5/RANTES, CD40 ligante/TNFSF5, componente do complemento C5/C5a, CXCL1/GRO α , CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1/CD54, IFN- γ , IL-1 α /IL-1F1, IL-1 β /IL-1F2, IL-1ra/IL-1F3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-16, IL-17A, IL-17E, IL-18/IL-1F4, IL-21, IL-27, IL-32 α , MIF, Serpin E1/PAI-1, TNF- α , TREM-1.

Para tanto, foi utilizado o kit semiquantitativo *Proteome Profiler Antibody Arrays Human Cytokine Array* (R&D Systems®, EUA). O sobrenadante proveniente das culturas de células-tronco mesenquimais foi analisado de acordo com as recomendações do kit. Em suma, o kit é composto por membranas de nitrocelulose que contém anticorpos de captura ancorados em sua superfície, em duplicata e em regiões estabelecidas. As membranas foram incubadas, sob agitação, por uma hora em temperatura ambiente com 2 mL do *Array Buffer 4*, para bloqueio de ligações inespecíficas. As amostras foram preparadas com a mistura de 700 μ L de amostra de sobrenadante da cultura de células, 300 μ L *Array Buffer 4*, 500 μ L *Array Buffer 5* e 15 μ L do *Human Cytokine Array Detection Antibody Cocktail* reconstituído, seguido da incubação por uma hora em temperatura ambiente, sob agitação. Após incubação, o *Array Buffer 4* das membranas foi descartado e essas foram incubadas junto às amostras por uma hora, em temperatura ambiente, sob agitação. Após essa incubação, as membranas foram incubadas *overnight* sob refrigeração (2 °C a 8 °C). Após essa etapa,

as membranas foram lavadas por quatro vezes com o *Wash Buffer*. Utilizando o *Array Buffer 5*, diluiu-se a Streptavidin-HRP, de acordo com as recomendações desse reagente e adicionou-se 2 mL dessa solução sobre cada membrana, que foram incubadas, sob agitação, por 30 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por três vezes com o *Wash Buffer*, sendo incubadas por um minuto com *Chemi Reagent Mix*, sob agitação. A leitura foi realizada no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science®, EUA) em modo de quimioluminescência e tempo de exposição de 10 a 20 minutos. A análise das imagens foi realizada com o software Image Quant TL 8.1 (GE Healthcare Life Science®, EUA) no modo *Array Analysis*. Os dados foram normalizados, dividindo-se os valores obtidos em cada ponto pela média do resultado dos padrões e multiplicando-se o resultado por 1000.

4.8 Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas entre os parâmetros das células-tronco mesenquimais de gordura obtidas por lipoaspiração convencional ou por lipoaspiração assistida por laser. Os dados foram analisados usando teste t através do pacote estatístico GraphPad Prism 8 (GraphPad®, EUA). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) de três diferentes experimentos realizados em duplicata considerando um valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização imunofenotípica das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo

Foi realizada a caracterização imunofenotípica das CTM-TA, provenientes de dois grupos distintos, lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser, contendo quatro indivíduos cada grupo. Os experimentos foram feitos por citometria de fluxo, para análise de marcadores mesenquimais e hematológicos. As células estavam na passagem 4 (P4) da cultura celular.

As CTM-TA expressaram, com positividade > 95%, os marcadores CD29, CD90 e CD105 (Tabela 1). Além disso, expressaram, abaixo de 5%, os marcadores hematopoiéticos CD14, CD34, CD45, CD80, CD117 e HLA-DR (Tabela 2).

Tabela 1 - Resultados de citometria de fluxo para expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais das CTM-TA obtidas através de lipoaspiração convencional ou pela lipoaspiração laser

	Convencional	Laser
CD29	96,6% $\pm$ 0,12	98,4% $\pm$ 0,53
CD90	96,0% $\pm$ 0,10	99,5% $\pm$ 0,22
CD105	96,4% $\pm$ 0,49	97,2% $\pm$ 0,37

Tabela 2 - Resultados de citometria de fluxo para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais das CTM-TA obtidas através de lipoaspiração convencional ou pela lipoaspiração laser

	Convencional	Laser
CD14	0,7% $\pm$ 0,01	1,2% $\pm$ 0,03
CD34	0,6% $\pm$ 0,02	1,8% $\pm$ 0,01
CD45	3,9% $\pm$ 0,01	0,7% $\pm$ 0,08
CD80	2,6% $\pm$ 0,02	2,1% $\pm$ 0,04
CD117	0,7% $\pm$ 0,03	0,8% $\pm$ 0,03
HLA-DR	0,5% $\pm$ 0,03	0,7% $\pm$ 0,05

5.2 Diferenciação das células-tronco mesenquimais em adipócitos, osteoblastos e condroblastos

Para caracterizar as CTM-TA, é necessário verificar a capacidade de diferenciação multipotente das células em três tipos celulares: adipócitos, osteoblastos e condroblastos²⁰. Foi realizada a diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condroblastos das oito amostras divididas em dois grupos iguais (lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser).

A diferenciação adipogênica (Figura 1) ocorreu através do cultivo em meio indutor de diferenciação adipogênica pelo período de 14 dias. A formação de vacúolos lipídicos foi confirmada com a coloração *Oil Red*. A diferenciação em osteoblastos (Figura 2) ocorreu através da cultura em meio indutor de diferenciação osteogênica pelo período de 21 dias. A produção de íons de cálcio (depósito de cálcio fixado) foi confirmada com a coloração Vermelho de Alizarina. A condrogênese (Figura 3) ocorreu através do cultivo em meio indutor de diferenciação em condroblastos pelo período de 21 dias. A formação do agregado celular condrogênico foi confirmada com a coloração de Safranina O.

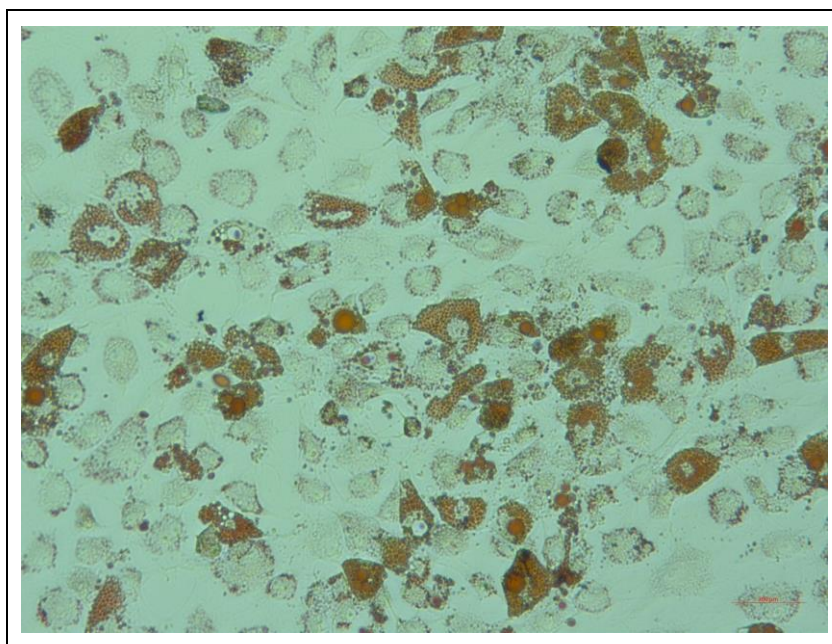


Figura 1 - Fotomicrografia representativa da diferenciação adipogênica das CTM-TA. As CTM-TA foram incubadas por 14 dias em meio indutor próprio para diferenciação adipogênica. Foi realizada coloração por Oil Red. A captura de imagens foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase; barra de calibração = 50 μm (20x)

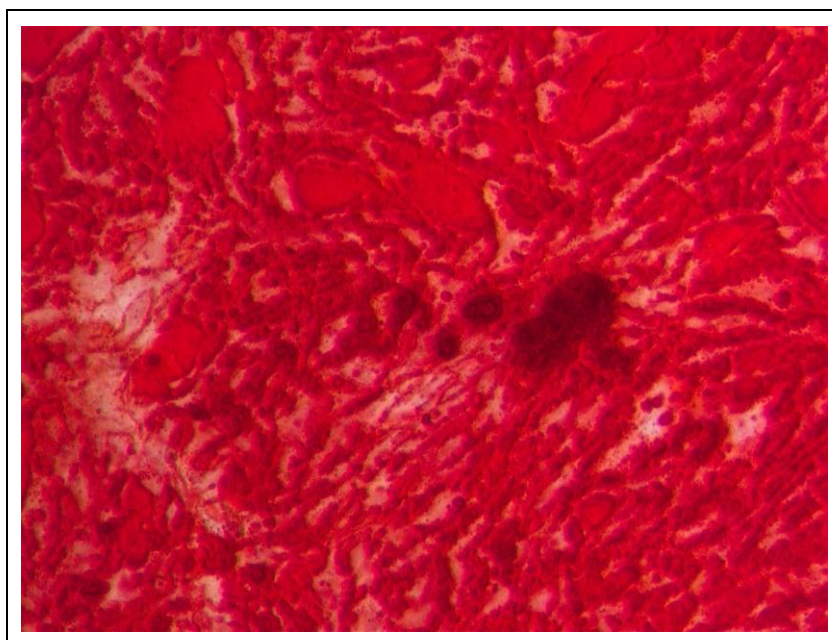


Figura 2 - Fotomicrografia representativa da diferenciação osteogênica das CTM-TA. As CTM-TA foram incubadas por 21 dias em meio indutor próprio para diferenciação osteogênica. Foi realizada a coloração vermelho de Alizarina. A captura de imagens foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase; barra de calibração = 50 μm (20x)

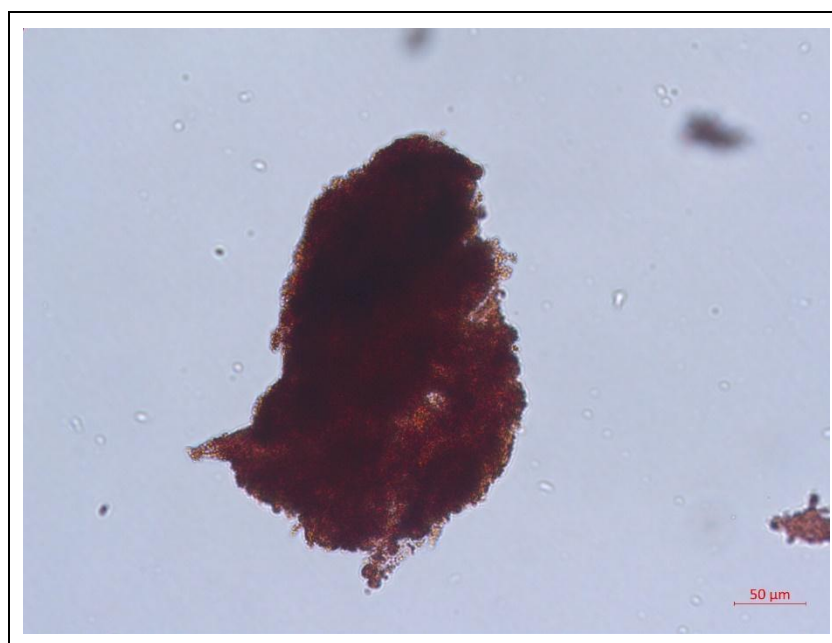


Figura 3 - Fotomicrografia representativa da diferenciação condrogênica das CTM-TA. Após tratamento com reagentes para diferenciação condrogênica e coloração Safranina O. As CTM-TA foram incubadas por 21 dias em meio indutor próprio para diferenciação condrogênica. Foi realizada a coloração por Safranina O. A captura de imagens foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase; barra de calibração = 50 µm (20x)

5.3 Análise da expressão de genes envolvidos na diferenciação e plasticidade celular

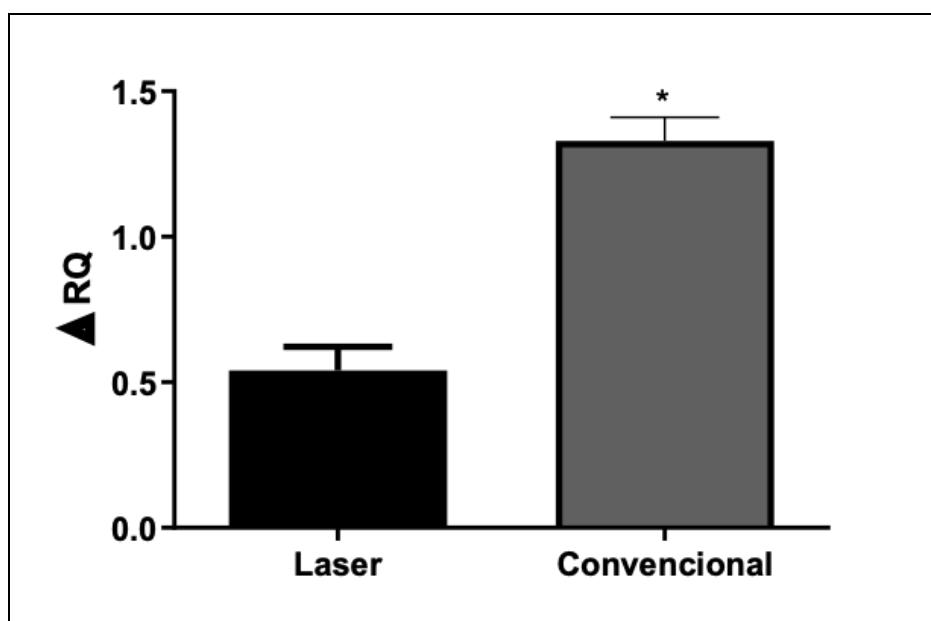
Após o crescimento celular, avaliou-se as expressões gênicas envolvidas nestes processos através da técnica de PCR em tempo real. Os genes estudados foram: ALPL (fosfatase alcalina), RUNX2, osteocalcina, osteopontina, PPAR γ , CEBP α , sidercano e perlecano.

5.3.1 Avaliação da expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina)

Foi analisada a expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina) por meio do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH.

Os resultados demonstraram que houve diferença na expressão do gene ALPL ($p = 0,004$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional, com aumento da expressão deste gene no grupo lipoaspiração convencional (Gráfico 2).

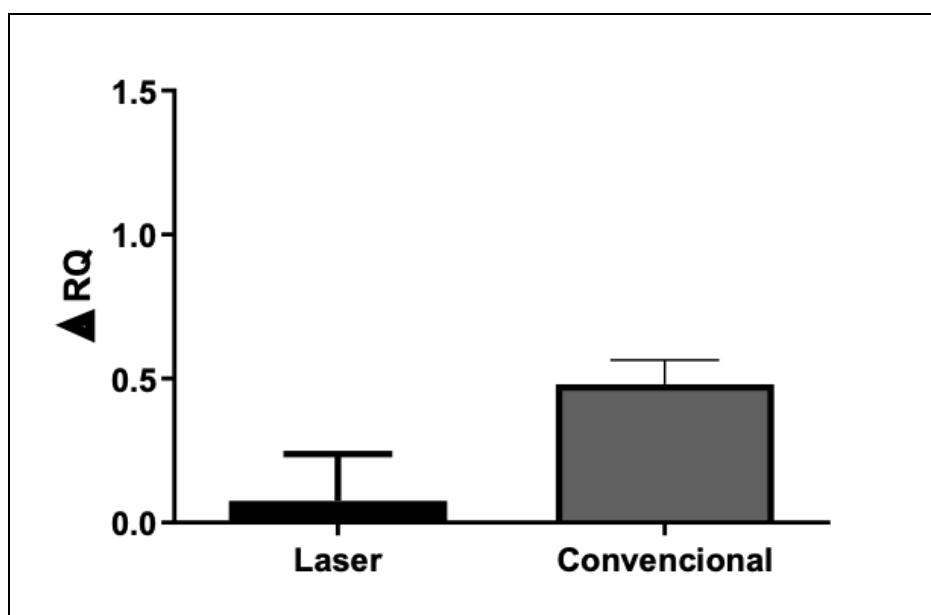
Gráfico 2 - Expressão do gene ALPL (fosfatase alcalina) nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,004$



5.3.2 Avaliação da expressão do gene RUNX2

Foi analisada a expressão do gene RUNX2 através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene RUNX2 ($p = 0,063$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 3).

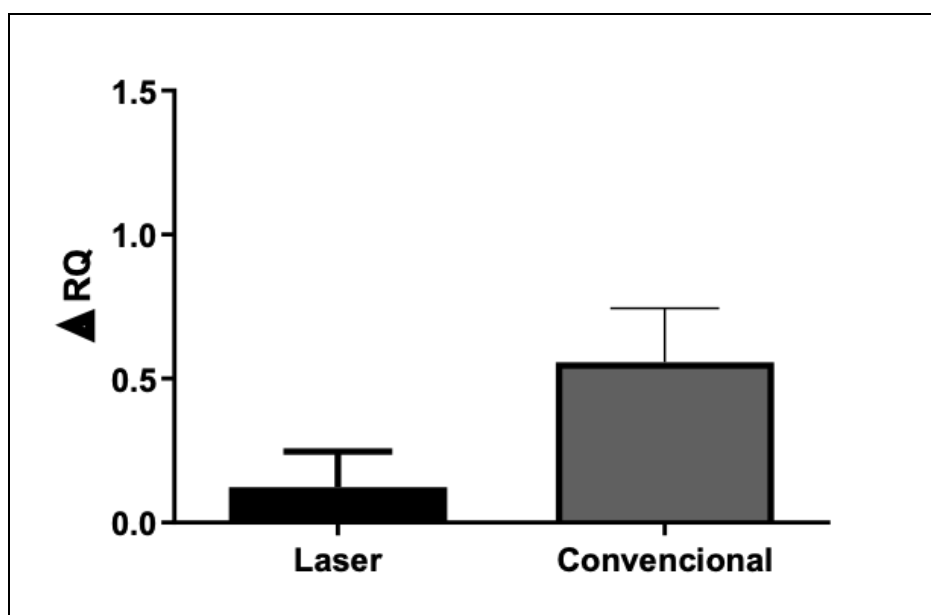
Gráfico 3 - Expressão do gene RUNX2 nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,063$



5.3.3 Avaliação da expressão do gene osteocalcina

Foi analisada a expressão do gene osteocalcina através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene osteocalcina ($p = 0,209$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 4).

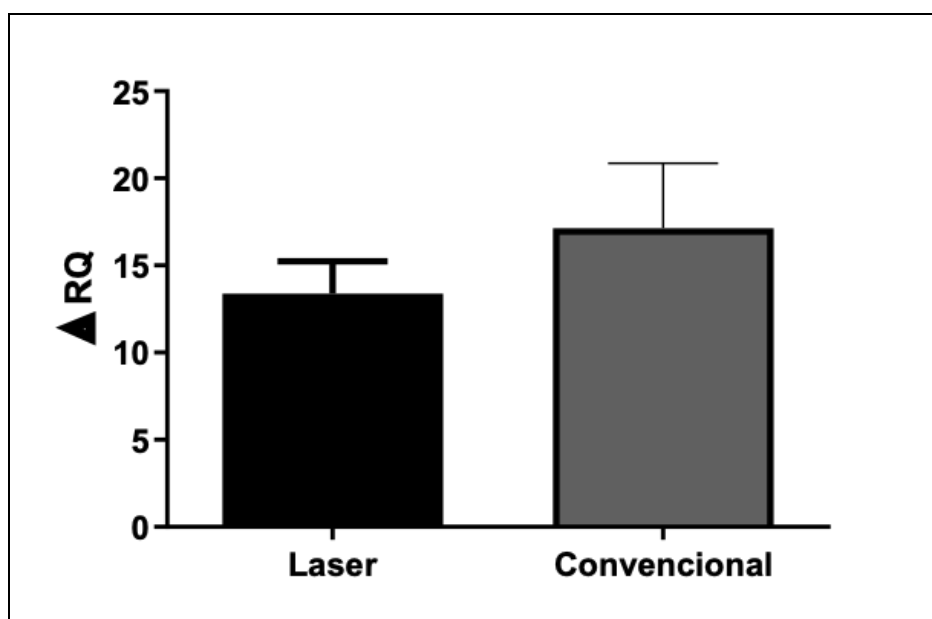
Gráfico 4 - Expressão do gene osteocalcina nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,209$



5.3.4 Avaliação da expressão do gene osteopontina

Foi analisada a expressão do gene osteopontina através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene osteopontina ($p = 0,507$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 5).

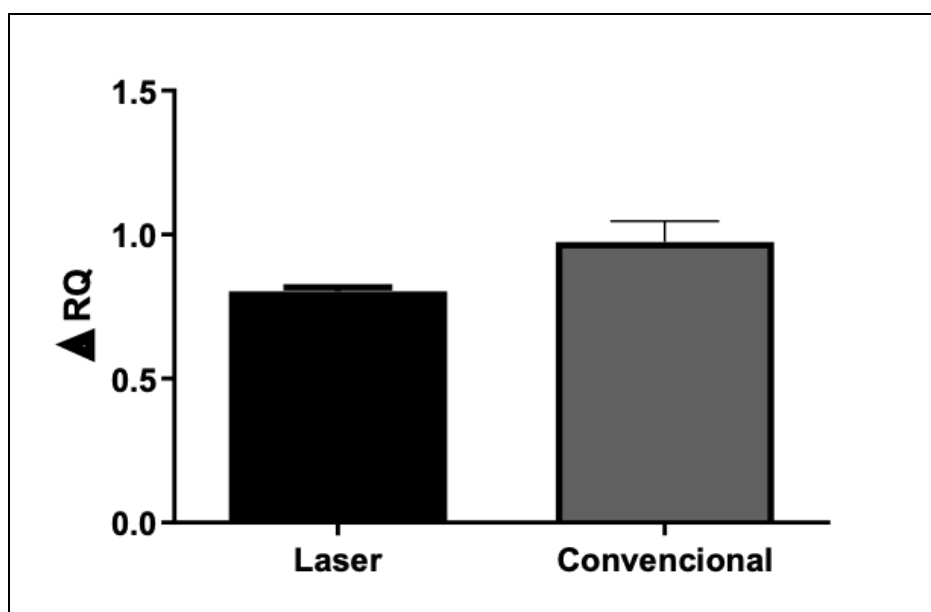
Gráfico 5 - Expressão do gene osteopontina nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,507$



5.3.5 Avaliação da expressão do gene PPAR γ

Foi analisada a expressão do gene PPAR γ através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene PPAR γ ($p = 0,1916$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Expressão do gene PPAR γ nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,1916$

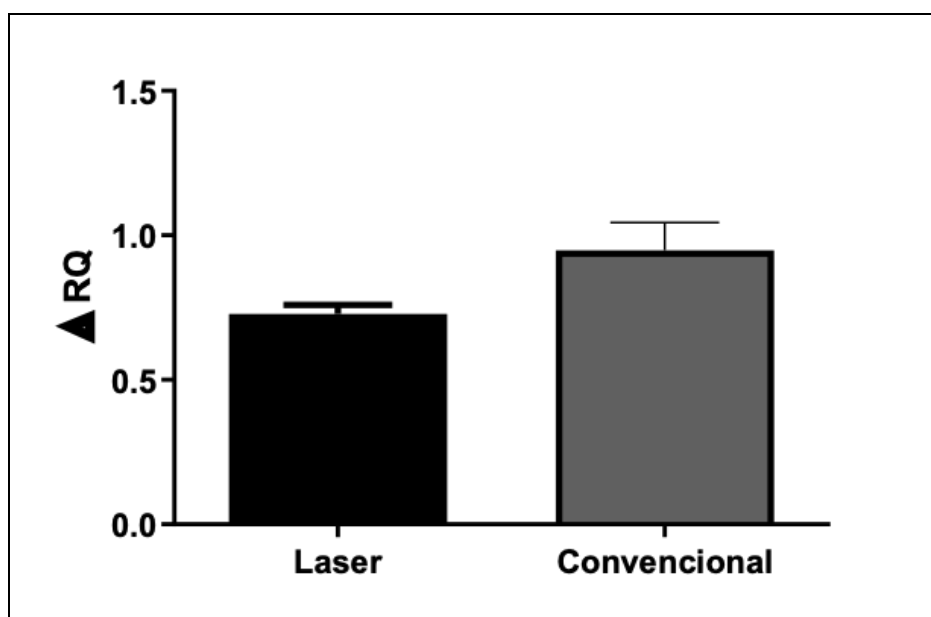


5.3.6 Avaliação da expressão do gene CEBP α

Foi analisada a expressão do gene CEBP α através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH.

Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene CEBP α ($p = 0,200$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 7).

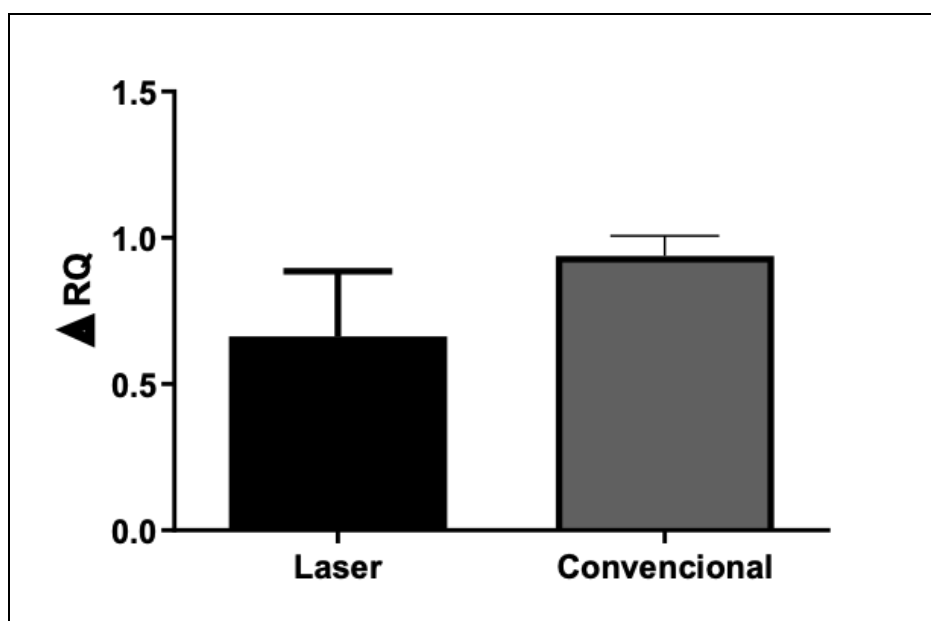
Gráfico 7 - Expressão do gene CEBP α nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,200$



5.3.7 Avaliação da expressão do gene sidercano

Foi analisada a expressão do gene sidercano através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH. Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene sidercano ($p = 0,182$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Expressão do gene sidercano nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,182$

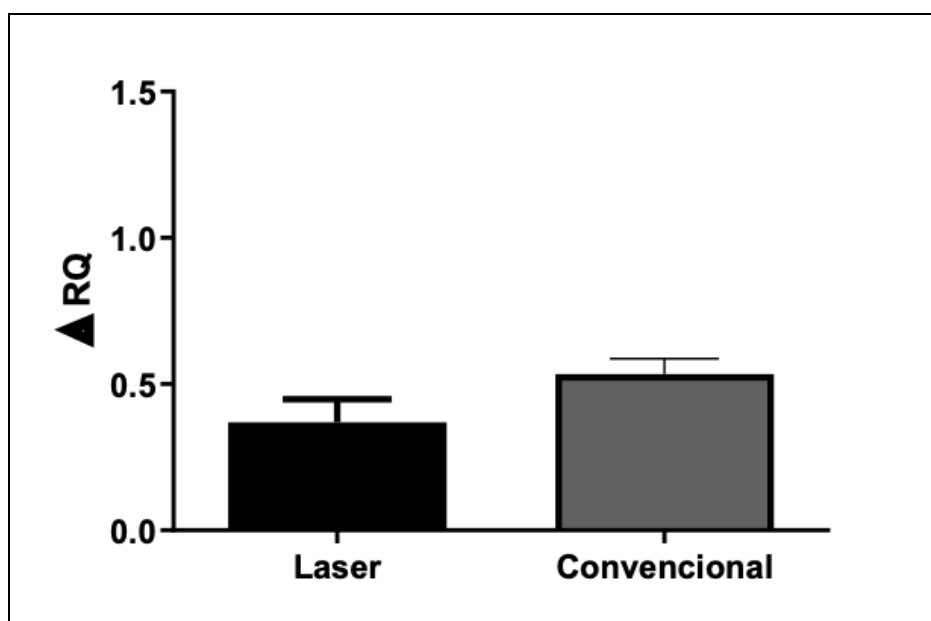


5.3.8 Avaliação da expressão do gene perlecano

Foi analisada a expressão do gene perlecano através do PCR em tempo real. A análise da expressão de mRNA foi normalizada em relação a expressão do gene endógeno GAPDH.

Os resultados demonstraram que não houve diferença na expressão do gene perlecano ($p = 0,146$) entre as CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional (Gráfico 9).

Gráfico 9 - Expressão do gene perlecano nas CTM-TA provenientes dos grupos lipoaspiração laser e lipoaspiração convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,146$



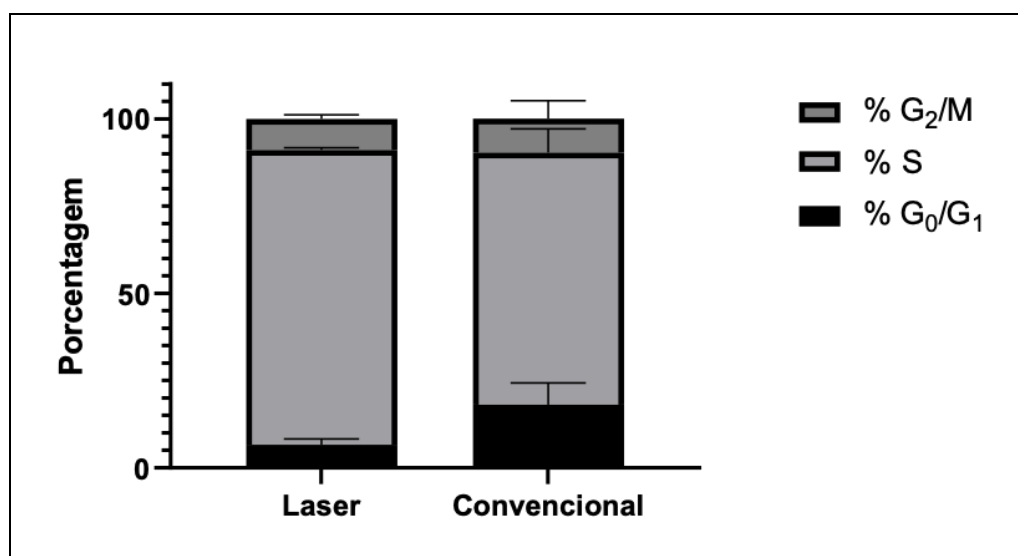
5.4 Análise do ciclo celular das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo

O ciclo celular é a sequência de eventos por meio dos quais uma célula duplica o seu genoma, cresce e divide-se, fechando assim esse ciclo. Entender o comportamento do ciclo celular das CTM-TA é etapa fundamental para avaliar o seu potencial de proliferação, relacionado com a capacidade de homeostase e correta replicação do material genético destas células.

Foi analisado o ciclo celular para verificar em quais fases encontravam-se as CTM-TA pela técnica de lipoaspiração convencional e pela lipoaspiração laser. O método utilizado foi a verificação da intensidade de fluorescência dos núcleos marcados com Hoechst 33342. As fases estudadas foram: G0/G1, S e G2/M.

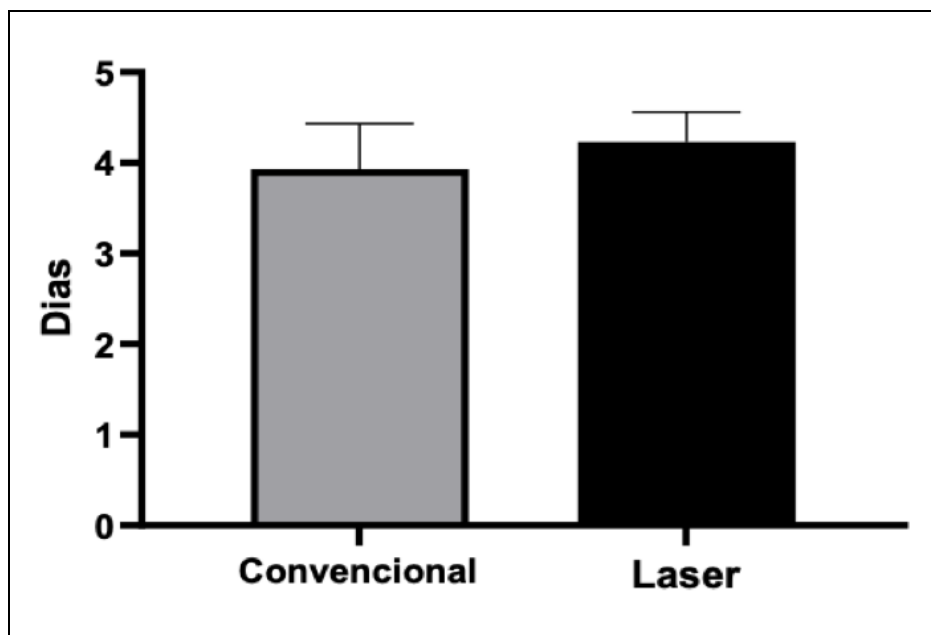
Os grupos lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas fases G0/G1 ($p = 0,0078$) e S ($p = 0,0045$). O grupo lipoaspiração laser apresentou menor atividade celular na fase G0/G1 (6,69% - 5%), estágio de transição entre a fase de quiescência e replicação dos cromossomos quando comparado ao grupo convencional (18,13% - 20%). Além disso, na fase S, momento que acontece a síntese do DNA, o grupo lipoaspiração laser apresentou um aumento de atividade (84,36% - 85%) estatisticamente significativo quando comparado com o grupo lipoaspiração convencional (72,20% - 70%) (Gráfico 10).

Gráfico 10 - Análise das fases do ciclo celular das CTM-TA. Os dados são representados pela porcentagem de fluorescência dos núcleos marcados com Hoechst 33342 nas diferentes fases do ciclo celular. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). G₀/G₁ ($p = 0,0078$) e S ($p = 0,0045$)



Apesar da diferença estatisticamente significativa encontrada nas fases G₀/G₁ e S no ciclo celular das CTM-TA oriundas de lipoaspiração convencional e pela lipoaspiração laser, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,6514$) no tempo de duplicação (DT - do inglês, *doubling time*) entre a lipoaspiração convencional ($3,93 \pm 0,5$ dias) e a lipoaspiração laser ($4,23 \pm 0,23$ dias) (Gráfico 11).

Gráfico 11 - Comparação do *doubling time* (DT) das CTM-TA originadas da lipoaspiração convencional e da lipoaspiração laser. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,6514$



5.5 Análise da expressão de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular

Durante a fase S, a replicação deve ocorrer com extrema precisão, minimizando o risco de mutações na próxima geração de células. O aumento da fase S observado no grupo lipoaspiração laser nos fez avaliar se ocorreram alterações em algum ponto de checagem (do inglês, *checkpoint*) do ciclo celular, o que poderia relacionar-se com potencial tumorigênico destas CTM-TA. Desta forma, foi analisada a expressão das seguintes proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular: BCL-2 ($p = 0,241$), BCL-6 ($p = 0,107$), Ciclina D1 ($p = 0,687$), Ciclina A2 ($p = 0,460$), *nuclear factor kappa B* (NF-KB) ($p = 0,340$) e *inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta* (IKBKB) ($p = 0,198$), não sendo observada nenhuma diferença entre os

grupos lipoaspiração laser e convencional (Gráficos de 12 a 17).

Gráfico 12 - Expressão de BCL-2 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,241$

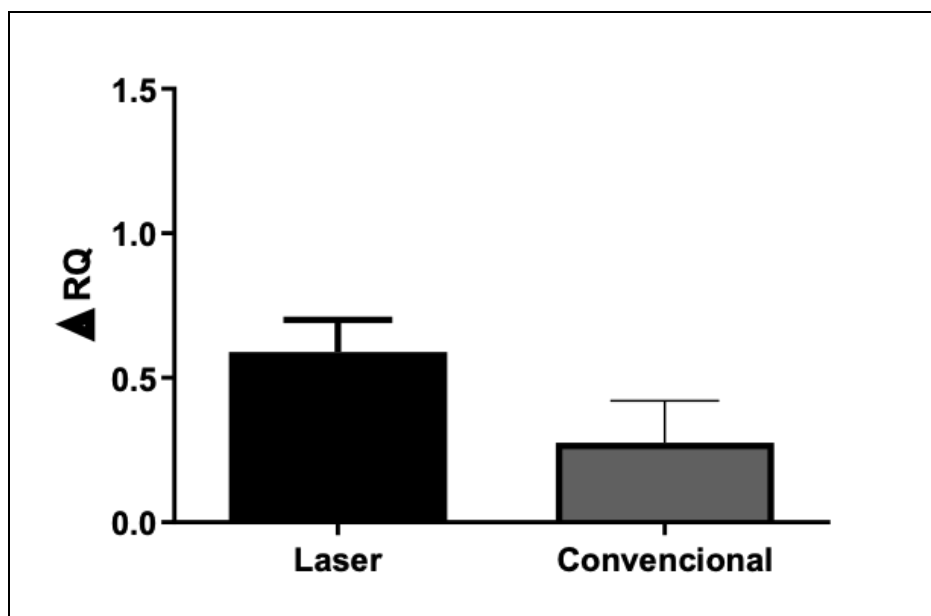


Gráfico 13 - Expressão de BCL-6 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,107$

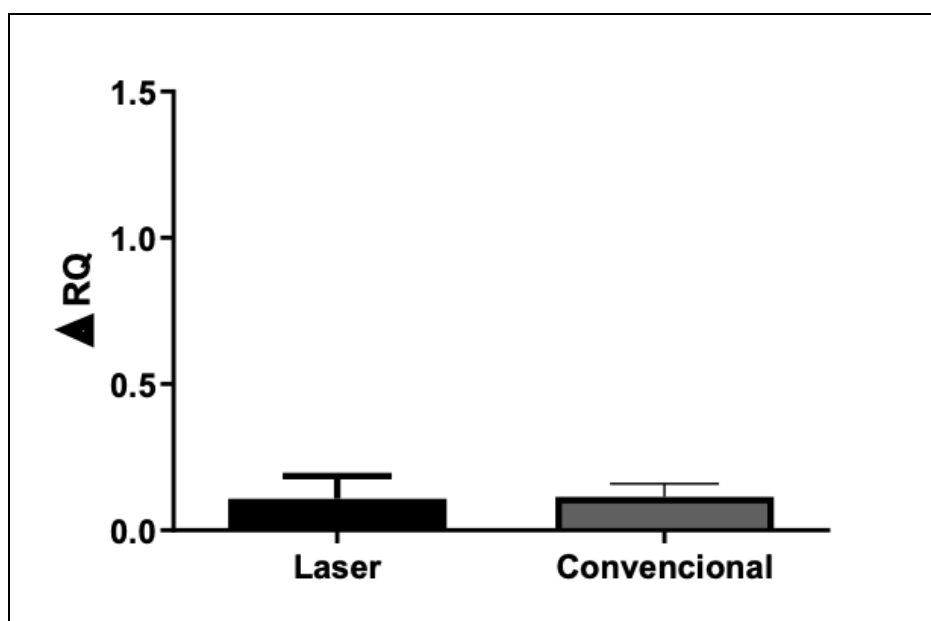


Gráfico 14 - Expressão de Ciclina D1 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,687$

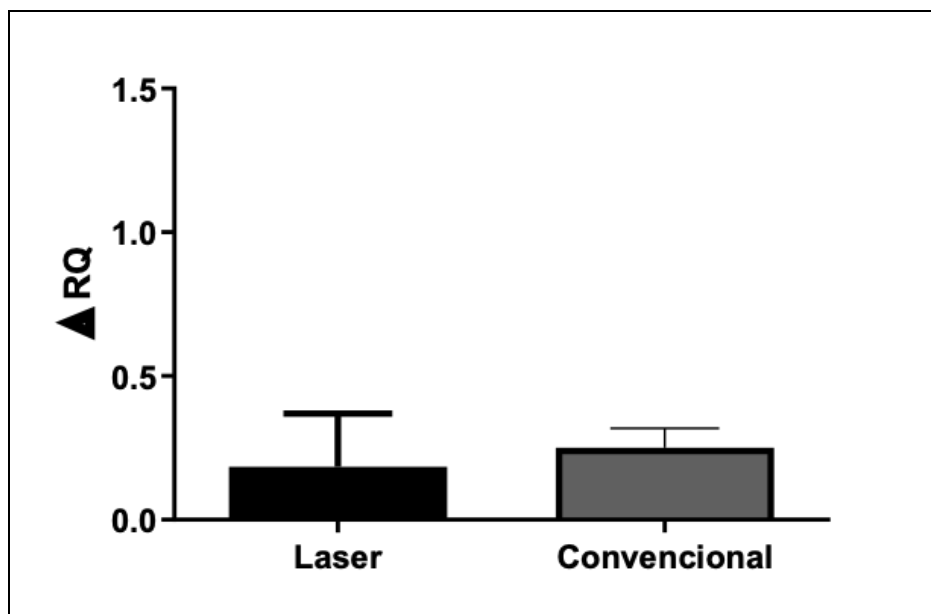


Gráfico 15 - Expressão de Ciclina A2 das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,460$

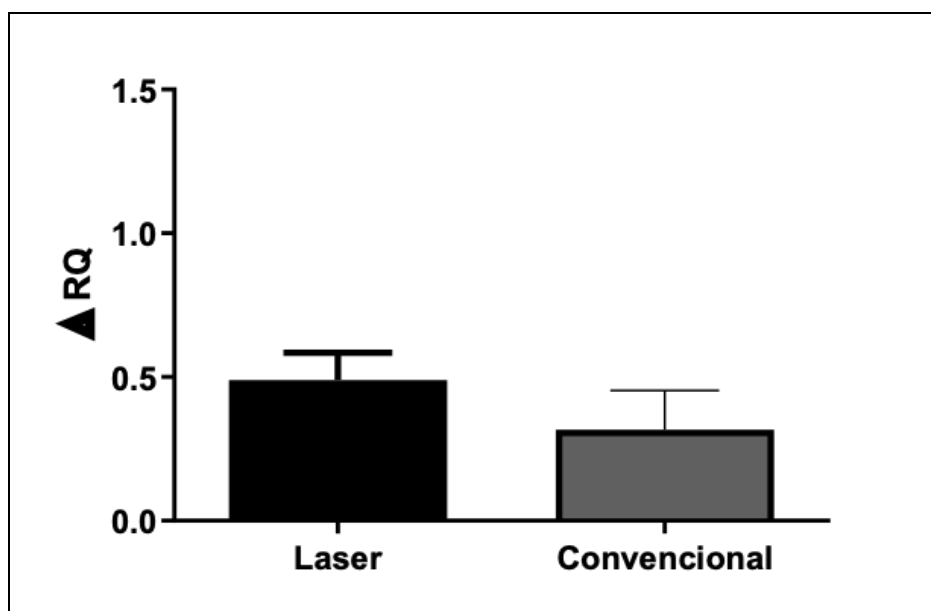


Gráfico 16 - Expressão de NF-KB das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,340$

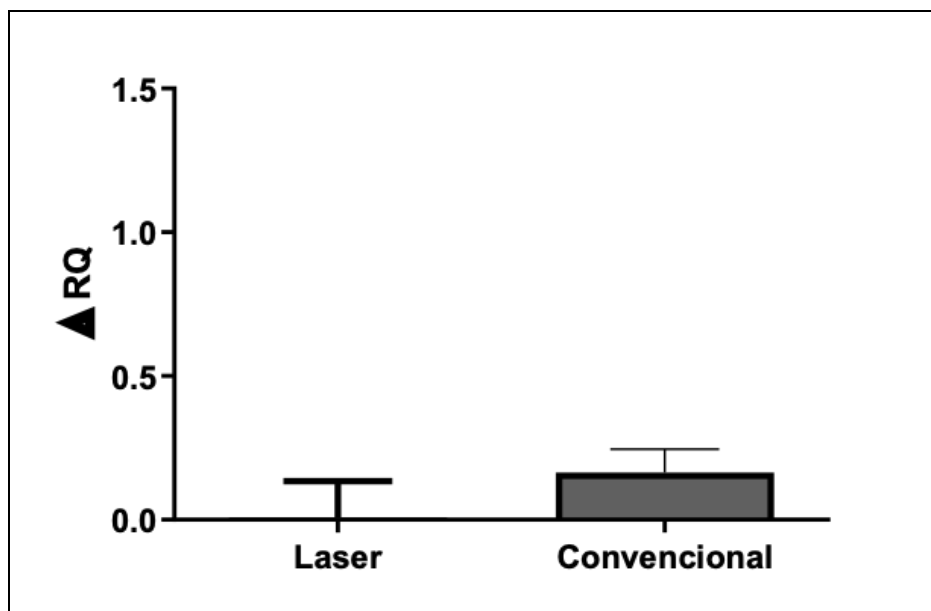
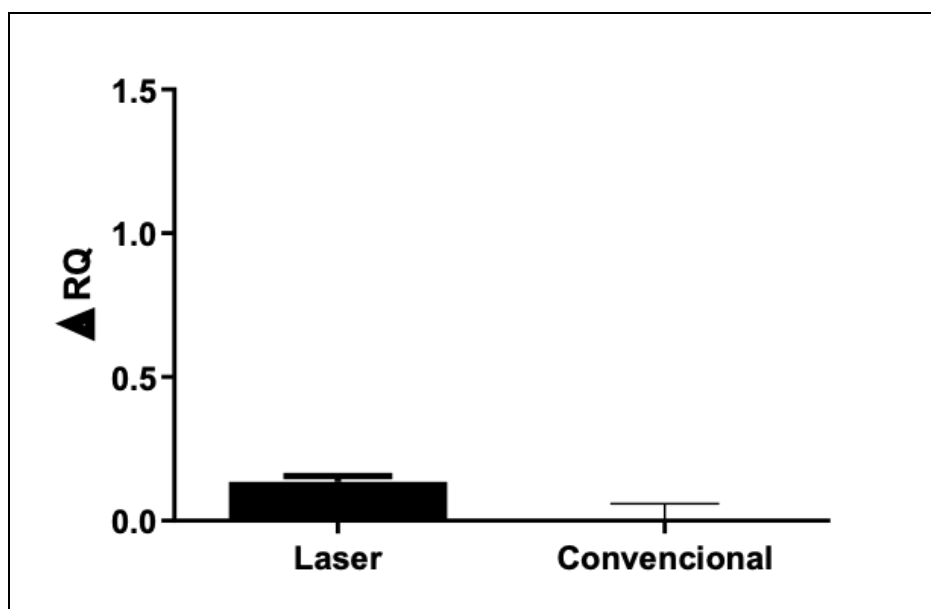


Gráfico 17 - Expressão de IKBKB das CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,198$



5.6 Array de citocinas

Além da caracterização destas células como CTM, análise do ciclo celular e da expressão dos genes envolvidos na diferenciação celular, realizou-se a dosagem semiquantitativa das citocinas produzidas por essas CTM-TA, tanto nas amostras obtidas pela lipoaspiração convencional, como também através da lipoaspiração laser, utilizando o kit semiquantitativo *Proteome Profiler Antibody Arrays Human Cytokine Array* (R&D Systems®, EUA).

Das 36 citocinas analisadas, houve a expressão de apenas três proteínas: Serpin E1/PAI-1, IL-6 e SDF-1/CXCL-12 (Figura 4). Não foi identificada a expressão de das outras 33 citocinas (CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, MIP-1 α /MIP-1 β , CCL5/RANTES, CD40 ligante/TNFSF5, componente do complemento C5/C5a, CXCL1/GRO α , CXCL10/IP-10, CXCL11/I-TAC, G-CSF, GM-CSF, ICAM-1/CD54, IFN- γ , IL-1 α /IL-1F1, IL-1 β /IL-1F2, IL-1ra/IL-1F3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-16, IL-17A, IL-17E, IL-18/IL-1F4, IL-21, IL-27, IL-32 α , MIF, TNF- α e TREM-1) analisadas pelo método.

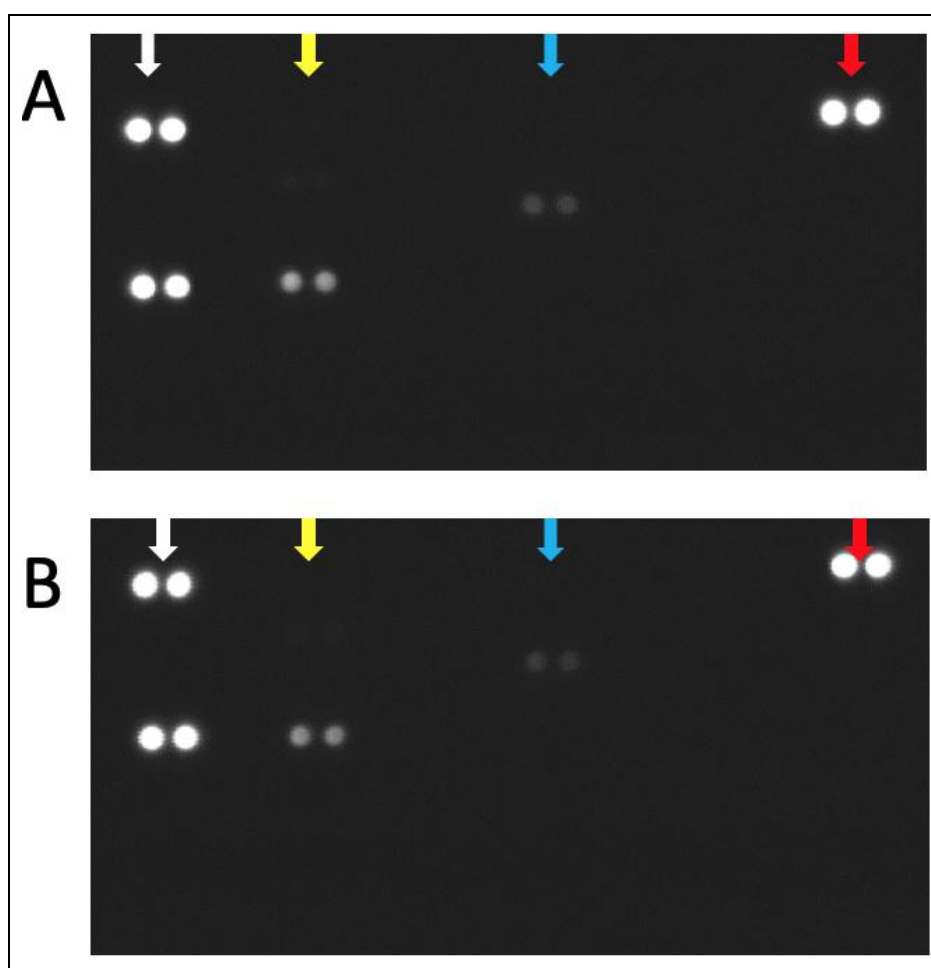


Figura 4 - Avaliação semiquantitativa da expressão das citocinas expressas pelas CTM (array de citocinas). A: lipoaspiração laser. B: lipoaspiração convencional. Controle (seta branca), IL-6 (seta amarela), SDF-1/CXCL-12 (seta azul) e Serpin E1/PAI-1 (seta vermelha). Leitura realizada no equipamento ImageQuant LAS 4000 em modo de quimioluminescência

Quando comparadas as linhagens provenientes da lipoaspiração laser e convencional, as duas linhagens expressaram as mesmas três citocinas IL-6 ($p = 0,07$), SDF-1/CXCL-12 ($p = 0,49$) e Serpin E1/PAI-1 ($p = 0,22$), sem diferenças significativas na expressão semiquantitativa entre os grupos (Gráficos de 18 a 20).

Gráfico 18 - Comparação da quantidade de IL-6 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,07$

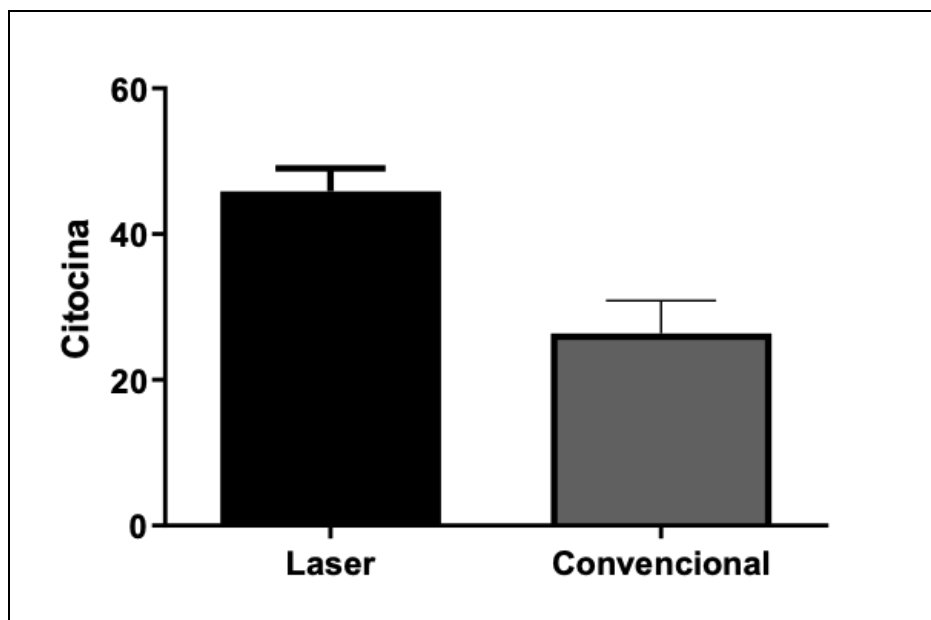


Gráfico 19 - Comparação da quantidade de SDF-1/CXCL-12 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,49$

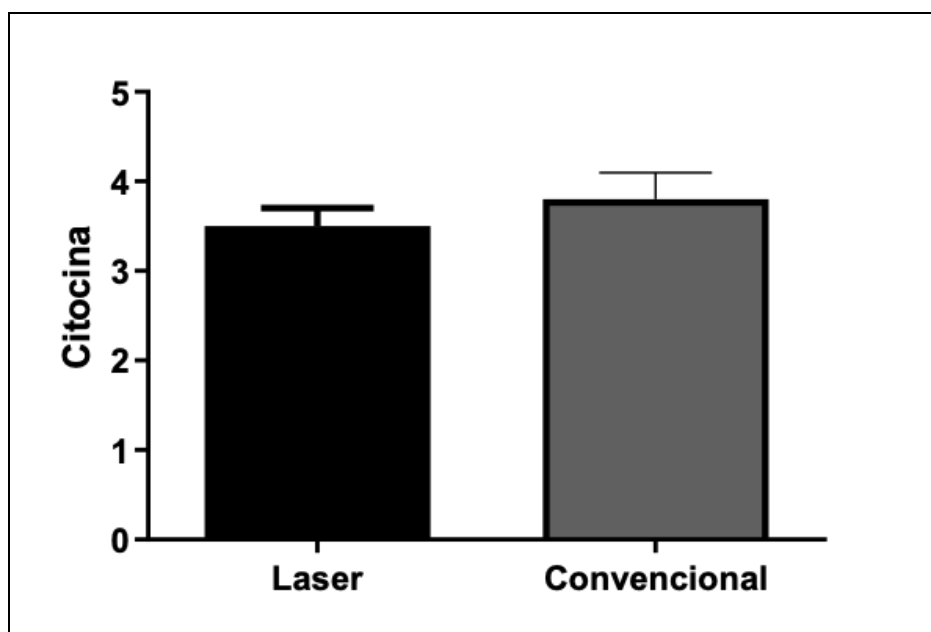
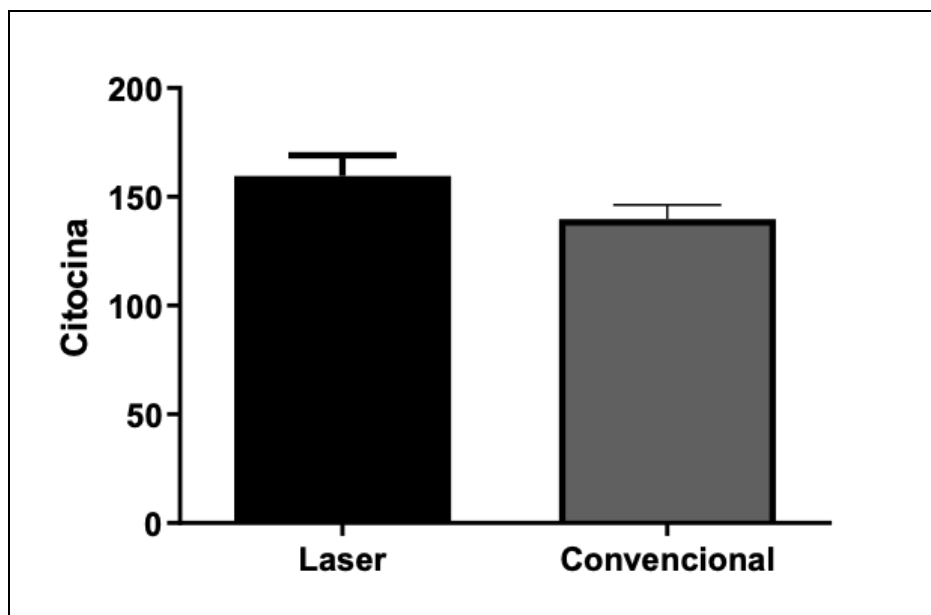


Gráfico 20 - Comparação da quantidade de Serpin E1/PAI-1 produzida pelas CTM-TA originadas da lipoaspiração laser e convencional. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). $p = 0,22$



6 DISCUSSÃO

As dificuldades relacionadas ao processo de reparo/cicatrização de uma lesão da cartilagem, descritas desde o século XVIII³³, permanecem como um grande desafio terapêutico, mesmo nos dias de hoje. As lesões da cartilagem articular são muito comuns, podendo ter prevalência em até 63% das artroscopias do joelho¹. Por tratar-se de um tecido hipocelular e avascular², apresenta um limitado potencial de reparo intrínseco, levando à progressão para OA^{3,4}, uma importante causa de dor e incapacidade na população contemporânea⁵. Técnicas cirúrgicas envolvendo a perfuração do osso subcondral, subcondroplastia, microfraturas e transplantes osteocondrais são aplicadas no tratamento das lesões osteocondrais do joelho, entretanto, apresentam limitações no seu uso clínico^{6-13,145}. Em 1994, foi publicada a primeira série de casos utilizando o implante autólogo de condrócitos no tratamento da lesão condral do joelho¹⁴. Desde então, a aplicação da terapia celular como opção terapêutica vem ganhando cada vez mais espaço nos processos de reparo da cartilagem. Nesse contexto, as CTM são uma promissora fonte de células que podem ser aplicadas no tratamento da lesão condral¹⁵⁻¹⁸.

As CTM, descritas em 1991⁴³, são células com potencial de diferenciação multipotente capazes de autorrenovação e que podem ser extraídas de diferentes fontes do tecido conjuntivo, como medula óssea,

tecido adiposo, sinóvia, periósteo, placenta, dentre outros¹⁹. Embora as CTM possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada do que as CTE, apresentam grandes vantagens quando se considera o possível uso clínico, como a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura e menores entraves éticos para uso clínico, quando comparadas com as CTE⁵⁰. As CTM-TA vêm sendo entendidas como uma fonte promissora de CTM para aplicações clínicas¹⁴⁶, visto a sua maior facilidade de captação e quantidade até 500 vezes maior de CTM obtidas, quando se compara com o mesmo volume de CTM-MO²¹.

Visando definir uma uniformidade nos estudos das CTM humanas, a ISCT publicou três critérios que devem ser seguidos para caracterizar uma célula como CTM: aderência plástica ao frasco de cultura quando em condições de cultivo celular, expressão de antígenos de superfície específicos e diferenciação multipotente²⁰. Todos esses critérios validados na literatura foram, rigorosamente, seguidos e aplicados no presente estudo com CTM-TA provenientes da lipoaspiração convencional e pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo.

Pode-se verificar que a caracterização imunofenotípica das CTM-TA por citometria de fluxo, provenientes dos grupos lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser foi compatível com o que tanto a ISCT²⁰ como, mais recentemente, a IFATS³² padronizaram na literatura para a caracterização das CTM-TA. As CTM-TA estudadas expressaram, com positividade > 95%, os marcadores CD29, CD90 e CD105. Além disso, expressaram, abaixo de 5%, os marcadores hematopoiéticos CD14, CD34, CD45, CD80, CD117 e

HLA-DR. É importante destacar um ponto que costuma ser divergente na literatura das CTM-TA, a expressão positiva do CD34. Apesar de, classicamente, as CTM serem descritas como tendo expressão negativa do CD34²⁰, existem evidências da expressão positiva do CD34 na FVE¹⁴⁷ e durante as etapas mais iniciais da cultura das CTM-TA, com perda da expressão CD34 conforme ocorre a progressão das passagens^{32,148}.

Completando os critérios da ISCT²⁰ e da IFATS³², verificou-se a capacidade de diferenciação multipotente das oito amostras divididas em dois grupos iguais (lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser) em três tipos celulares: adipócitos, osteoblastos e condroblastos. A diferenciação adipogênica levou à formação de vacúolos lipídicos, visualizados com a coloração *Oil Red*. A diferenciação em osteoblastos produziu íons de cálcio (depósito de cálcio fixado) visualizados com a coloração vermelho de alizarina. Por fim, a condrogênese levou à formação do agregado celular condrogênico, confirmado com a coloração de Safranina O. Em adição à identificação das CTM baseadas em suas características morfológicas e imunofenotípicas, a habilidade de células clonais expandidas em formar estes três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar CTM genuínas e distingui-las de pré-osteoblastos, pré-adipócitos ou pré-condrócitos, que dão origem a somente um tipo celular⁵⁰. Acredita-se que seguir todos os critérios para caracterizar as células estudadas como CTM é o primeiro passo nessa linha de pesquisa com a lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, permitindo que análises relacionadas à forma de obtenção, capacidade de

proliferação e plasticidade celular sejam realizadas. Desta forma, pode-se constituir a base científica para fundamentar ensaios clínicos que avaliem essa nova forma de captação de CTM-TA e o seu potencial uso tratamento de lesões da cartilagem articular.

Existem inúmeros ensaios clínicos publicados na literatura mostrando resultados favoráveis no uso das CTM-TA tanto no tratamento da lesão condral focal do joelho^{127,130,149,150} quanto na OA de joelho^{15,151-154}. Recentemente, pode-se observar o Lipogems® ter seu uso liberado em território nacional. Este sistema fechado de processamento da gordura aplica forças mecânicas, sem ativação enzimática ou expansão celular, levando a microfragmentação do tecido adiposo autólogo e permitindo que a FVE tenha aplicações clínicas em tempo único^{24,155,156}.

Em uma coorte prospectiva de pacientes (n = 20) com OA de joelho tratados com a injeção intra-articular de gordura microfragmentada autóloga utilizando o Lipogems®¹⁵⁷, houve melhora significativa no KOOS, mantida no seguimento de 12 meses, sem complicações maiores relatadas. Um paciente relatou uma insatisfação estética por irregularidade na área doadora do tecido adiposo, sendo corrigida por um cirurgião plástico posteriormente.

Um ensaio clínico prospectivo e randomizado publicado em 2022 comparou o resultado de debridamento artroscópico isolado e debridamento artroscópico seguido de injeção intra-articular de gordura microfragmentada autóloga (Lipogems®) no mesmo tempo cirúrgico em 78 pacientes com OA de joelho grau 3 ou 4 de Kellgren-Lawrence (KL)¹⁵⁸. Aproximadamente, de

100 mL a 120 mL de gordura foram obtidos de cada paciente através de lipoaspiração abdominal. Tal procedimento permitiu o isolamento de uma seringa de 10 mL de gordura microfragmentada para cada paciente, sendo feita a injeção intra-articular de 6 mL a 8 mL após debridamento artroscópico. O uso adjuvante da gordura microfragmentada autóloga levou à melhora dos escores funcionais medidos com 6 e 24 meses, além de um melhor aspecto no tecido de reparo na avaliação por RM com 6 meses. Os autores descreveram este como o primeiro estudo controlado e randomizado que investiga o efeito da gordura microfragmentada autóloga combinada com um procedimento cirúrgico (debridamento artroscópico), trazendo um perfil de segurança favorável a esse tratamento, apoiando a lógica da aplicação deste tipo de FVE na OA de joelho.

Por falar em FVE, é importante esclarecer uma confusão de conceitos que, comumente, ocorre entre CTM-TA e FVE. Diversos dos trabalhos publicados avaliando o uso clínico das CTM-TA, na verdade, não utilizam CTM-TA isoladas, mas sim a FVE. A FVE é uma composição heterogênea de células hematopoiéticas, vasculares e estromais, que quando colocada em placas de cultura, pode apresentar aderência ao plástico e iniciar o processo de expansão das CTM^{32,159}. Apesar da popularidade do termo nas publicações científicas, CTM-TA precisam ser cultivadas em laboratório e, geralmente, exigem uma etapa de digestão enzimática, o que é uma barreira para o uso clínico¹⁷. O estudo de novas técnicas, com menor manipulação laboratorial, é um dos desafios para expandir o uso clínico de CTM-TA no contexto da terapia celular, demonstrando a relevância do presente trabalho.

Desde os trabalhos de Zuk *et al.*²², que em 2001 descreveram a metodologia clássica para extração enzimática de CTM-TA, várias alternativas para otimizar o processo de extração destas CTM-TA vêm sendo estudadas. Nesse contexto, técnicas sem uma etapa enzimática para isolamento das CTM-TA são interessantes^{23,24}, pois permitiriam uma redução no tempo de processamento²⁵, além de reduzir a manipulação, o que se torna relevante para adequação com as regulações impostas pelas agências de saúde^{26,27}. Entretanto, um dos desafios é que a quantidade de CTM-TA extraídas por métodos mecânicos seja equivalente à obtida por digestão enzimática. Existem evidências de que, para um mesmo volume de tecido adiposo processado, a quantidade CTM-TA acaba sendo maior com a utilização de enzimas, quando comparada com o processamento mecânico (agitação e centrifugação)²⁷. Visando otimizar os processos mecânicos, a utilização do laser para liberar estas CTM-TA do tecido conjuntivo da gordura é uma opção interessante e que merece ser melhor estudada.

Uma revisão sistemática, comparando o procedimento de lipoaspiração com laser e a lipoaspiração convencional, mostrou que o uso do laser pode trazer um melhor resultado estético, com ganhos na redução da gordura do subcutâneo, na retração da pele e na hemostasia, levando a uma melhor satisfação dos pacientes¹²⁴. Isso ocorre por conta da lipólise térmica ocasionada pelo laser, diminuindo o tempo cirúrgico e a morbidade da lipoaspiração, além de associar-se com melhores resultados estéticos²⁸. Entretanto, essa lipólise térmica pode impactar, de forma negativa, na qualidade e viabilidade das CTM-TA obtidas desse lipoaspirado. Isto é

relevante ao serem consideradas as potenciais aplicações destas CTM-TA na terapia celular. Chung *et al.*¹²³ compararam as CTM-TA obtidas via lipoaspiração convencional e laser (comprimento de onda de 1064 nm). Apesar do potencial de diferenciação ser mantido, houve uma inferioridade biológica das CTM-TA obtidas pelo laser, com menor potencial de proliferação e viabilidade celular, podendo estar relacionada ao dano térmico ocasionado pelo laser com esse comprimento de onda.

Centurion *et al.*³⁰ publicam um comentário sobre a revisão sistemática citada no parágrafo anterior¹²⁴, no qual os autores destacam que o laser aplicado nas publicações estudadas na revisão utiliza um comprimento de onda com afinidade para a água, ativando a fototermólise pelo laser e levando ao dano térmico dos adipócitos por aumento de permeabilidade da membrana. Como alternativa, os autores apresentam a lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, com a vantagem de ser um laser com comprimento de onda específico para o tecido adiposo (1210 nm).

Esta lipoespecificidade substitui a ação fototérmica do laser convencional pela ação fotoquímica, com separação dos adipócitos e CTM-TA do tecido conjuntivo da gordura sem dano celular, permitindo a aplicação destas células tanto para enxertia estética como para fins de terapia celular. O comprimento de onda de 980 nm, que apresenta grande afinidade com a água, requer 21 W de potência para a sua aplicação. Já o comprimento de onda de 1210 nm, que tem grande afinidade com a gordura, requer apenas 7 W, dois terços a menos que a energia necessária para o de 980 nm. Desta

forma, nota-se um maior nível de segurança em relação ao risco de queimaduras e dano térmico aos adipócitos. A aplicação do laser 1210 nm torna a lipoaspiração menos traumática, com melhores resultados funcionais e estéticos, além de permitir uma extração das CTM-TA sem a necessidade de digestão enzimática, com um potencial benefício biológico nas características destas células. Em 102 pacientes que realizaram lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo, os autores relataram ausência de complicações maiores, como hematomas significativos, queimaduras ou embolia gordurosa³¹, demonstrando segurança na aplicação clínica desta técnica. Tais achados justificaram e respaldaram o estudo mais aprofundado desta técnica de processamento de CTM-TA, comparando com o método convencional.

Pensando nas vantagens associadas à melhora dos resultados clínicos obtidos na lipoaspiração com laser e na possibilidade de extração de CTM-TA sem a necessidade da etapa de ativação enzimática, acredita-se ser importante estudar e mostrar que as CTM-TA obtidas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são tão boas quanto as CTM-TA obtidas por lipoaspiração convencional, considerando o seu potencial uso na terapia celular. Foi realizada a comparação da expressão gênica dos marcadores de diferenciação e plasticidade celular nas linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica. Para a diferenciação osteogênica, a expressão de quatro genes foi analisada: ALPL (fosfatase alcalina), RUNX2, osteocalcina e osteopontina. Destes, apenas o gene da ALPL (fosfatase alcalina) apresentou diferença

estatisticamente significativa entre os grupos, com expressão maior nas CTM-TA obtidas pela técnica convencional. A análise da expressão gênica durante o processo de diferenciação osteoblástica oferece mecanismos para a compreensão da função do ALPL¹⁶⁰. O ALPL é expressado nos estágios iniciais da diferenciação osteogênica¹⁶¹. Conforme o processo avança, há um aumento da expressão de outros genes, como osteocalcina, e redução da expressão do ALPL. Além disso, o RUNX2 tem um papel fundamental na regulação da diferenciação osteoblástica e na expressão do ALPL¹⁶². Durante o processo de diferenciação, o comprometimento da célula em seguir pela linhagem osteogênica ou adipogênica depende muito da balança RUNX2 (osteogênica) e PPAR- γ (adipogênica). Quando a célula se compromete com a linhagem osteogênica, ocorre um aumento da expressão de RUNX2 e uma redução recíproca da expressão do PPAR- γ . Por outro lado, durante a formação dos adipócitos, ocorre uma hiperexpressão de PPAR- γ , com redução de RUNX2⁷³. O RUNX2 é o fator de transcrição chave no processo de diferenciação osteogênica. Há evidências de que a hiperexpressão de PPAR- γ leva a uma redução dos níveis de osteocalcina mediada pela supressão de RUNX2 ocasionada pelo PPAR- γ ¹⁶³. Além dos genes já comentados que regulam a diferenciação osteogênica e adipogênica, foi avaliada também a expressão dos genes de diferenciação condrogênica (sidercano e perlecano), sem nenhuma diferença significativa entre os grupos. Isso reforça a tese do presente estudo de que as CTM-TA obtidas pela lipoaspiração laser possuem a mesma capacidade de comprometimento de diferenciação nas três linhagens que as CTM-TA convencionais.

Desta forma, pode-se interpretar que esse aumento isolado na expressão do gene ALPL nas CTM-TA provenientes da lipoaspiração convencional não está associado com diferença no potencial de diferenciação osteogênica entre os grupos, já que não houve nenhuma outra diferença entre os demais mecanismos reguladores da balança de diferenciação osteogênica/adipogênica. A família da enzima fosfatase alcalina é composta por quatro isoformas, sendo três delas tecido específicas (placentária, intestinal e de células germinativas) e uma forma não-específica para determinado tecido, sendo mais abundante no osso, fígado e rim. Cada uma dessas isoformas é regulada por um gene específico¹⁶⁴. A fosfatase alcalina não-específica, regulada pelo gene ALPL¹⁶⁵, não possui uma especificidade osteogênica, podendo estar aumentada em diversas outras situações, como em alterações da homeostasia celular e estresse oxidativo. Acredita-se que esse aumento isolado na expressão gênica do ALPL pode ser provocado pelo estresse oxidativo associado ao tempo de cultura celular, sem relação com o comprometimento de diferenciação com a linhagem osteogênica.

O estudo do ciclo celular é etapa fundamental para compreender a capacidade de proliferação destas CTM-TA, além de possíveis alterações da proliferação que podem ser deletérias para estas células¹⁶⁶. Os grupos lipoaspiração convencional e lipoaspiração laser apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas fases G0/G1 e S. O grupo lipoaspiração laser apresentou menor atividade celular na fase G0/G1, estágio de transição entre a fase de quiescência e replicação dos cromossomos, quando comparado ao grupo convencional. Além disso, na fase S, momento que

acontece a síntese do DNA, o grupo lipoaspiração laser apresentou um aumento de atividade estatisticamente significativo, quando comparado com o grupo convencional. Ou seja, as CTM-TA obtidas pela lipoaspiração laser encontram-se menos na fase G0/G1 e mais na fase S, o que pode ser interpretado como uma potencial melhor replicação destas células. Para fins de aplicação em terapia celular, a expansão das CTM *in vitro* costuma ser uma etapa para que um número suficiente de células seja obtido. Uma potencial melhor replicação celular pode ser uma vantagem a ser explorada, permitindo um processo mais rápido de obtenção de CTM em número adequado. Importante destacar que a idade é um fator que pode impactar na capacidade de proliferação das CTM¹⁶⁷. CTM provenientes de doadores mais velhos podem apresentar redução na sua capacidade de proliferação, inclusive evidência na literatura de uma maior taxa de apoptose de CTM-TA em indivíduos com idade superior a 55-60 anos¹⁶⁸. Os resultados do presente estudo não apresentaram esse viés, visto que os doadores de ambos os grupos eram mulheres jovens, da mesma faixa etária (entre 27 e 44 anos).

Outro ponto importante na interpretação desses resultados é entender se o estudo do ciclo celular foi feito de forma sincronizada ou não sincronizada. Uma forma popularmente utilizada para sincronizar o ciclo celular é manter as células em insuficiência nutricional (não acrescentar o soro fetal bovino na cultura)¹⁶⁹. A privação de nutrientes faz com que as células se acumulem na fase G0, desta forma, ao acrescentar o suplemento nutricional, todas as células iniciarão o seu processo de duplicação na mesma fase G0. O estudo do ciclo celular deste trabalho foi realizado de forma não sincronizada, conforme costuma ser o processo rotineiro de cultivo celular, já que foi adicionado o soro

fetal bovino na etapa inicial. Tal fato torna-se relevante nesta discussão já que, apesar do aumento da fase S no grupo CTM-TA (o que sugeriria um melhor perfil de replicação destas células), não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de duplicação (do inglês, *doubling time*) entre os grupos. Ou seja, a redução da fase G0/G1 e aumento da fase S não refletiu em diminuição no tempo de duplicação destas CTM-TA.

Um dos receios que se tem quando é realizada a expansão de CTM *in vitro* é que essa rápida proliferação celular possa predispor a ocorrência de alterações deletérias que se associam com malignidades e tumorigênese. Mesmo que nenhum efeito colateral crítico, incluindo a formação de tumor, tenha sido descrito em pacientes que receberam CTM em ensaios clínicos, o uso de CTM na terapia celular em humanos requer que a biossegurança dessas células seja, cuidadosamente, investigada por testes apropriados¹⁷⁰. Como foi identificado um aumento da fase S, podendo ser interpretado como uma maior capacidade proliferativa das CTM-TA obtidas pela lipoaspiração laser, decidiu-se pela realização do estudo das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular para avaliar possíveis alterações em algum *checkpoint* do ciclo celular, o que poderia relacionar-se com potencial tumorigênico destas CTM-TA. Desta forma, foi analisada a expressão das seguintes proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular: BCL-2, BCL-6, Ciclina D1, Ciclina A2, NF-KB e IKBKB, não sendo observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos lipoaspiração laser e convencional. A família de proteínas do gene BCL-2 pode ser vista como uma das principais reguladoras da via intrínseca da apoptose¹⁷¹, sendo a sua superexpressão associada a vários tipos de cânceres¹⁷². A expressão do

gene BCL-6 aumenta o potencial replicativo de células B humanas primárias em cultura e induz a expressão de Ciclina D1, sugerindo que o gene BCL-6 contribui para a oncogênese, tornando as células não responsivas aos sinais antiproliferativos. Determinar que a expressão dos genes BCL-2 e BCL-6 não teve diferença estatisticamente significativa entre os grupos é uma etapa importante para avaliar se o laser possui algum efeito deletério na composição genética das CTM-TA obtidas pela lipoaspiração laser.

Durante o ciclo celular, ocorrem modificações cíclicas nos níveis das proteínas ciclinas, resultando no agrupamento e ativação cíclicos dos complexos ciclina-CDK para cada estágio específico do ciclo celular, regulando assim os pontos de checagem para progressão do ciclo celular¹⁷³. Os níveis de CDK permanecem constantes, variando apenas os níveis de ciclina. O complexo Ciclina D-CDK regula o ponto de checagem G1-S, sendo o acúmulo de Ciclina D necessário para a progressão da fase G1 para a fase S. O complexo Ciclina A-CDK age tanto na progressão da fase S como no ponto de checagem G2/M¹⁷⁴. O padrão de expressão de Ciclina D1 e A2 no presente estudo, sem diferenças estatisticamente significativa entre os grupos lipoaspiração convencional e laser, é importante para demonstrar que a potencial melhor proliferação destas células por aumento de fase S não é às custas de uma perda do controle dos pontos de checagem do ciclo celular, o que poderia ocasionar mutações deletérias.

O estudo dos níveis de expressão do NF-KB e do IKBKB é importante para a compreensão do perfil de segurança de proliferação celular. Descoberto em 1986¹⁷⁵, o NF-KB regula a transcrição de diversos genes relacionados à resposta imune, adesão celular, proliferação, diferenciação,

angiogênese e apoptose, tendo um papel estabelecido na tumorigênese¹⁷⁶. O NF-KB é um regulador da transcrição que pode ser ativado por diversos estímulos como citocinas, irradiação ultravioleta, radicais livres, dentre outros. O NF-KB promove a progressão do ciclo celular, regulando a expressão de vários genes envolvidos no mecanismo do ciclo celular, como as ciclinas D1, D2, D3 e ciclina E^{177,178}. A expressão da ciclina D1 induzida por NF-KB parece ser um elemento chave no desenvolvimento da glândula mamária e na carcinogênese da mama¹⁷⁹. O NF-KB é considerado um dos principais fatores de transcrição envolvidos nos mecanismos de regulação dos processos inflamatórios, sendo constitutivamente ativo na maioria dos cânceres e a sua ativação está implicada em uma série de vias de sinalização relacionadas ao desenvolvimento tumoral^{180,181}.

Em células não estimuladas, o NF-KB é sequestrado e inativado no citoplasma por um complexo proteico inibitório específico, o IKBKB. A ativação do NF-KB é, estritamente, regulada pela interação com o IKBKB. Essa ligação citoplasmática do NF-KB com o IKBKB impede a migração nuclear do NF-KB, mantendo-o inativo. Assim, na maioria das células, o NF-KB está presente como um complexo latente, inativo, ligado a IKBKB no citoplasma¹⁸². Pode-se demonstrar que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas nos níveis de expressão dos genes NF-KB e IKBKB quando se compara as CTM-TA obtidas pelas técnicas lipoaspiração laser e convencional. Isso é muito relevante, já que a ativação inapropriada no NF-KB está associada com condições inflamatórias e carcinogênese, conforme discutido anteriormente.

Todo o estudo do ciclo celular e das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular é uma etapa fundamental para avaliar potenciais riscos de mutação e tumorigênese da aplicação da fotoestimulação seletiva nas CTM-TA por ação do laser com comprimento de onda associado com lipoespecificidade (1210 nm)³¹. Chen *et al.*¹⁸³, em 2011, estudam o efeito nos níveis de NF-KB após aplicação de um laser (comprimento de onda 810 nm) em fibroblastos de camundongos. Ocorre uma maior ativação de NF-KB após aplicação do laser, relacionada ao aumento da produção intracelular de espécies reativas do oxigênio, sugerindo que essas espécies reativas de oxigênio teriam um papel importante nas vias de sinalização do NF-KB. Os autores concluem que o aumento experimental da expressão desse gene antiapoptótico pode explicar efeitos clínicos da aplicação do laser, como em algumas condições dermatológicas. Apesar da fototerapia com laser já ser utilizada na prática clínica há bastante tempo¹⁸⁴⁻¹⁸⁷, ainda existem controvérsias sobre os seus efeitos biológicos a nível molecular e celular. Isto torna ainda mais relevante demonstrar a ausência de diferença na expressão das proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular e que poderiam predispor a ocorrência de alterações deletérias que se associam com malignidades e tumorigênese, o que pode servir como respaldo futuro para aplicações em terapia celular.

Caplan, que em 1991 criou o termo CTM⁴³, sugere que os efeitos terapêuticos das CTM deve-se muito mais à secreção de agentes bioativos com potencial imunomodulatório, trófico e anti-inflamatório do que, propriamente, à sua capacidade de ser uma "célula-tronco" com

diferenciação multilinhagem⁴⁶. Tanto que, em 2017, este mesmo autor publica o artigo “*Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!*”⁴⁹, sugerindo a mudança do nome “*Mesenchymal Stem Cells*” para “*Medicinal Signaling Cells*” (células sinalizadoras medicinais), mantendo a mesma sigla no inglês (MSC). Cada vez mais as CTM são compreendidas como residentes do espaço perivascular, em uma condição latente até que os sinais liberados após algum tipo de lesão tecidual ativem sua migração para o local lesionado, promovendo a produção de moléculas bioativas para restabelecer a homeostase do tecido¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. A atividade parácrina das CTM estaria envolvida no reparo tecidual, diminuindo o estado inflamatório, limitando a resposta ao estresse e apoptose, além de recrutar células imunológicas e reparadoras¹⁹¹. Considerando o potencial efeito das CTM como “sinalizadoras medicinais”, decidiu-se estudar o perfil secretório das CTM-TA obtidas pelas lipoaspiração laser e convencional através do *array* de citocinas.

Foi realizada a dosagem semiquantitativa das citocinas produzidas por essas CTM-TA, tanto nas amostras obtidas pela lipoaspiração convencional, como também através da lipoaspiração laser. Do total de 36 citocinas analisadas, houve a expressão de apenas três: IL-6, Serpin E1/PAI-1 e SDF-1/CXCL-12, sem diferença na análise da expressão semiquantitativa entre os grupos laser e convencional.

Park *et al.*⁹¹, em 2009, avaliam o perfil secretório de CTM-MO por *array* de 120 citocinas. Houve predominância na expressão de IL-6, além da identificação, em níveis mensuráveis, de apenas mais 5 citocinas: IL-8,

TIMP-2, MCP-1, VEGF e OPG. Esse perfil de expressão de citocinas mais limitado publicado por estes autores vai ao encontro dos resultados do presente estudo. O mecanismo de imunorregulação exercido pelas CTM é complexo, dependendo não só da secreção de fatores bioativos pelas CTM, como também da interação destas células com outras citocinas⁸⁷. As CTM podem secretar citocinas tanto espontaneamente como após o estímulo de outras citocinas, sendo IFN- γ , TNF- α e IL-1 β as mais relacionadas nesse processo^{86,192}. Pode-se interpretar que as condições locais do microambiente tecidual, como a presença de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-1 β), podem induzir a secreção de fatores tróficos e citocinas pelas CTM durante o processo de reparo tecidual *in vivo*, sendo estas alterações dinâmicas não identificadas em ensaios *in vitro* que seguem uma determinada metodologia.

A IL-6 foi umas das citocinas expressas no presente estudo, sendo este ponto bastante relevante. A predominância de IL-6 identificada por Park *et al.*⁹¹ corrobora com os achados de diversos outros autores que identificam a IL-6 como umas das citocinas mais frequentemente secretadas pelas CTM¹⁹³⁻¹⁹⁵. A IL-6 tem um papel regulatório dual, possuindo propriedades tanto pró-inflamatórias como anti-inflamatórias, podendo ativar genes envolvidos na diferenciação, apoptose e proliferação celular¹⁹⁶. Quando estimuladas, as CTM podem secretar IL-6, sendo esta citocina importante na regulação da resposta inflamatória local mediada por CTM através da modulação e inibição de células T^{197,198}. Rotineiramente, a IL-6 sempre foi colocada como uma citocina pró-inflamatória que, em conjunto com a IL-1 e

o TNF- α , induz a secreção de proteínas de fase aguda, causa o recrutamento de neutrófilos e uma mudança de inflamação induzida por neutrófilos para macrófagos. Por outro lado, acumulam-se evidências dessa função anti-inflamatória simultânea da IL-6, reduzindo a secreção de algumas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, TNF- α , GM-CSF e IFN- γ), além de induzir a síntese de glicocorticóides, IL-10 e de antagonistas do receptor de IL-1^{89,90,199}.

Além do já discutido envolvimento da IL-6 em processos de imunorregulação, outro ponto crítico estabelecido à IL-6 é o seu papel na proliferação e progressão do ciclo celular. Através do estudo de CTM-MO *in vitro* que silenciou a expressão de IL-6, Dorronsoro *et al.*²⁰⁰ demonstram que as células que tiveram a expressão de IL-6 silenciada apresentaram redução da proliferação e bloqueio de progressão do ciclo celular. Os autores ainda relatam que esse efeito na proliferação celular é dependente de mecanismos de controle intracelular da expressão de IL-6. A expressão de IL-6 no presente estudo pode estar associada com o adequado perfil de proliferação celular que foi encontrado em ambos os grupos avaliados, sendo uma citocina chave na homeostase das CTM.

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1 - do inglês, *plasminogen activator inhibitor*) é uma citocina codificada pelo gene Serpin E1²⁰¹, sendo considerada um importante inibidor da fibrinólise. Níveis aumentados de PAI-1 podem predispor os pacientes à formação de placas de aterosclerose com tendência à ruptura²⁰². Para facilitar a compreensão e evitar a duplicidade de conceitos, que é comum na literatura, foi utilizado o

termo Serpin E1/PAI-1 nos métodos e resultados. Além da associação dos níveis de Serpin E1/PAI-1 com eventos cardiovasculares^{203,204}, a produção e relação desta citocina com o microambiente das CTM vem sendo cada vez mais estudados²⁰⁵⁻²⁰⁸. Serpin E1/PAI-1 exerce várias atividades biológicas, incluindo a regulação da degradação da matriz extracelular, migração celular, apoptose e proliferação celular por meio de efeitos dependentes ou independentes de fibrinólise²⁰⁹.

Takafuji *et al.*²⁰⁷, em 2019, estudam o papel da Serpin E1/PAI-1 na diferenciação osteogênica de CTM-MO e CTM-TA em camundongos. A deficiência de Serpin E1/PAI-1 atenuou a expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica (por exemplo, ALPL - fosfatase alcalina), tanto em CTM provenientes do tecido adiposo como da medula óssea. Os autores sugerem que a regulação por Serpin E1/PAI-1 tem um papel fundamental na diferenciação osteogênica em camundongos. Matsumoto *et al.*²¹⁰, utilizando um modelo de células-tronco pluripotentes induzidas em pacientes com fibrodissplasia ossificante progressiva (FOP), uma condição rara que leva à formação óssea extraesquelética através de ossificação endocondral, demonstram que ocorreu supressão da diferenciação condrogênica quando foi adicionado um inibidor da Serpin E1/PAI-1 durante a indução destas CTM pluripotentes. Tais achados sugerem um papel regulatório da Serpin E1/PAI-1 nos processos de diferenciação osteogênica e condrogênica, o que torna relevante a expressão da Serpin E1/PAI-1 no presente estudo e sua potencial associação com o emprego destas CTM-TA em terapia celular voltada para Ortopedia.

O SDF-1, também conhecido como CXCL-12 (para evitar confusão conceitual, optou-se por utilizar o termo SDF-1/CXCL-12) foi isolado, originalmente, de uma linhagem celular estromal da medula óssea de roedores²¹¹, sendo expresso em vários tecidos durante o desenvolvimento e, frequentemente, justaposto em sua expressão com a do seu receptor único (CXCR4)²¹². Durante a formação da medula óssea, SDF-1/CXCL-12 e CXCR4 parecem ser determinantes moleculares críticos para o estabelecimento da medula no osso²¹³. Em um modelo *in vitro* avaliando a apoptose de CTM-MO em ratos, Liu *et al.*²¹⁴ demonstram que CTM que tiveram apoptose induzida por peróxido de hidrogênio e foram pré-tratadas com SDF-1/CXCL-12 tiveram um maior índice de sobrevivência e proliferação após a reoxigenação. O pré-tratamento com SDF-1/CXCL-12 também aumentou a migração e aumentou a secreção de citocinas pró-sobrevivência e angiogênicas (FGF e VEGF). Os autores sugerem que o eixo de regulação SDF-1/CXCL-12 e CXCR4 é crítico para a sobrevivência, migração e secreção de citocinas pelas CTM-MO.

Em um artigo de revisão, Marquez-Curtis *et al.*²¹⁵ discutem sobre a capacidade de aumentar a migração de CTM através da modulação do eixo SDF-1/CXCL-12 e CXCR4, apresentando uma série de modelos animais que relacionam o importante papel do SDF-1/CXCL-12 no recrutamento de CTM para locais de lesão/reparo. Já foi demonstrado que a expressão de SDF-1/CXCL-12 é crucial na migração de CTM em um modelo de fratura de fêmur em camundongos²¹⁶, com SDF-1/CXCL-12 aumentando a quimiotaxia de CTM *in vitro* de maneira dose-dependente. Além disso, o estudo da

migração de CTM *in vivo* demonstrou que as CTM recrutadas pelo SDF-1/CXCL-12 participaram do processo de reparo ósseo endocondral. Quando se considera que as CTM-TA do presente estudo apresentaram a expressão de SDF-1/CXCL-12, tal achado pode estar associado com a sobrevivência e proliferação adequada das células em condição de cultura e, além disso, servir como base para novos estudos que envolvem a aplicação destas CTM em processos de reparo de lesões ósseas.

Entende-se que este estudo apresenta algumas limitações que merecem ser discutidas com maior profundidade. Foi definido como critério de inclusão apenas doadores jovens (idade variando entre 27 e 44 anos), do sexo feminino, hígidos (sem comorbidades), com IMC na faixa de normalidade (20-25 kg/m²) e que realizaram lipoaspiração abdominal para fins estéticos. Como a maioria dos trabalhos analisa o lipoaspirado proveniente de cirurgias estéticas, é comum os trabalhos padronizarem o sexo feminino (estes procedimentos costumam ser mais frequentes em mulheres) como critério de inclusão, visando reduzir o fator de variabilidade relacionada ao sexo^{25,123,217}. Apesar da maioria dos estudos, assim como o presente estudo, utilizarem mulheres pré-menopausa para tentar reduzir a heterogeneidade da variação hormonal, nenhum dos estudos citados avaliou a fase do ciclo menstrual no momento da lipoaspiração ou o impacto do uso ou não de anticoncepcionais nas CTM-TA obtidas. Acredita-se que este tipo de avaliação específica vai além do escopo de estudos experimentais com um caráter de prova de conceito e de caracterização inicial, estando o este trabalho de acordo com o que está publicado na literatura.

A literatura demonstra que pacientes mais jovens possuem maior atividade proliferativa de CTM-TA quando comparados com pacientes com idade mais avançada, com a faixa etária de 55 a 60 anos apresentando maiores taxas de apoptose quando comparada com grupos mais jovens¹⁶⁸. Todos os doadores que participaram deste estudo estão numa faixa etária (27 a 44 anos) fora desse perfil com potencial comprometimento da atividade celular por senescência. Além disso, ao utilizar pacientes com IMC na faixa de normalidade (20 kg/m² a 25 kg/m²), pode-se reduzir uma possível variação nas características das CTM-TA por uma maior resposta pró-inflamatória local em indivíduos obesos^{137,138}.

Apesar desses critérios de inclusão minimizarem a potencial heterogeneidade das análises, ainda podem existir variabilidades, já que cada doador foi submetido a apenas uma das técnicas de obtenção de CTM-TA (lipoaspiração laser ou convencional). Como foram utilizados doadores que estavam realizando lipoaspiração estética por indicação clínica rotineira e para não incorrer no risco de ter alguma assimetria clínica por utilizar técnicas diferentes de lipoaspiração em cada lado do abdome, foi aplicada apenas uma técnica em cada indivíduo, não sendo realizado o pareamento por doador.

Vários trabalhos já foram publicados na literatura comparando duas diferentes técnicas para obtenção de CTM-TA de maneira pareada (as duas técnicas foram avaliadas no mesmo doador). Nestes casos, o tamanho amostral total (n = 3) foi considerado adequado para comparação de lipoaspiração convencional e lipoaspiração assistida por ultra sonografia¹³⁵,

lipoaspiração convencional e ressecção por abdominoplastia¹³⁴ e lipoaspiração assistida por dois tipos diferentes de ultrassonografia¹³³. Tomando estes trabalhos publicados em revistas científicas relevantes como referência e considerando que a presente análise não foi pareada, optou-se por aumentar o tamanho amostral total ($n = 8$), divididos de maneira igual entre os grupos lipoaspiração laser ($n = 4$) e convencional ($n = 4$).

Na descrição de uma nova técnica com manipulação mínima para isolamento de CTM-TA, Raposio *et al.*²³ avaliaram a expressão dos antígenos de superfície por citometria de fluxo em amostras de lipoaspirado ($n = 3$) de forma não pareada entre os doadores, o que reforça que o presente trabalho apresenta um tamanho amostral que vai ao encontro do que é publicado na literatura.

Entende-se que neste perfil de trabalho experimental existe o risco de cometer um erro estatístico do tipo 2, no qual a ausência de diferença entre os grupos analisados (no caso, lipoaspiração laser e convencional) pode se dar por um tamanho de amostra reduzido. Entretanto, trabalhos experimentais em laboratório com um caráter de prova de conceito e caracterização inicial não apresentam um tamanho amostral grande, por conta das características peculiares a este tipo de pesquisa, sendo o tamanho amostral analisado no presente trabalho adequado e aceito na literatura.

Os resultados apresentados reforçam a tese principal de que as CTM-TA obtidas através da lipoaspiração laser são tão boas e de baixo risco tumorigênico, para fins de aplicação em terapia celular, quanto as obtidas

por lipoaspiração convencional. Tal fato é bastante relevante, pois a captação de CTM-TA pela lipoaspiração assistida por laser consegue transpassar a etapa de dissociação enzimática, o que permite um processo mais rápido e com menor manipulação laboratorial, podendo facilitar a liberação do seu uso clínico por parte das agências regulatórias, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A Resolução RDC Nº 508, de 27 de maio de 2021²¹⁸ dispõe sobre as boas práticas em células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica. Esta normativa traz o conceito de manipulação mínima, correspondendo ao processamento das células ou tecidos que não altera de forma significativa as suas características biológicas, dentre as quais se incluem estado de diferenciação e ativação, o potencial de proliferação e a atividade metabólica. São considerados manipulação mínima os atos de cortar, separar, centrifugar, imergir ou preservar em soluções antibióticas, concentrar, purificar, filtrar, liofilizar, irradiar, congelar, criopreservar ou vitrificar, entre outros que atenderem a esta definição. Desta forma, o fato de a lipoaspiração laser não necessitar de ativação enzimática pode permitir que a técnica seja interpretada como de manipulação mínima e, conseqüentemente, abre espaço para que não seja considerada um produto de terapia celular avançada quando se considera a extração da FVE do tecido adiposo para uso em tempo único, o que tem impacto direto na sua liberação para uso clínico na prática do ortopedista.

Pode-se observar um crescente interesse por parte do ortopedista brasileiro na compreensão e utilização destas técnicas de terapia celular e medicina regenerativa, como as CTM, no tratamento de lesões

musculoesqueléticas. Tanto que, recentemente, a Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia criou a Comissão de Ortopedia Regenerativa e Terapia Celular para fomentar a discussão do tema na especialidade. Não é de hoje que a literatura nacional, através de publicações na Revista Brasileira de Ortopedia, demonstra interesse no estudo das CTM em processos de reparo/regeneração da cartilagem. Em 2011 foi publicado uma revisão sobre os avanços no uso de CTM em ortopedia, com destaque para a necessidade de novos estudos que avaliassem otimizações nas técnicas de cultivo celular e de como melhorar a entrega destas células no sítio de lesão²¹⁹. O artigo de atualização sobre o potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por CTM publicado em 2017²²⁰ destaca alguns resultados promissores com a injeção intra-articular de CTM-TA no tratamento da OA de joelho, entretanto, ainda necessitando de estudos adicionais para comprovar a eficácia e segurança do uso das CTM-TA neste cenário. Além disso, é importante citar a necessidade de melhor compreensão da influência que as condições microambientais inflamatórias do local em que vão ser injetadas as CTM tem no processo de reparo condral.

Outros grupos no Brasil publicaram resultados de pesquisas com CTM-TA para fins de terapia celular em ortopedia. Kaleka *et al.*²²¹ demonstraram diferença significativa na viabilidade de CTM-TA expostas à diferentes ácidos hialurônicos quando comparada com o controle (salina tamponada com fosfato), sugerindo que o ácido hialurônico pode ser usado como veículo para injeção intra-articular (*scaffold*) de CTM-TA. Recentemente, este mesmo grupo avaliou o impacto do ácido hialurônico na

viabilidade das CTM-TA cultivadas em membrana de colágeno tipo I/III, não sendo demonstrada superioridade na viabilidade celular quando comparada com soro fetal bovino (SFB)²²². Assim como a presente pesquisa, estes estudos laboratoriais possuem as suas limitações, com resultados experimentais que não devem ser extrapolados para a rotina clínica, embora possam nortear pesquisas futuras e demonstrar a tendência de que as aplicações de terapia celular irão, cada vez mais, fazer parte da prática do ortopedista no Brasil.

É importante destacar que não foi objetivo deste trabalho avaliar o potencial uso clínico destas CTM-TA obtidas por lipoaspiração laser, entretanto, presente estudo tem um importante papel como passo inicial dentro da linha de pesquisa de CTM-TA obtidas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo no tratamento de lesões ortopédicas. Trabalhos com modelos animais no tratamento de lesão da cartilagem e ensaios clínicos com a aplicação de CTM-TA no tratamento da OA devem ser temas de futuras pesquisas. Além disso, o IOT-HCFMUSP conta com o Núcleo de Ortopedia Regenerativa, Banco de Tecidos e Terapia Celular dentro do seu próprio prédio, fomentando o estudo e desenvolvimento da área de terapia celular em ortopedia, inclusive com publicação recente avaliando, de forma pioneira no Brasil, o transplante autólogo de condrócitos em membrana de colágeno²²³.

Como perspectivas futuras, acredita-se que a ortopedia regenerativa vai seguir ganhando espaço no Brasil. Inclusive, espera-se que o ortopedista tenha cada vez mais domínio de temas relacionados à biologia

celular/molecular como competências necessárias para aplicação de terapia celular e ortobiológicos na sua prática clínica. Apesar de ser, rotineiramente, utilizada na prática clínica nos Estados Unidos, a terapia celular ainda apresenta alguns entraves regulatórios no Brasil, sendo uma importante limitação ao uso clínico e desenvolvimento de novas opções em terapia celular. Existe uma tendência global de que os procedimentos ortopédicos sejam cada vez menos agressivos e que visem restaurar a integridade da biologia tecidual. Nesse contexto, as CTM surgem como excelente opção, podendo o seu potencial biológico ser aproveitado para fins terapêuticos.

Trabalhos como os desenvolvidos pelo nosso grupo, seguindo dentro de uma linha de pesquisa que vai desde estudos laboratoriais *in vitro* até ensaios clínicos, são fundamentais para gerar evidências que suportem o uso clínico e a aprovação junto às agências regulatórias, através de estudos que fundamentam e trazem a comprovação científica da eficácia e da segurança destas novas terapias. Isto é fundamental para evitar a banalização do tema, que pode colocar em risco a saúde das pessoas por meio do uso indiscriminado de produtos inseguros e sem eficácia comprovada, condição agravada pelo perigoso marketing direto ao consumidor sobre as intervenções com CTM e outros produtos de terapia celular não aprovados²²⁴. Desta forma, o campo de aplicações da terapia celular e ortopedia regenerativa pode avançar com segurança, tornando-se uma opção factível e que traga benefícios reais para os pacientes.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se concluir que as CTM-TA obtidas através da lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são, de fato, CTM. Através da comparação do potencial de diferenciação/plasticidade, da proliferação celular e da expressão de citocinas, concluímos também que as CTM-TA captadas pela lipoaspiração assistida por laser com fotoestimulação seletiva do tecido adiposo são tão boas e de baixo risco tumorigênico, para fins de aplicação em terapia celular, quanto as obtidas por lipoaspiração convencional.

Anexo A - Carta de aprovação Comissão Científica IOT-HCFMUSP

DEPARTAMENTO DE ORTOPEDIA E TRAUMATOLOGIA
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

COMISSÃO CIENTÍFICA

IDENTIFICAÇÃO

Protocolo IOT nº 1326

CEP E CEUA

Pesquisador Responsável: Prof. Marco Kawamura Demange

Pesquisador Executante: Dr. Lucas da Ponte Melo

Título: Validação de células tronco mesenquimais obtidas em sistema de captação por lipoaspiração auxiliada por *laser* para tratamento regenerativo de lesões articulares: análise celular e modelo experimental em animais

Grau de Pesquisa: Projeto Regular

APRECIÇÃO GERAL DA PROPOSTA

1º PARECER

Trata-se de um estudo para analisar as células do lipoaspirado obtido por meio de uma nova técnica a laser, o *ONE S.T.E.P Technique*, avaliando sua possível caracterização como células tronco mesenquimais (CTM), e a aplicação dessas CTM em um modelo animal em coelhos de lesão aguda de cartilagem, no qual cada animal será seu próprio controle.

O projeto é bem estruturado e, apesar da complexidade, cada etapa está bem detalhada (descrição da *ONE S.T.E.P Technique*, processamento e cultivo celular para obtenção das CTM, análise celular quanto a viabilidade, imunofenotipagem, proliferação e diferenciação celular, e o modelo experimental de lesão condral em coelhos).

Deverá realizar:

1. MATERIAL E MÉTODOS

1. Revisar e corrigir os tempos verbais utilizados (em algumas sentenças há verbos no pretérito perfeito e verbos no futuro do presente).
2. Revisar e corrigir concordância de número (diversos erros)
3. Explicar do que se trata a sentença “*Nove sítios por poço e três poços por tratamento será[ão] adquirido[s]*” na página 12. Sentença similar na página 14 (“*Nove sítios por poço e três poços por linhagem celular será[ão] adquirido[s]*”). Não há explicação do que significam os termos “sítio” e “poço” neste contexto.

Relator

Comissão Científica

05.06.2018

=====

DECISÃO DA COMISSÃO CIENTÍFICA EM 08.06.2018: Projeto aprovado com restrições.

Enviar para reavaliação do Relator:.

1) *Protocolo de pesquisa modificado conforme parecer do Relator, com as alterações destacadas no texto*

2) *Carta ao Relator explicando quais as alterações realizadas no projeto e resposta aos questionamentos.*

Anexo B - Carta de aprovação da CAPPESQ

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Validação de células tronco mesenquimais obtidas em sistema de captação por lipoaspiração auxiliada por laser para tratamento regenerativo de lesões articulares: análise celular e modelo experimental em animais.

Pesquisador: Marco Kawamura Demange

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 96541218.3.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.156.799

Apresentação do Projeto:

Trata-se de 3º relato, no qual o pesquisador fez as alterações solicitadas

Objetivo da Pesquisa:

Atender solicitação de pendência

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No TCLE item 5, onde se lê “entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661 7585 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br”, CORRIGIR PARA “entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”, endereço: Av. Dr. Arnaldo, 251 - 21º andar - sala 36, Cerqueira César - São Paulo – SP, Fone: 3893-4401/4407, E-mail: cep.fm@usp.br

Recomendações:

O início do projeto deverá ocorrer após fazer a correção do endereço no, Termo de Consentimento

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP**



Continuação do Parecer: 3.156.799

Livre e Esclarecido, conforme segue no item "Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatório".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

O início do projeto deverá ocorrer após fazer a correção do endereço no, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme segue no item "Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatório".

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1162659.pdf	21/01/2019 12:22:50		Aceito
Brochura Pesquisa	projeto_final.docx	14/11/2018 13:45:33	Marco Kawamura Demange	Aceito
Outros	Parecer_CEUA.pdf	14/11/2018 13:45:15	Marco Kawamura Demange	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_alterado.doc	14/11/2018 11:08:40	Marco Kawamura Demange	Aceito
Cronograma	Cronograma_MODIFICADO.xlsx	14/11/2018 11:04:13	Marco Kawamura Demange	Aceito
Outros	CADASTRODAPESQUISA_1326.pdf	16/08/2018 10:20:38	Marco Kawamura Demange	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.doc	02/08/2018 15:06:31	Marco Kawamura Demange	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	02/08/2018 15:02:48	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Anuencia_Hospital_Mori_ah.pdf	26/06/2018 16:35:10	Marco Kawamura Demange	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_anuencia_LIM31.pdf	26/06/2018 16:28:58	Marco Kawamura Demange	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.docx	26/06/2018 16:27:15	Marco Kawamura Demange	Aceito
Cronograma	Cronograma.xlsx	26/06/2018 16:24:49	Marco Kawamura Demange	Aceito

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - FMUSP



Continuação do Parecer: 3.156.799

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Fevereiro de 2019

Assinado por:

Antonio de Padua Mansur
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-903

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3893-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DOS RESPONSÁVEIS LEGAIS

1. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº.: _____ SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº. _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (_____) _____

2. NOME: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO: ____/____/____

ENDEREÇO: _____ Nº. _____ APTO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ CEP: _____

TELEFONE: DDD (_____) _____

DADOS SOBRE A PESQUISA

- **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Validação de células tronco mesenquimais obtidas em sistema de captação por lipoaspiração auxiliada por *LASER* para tratamento regenerativo de lesões articulares: análise celular e modelo experimental em animais.

- **PESQUISADOR:** Prof. Dr. Marco Kawamura Demange

CARGO/FUNÇÃO: Médico

INSCRIÇÃO DO CONSELHO REGIONAL: 100.483

UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto de Ortopedia e Traumatologia

- **PESQUISADORES E COLABORADORES:** Lucas da Ponte Melo, Alexandre Mendonça Munhoz, Débora Levy, Luis Eduardo Tirico, Pedro Nogueira Giglio, Riccardo Gomes Gobbi, Sérgio Paulo Bydlowski.

- **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 12 meses

1 – Desenho do estudo e objetivo (s):

O objetivo deste estudo, para o qual está sendo solicitada a coleta e processamento do lipoaspirado de indivíduos doadores humanos submetidos à lipoaspiração, por indicação clínica rotineira, é analisar as células provenientes do lipoaspirado pela One S.T.E.P technique® (com a utilização de LASER), avaliando viabilidade celular, imunofenotipagem, proliferação e diferenciação celular. Este tipo de análise permite que possamos caracterizar estas células como células tronco mesenquimais (CTM). Subsequentemente, pretendemos avaliar, em modelo animal de lesão de cartilagem do joelho, a aplicação destas CTM no tratamento destas lesões.

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Pesquisador: _____ 1



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O estudo consiste em sua participação voluntária para autorizar a coleta e o processamento do lipoaspirado para que essas células sejam validadas e testadas no tratamento de animais submetidos a lesão de cartilagem no joelho.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados: Será utilizado material lipoaspirado de indivíduos doadores humanos submetidos à lipoaspiração por indicação clínica rotineira. A coleta do material será realizada por Cirurgião Plástico experiente, treinado e habituado com esta técnica. Os doadores serão consultados, previamente à cirurgia, quanto ao interesse de doação do material, tendo completa autonomia para recusar-se a participar do estudo. O material lipoaspirado é, rotineiramente, descartado e o seu uso para pesquisa não implica em nenhum risco adicional ao paciente.

3 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos do item 2: Para a coleta do lipoaspirado pela técnica em questão, não se identifica nenhum risco adicional, visto que o doador já iria ser submetido a este procedimento e todo o material coletado seria descartado. Os riscos inerentes à lipoaspiração são dor pós-operatória local, equimoses no local, alteração de sensibilidade, infecção e perfuração da parede abdominal. Os riscos para a equipe da pesquisa estão relacionados à contaminação com material biológico, inerentes aos cuidados com saúde, que são minimizados uma vez que o profissional responsável pela coleta dos materiais biológicos deverá estar protegido pelos equipamentos de proteção individual como os mesmos dispositivos de segurança usados pelos demais membros da equipe de saúde, como capote cirúrgico, gorro, máscara e luvas estéreis.

4 – Benefícios para o participante: Não está previsto qualquer benefício imediato ao participante da pesquisa. Entretanto, o projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos, no modelo animal, de lesão condral em joelhos de coelhos e poderá no futuro, oferecer alternativas de tratamento para seres humanos.

5 – Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Marco Kawamura Demange, que pode ser encontrado no Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Rua Dr. Ovidio Pires de Campo, 333 – 2º andar, tel: 2661-6912. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, endereço: Av. Dr. Arnaldo, 251 – 21º andar – sala 36, Cerqueira César – São Paulo – SP, Fone: 3893-4401/4407, E-mail: cep.fm@usp.br

6 – Será garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Pesquisador: _____ 2



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

7 – Os senhores serão informados sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

8 – Não haverá despesas pessoais para os senhores em qualquer fase do estudo. Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Sua participação acaba após a coleta do lipoaspirado.

9 – O pesquisador se compromete a utilizar os dados e os materiais coletados somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito dos dados que li ou que foram lidos para mim, descrevendo o estudo "Validação de células tronco mesenquimais obtidas em sistema de captação por lipoaspiração auxiliada por *LASER* para tratamento regenerativo de lesões articulares: análise celular e modelo experimental em animais". Eu discuti com o Prof. Dr. Marco Kawamura Demange sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do representante legal

Data: / /

Assinatura do representante legal

Data: / /

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido dos representantes legais para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data: / /

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Responsável Legal: _____

Rubrica do Pesquisador: _____ 3

Anexo D - Kit introdutório de cateter descartável

[illegible]



9 REFERÊNCIAS

1. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy*. 1997;13(4):456-60.
2. Minas T. A primer in cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br*. 2012;94(11 Suppl A):141-6.
3. Davies-Tuck ML, Wluka AE, Wang Y, Teichtahl AJ, Jones G, Ding C, et al. The natural history of cartilage defects in people with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(3): 337-42.
4. Cicuttini F, Ding C, Wluka A, Davis S, Ebeling PR, Jones G. Association of cartilage defects with loss of knee cartilage in healthy, middle-age adults: a prospective study. *Arthritis Rheum*. 2005;52(7): 2033-9.
5. Bitton R. The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*. 2009;15(8 Suppl):S230-5.
6. Pridie KH, Z-k H, Gordon-Strachan G. A method of resurfacing osteoarthritis knee joints [internet]. 1959 [citado em: 6 fev. 2020]. Disponível em: <https://www.scienceopen.com/document?vid=404b08e4-b48c-4032-944c-c13fe5b7f085>.

7. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;(391 Suppl):S362-9.
8. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. *Arthritis Rheum*. 1998;41(8):1331-42.
9. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 1997;5(4):262-7.
10. Hangody L, Füles P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 2:25-32.
11. Gross AE, Silverstein EA, Falk J, Falk R, Langer F. The allotransplantation of partial joints in the treatment of osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop Relat Res*. 1975;(108):7-14.
12. Sherman SL, Garrity J, Bauer K, Cook J, Stannard J, Bugbee W. Fresh osteochondral allograft transplantation for the knee: current concepts. *J Am Acad Orthop Surg*. 2014;22(2):121-33.
13. Steadman JR, Briggs KK, Rodrigo JJ, Kocher MS, Gill TJ, Rodkey WG. Outcomes of microfracture for traumatic chondral defects of the knee: average 11-year follow-up. *Arthroscopy*. 2003;19(5):477-84.

14. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-95.
15. Jo CH, Lee YG, Shin WH, Kim H, Chai JW, Jeong EC, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof-of-concept clinical trial. *Stem Cells*. 2014;32(5):1254-66.
16. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiarini M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2013;21(8):1717-29.
17. Yokota N, Hattori M, Ohtsuru T, Otsuji M, Lyman S, Shimomura K, et al. Comparative Clinical Outcomes After Intra-articular Injection With Adipose-Derived Cultured Stem Cells or Noncultured Stromal Vascular Fraction for the Treatment of Knee Osteoarthritis. *Am J Sports Med*. 2019;47(11):2577-83.
18. Dubey NK, Mishra VK, Dubey R, Syed-Abdul S, Wang JR, Wang PD, et al. Combating Osteoarthritis through Stem Cell Therapies by Rejuvenating Cartilage: A Review. *Stem Cells Int*. 2018;2018:5421019.
19. Ma Q, Liao J, Cai X. Different Sources of Stem Cells and their Application in Cartilage Tissue Engineering. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2018;13(7):568-75.

20. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
21. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006;24(4):150-4.
22. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.
23. Raposio E, Caruana G, Bonomini S, Libondi G. A novel and effective strategy for the isolation of adipose-derived stem cells: minimally manipulated adipose-derived stem cells for more rapid and safe stem cell therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2014;133(6):1406-9.
24. Bianchi F, Maioli M, Leonardi E, Olivi E, Pasquinelli G, Valente S, et al. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant*. 2013;22(11):2063-77.
25. Baptista LS, do Amaral RJFC, Carias RBV, Aniceto M, Claudio-da-Silva C, Borojevic R. An alternative method for the isolation of mesenchymal stromal cells derived from lipoaspirate samples. *Cytotherapy*. 2009;11(6):706-15.

26. Raposio E, Ciliberti R. Clinical use of adipose-derived stem cells: European legislative issues. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017;24:61-4.
27. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg (Lond)*. 2017;20:87-91.
28. Parlette EC, Kaminer ME. Laser-assisted liposuction: here's the skinny. *Semin Cutan Med Surg*. 2008;27(4):259-63.
29. Apfelberg D. Laser-assisted liposuction may benefit surgeons, patients. *Clin Laser Mon*. 1992;10(12):193-4.
30. Centurion P, Caballero G, Weiss M. Comment to: "Laser-Assisted Liposuction (LAL) Versus Traditional Liposuction: Systematic Review". *Aesthetic Plast Surg*. 2019;43(4):1122-3.
31. Centurion P, Noriega A. Fat preserving by laser 1210-nm. *J Cosmet Laser Ther*. 2013;15(1):2-12.
32. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-8.

33. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743.
Clin Orthop Relat Res. 1995;(317):3-6.
34. Gardner DL, McGillivray DC. Surface structure of articular cartilage.
Historical review. *Ann Rheum Dis.* 1971;30(1):10-4.
35. Fuller JA, Ghadially FN. Ultrastructural observations on surgically
produced partial-thickness defects in articular cartilage. *Clin Orthop
Relat Res.* 1972;86:193-205.
36. Behrens P, Ehlers EM, Köchermann KU, Rohwedel J, Russlies M, Plötz
W. New therapy procedure for localized cartilage defects. Encouraging
results with autologous chondrocyte implantation. *MMW Fortschr Med.*
1999;141(45):49-51.
37. Caron MMJ, Emans PJ, Coolsen MME, Voss L, Surtel DAM, Cremers
A, et al. Redifferentiation of dedifferentiated human articular
chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis
Cartilage.* 2012;20(10):1170-8.
38. Bianchi VJ, Weber JF, Waldman SD, Backstein D, Kandel RA.
Formation of Hyaline Cartilage Tissue by Passaged Human
Osteoarthritic Chondrocytes. *Tissue Eng Part A.* 2017;23(3-4):156-65.
39. Eftekhari A, Maleki Dizaj S, Sharifi S, Salatin S, Rahbar Saadat Y,
Zununi Vahed S, et al. The Use of Nanomaterials in Tissue Engineering
for Cartilage Regeneration; Current Approaches and Future
Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):536.

40. Nazempour A, Van Wie BJ. Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng.* 2016;44(5):1325-54.
41. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-40.
42. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.
43. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.
44. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292: 154–156.
45. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391): 1145-7.
46. Caplan AI. What's in a name? *Tissue Eng Part A.* 2010;16(4):2415-7.
47. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
48. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008;26(9):2287-99.

49. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(6) 1445-51.
50. Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2009;31:25-35.
51. Li X, Wang M, Jing X, Guo W, Hao C, Zhang Y, et al. Bone Marrow- and Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Characterization, Differentiation, and Applications in Cartilage Tissue Engineering. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2018;28(4):285-310.
52. Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, Selvamurugan N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol.* 2015;78:202-8.
53. Bruderer M, Richards RG, Alini M, Stoddart MJ. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 2014;28:269-86.
54. Narayanan A, Srinaath N, Rohini M, Selvamurugan N. Regulation of Runx2 by MicroRNAs in osteoblast differentiation. *Life Sci.* 2019;232: 116676.
55. Vincenti MP, Brinckerhoff CE. Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res Ther.* 2002;4(3):1-8.

56. Cao Y, Lv Q, Lv C. MicroRNA-153 suppresses the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein receptor type II. *Int J Mol Med*. 2015;36(3):760-6.
57. Liu W, Zhang L, Xuan K, Hu C, Liu S, Liao L, et al. Alpl prevents bone ageing sensitivity by specifically regulating senescence and differentiation in mesenchymal stem cells. *Bone Res*. 2018;6:27.
58. Chang CY, Rosenthal DI, Mitchell DM, Handa A, Kattapuram SV, Huang AJ. Imaging Findings of Metabolic Bone Disease. *Radiographics*. 2016;36(6):1871-87.
59. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev*. 1994;15(4):439-61.
60. Komori T. Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20):7513.
61. Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, et al. Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. *PLoS Genet*. 2020;16(5):e1008586.
62. Franzén A, Heinegård D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. *Biochem J*. 1985;232(3):715-24.

63. Shimodaira T, Matsuda K, Uchibori T, Sugano M, Uehara T, Honda T. Upregulation of osteopontin expression via the interaction of macrophages and fibroblasts under IL-1b stimulation. *Cytokine*. 2018;110:63-9.
64. Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*. 2004;121(2):228-41.
65. Sodek J, Ganss B, McKee. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):279-303.
66. Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol*. 2004;26(3):179-84.
67. Levy D, de Melo TC, Ruiz JLM, Bydlowski SP. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. *Chem Phys Lipids*. 2017;207(Pt B):223-30.
68. Moseti D, Regassa A, Kim W-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1):124.
69. Evans RM, Barish GD, Wang Y-X. PPARs and the complex journey to obesity. *Nat Med*. 2004;10(4):355-61.
70. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001;7(1):161-71.

71. Lefterova MI, Lazar MA. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(3):107-14.
72. Kim W-K, Meliton V, Amantea CM, Hahn TJ, Parhami F. 20(S)-hydroxycholesterol inhibits PPARgamma expression and adipogenic differentiation of bone marrow stromal cells through a hedgehog-dependent mechanism. *J Bone Miner Res.* 2007;22(11):1711-9.
73. Stechschulte LA, Lecka-Czernik B. Reciprocal regulation of PPAR γ and RUNX2 activities in marrow mesenchymal stem cells: Fine balance between p38 MAPK and Protein Phosphatase 5. *Curr Mol Biol Rep.* 2017;3(2):107-13.
74. Okuma T, Hirata M, Yano F, Mori D, Kawaguchi H, Chung U-I, et al. Regulation of mouse chondrocyte differentiation by CCAAT/enhancer-binding proteins. *Biomed Res.* 2015;36(1):21-9.
75. Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(21):2435-45.
76. French MM, Gomes RR Jr, Timpl R, Höök M, Czymmek K, Farach-Carson MC, et al. Chondrogenic activity of the heparan sulfate proteoglycan perlecan maps to the N-terminal domain I. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):48-55.
77. Minina E, Kreschel C, Naski MC, Ornitz DM, Vortkamp A. Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell.* 2002;3(3):439-49.

78. Gomes RR Jr, Farach Carson MC, Carson DD. Perlecan-stimulated nodules undergo chondrogenic maturation in response to rhBMP-2 treatment in vitro. *Connect Tissue Res.* 2003;44(Suppl 1):196-201.
79. Rapraeger AC. Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol.* 2000;149(5):995-8.
80. Fisher MC, Li Y, Seghatoleslami MR, Dealy CN, Kosher RA. Heparan sulfate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation. *Matrix Biol.* 2006;25(1):27-39.
81. Meirelles L da S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-27.
82. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion.* 2014;54(5):1418-37.
83. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* 2013;95(12):2196-211.
84. Wu Y, Zhao RCH, Tredget EE. Concise review: bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. *Stem Cells.* 2010;28(5):905-15.
85. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2173-85.

86. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):392-402.
87. Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E, Mourdjeva M, Oreshkova T, Belemmezova K, et al. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(5):552-70.
88. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986;324(6092):73-6.
89. Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. 2000;117(4):1162-72.
90. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(5):878-88.
91. Park CW, Kim K-S, Bae S, Son HK, Myung P-K, Hong HJ, et al. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *Int J Stem Cells*. 2009;2(1):59-68.
92. Yoshimura A, Muto G. TGF- β function in immune suppression. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2011;350:127-47.
93. Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2724-52.

94. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
95. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
96. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GMJS, Claas FHJ, Fibbe WE, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-45.
97. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 2000;109(1):235-42.
98. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001;44(8):1928-42.
99. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
100. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-213.

101. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(4):579-92.
102. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002;10(3):199-206.
103. Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(1):74-9.
104. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai B-C, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med.* 2010;38(6):1110-16.
105. Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B, Cenacchi A, Giannini S. Osteochondral lesions of the knee: a new one-step repair technique with bone-marrow-derived cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2010;92(Suppl 2): 2-11.

106. Welsch GH, Zak L, Mamisch TC, Resinger C, Marlovits S, Trattnig S. Three-dimensional magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) score assessed with an isotropic three-dimensional true fast imaging with steady-state precession sequence at 3.0 Tesla. *Invest Radiol.* 2009;44(9): 603-12.
107. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5(2):146-50.
108. Gobbi A, Chaurasia S, Karnatzikos G, Nakamura N. Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation versus Multipotent Stem Cells for the Treatment of Large Patellofemoral Chondral Lesions: A Nonrandomized Prospective Trial. *Cartilage.* 2015;6(2):82-97.
109. Akgun I, Unlu MC, Erdal OA, Ogut T, Erturk M, Ovali E, et al. Matrix-induced autologous mesenchymal stem cell implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation in the treatment of chondral defects of the knee: a 2-year randomized study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2015;135(2):251-63.
110. Gobbi A, Whyte GP. Long-term Clinical Outcomes of One-Stage Cartilage Repair in the Knee With Hyaluronic Acid-Based Scaffold Embedded With Mesenchymal Stem Cells Sourced From Bone Marrow Aspirate Concentrate. *Am J Sports Med.* 2019;47(7):1621-8.

111. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. II. The similar effects of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *J Biol Chem*. 1966;241(1):130-9.
112. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of “ghosts” and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. *J Biol Chem*. 1967;242(24):5744-50.
113. Rodbell M, Jones AB. Metabolism of isolated fat cells. 3. The similar inhibitory action of phospholipase C (*Clostridium perfringens* alpha toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline. *J Biol Chem*. 1966;241(1):140-2.
114. Young C, Jarrell BE, Hoying JB, Williams SK. A porcine model for adipose tissue-derived endothelial cell transplantation. *Cell Transplant*. 1992;1(4):293-8.
115. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
116. Mohamed-Ahmed S, Fristad I, Lie SA, Suliman S, Mustafa K, Vindenes H, et al. Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):168.
117. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int*. 2012;2012:812693.

118. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002;13(12):4279-95.
119. Lockhart RA, Hakakian CS, Aronowitz JA. Tissue dissociation enzymes for adipose stromal vascular fraction cell isolation: a review. *J Stem Cell Res Ther*. 2015;5:12.
120. Aronowitz JA, Ellenhorn JDI. Adipose stromal vascular fraction isolation: a head-to-head comparison of four commercial cell separation systems. *Plast Reconstr Surg*. 2013;132(6):932e–9e.
121. Aronowitz JA, Lockhart RA, Hakakian CS. Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *Springerplus*. 2015;4:713.
122. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15(8):979-85.
123. Chung MT, Zimmermann AS, Paik KJ, Morrison SD, Hyun JS, Lo DD, et al. Isolation of human adipose-derived stromal cells using laser-assisted liposuction and their therapeutic potential in regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(10):808-17.
124. Pereira-Netto D, Montano-Pedroso JC, Aida ALES, Marson WL, Ferreira LM. Laser-Assisted Liposuction (LAL) Versus Traditional Liposuction: Systematic Review. *Aesthetic Plast Surg*. 2018;42(2):376-83.

125. Collins NJ, Misra D, Felson DT, Crossley KM, Roos EM. Measures of knee function: International Knee Documentation Committee (IKDC) Subjective Knee Evaluation Form, Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS), Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score Physical Function Short Form (KOOS-PS), Knee Outcome Survey Activities of Daily Living Scale (KOS-ADL), Lysholm Knee Scoring Scale, Oxford Knee Score (OKS), Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC), Activity Rating Scale (ARS), and Tegner Activity Score (TAS). *Arthritis Care Res.* 2011;63(Suppl 11):S208-28.
126. Koh YG, Choi YJ, Kwon OR, Kim YS. Second-Look Arthroscopic Evaluation of Cartilage Lesions After Mesenchymal Stem Cell Implantation in Osteoarthritic Knees. *Am J Sports Med.* 2014;42(7):1628-37.
127. Koh Y-G, Kwon O-R, Kim Y-S, Choi Y-J, Tak D-H. Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells With Microfracture Versus Microfracture Alone: 2-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Arthroscopy.* 2016;32(1):97-109.
128. Pers Y-M, Rackwitz L, Ferreira R, Pullig O, Delfour C, Barry F, et al. Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(7):847-56.

129. Ranmuthu CDS, Ranmuthu CKI, Khan WS. Evaluating the Current Literature on Treatments Containing Adipose-Derived Stem Cells for Osteoarthritis: a Progress Update. *Curr Rheumatol Rep.* 2018;20(11):67.
130. Kyriakidis T, Iosifidis M, Michalopoulos E, Melas I, Stavropoulos-Giokas C, Verdonk R. Good mid-term outcomes after adipose-derived culture-expanded mesenchymal stem cells implantation in knee focal cartilage defects. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2020;28(2):502-8.
131. Kaoutzanis C, Gupta V, Winocour J, Layliev J, Ramirez R, Grotting JC, et al. Cosmetic Liposuction: Preoperative Risk Factors, Major Complication Rates, and Safety of Combined Procedures. *Aesthet Surg J.* 2017;37(6):680-94.
132. Wu S, Coombs DM, Gurunian R. Liposuction: Concepts, safety, and techniques in body-contouring surgery. *Cleve Clin J Med.* 2020;87(6):367-5.
133. Duscher D, Maan ZN, Luan A, Aitzetmüller MM, Brett EA, Atashroo D, et al. Ultrasound-assisted liposuction provides a source for functional adipose-derived stromal cells. *Cytotherapy.* 2017;19(12):1491-500.
134. Duscher D, Luan A, Rennert RC, Atashroo D, Maan ZN, Brett EA, et al. Suction assisted liposuction does not impair the regenerative potential of adipose derived stem cells. *J Transl Med.* 2016;14(!):126.

135. Duscher D, Atashroo D, Maan ZN, Luan A, Brett EA, Barrera J, et al. Ultrasound-Assisted Liposuction Does Not Compromise the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(2):248-57.
136. Mckinnirey F, Herbert B, Vesey G, McCracken S. Immune modulation via adipose derived Mesenchymal Stem cells is driven by donor sex in vitro. *Sci Rep.* 2021;11(1):12454.
137. Eljaafari A, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G, et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes.* 2015;64(7):2477-88.
138. Conley SM, Hickson LJ, Kellogg TA, McKenzie T, Heimbach JK, Taner T, et al. Human Obesity Induces Dysfunction and Early Senescence in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:197.
139. Wahl EA, Schenck TL, Machens HG, Egaña JT. Acute stimulation of mesenchymal stem cells with cigarette smoke extract affects their migration, differentiation, and paracrine potential. *Sci Rep.* 2016;6:22957.
140. Calcat-I-Cervera S, Sanz-Nogués C, O'Brien T. When Origin Matters: Properties of Mesenchymal Stromal Cells From Different Sources for Clinical Translation in Kidney Disease. *Front Med.* 2021;8:728496.

141. van de Vyver M. Intrinsic Mesenchymal Stem Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus: Implications for Autologous Cell Therapy. *Stem Cells Dev.* 2017;26(14):1042-53.
142. Klein JA. The Tumescent Technique for Lipo-Suction Surgery. *Am J Cosmet Surg.* 1987;4:263-7.
143. Coleman SR. Structural fat grafts: the ideal filler? *Clin Plast Surg.* 2001;28(1):111-9.
144. Silva SF, Levy D, Ruiz JLM, de Melo TC, Isaac C, Fidelis ML, et al. Oxysterols in adipose tissue-derived mesenchymal stem cell proliferation and death. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017;169:164-75.
145. Bonadio MB, Giglio PN, Helito CP, Pécora JR, Camanho GL, Demange MK. Subchondroplasty for treating bone marrow lesions in the knee - initial experience. *Rev Bras Ortop.* 2017;52(3):325-30.
146. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 2008;26(6):664-75.
147. Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, et al. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res.* 2008;102(1):77-85.

148. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64-76.
149. Freitag J, Li D, Wickham J, Shah K, Tenen A. Effect of autologous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of a post-traumatic chondral defect of the knee. *BMJ Case Rep.* 2017;2017:bcr2017220852.
150. Freitag J, Ford J, Bates D, Boyd R, Hahne A, Wang Y, et al. Adipose derived mesenchymal stem cell therapy in the treatment of isolated knee chondral lesions: design of a randomised controlled pilot study comparing arthroscopic microfracture versus arthroscopic microfracture combined with postoperative mesenchymal stem cell injections. *BMJ Open.* 2015;5:e009332.
151. Lu L, Dai C, Zhang Z, Du H, Li S, Ye P, et al. Treatment of knee osteoarthritis with intra-articular injection of autologous adipose-derived mesenchymal progenitor cells: a prospective, randomized, double-blind, active-controlled, phase IIb clinical trial. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):143.
152. Song Y, Du H, Dai C, Zhang L, Li S, Hunter DJ, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells for osteoarthritis: a pilot study with long-term follow-up and repeated injections. *Regen Med.* 2018;13(3):295-307.

153. Koh Y-G, Jo S-B, Kwon O-R, Suh D-S, Lee S-W, Park S-H, et al. Mesenchymal stem cell injections improve symptoms of knee osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2013;29(4):748-55.
154. Jo CH, Chai JW, Jeong EC, Oh S, Shin JS, Shim H, et al. Intra-articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A 2-Year Follow-up Study. *Am J Sports Med*. 2017;45(12):2774-83.
155. Tremolada C, Ricordi C, Caplan AI, Ventura C. Mesenchymal Stem Cells in Lipogems, a Reverse Story: from Clinical Practice to Basic Science. *Methods Mol Biol*. 2016;1416:109-22.
156. Tremolada C, Colombo V, Ventura C. Adipose Tissue and Mesenchymal Stem Cells: State of the Art and Lipogems® Technology Development. *Curr Stem Cell Rep*. 2016;2(3):304-12.
157. Barfod KW, Blønd L. Treatment of osteoarthritis with autologous and microfragmented adipose tissue. *Dan Med J*. 2019;66(10):A5565.
158. Ulivi M, Meroni V, Viganò M, Colombini A, Lombardo MDM, Rossi N, et al. Micro-fragmented adipose tissue (mFAT) associated with arthroscopic debridement provides functional improvement in knee osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2022; 1-12.
159. Lin K, Matsubara Y, Masuda Y, Togashi K, Ohno T, Tamura T, et al. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system. *Cytotherapy*. 2008;10(4):417-26.

160. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene*. 2020;754:144855.
161. Siller AF, Whyte MP. Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *J Bone Miner Res*. 2018;33(2):362-4.
162. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nat Rev Endocrinol*. 2016;12(4):203-21.
163. Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, Kim SW, Park KS, Park S-W, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2003;278(26):23270-7.
164. Zaher DM, El-Gamal MI, Omar HA, Aljareh SN, Al-Shamma SA, Ali AJ, et al. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors. *Arch Pharm*. 2020;353:e2000011.
165. Liedtke D, Hofmann C, Jakob F, Klopocki E, Graser S. Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase-A Gatekeeper of Physiological Conditions in Health and a Modulator of Biological Environments in Disease. *Biomolecules*. 2020;10(12):1648.
166. Poon RYC. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. *Methods Mol Biol*. 2016;1342:3-19.

167. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008;129:163-73.
168. Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 2008;60(5):538-44.
169. Davis PK, Ho A, Dowdy SF. Biological methods for cell-cycle synchronization of mammalian cells. *Biotechniques.* 2001;30(6):1322-6, 1328, 1330-1.
170. Achille V, Mantelli M, Arrigo G, Novara F, Avanzini MA, Bernardo ME, et al. Cell-cycle phases and genetic profile of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expanded in vitro from healthy donors. *J Cell Biochem.* 2011;112(7):1817-21.
171. Papaliagkas V, Anogianaki A, Anogianakis G, Ilonidis G. The proteins and the mechanisms of apoptosis: a mini-review of the fundamentals. *Hippokratia.* 2007;11(3):108-13.
172. Suvarna V, Singh V, Murahari M. Current overview on the clinical update of Bcl-2 anti-apoptotic inhibitors for cancer therapy. *Eur J Pharmacol.* 2019;862:172655.
173. Boward B, Wu T, Dalton S. Concise Review: Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. *Stem Cells.* 2016;34(6):1427-36.

174. Mens MMJ, Ghanbari M. Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs. *Stem Cell Rev Rep*. 2018;14(3):309-22.
175. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*. 1986;46 705-16.
176. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. NF- κ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005;446(5):475-82.
177. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NF- κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol Cell Biol*. 1999;19(4):2690-8.
178. Hinz M, Löser P, Mathas S, Krappmann D, Dörken B, Scheidereit C. Constitutive NF- κ B maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*. 2001;97(9):2798–807.
179. Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. *Nature*. 2001;411(6841):1017-21.
180. Karin M. NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(5):a000141.
181. Grivennikov SI, Karin M. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):11-9.

182. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680–4.
183. Chen AC-H, Arany PR, Huang Y-Y, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2011;6:e22453.
184. Afifi L, Maranda EL, Zarei M, Delcanto GM, Falto-Aizpurua L, Kluijfhout WP, et al. Low-level laser therapy as a treatment for androgenetic alopecia. *Lasers Surg Med*. 2017;49(1) 27-39.
185. Darwin E, Heyes A, Hirt PA, Wikramanayake TC, Jimenez JJ. Low-level laser therapy for the treatment of androgenic alopecia: a review. *Lasers Med Sci*. 2018;33:425-34.
186. Zarei M, Wikramanayake TC, Falto-Aizpurua L, Schachner LA, Jimenez JJ. Low level laser therapy and hair regrowth: an evidence-based review. *Lasers Med Sci*. 2016;31(1):363-71.
187. Ren C, McGrath C, Jin L, Zhang C, Yang Y. The effectiveness of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a meta-analysis. *J Periodontal Res*. 2017;52(1):8-20.
188. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628767.

189. Caplan AI. MSCs: The Sentinel and Safe-Guards of Injury. *J Cell Physiol.* 2016;231(7):1413-6.
190. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell.* 2008;3(3):301-13.
191. Tolar J, Le Blanc K, Keating A, Blazar BR. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 2010;28(8):1446-55.
192. Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24(1):49-57.
193. Salgado AJBOG, Reis RLG, Sousa NJC, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2010;5(2):103-10.
194. Blaber SP, Webster RA, Hill CJ, Breen EJ, Kuah D, Vesey G, et al. Analysis of in vitro secretion profiles from adipose-derived cell populations. *J Transl Med.* 2012;10:172.
195. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med.* 2012;18(2):128-34.
196. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.

197. Djouad F, Charbonnier L-M, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25(8):2025-32.
198. Liu C-H, Hwang S-M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*. 2005;32(6):270-9.
199. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998;101(2):311-20.
200. Dorronsoro A, Lang V, Ferrin I, Fernández-Rueda J, Zabaleta L, Pérez-Ruiz E, et al. Intracellular role of IL-6 in mesenchymal stromal cell immunosuppression and proliferation. *Sci Rep*. 2020;10(1):21853.
201. Sakamoto H, Koma Y-I, Higashino N, Kodama T, Tanigawa K, Shimizu M, et al. PAI-1 derived from cancer-associated fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma promotes the invasion of cancer cells and the migration of macrophages. *Lab Invest*. 2020;101(3):353-68.
202. Morange PE, Saut N, Alessi MC, Yudkin JS, Margaglione M, Di Minno G, et al. Association of Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)-1 (SERPINE1) SNPs With Myocardial Infarction, Plasma PAI-1, and Metabolic Parameters. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):2250-7.

203. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2000;342(24):1792-801.
204. Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ. Intramural Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Coronary Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(11):1979-89.
205. Li L, Wang Y, Yu X, Bao Y, An L, Wei X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote plasminogen activator inhibitor 1 expression in vascular cells in the local microenvironment during rabbit osteonecrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):480.
206. Melzer C, von der Ohe J, Otterbein H, Ungefroren H, Hass R. Changes in uPA, PAI-1, and TGF- β Production during Breast Cancer Cell Interaction with Human Mesenchymal Stroma/Stem-Like Cells (MSC). *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2630.
207. Takafuji Y, Tatsumi K, Ishida M, Kawao N, Okada K, Matsuo O, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency suppresses osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in mice. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):9687-97.
208. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ, et al. Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;435(4):574-9.

209. Declerck PJ, Gils A. Three decades of research on plasminogen activator inhibitor-1: a multifaceted serpin. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(4):356-64.
210. Matsumoto Y, Ikeya M, Hino K, Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, et al. New Protocol to Optimize iPS Cells for Genome Analysis of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Stem Cells.* 2015;33(6):1730-42.
211. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14726-9.
212. McGrath KE, Koniski AD, Maltby KM, McGann JK, Palis J. Embryonic expression and function of the chemokine SDF-1 and its receptor, CXCR4. *Dev Biol.* 1999;213(2):442-56.
213. Kim CH, Broxmeyer HE. SLC/exodus2/6Ckine/TCA4 induces chemotaxis of hematopoietic progenitor cells: differential activity of ligands of CCR7, CXCR3, or CXCR4 in chemotaxis vs. suppression of progenitor proliferation. *J Leukoc Biol.* 1999;66(3):455-61.
214. Liu X, Duan B, Cheng Z, Jia X, Mao L, Fu H, et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell.* 2011;2(10):845-54.

215. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Enhancing the Migration Ability of Mesenchymal Stromal Cells by Targeting the SDF-1/CXCR4 Axis. *Biomed Res Int*. 2013;2013:561098.
216. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, Tsutsumi R, Yoshitomi H, Oishi S, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis Rheum*. 2009;60(3):813-23.
217. Tsekouras A, Mantas D, Tsilimigras DI, Moris D, Kontos M, Zografos GC. Comparison of the Viability and Yield of Adipose-Derived Stem Cells (ASCs) from Different Donor Areas. *In Vivo*. 2017;31(6):1229-34.
218. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 508, de 27 de maio de 2021. Dispõe sobre as Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências [internet]. 2021 [citada em 10 fev. 2022]. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-508-de-27-de-maio-de-2021-323013606>.
219. Cristante AF, Narazaki DK. Avanços no uso de células-tronco em ortopedia. *Rev Bras Ortop*. 2011;46(4):359-67.
220. Cruz IBM da, Severo AL, Azzolin VF, Garcia LFM, Kuhn A, Lech O. Potencial regenerativo do tecido cartilaginoso por células-tronco mesenquimais: atualização, limitações e desafios. *Rev Bras Ortop*. 2017;52(1):2-10.

221. Kaleka CC, Zucconi E, Vieira T da S, Secco M, Ferretti M, Cohen M. Avaliação de diferentes ácidos hialurônicos comerciais como veículo de injeção para células mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo. *Rev Bras Ortop.* 2018;53(5):557-63.
222. Kaleka CC, Debieux P, Antonioli E, Zucconi E, Cohen M, Ferretti M. Impacto do ácido hialurônico na viabilidade das células mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em membrana de colágeno tipo I/III. *Rev Bras Ortop.* 2022;57(6):1022-9.
223. Giglio PN, Lizier NF, Levy D, Sobrado MF, Gobbi RG, Pécora JR, et al. Autologous chondrocyte implantation in Brazil. *Acta Ortop Bras.* 2020;28(3):131-6.
224. de Santis GC, Langhi Júnior DM, Feitoza A, Mendrone Junior A, Kutner JM, Covas DT, et al. Consenso da Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular sobre Células Geneticamente Modificadas. V: Manufatura e Controle de Qualidade [internet]. 2021 [acesso em 27 mar. 2022]. Disponível em: <https://abhh.org.br/wp-content/uploads/2021/08/V.-Controle-de-qualidade-e-manufatura-1.pdf>.