

ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA
VIABILIDADE DO RETALHO
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO MÚSCULO RETO DO ABDOME, EM RATOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

SÃO PAULO

2016

ANDRÉ LUIZ PIRES DE FREITAS

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA
VIABILIDADE DO RETALHO
MUSCULOFASCIOCUTÂNEO TRANSVERSO
DO MÚSCULO RETO DO ABDOME, EM RATOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Prof^a. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

COORIENTADOR: Prof. Dr. SANG WON HAN

SÃO PAULO

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Vasco e Amélia, pessoas iluminadas, que possibilitaram e facilitaram minha caminhada.

Aos meus irmãos Junior, Flávio, Alessandra e Sandra, irmãos maravilhosos em todos os momentos.

À minha mulher Ana Paula, carinhosa e paciente nos momentos difíceis. Forte e decisiva nos momentos importantes.

À minha filha Maria Eduarda, luz, alegria e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À **PROF^a. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo, Chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, por iniciar meu aprendizado como pesquisador, pela orientação, estímulo, exemplo de retidão e dinamismo profissional.

Ao **PROF. DR. SANG WON HAN**, Professor Titular e Livre Docente do Departamento de Biofísica e Pesquisador do Centro de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo, pela orientação, disponibilidade, estímulo e boa vontade em compartilhar sua valiosa experiência.

À **PRISCILA KEIKO MATSUMOTO MARTIM**, Bióloga e Doutora pelo Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, disponibilidade e ajuda nos procedimentos de terapia celular.

Ao **PROF. VICTOR ARIAS**, Médico Assistente do Departamento de Patologia da Universidade Federal de São Paulo, por seu apoio e ajuda preciosa na imuno-histoquímica e análise das lâminas histológicas.

À **PROF^a GIANNI MARA SILVA DOS SANTOS**, Professora da Disciplina de Bioestatística da Universidade Federal de São Paulo, pelos ensinamentos, disponibilidade, orientação e auxílio na realização da análise estatística.

Ao **PROF. LEONARDO MARTINS**, Biólogo e Doutor pelo Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo, pela amizade, disponibilidade e ajuda nos procedimentos de preparo das lâminas histológicas.

Ao **Sr. VICTOR LEMOS**, Designer Gráfico da Faculdade UNIBAN, pela elaboração das ilustrações deste trabalho.

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.”

“Uma vez tendo experimentado voar, caminharás para sempre sobre a Terra de olhos postos no Céu, pois lá você esteve e para lá tencionas voltar.”

Leonardo Da Vinci

1501

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
LISTAS	vii
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	6
3. LITERATURA	8
4. MÉTODOS	35
5. RESULTADOS	57
6. DISCUSSÃO	72
7. CONCLUSÃO	87
8. REFERÊNCIAS	89
NORMAS ADOTADAS	100
ABSTRACT	101
APÊNDICES	102
ANEXOS	115
FONTES CONSULTADAS	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Demarcação da incisão na região inguinal, incisão, remoção do tecido adiposo e sutura da área doadora.....	38
Figura 2.	Diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.....	41
Figura 3.	Demarcação do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome.....	43
Figura 4.	Incisão do retalho em toda a área pré-marcada.....	44
Figura 5.	Dissecção do segmento contralateral do retalho até a linha média.....	44
Figura 6.	Dissecção da porção ipsilateral do retalho até a margem do músculo reto do abdome direito.....	45
Figura 7.	Incisão na linha média do abdome, com separação dos músculos retos do abdome.....	45
Figura 8.	Liberação do retalho, com incisão do músculo reto do abdome direito cranialmente.....	46
Figura 9.	Retalho TRAM monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos.....	46
Figura 10.	Colocação de barreira de silicone sob o retalho TRAM.....	47
Figura 11.	Distribuição e fixação do retalho TRAM.....	47
Figura 12.	Síntese do retalho TRAM com sutura contínua.....	48
Figura 13.	Pontos do transplante de células-tronco no abdome, durante o procedimento do retalho TRAM.....	49
Figura 14.	Zonas do retalho TRAM e as áreas de biópsias.....	51
Figura 15.	<i>Boxplot</i> da percentagem total de necrose dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.....	59

Figura 16. <i>Boxplot</i> do número de vasos sanguíneos no total dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.....	64
Figura 17. <i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona I do retalho TRAM nos grupos.....	65
Figura 18. <i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona II do retalho TRAM nos grupos.....	66
Figura 19. <i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona III do retalho TRAM nos grupos.....	67
Figura 20. <i>Boxplot</i> da contagem média de vasos sanguíneos na zona IV do retalho TRAM nos grupos.....	68
Figura 21. Diagrama de dispersão bidimensional entre porcentagem de necrose e número de vasos no total dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.....	70
Figura 22. Células Dil+ na microscopia de fluorescência.....	71
Figura 23. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo Célula-Tronco, segundo as zonas do retalho.....	102
Figura 24. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo Alfa MEM, segundo as zonas do retalho.....	103
Figura 25. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo TRAM, segundo as zonas do retalho.....	104
Figura 26. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo Célula-Tronco, segundo as zona do retalho.....	105
Figura 27. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo Alfa MEM, segundo as zonas do retalho.....	106

Figura 28. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo TRAM, segundo as zonas do retalho.....	107
Figura 29. Marcador HHF-35 com aumento de 400X.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Porcentagem total de necrose do retalho TRAM.....	58
Tabela 2.	Comparações da porcentagem total de necrose do retalho entre os grupos.....	59
Tabela 3.	Estimativas pontuais e intervalares do coeficiente de correlação intraclasse entre os avaliadores quanto ao número de vasos, segundo as zonas do retalho e grupo.....	62
Tabela 4.	Valores de média e desvio-padrão (dp) da contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas.....	63
Tabela 5.	Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona I.....	108
Tabela 6.	Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona II.....	108
Tabela 7.	Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona III.....	109
Tabela 8.	Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona IV.....	109
Tabela 9.	Necrose do retalho no grupo TRAM.....	109
Tabela 10.	Necrose do retalho no grupo Alfa MEM.....	109
Tabela 11.	Necrose do retalho no grupo Célula-Tronco.....	110
Tabela 12.	Contagem de vasos do grupo TRAM	110
Tabela 13.	Contagem de vasos do grupo Alfa MEM.....	110
Tabela 14.	Contagem de vasos do grupo Célula-Tronco.....	111
Tabela 15.	Resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de igualdade de variâncias (Levene).....	111
Tabela 16.	Fluorescência do marcador Dil nas zonas do TRAM.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Alfa MEM	Meio de cultura Alfa MEM (<i>minimum essential medium eagle alpha modification</i>)
ADSC	Células-tronco derivadas do tecido adiposo (<i>adipose-derived stem cells</i>)
BSA	Soro albumina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Grupamento de diferenciação ou cluster de diferenciação
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
DAB	<i>Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DAPI	Marcador fluorescente de núcleo celular (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride salt</i>)
Dil	Marcador fluorescente para células (<i>1,1-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
eNOS	Óxido nítrico endotelial (<i>endothelial nitric oxide</i>)
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>green fluorescent protein</i>)
°C	Grau Celsius
Gy	Gray - Unidade de absorção de radiação
HHF-35	Anticorpo para o fator cardíaco humano (<i>human heart factor</i>)
HIF-1 α	Fator 1 alfa hipóxia-induzido (<i>hypoxia-inducible factor-1α</i>)
IPS	Células-tronco pluripotentes induzidas (<i>induced pluripotent stem cells</i>)

kg	Quilograma
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
min	Minuto
mm	Milímetro
M	Molar ou Mol/l
µM	Micromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
ms	Milissegundo
MSC	Células-tronco mesenquimais (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NaN ₃	Azida sódica
ng	Nanograma
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
pH	Potencial hidrogeniônico
s	Segundo
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TRAM	Retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome (<i>transverse rectus abdominus myocutaneous</i>)
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)

RESUMO

Introdução: O retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome (TRAM) é considerado uma opção cirúrgica importante para a reconstrução mamária porém pode apresentar necrose, sobretudo em pacientes com fatores de risco. A perspectiva para a utilização de terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo estimulando a neovascularização e diminuindo a necrose do retalho TRAM, originou este estudo. **Objetivo:** Determinar o efeito das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo na viabilidade do retalho TRAM, em ratos. **Métodos:** Vinte e quatro ratos da linhagem Wistar-EPM foram distribuídos em três grupos (n = 8). O retalho TRAM de pedículo caudal direito foi realizado em todos os animais e foi o único procedimento realizado no grupo I (TRAM). Nos grupos II (Alfa MEM) e III (Célula-Tronco), com o procedimento do retalho TRAM foi realizada a injeção intradérmica de meio de cultura Alfa MEM e meio de cultura Alfa MEM com dois milhões de células-tronco mesenquimais com o marcador fluorescente Dil, respectivamente. Foram avaliados a porcentagem de necrose do retalho, a neovascularização através de imuno-histoquímica com o anticorpo HHF-35 e a distribuição das células-tronco no retalho TRAM através de microscopia de fluorescência. **Resultados:** Os grupos TRAM, Alfa MEM e Célula-Tronco mostraram uma média de porcentagem de necrose de 50,42%, 53,57%, e 23,36%, respectivamente (p = 0,005). A imuno-histoquímica mostrou um aumento significativo do número de vasos na zona IV do retalho no grupo III. **Conclusão:** As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo aumentaram a viabilidade e o número de vasos na zona IV do retalho TRAM, em ratos.

1. INTRODUÇÃO

A reconstrução mamária pós-mastectomia constitui uma área de estudo em cirurgia plástica que, atualmente, dispõe de várias técnicas para a reconstrução do relevo mamário. O retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome (TRAM) é considerado uma opção importante para a reconstrução mamária em vários centros (HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK, 1982; HARTRAMPF & BENNET, 1987; KROLL *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2004; BOZOLA, 2005). O uso de tecido autógeno, propiciando naturalidade e a melhora do contorno abdominal são as principais vantagens desta técnica (HARTRAMPF & BENNET, 1987; HARTRAMPF, 1988; KROLL *et al.*, 1998). Contudo, a vascularização do TRAM pode ser insuficiente, levando a complicações como necrose de pele e tecido adiposo (SCHEFLAN & DINNER, 1983; HARTRAMPF, 1988; KROLL *et al.*, 1998).

Vários estudos e modificações técnicas buscaram aumentar a vascularização desse retalho para minimizar suas complicações (ISHII *et al.*, 1985; SEMPLE, 1994; CODNER & BOSTWICK, 1998). O aumento da vascularização e o conseqüente aumento da viabilidade do retalho TRAM têm importância principalmente em pacientes com fatores de risco para a isquemia, como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, obesidade, doenças vasculares, doenças do colágeno, radioterapia prévia, tabagismo e cirurgias abdominais prévias (HARTRAMPF, 1988; SEMPLE, 1994; CODNER & BOSTWICK, 1998; HALLOCK & RICE, 1998).

A autonomização cirúrgica é considerada uma opção para o aumento da vascularização através da transferência do retalho em dois tempos

cirúrgicos. No primeiro tempo o retalho é submetido a um procedimento cirúrgico para causar isquemia parcial e após um período que pode variar de dias a semanas, é transferido à área receptora. Este procedimento estimula novos angiossomos tornando o retalho mais vascularizado. A vasodilatação com diminuição da resistência periférica e a angiogênese foram sugeridos como mecanismos responsáveis pelo aumento da viabilidade do retalho autonomizado (HALLOCK & RICE, 1995a; SEIFY, BILKAY E JONES, 2003; YUE *et al.*, 2013).

Vários autores buscaram alternativas para substituir a autonomização cirúrgica por uma autonomização química. CLUGSTON *et al.* (1995) obtiveram aumento da viabilidade do retalho TRAM em ratos com o uso de alopurinol. KARACAOGLU *et al.* (2002) utilizaram microesferas contendo epinefrina no retalho TRAM e mostraram viabilidade semelhante à autonomização cirúrgica.

Avanços em biologia vascular sugeriram algumas possibilidades terapêuticas para aumento da viabilidade de tecidos isquêmicos. A possibilidade da indução de angiogênese em tecidos não isquêmicos para aumentar sua vascularização, diminuindo as complicações isquêmicas pós-operatórias, foi estudada (PADUBIDRI & BROWNE, 1996; TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000). Há três décadas, um grupo de polipeptídios com ação angiogênica foi identificado, trazendo novas perspectivas terapêuticas. Denominados fatores de crescimento, esses polipeptídios foram objeto de vários estudos com a finalidade de aumentar a viabilidade de retalhos cutâneos e musculares em modelos animais (TAUB, SILVER, WEINBERG, 2000; ZHANG *et al.*, 2001).

SEIFY, BILKAY, JONES (2003) utilizaram o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) na sua forma recombinante para aumentar a viabilidade do retalho TRAM em ratos, obtendo melhora no grupo tratado.

FREITAS *et al.* (2010) estudaram o aumento da viabilidade do retalho TRAM em ratos através da terapia gênica com VEGF e observaram uma menor isquemia no grupo tratado.

Contudo, o efeito de terapias exógenas com fatores de crescimento pode ser limitado pelo número de células endoteliais presentes. Uma estratégia alternativa seria aumentar o número de células endoteliais com a construção de novos vasos sanguíneos (ISNER & ASAHARA, 1999; FOROGLU *et al.*, 2016).

Há duas décadas postula-se que a neovascularização ocorre através de dois mecanismos distintos. O primeiro é a angiogênese onde há a formação de vasos a partir de capilares pré-existentes. O segundo mecanismo é a vasculogênese com a formação de vasos sanguíneos através da diferenciação *in situ* de células endoteliais progenitoras (ASAHARA *et al.*, 1997; TEPPER *et al.*, 2003). Tradicionalmente acreditava-se que a vasculogênese ocorreria somente durante o desenvolvimento embriológico, porém estudos mostraram evidências da sua ocorrência em sistema vascular adulto (ASAHARA *et al.*, 1997).

Células-tronco mesenquimais da medula óssea mostraram seu potencial para se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo células endoteliais representando uma alternativa à utilização de células endoteliais progenitoras em terapia celular (OSWALD *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005).

Estudos prévios identificaram a presença de células-tronco mesenquimais em tecido adiposo, que podem ser isoladas semelhantemente às células derivadas de medula óssea (ZUK *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002). A utilização dessa modalidade celular apresenta como principais vantagens, a facilidade na sua obtenção, a possibilidade de remoção de grande quantidade de células e uma menor morbidade da área doadora (LU *et al.*, 2008). A célula-tronco derivada do tecido adiposo (ADSC) pode diferenciar-se em linhagens osteogênicas, condrogênicas, adipogênicas, miogênicas, neurogênicas e angiogênicas (ZUK *et al.*, 2001; MIZUNO *et al.*, 2002; ZUK *et al.*, 2002; DE UGARTE *et al.*, 2003a; DE UGARTE *et al.*, 2003b; PLANAT BERNARD *et al.*, 2004; REHMAN *et al.*, 2004).

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo poderiam então, se transdiferenciar em células endoteliais progenitoras, células endoteliais e novos vasos sanguíneos assim como as células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.

A escassez de estudos na literatura, sobretudo do efeito da terapia celular com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na vascularização de retalhos musculocutâneos e a possibilidade de se avaliar uma técnica de terapia celular com potencial efeito localizado e duradouro, estimularam a elaboração deste estudo para determinar os efeitos na viabilidade do retalho TRAM, em ratos.

2. OBJETIVO

2. Objetivo

Avaliar as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome, em ratos.

3. LITERATURA

3.1 RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA COM O RETALHO TRAM

ROBBINS (1979) descreveu a técnica original de reconstrução mamária para pacientes mastectomizadas, usando um retalho musculofasciocutâneo em ilha do músculo reto do abdome com disposição vertical. O autor utilizou a técnica em quatro pacientes, obtendo boa forma e volume, sem a necessidade de implantes.

HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982) descreveram a técnica original de reconstrução mamária com o retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal de músculo reto do abdome (TRAM). Descreveram o estudo anatômico dos vasos epigástricos em cadáveres e propuseram uma orientação horizontal para a ilha de pele do retalho abdominal descrito anteriormente em posição vertical por ROBBINS (1979). Apresentaram considerações anatômicas, cirúrgicas e resultados clínicos da utilização do retalho em 16 pacientes.

GANDOLFO (1982) publicou técnica semelhante à descrita por HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK (1982), utilizando o retalho musculofasciocutâneo do abdome inferior em posição transversal, com pedículo único nos vasos epigástricos superiores. Utilizou a técnica em cinco pacientes com bons resultados.

SCHEFLAN & DINNER (1983) descreveram sua experiência de reconstrução mamária com 65 retalhos TRAM monopediculados em 60 pacientes consecutivas. Discutiram a anatomia cirúrgica, as indicações, contraindicações e complicações da técnica e salientaram as vantagens em relação à reconstrução mamária com retalho do músculo grande dorsal.

HARTRAMPF & BENNETT (1987) relataram a experiência com 300 pacientes submetidas à reconstrução mamária ou tórax com o retalho TRAM entre 1980 e 1986. Os autores obtiveram os dados por meio da análise de prontuários e questionários aplicados às pacientes. Os resultados mostraram complicações em 16% dos casos. A complicação mais frequente foi a necrose parcial do retalho em dezenove pacientes (6,3%) e a complicação mais grave foi a embolia pulmonar, que ocorreu em duas pacientes (0,6%). O questionário foi respondido por 97,6% das pacientes e a aprovação do procedimento de reconstrução mamária ocorreu em 98% dos casos. Os autores concluíram que a reconstrução mamária com TRAM, realizada por cirurgião experiente, é um procedimento seguro, com bons resultados.

HARTRAMPF (1988) apresentou uma revisão crítica de sete anos de experiência em reconstrução mamária com o retalho TRAM, enfatizando refinamentos da técnica operatória e qualificando as indicações e contraindicações para esse procedimento. O autor atribuiu notas de um a dez aos diferentes fatores de risco para complicações pós-operatórias, classificando em quatro grupos. O grupo I incluiu pacientes sem fatores de risco ou com nota zero, boas candidatas para a reconstrução com o TRAM.

Ao grupo II pertenceram as pacientes com um fator de risco e nota igual ou inferior a dois. Estas pacientes são boas candidatas, porém o cirurgião deve minimizar os riscos. As pacientes com nota menor que cinco ou dois fatores de risco se encontram no grupo III, que representa uma situação intermediária na qual a cirurgia poderá ser indicada. As pacientes com nota entre cinco e dez ou três ou mais fatores de risco não devem ser submetidas à reconstrução mamária com o retalho TRAM. Alguns fatores de risco apresentam isoladamente nota entre cinco e dez, contraindicando a cirurgia. O autor coloca nessa situação as pacientes portadoras de obesidade grave, tabagistas, portadoras de doenças autoimunes, diabéticas, pacientes com dependência química, doença pulmonar crônica, doença cardiovascular grave, hipertensão não controlada e pacientes com cirurgias abdominais em que houve secção dos vasos perfurantes (abdominoplastia) ou dos vasos epigástricos.

KROLL *et al.* (1998) compararam a incidência de necrose gordurosa nas reconstruções realizadas com o retalho TRAM microcirúrgico e o retalho TRAM pediculado em 110 pacientes com 116 reconstruções mamárias. Quarenta e nove pacientes realizaram reconstrução com o TRAM microcirúrgico e apresentaram oito por cento de necrose gordurosa, evidenciada clinicamente, e dois por cento pela mamografia. As 67 pacientes submetidas à reconstrução com o retalho convencional ou pediculado apresentaram necrose gordurosa, detectada clinicamente em 26,9% e detectada na mamografia em 14,4%. Os autores encontraram diferença significativa na incidência de necrose gordurosa entre os grupos, nas duas formas de avaliação.

3.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DO RETALHO TRAM

DUNN & MANCOLL (1992) descreveram as diferenças na vascularização da pele de animais e do homem. Realizaram uma revisão de todos os retalhos descritos em ratos e sua aplicabilidade. O retalho randômico dorsal, o retalho ventral toracoabdominal, o retalho dorsal com pedículo caudal ou cranial e os retalhos epigástricos. Propuseram o estudo da vascularização do abdome para desenvolvimento do modelo do retalho musculofasciocutâneo abdominal transversal do músculo reto do abdome.

DUNN, HUFF, MANCOLL (1993) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Realizaram estudo anatômico, com tinta da Índia para avaliar a distribuição dos vasos epigástricos craniais e caudais e aplicaram o modelo em quatro grupos de animais. Um grupo controle sem confecção do retalho, um grupo com pedículo cranial, um grupo com pedículo caudal e um grupo com retalho bipediculado caudal. Mostraram em seu estudo que a pele do abdome do rato apresenta artérias musculocutâneas e não somente artérias cutâneas diretas, como outros pesquisadores acreditavam. Neste caso, esse modelo poderia simular a irrigação do abdome no humano. A fisiologia mostrou-se semelhante à do humano, apresentando *choke vessels*. Os animais submetidos ao retalho monopediculado cranial e bipediculado caudal apresentaram 97% de viabilidade. O grupo com pedículo monopediculado caudal apresentou 77% de viabilidade.

OZGENTAS, SHENAQ, SPIRA (1994) estudaram a dominância vascular dos pedículos do retalho TRAM em ratos. O objetivo do estudo foi desenvolver um modelo animal do retalho que mimetizasse o retalho no humano, particularmente sob o aspecto do seu desenho anatômico. O retalho em humanos é usualmente localizado no abdome inferior, tendo a artéria epigástrica superior como pedículo, e o alto índice de necrose parcial do retalho é atribuído ao uso desse pedículo não dominante. Os autores observaram que, no modelo do rato, o pedículo vascular da artéria epigástrica cranial é mais calibroso e contribui mais para a vascularização do retalho do que o sistema caudal; conseqüentemente, os retalhos baseados no sistema epigástrico cranial têm áreas de retalhos viáveis maiores do que aqueles baseados no sistema epigástrico caudal. Os autores concluíram que o modelo do retalho TRAM no rato assemelha-se ao retalho convencional em humanos e constitui uma alternativa confiável e de baixo custo para o estudo do retalho.

HALLOCK & RICE (1995b) realizaram estudo anatômico e fisiológico dos pedículos do retalho TRAM em ratos. O estudo anatômico foi realizado em 13 ratos e observou um maior calibre dos vasos que emergem superiormente no músculo reto do abdome (vasos epigástricos profundos craniais) em continuação à artéria torácica interna (mamária). Os vasos epigástricos profundos caudais frequentemente eram vestigiais. Nesse estudo, observaram uma média de 4,7 vasos perfurantes (2 a 7) dos vasos epigástricos do processo xifoide até o púbis. Esses vasos frequentemente emergem dos vasos epigástricos profundos craniais e fazem inúmeras anastomoses com os vasos perfurantes contralaterais. O estudo fisiológico através de laser Doppler mostrou um fluxo sanguíneo

maior no retalho baseado no pedículo cranial. O grupo com o retalho de pedículo cranial apresentou maior viabilidade estatisticamente significativa, em relação ao grupo em que o TRAM tinha um pedículo caudal.

ELY & FERREIRA (2003) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Estudaram o retalho com extensão de cinco centímetros transversal por três centímetros no sentido longitudinal, monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos, e descreveram de forma pormenorizada os passos para sua execução. Os autores concluíram que o modelo experimental do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome (TRAM) é aplicável e efetivo como um modelo experimental em rato. Há perspectiva do uso desse modelo experimental no estudo de diferentes extensões de tamanho do retalho e efeito de drogas na sua perfusão e viabilidade.

GARCIA *et al.* (2004) descreveram o modelo experimental do retalho TRAM em ratos. Os autores descreveram o retalho de pedículo cranial direito medindo cinco centímetros no sentido transversal, tomando-se a linha média como parâmetro, e três centímetros no sentido longitudinal, distando um centímetro do processo xifoide. Os autores classificaram o modelo como simples, reprodutível e de baixo custo, possibilitando o melhor entendimento da fisiopatologia e a aplicação de novos tratamentos para prevenir a necrose parcial ou total do retalho TRAM.

3.3 VASCULARIZAÇÃO DO TRAM

BOYD, TAYLOR, CORLETT (1984) realizaram o estudo anatômico dos territórios de vascularização dos vasos epigástricos profundos superiores e inferiores. Utilizando 65 cadáveres, os autores dividiram seu estudo em dissecação, injeção de corante e estudo radiográfico contrastado. O estudo com corantes foi realizado com injeção de tinta da Índia nos vasos epigástricos profundos superiores e inferiores, separadamente. A injeção dos vasos inferiores mostrou que os vasos epigástricos profundos inferiores contribuem mais para a vascularização da pele e parede abdominal. O estudo anatômico mostrou a disposição dos vasos e a discrepância em relação ao diâmetro dos vasos inferiores (média de 3,4 mm) e superiores (média de 1,6 mm). Muitos vasos perfurantes emergem da bainha anterior do músculo reto do abdome, mas a concentração ocorre na região periumbilical. O estudo contrastado confirmou os achados e possibilitou correlacionar os resultados da dissecação com os achados do estudo com corante.

CLUGSTON *et al.* (1995) estudaram a viabilidade do retalho TRAM em ratos tratados com alopurinol e pentoxifilina. Utilizaram o retalho TRAM com pedículo cranial direito em 30 animais distribuídos em três grupos. Os animais do primeiro grupo receberam, no pós-operatório, água com alopurinol via oral na dose de 20 mg/kg por dia e os animais do segundo grupo receberam pentoxifilina via oral na dose de 100 mg/kg por dia. Após 48 horas, a área de viabilidade do retalho foi gabaritada em molde de papel e digitalizada para a mensuração em programa

computadorizado. Os resultados mostraram um aumento significativo da viabilidade do TRAM no grupo tratado com alopurinol, em relação ao grupo controle ($p = 0,018$).

HALLOCK & RICE (1995a) estudaram a autonomização do retalho TRAM em ratos. Utilizaram o modelo descrito por DUNN, HUFF, MANCOLL (1993) com pedículo caudal direito. No grupo controle, os animais foram submetidos apenas ao retalho TRAM. Nos grupos experimentais (cinco animais), houve variações no período de autonomização (14 e 28 dias) e no tipo do procedimento de autonomização (ligadura unilateral ou bilateral dos pedículos). Os autores não encontraram diferença significativa na viabilidade do retalho TRAM no grupo de 14 dias de autonomização, em relação ao grupo controle. O grupo com 28 dias de autonomização e ligadura ipsilateral apresentou maior viabilidade do retalho.

CODNER & BOSTWICK (1998) propuseram a autonomização do retalho TRAM em pacientes com os fatores de risco, como obesidade, radioterapia prévia, tabagismo e cicatrizes cirúrgicas no abdome. Destacaram os mecanismos de aumento da vascularização do retalho TRAM através do aumento do fluxo sanguíneo arterial e diminuição da congestão venosa. Os autores descreveram o procedimento cirúrgico de autonomização, realizando duas incisões cirúrgicas de quatro a seis centímetros na área de marcação inferior do retalho TRAM e ligadura dos vasos epigástricos profundos bilateral, duas semanas antes do procedimento cirúrgico do retalho TRAM.

KARACAOGLU *et al.* (2002) propuseram a autonomização química como uma alternativa à autonomização cirúrgica para aumento da viabilidade do TRAM em ratos. Utilizaram um sistema de microesferas de polímero biodegradável contendo drogas em seu interior, que eram liberadas lentamente com a sua degradação. Os animais foram distribuídos em três grupos de dez animais. No grupo I os animais foram submetidos à autonomização cirúrgica, no grupo II foram tratados com injeção subcutânea do sistema de microesferas contendo solução salina e no grupo III os animais foram tratados com injeção subcutânea do sistema de microesferas contendo epinefrina. Após sete dias, todos os animais foram submetidos ao retalho TRAM. A viabilidade foi medida por meio de fotografias digitais e programa computadorizado após sete dias. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre as duas formas de autonomização.

SEIFY, BILKAY, JONES (2003) compararam o efeito do VEGF recombinante e da autonomização cirúrgica, na viabilidade do TRAM, em ratos tratados no pré-operatório de dez dias. Utilizaram o retalho TRAM com pedículo nos vasos epigástricos caudais. O VEGF recombinante foi administrado, por via intramuscular e intra-arterial, em dose única de 100µg. Obtiveram melhora da viabilidade do retalho TRAM no grupo autonomizado, nos grupos tratados com o VEGF e nos grupos em que houve associação de ambos.

3.4 CÉLULAS-TRONCO, TERAPIA CELULAR E ANGIOGÊNESE

ASAHARA *et al.* (1997) isolaram células progenitoras endoteliais ou angioblastos de sangue periférico humano através da expressão de anticorpos de superfície. No estudo *in vitro*, as células se diferenciaram em células progenitoras endoteliais. Em modelos experimentais de isquemia, heterólogos, homólogos, e autólogos, as células progenitoras endoteliais foram incorporadas aos sítios de atividade angiogênica. Os achados sugerem que as células progenitoras endoteliais apresentam potencial para estimular o crescimento de vasos colaterais em tecidos isquêmicos (angiogênese terapêutica) e mobilizar fatores anti ou pro-angiogênicos, para sítios de anormalidades onde se deseja diminuir a angiogênese ou combater a isquemia.

ASAHARA *et al.* (1999) isolaram células progenitoras endoteliais do sangue periférico de humanos adultos. Para determinar a origem e o papel das células progenitoras endoteliais na vasculogênese em indivíduos adultos, as células foram transplantadas em camundongos transgênicos expressando beta-galactosidase sob regulação de transcrição de um promotor específico das células progenitoras endoteliais (Flk-1/LZ ou Tie-2/LZ). A localização das células marcadas por Flk-1 ou Tie-2/lacZ foi realizada no corpo lúteo e neovascularização endometrial após indução da ovulação. Células de neoplasia de colón de ratos (MCA38) foram implantadas no subcutâneo dos camundongos Flk-1/LZ/BMT (transplante de medula) e Tie-2/LZ/BMT. Amostras do tumor mostraram, após uma semana, abundante Flk-1/lacZ e Tie-2/lacZ, e amostras com X-gal

demonstraram que a neovascularização do tumor frequentemente mostrou expressão de Flk-1- ou Tie-2 de células endoteliais progenitoras. Feridas cutâneas examinadas quatro e sete dias após a remoção com biópsia mostraram grande quantidade de células progenitoras endoteliais incorporadas no sítio de neovascularização. Uma semana após o início da isquemia do membro, células progenitoras lacZ-positive EPCs foram identificadas e incorporadas nos capilares, entre os miócitos. Após a ligadura permanente da coronária esquerda, amostras histológicas dos sítios do coração infartado, demonstraram, a incorporação de células progenitoras endoteliais nas margens do infarto. Esses achados indicam que a neovascularização pós-natal não ocorre apenas em áreas de vasos preexistentes (angiogênese). As células progenitoras endoteliais circulantes, oriundas da medula óssea contribuem na fisiologia da neovascularização (vasculogênese pós-natal).

ISNER & ASAHARA (1999) descreveram o papel de fatores angiogênicos e células endoteliais progenitoras na neovascularização. Ressaltaram o papel da vasculogênese pós-natal como perspectiva terapêutica de neovascularização, anteriormente restrita a angiogênese. Descreveram as interações positivas entre as células endoteliais progenitoras e o fator de crescimento do endotélio vascular.

TAUB, SILVER, WEINBERG (2000) apresentaram perspectivas da utilização do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em cirurgia plástica através da terapia gênica. Descreveram a localização do

gene que codifica a proteína e inúmeras funções, mecanismo de ação, receptores, mediadores e características do VEGF.

ZUK *et al.* (2001) estudaram a população de células do tecido adiposo humano obtidas através de lipoaspiração. O tecido removido foi processado obtendo-se uma população de células semelhantes a fibroblatos que foram mantidas em cultura. A imunofluorescência e citometria de fluxo mostraram que a maioria das células eram de origem mesodérmica ou mesenquimal com baixo nível de presença de células endoteliais e células de músculo liso. As células se diferenciaram *in vitro* em células adipogênicas, condrogênicas, miogênicas e osteogênicas na presença de fatores indutores de linhagem específica. Concluíram que o lipoaspirado humano contém células multipotentes e pode representar uma fonte alternativa de células mesenquimais, além da medula óssea.

MIZUNO *et al.* (2002) estudaram a diferenciação de células mesenquimais de tecido adiposo em células musculares. Utilizaram o lipoaspirado de oito pacientes submetidos a cirurgia cosmética e mantiveram as células em meio adequado para diferenciação em miócitos por seis semanas. A expressão de marcadores de miócitos MyoD1 e miosina, a histologia e PCR foram avaliados. Os resultados histológicos foram quantificados e o nível de diferenciação para miócitos foi avaliado. Os autores encontraram que a diferenciação das células ocorreu após três semanas. Os marcadores, MyoD1 e miosina de músculo esquelético apresentaram expressão em tempos distintos. Durante a diferenciação, MyoD1 apresentou sua expressão primeiro que a expressão da miosina. Os

autores encontraram aproximadamente 15 % de diferenciação, após seis semanas de indução.

ZUK *et al.* (2002) realizaram um estudo bioquímico e molecular do tecido adiposo humano obtido através de lipoaspiração. As células expressaram múltiplos antígenos comuns aos antígenos observados nas células tronco mesenquimais. As análises bioquímicas também confirmaram a atividade de uma linhagem específica. As células foram diferenciadas em células neurogênicas, exibindo uma morfologia semelhante a neurônios e expressando várias proteínas comuns ao fenótipo neuronal. As células extraídas do tecido adiposo exibiram características únicas, observadas em células-tronco mesenquimais, incluindo um perfil de marcadores e expressão gênica.

TEPPER *et al.* (2003) realizaram uma revisão das perspectivas de utilização das células endoteliais progenitoras (EPC) em cirurgia plástica, principalmente sobre a neovascularização dos tecidos. Descreveram os mecanismos de neovascularização (angiogênese e vasculogênese) ressaltando as interações entre as células endoteliais responsáveis pela angiogênese e as EPCs que são responsáveis pela vasculogênese. A angiogênese é mais responsável pelo *turnover* celular e ocorre nas células endoteliais locais. A migração das EPCs, sua diferenciação e consequente vasculogênese acontece principalmente em situações de isquemia e trauma. A ação e a produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) estão relacionadas às EPC. O aumento de VEGF aumenta o recrutamento das EPCs provenientes da medula óssea, que por sua vez secretam mais

VEGF, completando o ciclo da neovascularização. A neovascularização é resultado da integração entre as células endoteliais progenitoras (vasculogênese) e as células endoteliais (angiogênese) em graus diversos de contribuição, dependendo do estímulo desencadeado para a produção de vasos.

DE UGARTE *et al.* (2003a), estudaram os fenótipos de superfície de células da medula óssea e derivadas de tecido adiposo de cinco pacientes submetidos a cirurgia. As células dos dois tecidos foram isoladas, e cultivadas. A expressão de antígenos de superfície foi avaliada através da citometria de fluxo. Os dois tipos celulares expressaram CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, SH-3, e STRO-1. As diferenças de expressão foram notadas para moléculas de adesão celular CD49d (Integrina alpha4), CD54 (ICAM-1), CD34, e CD106 (VCAM-1).

DE UGARTE *et al.* (2003b) realizaram estudo comparando as células do tecido adiposo removidas, através de lipoaspiração, de células tronco mesenquimais (MSCs). Não houve diferenças significantes observadas, na aderência entre as células, sinescência, capacidade de diferenciação em multilinhagens e eficiência de transdução gênica. Os autores concluíram que o tecido adiposo é fonte abundante e de fácil remoção de células, com potencial semelhante a células-tronco mesenquimais para uso em engenharia de tecidos e possível carreador em terapia gênica.

OSWALD *et al.* (2004) descreveram a diferenciação das células mesenquimais humanas de medula óssea em células endoteliais. Realizaram a imunotipagem das células com citometria de fluxo e a diferenciação em adipócitos e osteócitos. Para a diferenciação em células endoteliais, a cultura das células-tronco foi realizada em meio com 50 ng/ml de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). Os autores encontraram positividade na análise imunohistoquímica do fator de Von Willebrand após sete dias, indicando a presença de células endoteliais. A citometria de fluxo mostrou positividade para marcadores específicos de células endoteliais como FLT-1 e KDR (receptores de VEGF) e VE cadherin e VCAM-1. As células já diferenciadas mostraram habilidade de formar estruturas semelhantes a capilares em meio semissólido (*in vitro kit angiogenese*).

PLANAT BERNARD *et al.* (2004) estudaram o efeito da fração vascular estromal derivada de tecido adiposo, no modelo experimental de isquemia de membro em camundongos atímicos. Observaram um grande efeito pró-angiogênico, promovendo neovascularização. *In vitro*, essas células apresentaram uma população homogênea positiva para CD34, CD13, CD31 e fator de Von Willebrand. As células apresentaram um rápido potencial de adquirir um fenótipo de células endoteliais *in vitro*, promover neovascularização em tecidos isquêmicos e formar uma estrutura semelhante a vasos sanguíneos em Matrigel, sugerindo que essas células endoteliais e adipócitos podem ter o mesmo precursor.

REHMAN *et al.* (2004) estudaram a secreção de fatores angiogênicos e antiapoptóticos pelas células adiposas estromais humanas. As células estromais (ASCs) foram isoladas do tecido adiposo humano e caracterizadas por citometria de fluxo. As células secretaram 1203 ± 254 pg de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) por 10^6 células, 12280 ± 2944 pg de fator de crescimento de hepatócito por 10^6 células, e 1247 ± 346 pg de fator de crescimento beta por 10^6 células. A cultura em condições de hipóxia mostrou aumento da secreção de VEGF de cinco vezes para 5980 ± 1066 pg/ 10^6 células ($P=0,0016$). Os autores obtiveram, em condições de isquemia, um significativo aumento do crescimento de células endoteliais e redução da apoptose ($P<0,05$). O camundongo atímico com isquemia de membro demonstrou aumento da perfusão quando tratado com células estromais adiposas humanas ($P<0,05$).

SILVA *et al.* (2005) estudaram a diferenciação das células-tronco mesenquimais da medula em células endoteliais em modelo canino de isquemia miocárdica. Utilizaram doze cães distribuídos em dois grupos. No grupo experimento os animais foram tratados com injeção intramiocárdica de 1×10^8 células e no grupo controle os animais foram tratados com a injeção de soro fisiológico. Avaliaram a fração de ejeção e o aumento da vascularização miocárdica após 60 dias de isquemia e 30 dias da aplicação. Encontraram aumento significativo da fração de ejeção e vascularização miocárdica no grupo tratado. A microscopia evidenciou células marcadas com Dil e células positivas para o fator VIII na parede dos vasos, concluindo a transdiferenciação das células-tronco em células endoteliais.

DOMICINI *et al.* (2006) relataram os critérios que a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs para definir as células-tronco mesenquimais: aderência ao plástico em cultura de células isoladas, expressão de CD105, CD73 e CD90 em mais de 95% da cultura e a perda de expressão dos marcadores CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA Classe II (não mais que 2% da cultura) e capacidade de diferenciação *in vitro* das células em osteoblasto, condroblasto e adipoblasto em condições de cultura padronizadas. A diferenciação osteoblástica pode ser demonstrada com coloração por Alizarina Vermelha ou corante de von Kossa, a adipoblástica por Oil Red e a condroblástica pela coloração com Azul de Alcian. Os autores afirmaram que futuramente novos marcadores poderiam ser recomendados. Além da positividade dos marcadores sugeridos, mais importante foi considerar a obrigatória negatividade de alguns marcadores particularmente de origem hematopoiética como CD45 (um marcador panleucocitário), CD34 (que marca células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais) CD14 ou CD11b (que se expressam em monócitos e macrófagos) e CD79 ou CD19 α (que se expressam nas células B). Relativamente aos marcadores de macrófagos e células B, a SITC considera como suficiente a testagem de apenas um dos marcadores.

SCHÄFFLER & BÜCHLER (2007) realizaram uma revisão sobre as células estromais ou mesenquimais, derivadas do tecido adiposo (ADSC). Destacaram a multipotencialidade de diferenciação dessas células. Descreveram a metodologia de isolamento dessas células, a caracterização molecular, a capacidade de diferenciação e discutiram os mecanismos e

perspectivas da utilização das ADSC no reparo de tecidos mesenquimais e engenharia tecidual.

ZHENG *et al.* (2008) estudaram o efeito da associação da terapia gênica com plasmídeo do gene do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) e células-tronco mesenquimais da medula óssea (MSC), na viabilidade do retalho randômico dorsal de ratos. Utilizaram trinta animais distribuídos em três grupos. Após 4 dias da injeção, os animais foram submetidos ao retalho randômico de 9x2 cm e após 14 dias as áreas de necrose foram avaliadas. O grupo A foi tratado com células tronco transfectadas com o VEGF, no grupo B os autores utilizaram apenas as células tronco e no grupo C, apenas o meio de cultura. Os autores encontraram um aumento significativo da viabilidade do retalho ($P < 0,01$) e número de vasos ($P < 0,01$) no grupo A em relação aos grupos controles (B e C). O grupo B apresentou maior viabilidade ($p < 0,01$) e número de vasos ($p < 0,05$) em comparação com o grupo C.

LU *et al.* (2008) estudaram o aumento da vascularização do retalho dorsal em ratos com células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Utilizaram um retalho dorsal três centímetros de largura por dez centímetros de extensão. Após a elevação do retalho cutâneo, dois grupos de dez animais foram tratados com injeção subcutânea de 1×10^6 células-tronco derivadas de tecido adiposo, em terceira passagem, marcadas com marcador fluorescente (Dil), na base do retalho (grupo A) e 1,5 cm distal ao pedículo (grupo B). Nos grupos controles, os animais receberam adipócitos adultos, fator de crescimento de fibroblastos e DMEM (10 animais por

grupo). A avaliação no sétimo dia mostrou aumento da viabilidade do retalho e aumento da densidade capilar nos grupos tratados. Algumas células endoteliais apresentavam marcação Dil positiva.

BEHR *et al.* (2010) descrevem uma revisão sobre as células-tronco, suas perspectivas na medicina regenerativa e cirurgia plástica. Descreveram os inúmeros tipos de células-tronco e controvérsia na utilização das células-tronco embrionárias e das células-tronco pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* – IPS). Ressaltaram as vantagens das células-tronco adultas, quanto à segurança da aplicabilidade clínica e as vantagens da utilização do tecido adiposo como doador das células tronco mesenquimais.

GAO *et al.* (2011) estudaram as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no modelo experimental isquêmico de diabetes em camundongos. Utilizaram células-tronco humanas de três doadores submetidos à lipoaspiração, que foram expandidas até a terceira passagem e marcadas com o marcador fluorescente Dil. Quarenta e cinco animais foram distribuídos em três grupos e submetidos ao retalho randômico dorsal de 3x10 cm. No grupo A, os autores aplicaram 1×10^7 células, no grupo B utilizaram apenas o meio de cultura e no grupo C não realizaram nenhum tratamento. Realizaram também o estudo com laser Doppler fluxometria na extremidade dos retalhos. Encontraram diferença significativa na viabilidade do retalho, aumento das unidades de perfusão e células próximas a vasos sanguíneos, e raramente na parede deles.

SCHLOSSER *et al.* (2012) investigaram os efeitos hemodinâmicos de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MSCs) no modelo de retalho cutâneo isquêmico em ratos. Células mesenquimais derivadas da medula óssea foram colhidas de animais GFP (+) (proteína verde fluorescente) e transferidas para seis animais. Os animais foram divididos em dois grupos. Os animais do grupo controle receberam fibroblastos. Realizaram microscopia convencional, microscopia de fluorescência e confocal de varredura a laser. Para a análise morfológica, monitoramento e avaliação quantitativa das células-tronco utilizaram a imuno-histoquímica para GFP, eNOS (Óxido Nítrico Endotelial), iNOS e VEGF. A viabilidade do tecido foi analisada pelo método ensaio de TUNEL (*dUTP nick end labeling*), que é um método para detecção de fragmentação de DNA. Os autores observaram células perivasculares de MSCs *in vivo*. Após quatro dias, as MSCs apresentavam-se alinhadas ao longo da parede vascular, mas não sofreram diferenciação em células endoteliais durante o período de observação. O aumento progressivo na resistência vascular arterial observada no grupo de controle foi abolido após a administração MSC ($P < 0,01$). Em nível capilar, uma forte resposta angiogênica foi encontrado a partir do sétimo dia, em diante. A densidade capilar funcional foi elevada no grupo MSC a 197%, em comparação com 132% no grupo controle ($P < 0,01$). A ação parácrina de expressão de VEGF e da iNOS, mas não eNOS, pode ser mostrado no grupo MSC, mas não nos controles.

KARATHANASIS *et al.* (2013) investigaram se as células estromais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) autólogas geneticamente modificadas aumentariam a viabilidade de retalhos. Eles realizaram um estudo

experimental em que as células derivadas do tecido adiposo, marcadas com proteína verde fluorescente, foram injetadas por via intradérmica em retalhos cutâneos randômicos em ratos Wistar. Utilizaram seis animais com retalho duplo no dorso de 8 x 2 cm (autocontrole), tratados com 1×10^6 células e avaliados após sete dias. Os resultados indicaram que o transplante das células melhorou a viabilidade dos retalhos. As células marcadas com o GFP foram encontradas no endotélio dos vasos sanguíneos que coexpressavam o marcador endotelial fator de Von Willebrand, o que sugere que as células promoveram a regeneração de vasos sanguíneos *in vivo*.

YUE *et al.* (2013) estudaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) na viabilidade do retalho randômico dorsal, comparando ao retalho pré-condicionado à hipóxia através da autonomização cirúrgica. Utilizaram quarenta e dois animais, distribuídos em seis grupos. No grupo A os animais foram submetidos à autonomização, três e sete dias antes do procedimento. No grupo B foram tratados com ADSCs no momento da realização do retalho, três dias antes e sete dias antes do retalho. No grupo C foram tratados com a associação de células-tronco e autonomização, três e sete dias antes do procedimento do retalho. Demonstraram que o transplante pré-operatório de ADSCs, combinado com o pré-condicionamento hipóxico, efetivamente melhora a viabilidade dos retalhos isquêmicos em ratos, quando aplicados no pré-operatório (três dias), através de neovascularização associada com a produção e ativação do fator hipóxia induzido 1α (HIF- 1α), juntamente com um aumento de VEGF.

DERBY *et al.* (2014) identificaram a transdiferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) em células-tronco epiteliais, através da co-expressão de GFP (proteína verde fluorescente) com o marcador de células-tronco epiteliais (p63) em um modelo *in vivo* de enxerto de gordura. Seis ratos GFP positivos serviram como doadores de tecido adiposo. Doze ratos *nudes* foram distribuídos em dois grupos de seis animais. No grupo I (controle) os animais receberam o enxerto de gordura em plano subdérmico na região paraescapular esquerda e no grupo II (experimento) receberam hidrogel, carreando células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. O plano subdérmico paraescapular direito serviu como controle. Após 8 semanas os retalhos foram ressecados e submetidos à microscopia de fluorescência confocal e à reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) para níveis de expressão de RNAm de p63. O exame macroscópico dos retalhos cutâneos demonstrou o aumento de vasos dérmicos envolvendo a gordura e o transplante de ADSCs. As células GFP+ foram visualizadas dentro da arquitetura da derme sobrejacente e expressavam p63. Os níveis significativamente aumentados de expressão p63 foram encontrados no retalho cutâneo com as ADSC + hidrogel.

LEE *et al.* (2014) investigaram o potencial angiogênico de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) em diferentes vias de administração para aumentar a viabilidade do retalho cutâneo randômico dorsal. Células-tronco marcadas com PKH26 foram aplicadas através de quatro métodos na base cranial do retalho cutâneo randômico em ratos. Utilizaram: (a) injeção intravenosa; (B) a injeção subcutânea; (C) aplicação com sementeira em esponja de colágeno; e (d) aplicação com sementeira de

cola de fibrina. As ADSCs conduziram a um aumento significativo na viabilidade do retalho no grupo de injeção subcutânea e no grupo de esponja de colágeno. O fluxo sanguíneo foi maior nos grupos de injeção intravenosa, injeção subcutânea e esponja de colágeno. A densidade capilar foi significativamente maior no grupo com injeção intravenosa e esponja de colágeno, em relação ao grupo controle (sem tratamento). As células PKH26-positivas através da esponja de colágeno foram distribuídas mais densamente dentro do retalho, em relação aos outros grupos. Este estudo demonstrou que o método de aplicação das células-tronco associadas a esponja de colágeno foi eficaz na distribuição das células pelo retalho e aumento da vascularização do retalho.

ZHANG & TANG (2014) realizaram revisão sobre os mecanismos de ação das células-tronco mesenquimais no aumento da viabilidade de retalhos pediculados, retalhos microcirúrgicos e enxertos de pele. Concluíram que o aumento da vascularização de retalhos e enxertos se dá pela neoangiogênese, vasculogênese e liberação de fatores de crescimento e citocinas, principalmente, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator hipóxia-induzido 1 alfa (*hypoxia-inducible factor 1 α*), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator derivado de células estromais-1 α (SDF-1 α) e a citocina receptor tipo 4 (CXCR4).

HASDEMIR *et al.* (2015) estudaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no retalho randômico dorsal de 10 x 3 cm, irradiado. Utilizaram quarenta ratos distribuídos em quatro

grupos. Os dois primeiros grupos eram de animais irradiados e não irradiados e os dois outros grupos de animais tratados com célula-tronco em terceira passagem e tratados apenas com o meio de cultura. Os animais do grupo experimento foram submetidos a radioterapia em dose única de 20 Gy, oito semanas antes do procedimento do retalho e receberam células-tronco marcadas com GFP (proteína verde fluorescente) na dose de 2×10^6 , por via intradérmica, distribuídas em seis pontos do retalho, na parte distal do retalho, distando 1,5 cm entre eles. A viabilidade do retalho e a neovascularização através da histologia e imuno-histoquímica, foram avaliadas após sete dias. Os autores encontraram diferenças significantes da viabilidade do retalho nos grupos tratados com célula-tronco, porém não encontraram aumento significativo do número de vasos entre os grupos irradiados e entre o controle sem irradiação.

XU *et al.* (2015) estudaram o efeito das células estromais derivadas de tecido adiposo (ADSCs) no modelo experimental de retalho com congestão venosa, em coelhos. Neste estudo, 2×10^6 células da terceira passagem foram isoladas, identificadas e injetadas em pontos ao longo da linha média do retalho cutâneo. Os retalhos do grupo controle apresentaram após sete dias, congestão venosa, edema, hemorragia ou necrose de pele. O grupo tratado com célula-tronco apresentou aumento significativo da viabilidade dos retalhos. A coloração de hematoxilina-eosina (HE) revelou neovascularização e ausência de trombose no grupo tratado. A imunofluorescência revelou que o nível de expressão de CD34 e o número de capilares aumentaram significativamente no grupo de tratamento com ADSC. Os autores concluíram que o transplante de ADSC promove

neovascularização em retalhos cutâneos com congestão venosa aumentando a viabilidade.

HAN *et al.* (2015) estudaram o efeito da terapia com células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) no retalho cutâneo com congestão venosa. Utilizaram ratos Sprague-Dawley (n=21) distribuídos aleatoriamente em três grupos. No grupo I, o retalho foi suturado sem isquemia venosa. No grupo II, a veia foi seletivamente clampeada por quatro horas e foi administrado o meio de cultura após o restabelecimento do fluxo. No grupo III, ADSCs foram administradas após a retirada do clameamento. No sétimo dia pós-operatório, as áreas de viabilidade e os achados histopatológicos foram avaliados. Além disso, a expressão de heme-oxigenase (HO)-1 e fator nuclear- κ B (NF) foram avaliados por *Western blot*. O grupo tratado com célula-tronco mostrou um aumento significativo da viabilidade do retalho ($P < 0,05$) em comparação com o grupo II ($51,6\% \pm 13,6\%$ e $31,2\% \pm 11,9\%$, respectivamente). O grau de alterações histológicas foi significativamente menor no grupo III do que no grupo II ($9,38\% \pm 1,39$ e $6,46 \pm 2,57\%$, $P < 0,05$). Além disso, no grupo III, a expressão de NF- κ B foi significativamente menor ($0,51 \pm 0,21$ vs $0,34 \pm 0,21$, $P < 0,05$), ao passo que de HO-1 foi significativamente maior ($0,25 \pm 0,11$ vs $0,43 \pm 0,18$, $P < 0,01$). A imunofluorescência mostrou mais células HO-1-positivos no grupo III do que no grupo II ($10,9\% \pm 1,6\%$ vs. $16,0\% \pm 1,7\%$; $P < 0,01$).

FOROGLOU *et al.* (2016) realizaram uma revisão sobre o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) na

viabilidade de vários modelos animais de retalhos cutâneos randômicos, transplantes pediculados e retalhos pré-fabricados. Discutiram as vias de administração das células-tronco, seus efeitos na viabilidade dos retalhos, as diferentes formas de marcação dessas células e os mecanismos sugeridos de aumento da vascularização promovido pelas ADSCs.

IZMIRLI *et al.* (2016) estudaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo no modelo experimental de retalho cutâneo dorsal de interpolação em ratos. Utilizaram trinta e dois ratos distribuídos em dois grupos de dezesseis animais. No grupo experimento utilizaram 3×10^6 células, marcadas com proteína verde fluorescente (GFP), com injeção intradérmica no retalho. No grupo controle utilizaram a injeção de solução do meio de cultura Alfa MEM. Os autores subdividiram o tempo de secção do pedículo do retalho em 5, 8, 11 e 14 dias. Utilizaram cintilografia, microangiografia com injeção de contraste pela veia peniana, avaliação de histopatológica e análise macroscópica da área de necrose. A área de viabilidade e a neovascularização foram avaliadas após sete dias. Os autores encontraram um aumento significativo da viabilidade no grupo experimento, em todos os momentos de secção do pedículo. A taxa de retenção da substância radioativa foi maior no grupo experimento, assim como o número de vasos sanguíneos. A imunofluorescência estava presente apenas no grupo experimento.

4. MÉTODOS

4.1 DESENHO DE PESQUISA

Este foi um estudo primário, intervencional, experimental, longitudinal, prospectivo, analítico, controlado e aleatorizado. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (0148/12).

4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 24 ratos da linhagem Wistar, machos, adultos, com peso variando entre 250 e 300 gramas (g) com idade de três meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado, utilizando o programa de randomização por urna (*Urn Randomization – University of Connecticut Health Center*), em três grupos de oito animais, sendo dois grupos controle e um grupo de experimento. Os animais foram mantidos no biotério do Centro Interdisciplinar de Terapia Gênica (CINTERGEN) da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, em gaiolas individuais de polipropileno, com ciclo claro/escuro, controle de temperatura, ração própria comum e água *ad libitum*.

No grupo I (grupo TRAM) os animais foram submetidos ao procedimento do retalho TRAM e injeção intradérmica de solução salina.

Os animais do grupo II (grupo Alfa MEM) foram submetidos ao procedimento do retalho TRAM e injeção intradérmica de meio de cultura Alfa MEM (*minimum essential medium eagle alpha modification*).

Nos animais do grupo III (grupo Célula-Tronco), foram realizados os procedimentos do retalho TRAM e injeção intradérmica de célula-tronco com seu meio de cultura, Alfa MEM.

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 Alimentação, anestesia e preparo dos animais para os procedimentos

Os animais foram colocados em gaiolas individuais, pesados e mantidos durante o estudo no biotério do CINTERGEN – UNIFESP.

A anestesia foi realizada com a administração intraperitoneal de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan na dose de 25 mg/kg. Os animais foram imobilizados em prancha cirúrgica, em decúbito dorsal, e a tricotomia da região ventral foi realizada através de aparelho elétrico Oster 76274 (Oster, Tennessee, USA).

4.3.2 Obtenção do tecido adiposo

O tecido adiposo foi removido da região inguinal bilateral do rato. Uma linha de três centímetros de extensão foi demarcada na prega inguinal do animal, com prolongamento superior na linha axilar anterior medindo dois centímetros e distando três centímetros da linha média. Foi realizada a assepsia e antissepsia do local com solução alcoólica de Digluconato de Clorexidina 0,5% e colocação de campos operatórios estéreis. A incisão foi realizada com bisturi lâmina 15, o descolamento com tesoura e ressecção de fragmento de tecido adiposo pesando 0,5 a 1,0 g (Figura 1) (FREITAS *et al.*, 2014).

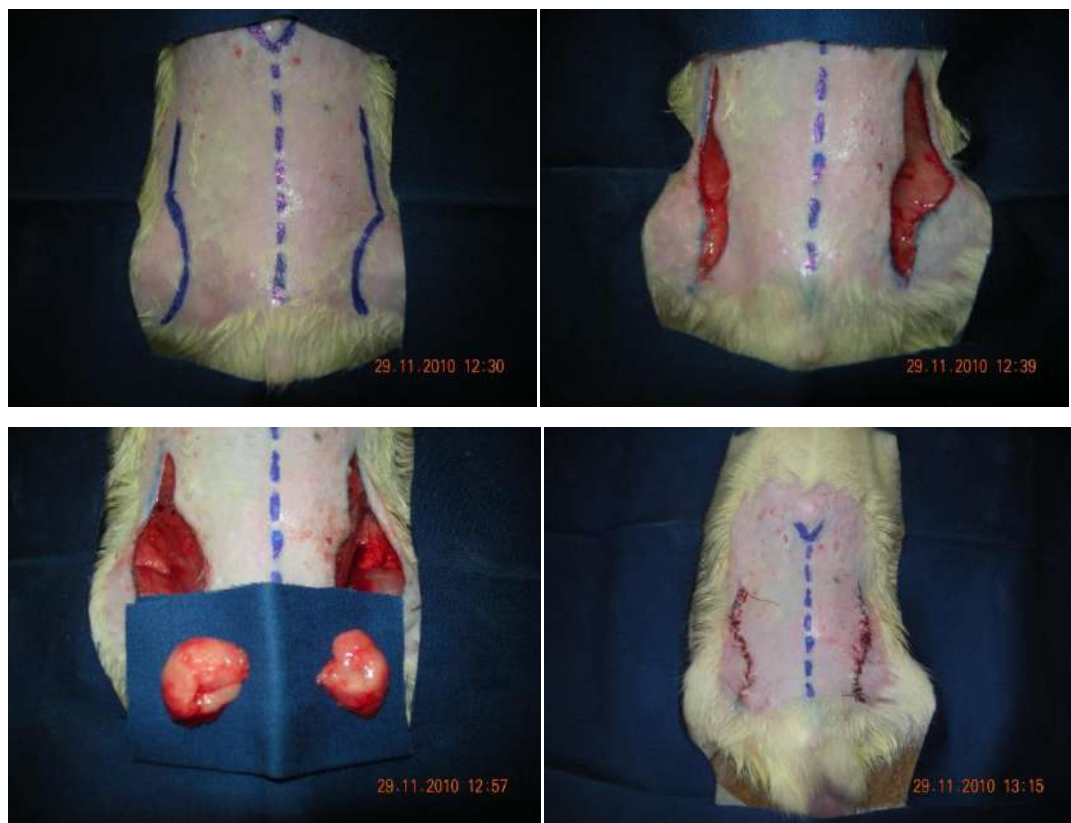


Figura 1. Demarcação da incisão na região inguinal, incisão, remoção do tecido adiposo e sutura da área doadora.

Após a remoção, todo fragmento de tecido adiposo foi colocado em recipiente estéril (tubo de Falcon) contendo 20 ml de soro fetal bovino.

4.3.3 Isolamento, cultura e caracterização das células tronco derivadas do tecido adiposo

Após a remoção do tecido adiposo, o mesmo foi seccionado em pedaços menores de dois milímetros com tesoura e incubado em colagenase tipo I 1mg/ml por 3 horas a 37°C, sob agitação. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 400 g e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em meio Alfa MEM (Gibco, San Diego, CA, USA), suplementado com 200 mM L-glutamina (Gibco), 10000 unidades/ml penicilina (Gibco), 10.000 unidades/ml estreptomicina (Gibco) e 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), e submetidas a contagem em câmara de Neubauer.

Após a contagem com azul de Trypan, as células foram incubadas na concentração de 1×10^6 células/cm² e mantidas a 37°C em 5% dióxido de carbono. As células aderentes foram mantidas em meio de cultura Alfa MEM suplementado, em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

As células foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de superfície, de acordo com o manual de critérios mínimos para a caracterização de células-tronco mesenquimais (DOMINICI *et al.*, 2006). Foram utilizados os anticorpos primários CD73 sc-14682, CD105 - endogлина sc-20632, CD45 sc-25590, Ataxin-1 sc-12528 (Sca-1) CD90 e CD34.

As células foram colocadas em lamínulas de 13 mm de diâmetro, lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído 4% por 10 minutos. Foi realizada a lavagem com triton X-100 0,5% para permeabilização e o bloqueio foi feito com BSA 10% associado ao leite MOLICO® (Nestle, Vevey, Suíça), 8% por 30 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos na proporção 1:50 e 1:100, e incubados *overnight* a 4° Celsius. O anticorpo secundário ALEXA FLUOR® 594 (Thermo Fischer, Massachusetts, USA) foi incubado por 1 hora à temperatura ambiente. O núcleo foi marcado com DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride salt*) na concentração 1:1000 por 5 minutos. As lamínulas foram montadas em Fluormount G e fotografadas em microscópio de fluorescência.

As células da terceira passagem foram analisadas por citometria de fluxo com os anticorpos positivos para CD105, CD73 e CD90, e negativos para CD45 e CD34.

As células também foram avaliadas em relação a sua proliferação como células aderentes e capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (DOMINICI *et al.*, 2006) (Figura 2).

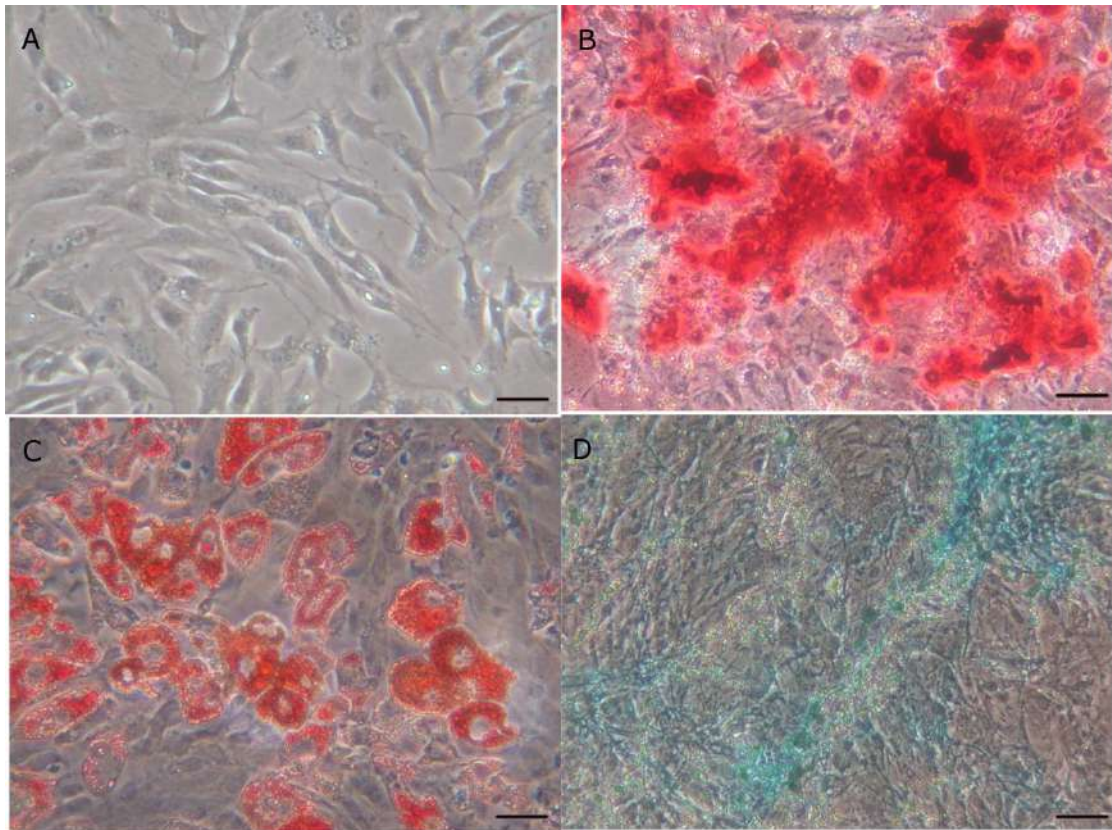


Figura 2. Diferenciação das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. **A**-Células não diferenciadas. **B**-Diferenciação osteogênica. **C**-Diferenciação adipogênica. **D**-Diferenciação condrogênica.

Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em alta confluência (80%) por aproximadamente um mês em meio Alfa MEM contendo 10% de SFB (Gibco, San Diego, CA, USA), 10^{-8} M de dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 5 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico (Sigma) e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma). Para observação do depósito de cálcio, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com Alizarin Red pH 4,2 (Sigma). O excesso de corante foi removido com água destilada.

Para diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em meio Alfa MEM contendo 10^{-10} M de dexametasona (Sigma), 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina (Sigma), 5 μM de rosiglitasona (Sigma). Um mês após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com Oil Red (Sigma). O excesso de corante foi removido com água destilada.

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em meio Alfa MEM 6,25 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, 10 ng/ml TGF β 1, 50 nM de ácido ascórbico e 10% de SFB. Um mês após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com Alcian Blue 2,5% (Sigma). O excesso de corante foi removido com água destilada.

4.3.4 Marcação e preparo das células-tronco

As células foram tratadas com marcador fluorescente Dil (1,1-Dioctadecyl-3,3,3,3-Tetramethylindocarbocyanine), para o estudo da sua localização e distribuição no retalho através de microscopia de fluorescência. O marcador foi acrescentado ao meio de cultura das células aderidas na proporção 1:1000, 12 horas antes do procedimento cirúrgico.

Somente culturas com células-tronco isoladas da terceira passagem foram utilizadas no estudo *in vivo*. As células foram ressuspensas no meio Alfa MEM na concentração de 5×10^5 células em 0,1 ml para a injeção em cada ponto do retalho, totalizando 0,4 ml ou 2×10^6 células por animal.

4.3.5 Retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome (DUNN & MALCOL, 1992; DUNN, HUFF, MALCOL, 1993; HALLOCK & RICE, 1995a; ELY, MILTERSTEINER, HOFF, 1997; ELY & FERREIRA, 2003)

O retalho foi demarcado, na região ventral cranial, medindo cinco centímetros no sentido transversal, tomando-se a linha média como parâmetro, e três centímetros no sentido longitudinal, distando um centímetro do *processus xiphoideus* (processo xifóide) (Figura 3).

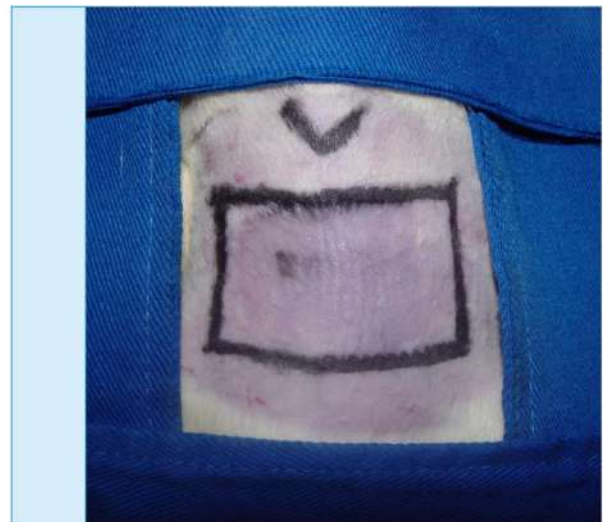
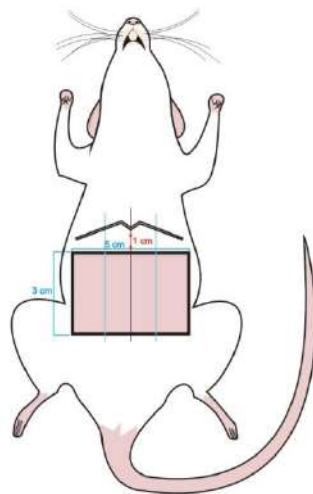


Figura 3. Demarcação do retalho musculofasciocutâneo abdominal transverso do músculo reto do abdome.

A incisão na pele foi realizada com bisturi lâmina 15, em toda a sua extensão, seguindo a demarcação prévia (Figura 4).

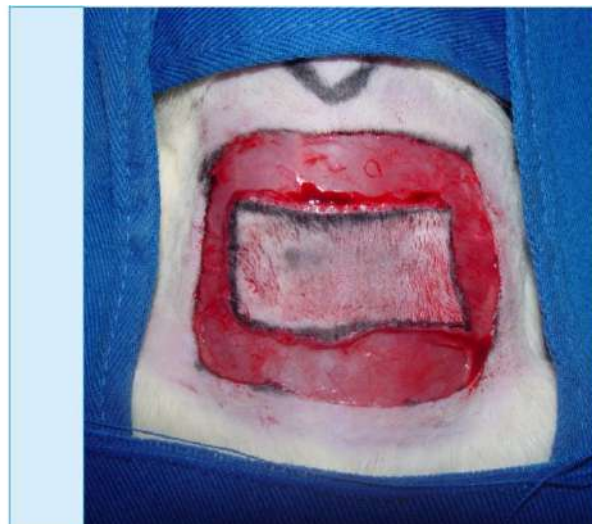
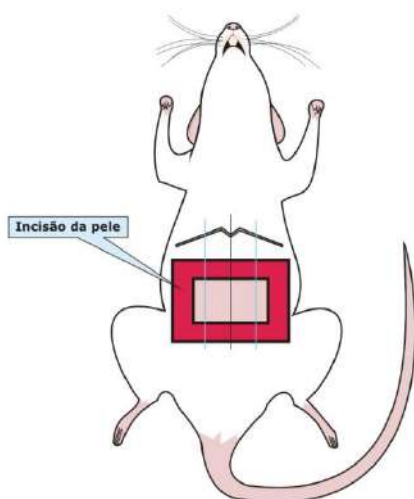


Figura 4. Incisão do retalho em toda a área pré-marcada.

A dissecação com tesoura foi feita no plano suprafascial. O segmento contralateral foi descolado até a linha média (Figura 5).

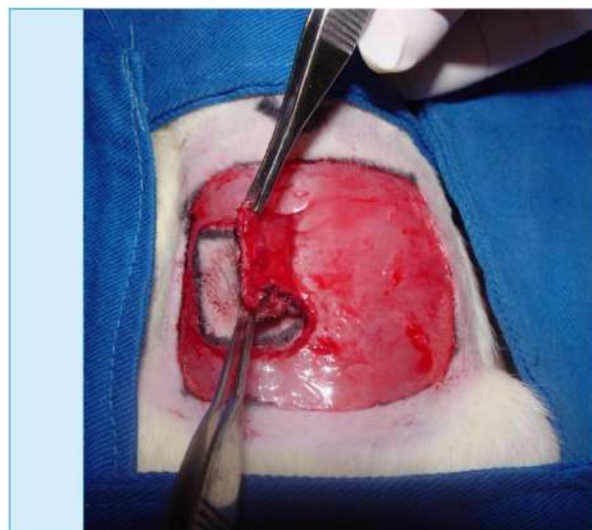
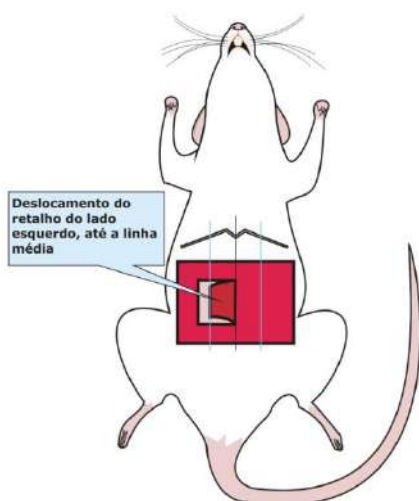


Figura 5. Dissecação do segmento contralateral do retalho até a linha média.

O segmento ipsilateral foi dissecado da margem direita do retalho até a margem direita do músculo reto do abdome direito (Figura 6).

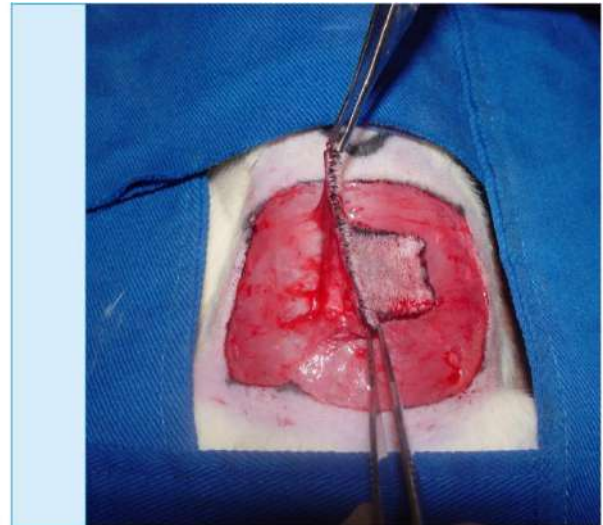
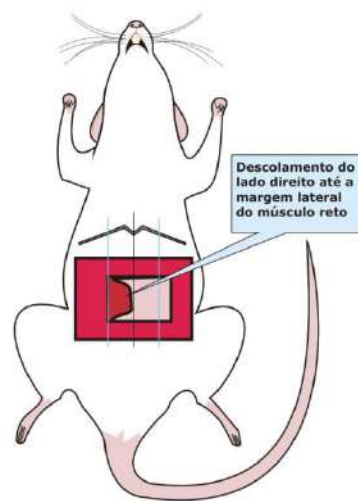


Figura 6. Dissecção da porção ipsilateral do retalho até a margem do músculo reto do abdome direito.

O retalho foi liberado com a incisão da linha média e separação dos músculos retos (Figura 7), incisão da porção cranial do músculo reto do abdome direito na mesma linha da incisão cutânea e incisão junto à margem direita do músculo reto do abdome direito (Figura 8).

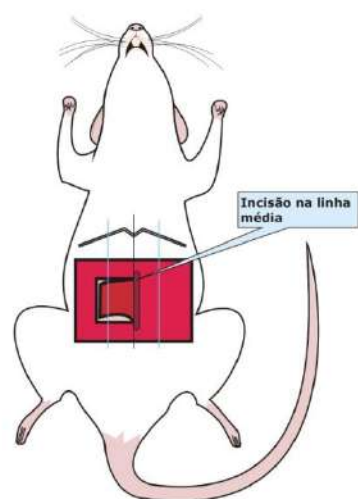


Figura 7. Incisão na linha média do abdome, com separação dos músculos retos do abdome.

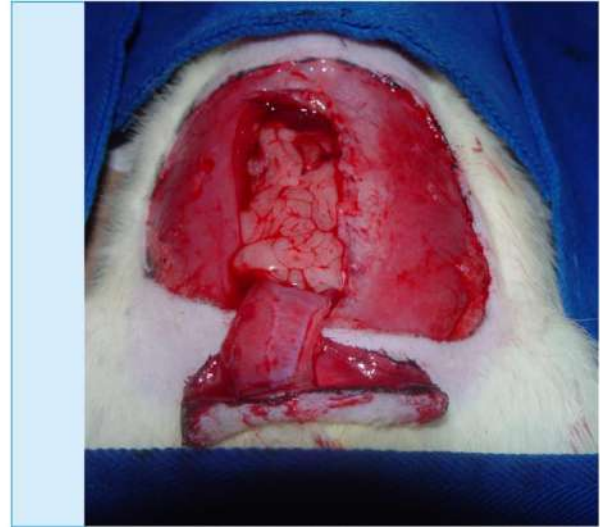
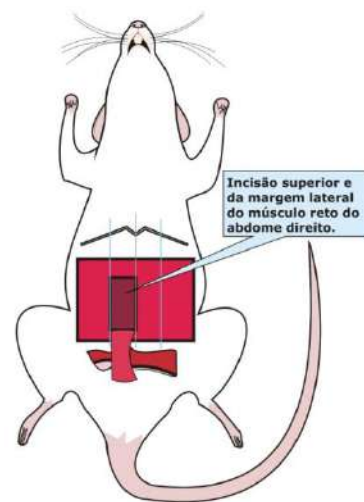


Figura 8. Liberação do retalho, com incisão do músculo reto do abdome direito cranialmente.

Dessa forma, o retalho foi rebatido caudalmente e permaneceu vascularizado apenas pelo pedículo caudal do músculo reto do abdome direito (Figura 9).

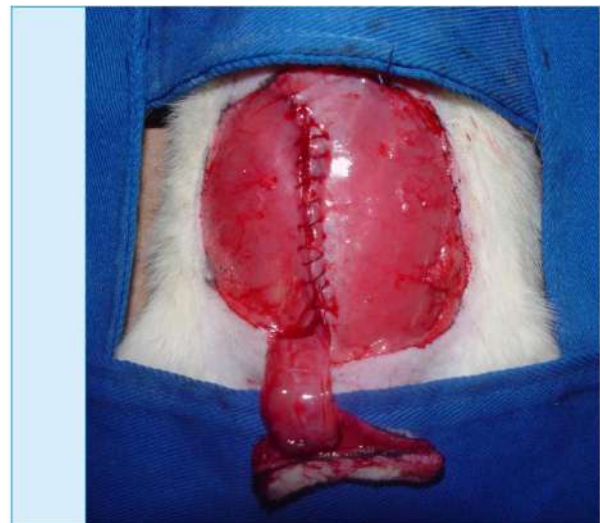
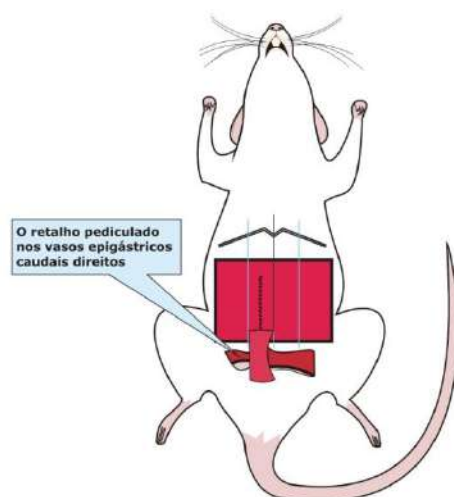


Figura 9. Retalho TRAM monopediculado nos vasos epigástricos caudais direitos.

Foi colocada uma lâmina de silicone de cinco centímetros de largura, três centímetros de comprimento e três milímetros de espessura, entre o retalho e a área doadora (HALLOCK & RICE, 1995a; HALLOCK & RICE, 1998) (Figura 10).

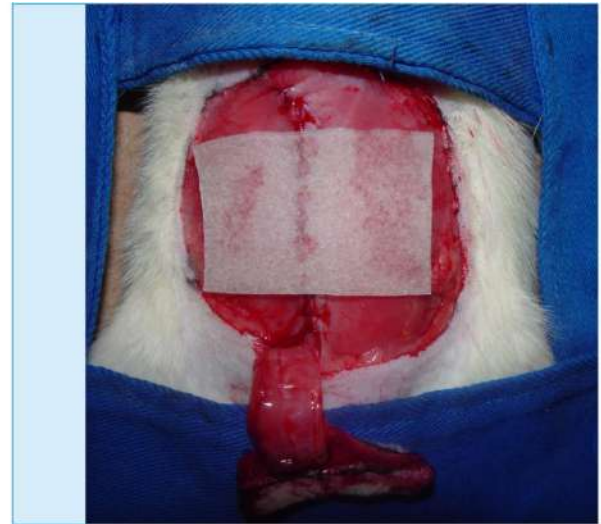
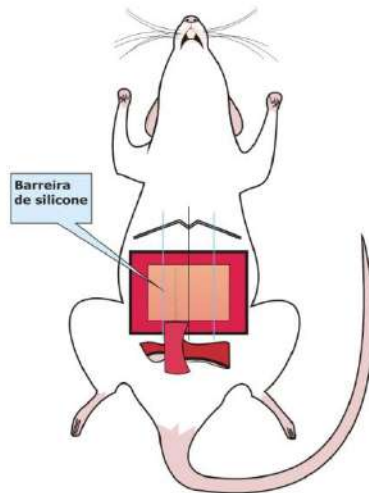


Figura 10. Colocação de barreira de silicone sob o retalho TRAM.

A síntese da parede abdominal foi realizada com sutura contínua de náilon monofilamentar 5-0. O retalho foi distribuído e fixado com pontos simples do mesmo fio nos quatro ângulos e no ponto médio cranial (Figura 11).

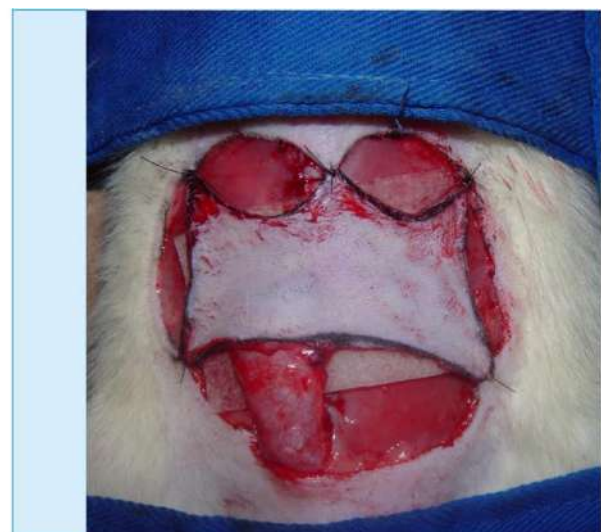
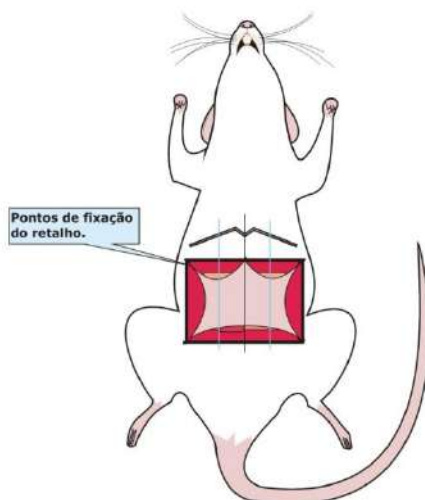


Figura 11. Distribuição e fixação do retalho TRAM.

A pele foi suturada de forma contínua, também com náilon monofilamentar 5-0 (Figura 12).

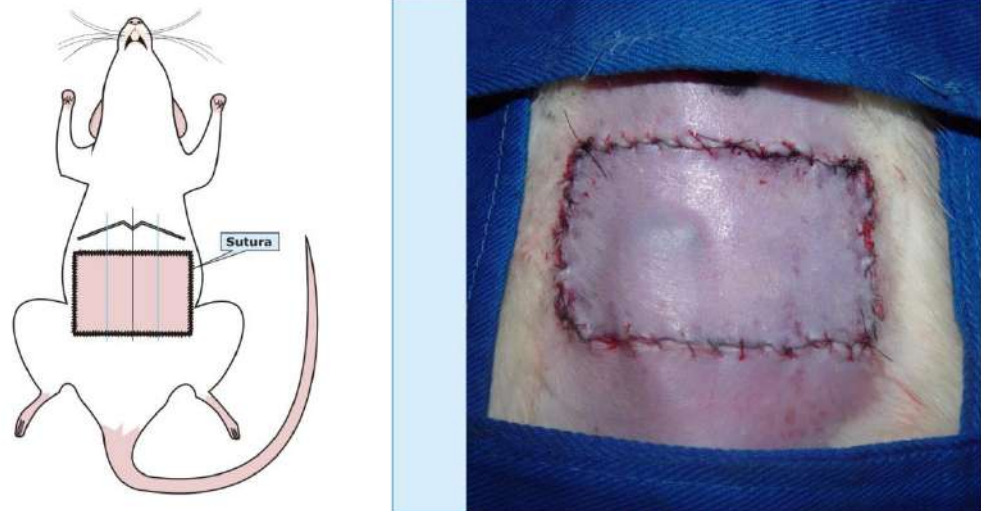


Figura 12. Síntese do retalho TRAM com sutura contínua.

Foi realizada a documentação fotográfica dos animais (*Sony Alfa 55; Sony, Japan*) com a lente da máquina posicionada a 40 cm e etiqueta padronizada com o número do animal, medindo 2 cm (Apêndices). Foi colocado um colar cervical de material plástico para evitar a autofagia do ferimento (ELY *et al.*, 1997). O colar foi fixado com quatro pontos de náilon 0, nas posições cranial, caudal, lateral direita e lateral esquerda. Os animais foram recolocados em gaiolas individuais, com ração e água à vontade.

4.3.6 Transplante da célula-tronco

Após a sutura do retalho TRAM foi administrada a solução salina no grupo I, meio de cultura Alfa MEM no grupo II e a solução do meio de cultura Alfa MEM com as células-tronco no grupo III. Nesse último foi administrado 0,1ml da solução de Alfa MEM, contendo quinhentas mil células, via intradérmica, em cada ponto de aplicação, em dose única, totalizando dois milhões de células por animal. Uma agulha 26 gauge foi utilizada para o transplante de células em quatro pontos que correspondem às áreas centrais de cada zona do retalho TRAM. A zona chamada I compreende o segmento de pele entre a linha média e a margem lateral do músculo reto do abdome direito (pedículo). A zona II compreende o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome esquerdo e a linha média. A zona III compreende o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome direito e a margem lateral direita do retalho, e a zona IV o segmento entre a margem lateral do músculo reto do abdome esquerdo e a margem esquerda do retalho (Figura 13).

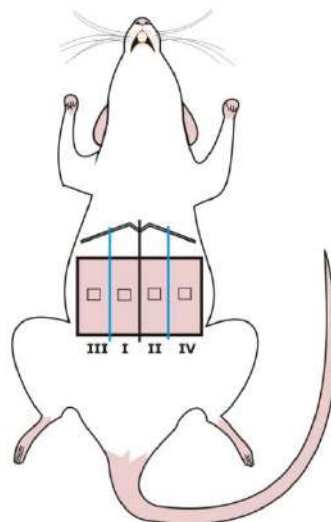


Figura 13. Pontos do transplante de células-tronco no abdome, durante o procedimento do retalho TRAM.

4.3.7 Avaliação da área de necrose

Em todos os grupos, após um período de sete dias do procedimento do retalho TRAM (LU *et al.*, 2008), os animais foram submetidos a anestesia, para avaliação da área de necrose do retalho.

Os registros fotográficos dos retalhos foram realizados com os parâmetros idênticos àqueles do pós-operatório imediato e transferidos para um computador. Foram utilizados os recursos do programa *IMAGE TOOL* da University of Texas Health Science Center in San Antonio para obter a área total do retalho e a área de necrose do retalho, em centímetros quadrados (cm²). Foi calculada então a porcentagem de necrose dos retalhos (ELY, GOLDENBERG, D'ACAMPORA, 1999). Após o registro fotográfico, os animais foram submetidos ao óbito induzido com superdosagem de anestésico.

4.3.8 Avaliação microscópica com imuno-histoquímica e fluorescência

Um fragmento de seis milímetros por seis milímetros foi retirado do centro de cada zona do retalho TRAM (LINEAWEAVER *et al.*, 2004) (Figura 14). Todos os tecidos foram avaliados, pela microscopia óptica, com imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo HHF 35 (antiactina muscular específica, clone HHF 35 - *human heart factor* (Dako

Corporation, California, USA), para avaliação da neovascularização. Para a microscopia de fluorescência, foi avaliada a presença do corante Dil nas células-tronco mesenquimais

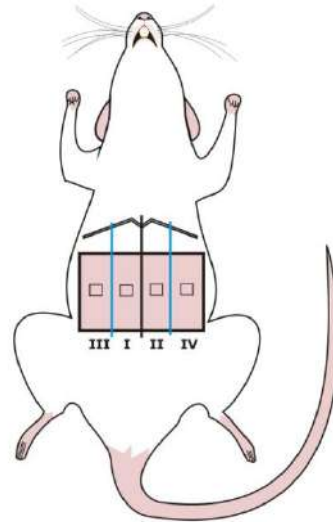


Figura 14. Zonas do retalho TRAM e as áreas de biópsias.

4.3.9 Preparação das amostras para imuno-histoquímica e microscopia de fluorescência

Após a retirada das amostras do retalho, estas foram colocadas em formol tamponado a 10% até o momento do preparo das lâminas. O tecido clivado foi processado histologicamente, utilizando-se banhos em gradiente de etanol e xilol e incluído em parafina. Os blocos resultantes foram microtomizados em cortes de 5 μm e estes foram montados em lâminas histológicas previamente silanizadas (*3-Aminopropyl-triethoxy-silane*, Sigma A-3648, EUA).

Após desparafinização e reidratação dos cortes, estes foram submetidos à reação imuno-histoquímica. Para a recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em solução de ácido cítrico dez milimolar (mM), potencial hidrogeniônico (pH) 6, em fervura na panela de pressão (Eterna, Nigro), por quatro minutos a partir da pressurização total. Logo após, a panela foi resfriada sob água corrente e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 6%, com três trocas de dez minutos cada, e posteriormente as lâminas foram lavadas novamente em água corrente e destilada.

Após a fase de bloqueio da peroxidase, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) dez mM, pH 7,4, por cinco minutos. Logo após, foram incubadas com o anticorpo antiactina muscular específica (HHF 35), diluído 1/200 em tampão PBS contendo soroalbumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, durante 120 minutos, a 37°C.

QUADRO 1 Anticorpo utilizado na imuno-histoquímica

Anticorpo	Clone	Diluições	Fabricantes/códigos
Actina (antimúsculo) clone HHF 35	Anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti actina alfa e gama	1:200	Dako Corporation/M0635, California, EUA

As lâminas foram lavadas em solução tampão PBS com três trocas de três minutos cada, e a revelação da reação foi feita utilizando-se o

método da estreptavidina-biotina-peroxidase (*kit LSAB+*, Dako K0690, USA).

As lâminas foram reveladas em solução substrato cromógeno: 3,3' *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) 100 mg% (Sigma, D-5637, USA); 1 ml dimetilsulfóxido (DMSO); 1 ml H₂O₂ 6%; 100 ml PBS por cinco minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

As lâminas controle foram observadas ao microscópio para o desenvolvimento de precipitado castanho alaranjado, com o produto final da reação. Depois, foram lavadas em água corrente e destiladas, contracoradas com hematoxilina de Harris por seis minutos e lavadas novamente em água corrente e destilada.

Logo após, foram imersas duas vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%), sendo lavadas em seguida em água corrente e destilada. Para a desidratação das lâminas, foram imersas em etanol 50% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 80% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 30 segundos cada e xilol quatro vezes por 30 segundos cada.

Após esse procedimento, as lâminas foram montadas com Entellan Neu (Merck, 1.07961, Germany).

Os tecidos também foram processados para a análise de congelação. Foram fixados em paraformaldeído 4% (HO(CH₂O)_nCH₂OH) e posteriormente incubados em solução de sacarose 30% (C₁₂H₂₂O₁₁) para crioproteção. Após cerca de três dias, as amostras foram incluídas em Tissue-Tek® (Sakura Finetek, EUA), montados em um criomolde, e congelados a - 80°C, até processamento. Os tecidos preparados dessa forma foram cortados com 5 µm de espessura com o auxílio de um criostato

(Leica CM1850®, Wetzlar, Germany). Os cortes foram montados em lâminas revestidas com gelatina para análise em microscopia de fluorescência.

4.3.10 Quantificação da densidade microvascular

A visualização dos cortes histológicos foi realizada utilizando-se microscópio óptico trinocular, marca Olympus, acoplado a máquina fotográfica digital marca Sony, para captação das imagens. Inicialmente, foi realizado um exame sob lente panorâmica a um aumento de 100x para identificação das áreas de maior densidade microvascular (*hot spot*). Uma vez identificada essa área, foi realizada a captação da imagem com uma lente ocular de 10x e objetiva de 40x, totalizando um aumento de 400x. A imagem captada foi transferida para o programa *IMAGE TOOL* da University of Texas Health Science Center em San Antonio e submetida à análise morfométrica para contagem dos vasos. Para a leitura morfométrica, foram observadas cinco imagens que correspondiam a cinco campos em cada lâmina. O estudo quantitativo foi realizado por dois pesquisadores que não tinham conhecimento do grupo ao qual as lâminas pertenciam.

4.3.11 Localização e distribuição das células-tronco no retalho TRAM

Foram realizadas fotografias fluorescentes usando o microscópio de fluorescência acoplado a máquina fotográfica. As fotografias foram usadas para revelar se as células endoteliais dos capilares eram originadas das células-tronco Dil-positivas, transplantadas. Foi realizado um exame sob lente panorâmica a um aumento de 100x para identificação da área de fluorescência. Uma vez identificada essa área, foi realizada a captação da imagem com uma lente ocular de 10x e objetiva de 10x, totalizando um aumento de 100x e imagens com aumento de 400x.

4.3.12 Análise estatística

A análise estatística de todas as informações coletadas neste trabalho foi inicialmente feita de forma descritiva. Para a área de necrose, porcentagem de necrose e contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas, foram calculadas algumas medidas-resumo, como média, mediana, valores mínimo e máximo, desvio-padrão, gráficos boxplot e dispersão bidimensional.

As análises inferenciais empregadas com o intuito de confirmar ou refutar evidências encontradas na análise descritiva foram:

- Análise de Variância (ANOVA) com um fator fixo (NETER *et al.*, 1996) ou Kruskal-Wallis (SIEGEL, 2006) na comparação da área e porcentagem de necrose, número de vasos nas quatro zonas e no total entre os grupos (Célula-Tronco, Alfa MEM, TRAM). Utilizou-se as comparações múltiplas de Tukey como complemento da ANOVA com um fator fixo quando necessário.

- Teste de Shapiro-Wilk para verificar se a contagem média de vasos e células tronco nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas apresenta distribuição normal.
- Teste de Levene para verificar se a contagem média de vasos e células tronco nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas apresentou a mesma variância entre os grupos (homocedasticidade).
- Estimação do coeficiente de correlação intraclasse (FLEISS, 1981) e construção do gráfico de Bland-Altman com o objetivo de estudar e quantificar a concordância entre dois avaliadores quanto à contagem média de vasos (concordância interobservador).
- Coeficiente de correlação de Spearman (SIEGEL, 2006) na quantificação da correlação entre porcentagem de necrose e o número de vasos no total.

Em todas as conclusões obtidas através das análises inferenciais foi utilizado o nível de significância alfa igual a 5%.

Os dados foram digitados em planilhas do Excel 2010 for Windows para o adequado armazenamento das informações. As análises estatísticas foram realizadas com o programa estatístico R versão 3.0.2. (disponível gratuitamente em www.r-project.org).

5. RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE DOS RETALHOS

Para o estudo da viabilidade dos retalhos calculou-se a porcentagem de necrose do retalho a partir da mensuração da área total do retalho e da área de necrose do retalho (Tabela 1).

TABELA 1 Porcentagem total de necrose do retalho TRAM

	Grupo I TRAM	Grupo II Alfa MEM	Grupo III Célula-Tronco
	46,71	35,57	7,16
	42,31	36,70	10,98
	34,50	100	66,74
	50,79	67,86	27,83
	66,54	73,79	20,77
	100	70,26	10,24
	27,30	18,80	13,62
	35,19	25,60	29,57
Média	50,42	53,57	23,36

Com o intuito de verificar se os grupos apresentam valores médios estatisticamente iguais de porcentagem total de necrose, foi utilizado o teste ANOVA. As suposições de normalidade da porcentagem de necrose e igualdade de variâncias entre os grupos exigidas para o adequado uso da ANOVA foram satisfeitas (Apêndices).

O gráfico *Boxplot* descreve o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 15).

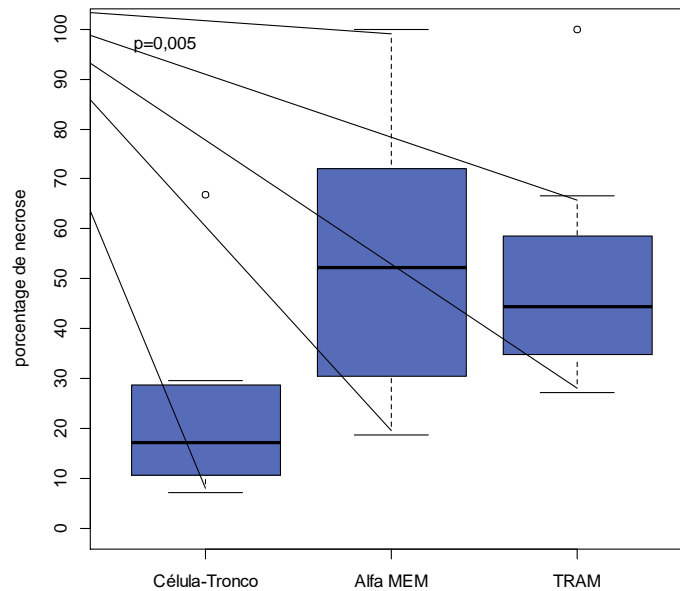


Figura 15. *Boxplot* da porcentagem total de necrose dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.

Os resultados inferenciais revelaram que os grupos apresentam diferenças significantes entre os valores médios de porcentagem total de necrose ($p = 0,005$). A Tabela 2 apresenta os resultados das comparações entre os grupos.

TABELA 2 Comparações da porcentagem total de necrose do retalho TRAM entre os grupos

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
Célula-Tronco	TRAM	Célula-Tronco < TRAM	0,012
Célula-Tronco	Alfa MEM	Célula-Tronco < Alfa MEM	0,012
TRAM	Alfa MEM	TRAM = Alfa MEM	0,999

Teste ANOVA

De acordo com os resultados demonstrados, foram encontradas diferenças significantes entre o grupo III (Célula-Tronco) e os grupos I (TRAM) e II (Alfa MEM), que apresentaram maior porcentagem de necrose. Não houve diferença significativa entre os grupos TRAM e Alfa MEM.

5.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E CONTAGEM DOS VASOS SANGUÍNEOS

A análise imuno-histoquímica e contagem do número de vasos foi realizada nos 24 ratos, e nestes foram feitas leituras para quatro zonas (I, II, III e IV) do retalho TRAM. A leitura de cada zona foi a média aritmética de cinco campos distintos. Dessa forma, cada avaliador fez 480 leituras (20 medidas em 24 ratos).

O estudo da concordância da contagem do número de vasos por dois avaliadores distintos foi realizado com a construção de diagramas de dispersão bidimensional e gráficos de BLAND & ALTMAN (1999).

Conforme sugerem os diagramas de dispersão bidimensional entre os avaliadores (Apêndices), estes tendem a concordar entre si, pois os pontos nessas figuras estão próximos à reta de 45° (reta tracejada da cor preta), indicando boa concordância. É importante destacar que ambos os avaliadores na zona IV, nos grupos Alfa MEM e TRAM, concordaram integralmente, pois relataram não identificar nenhum vaso.

Ainda em caráter descritivo, os gráficos de BLAND & ALTMAN (1999) foram construídos para as várias situações de concordância investigadas (Apêndices).

No diagrama de dispersão bidimensional, o eixo Y representa a diferença entre as leituras dos avaliadores e o eixo X a média dessas leituras. Os limites com 95% de confiança de concordância entre os avaliadores devem ser inseridos no gráfico, de modo que se 95% dos pontos estiverem nesse limite e a distribuição destes pontos for aleatória (sem nenhuma evidente tendência), há indícios de boa concordância entre os avaliadores. Com base na distribuição dos valores dos dois avaliadores, foi confirmada a boa concordância entre eles.

Com o intuito de corroborar com os achados descritos, estimou-se o coeficiente de correlação intraclasse (CCI) entre os avaliadores (Tabela 3).

Conforme estimativas desse coeficiente, em que todos foram próximos a 1 (um), houve uma boa e significativa concordância entre os avaliadores quanto à contagem do número de vasos (Tabela 3).

TABELA 3 Estimativas pontuais e intervalares do coeficiente de correlação intraclasse entre os avaliadores quanto ao número de vasos, segundo as zonas do retalho e grupo

		Célula-Tronco	Alfa MEM	TRAM
zona I	coeficiente de correlação intraclasse (CCI)	0,944	0,987	0,980
	intervalo com 95% de confiança para CCI	0,768 ; 0,999	0,942 ; 0,997	0,912 ; 0,996
	P	<0,001	<0,001	<0,001
zona II	coeficiente de correlação intraclasse (CCI)	0,984	0,999	0,999
	intervalo com 95% de confiança para CCI	0,931 ; 0,997	0,996 ; 1,000	0,995 ; 1,000
	P	<0,001	<0,001	<0,001
zona III	coeficiente de correlação intraclasse (CCI)	0,896	0,715	0,995
	intervalo com 95% de confiança para CCI	0,603 ; 0,978	0,140 ; 0,934	0,980 ; 0,999
	P	<0,001	0,011	<0,001
zona IV	coeficiente de correlação intraclasse (CCI)	0,967	*	*
	intervalo com 95% de confiança para CCI	0,860 ; 0,993		
	P	<0,001		

*Não foi possível a estimação do CCI, pois ambos os avaliadores não identificaram nenhum vaso sanguíneo.

Dados os resultados obtidos anteriormente, que mostraram uma alta concordância entre as leituras dos avaliadores 1 e 2, utilizaram-se, nos resultados a seguir, as medidas obtidas pelo avaliador 1.

Algumas medidas-resumo do número de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas podem ser observadas na Tabela 4.

TABELA 4 Valores de média e desvio-padrão (dp) da contagem média de vasos nas zonas I, II, III, IV e na soma das zonas

	Célula-Tronco (n=8)	Alfa MEM (n=8)	TRAM (n=8)	Total (n=24)	P	poder amostral
número de vasos na zona I **						
Média	5,68	4,80	4,83	5,10	0,435	0,863
Mediana	6,00	5,50	5,60	5,70		
mínimo-máximo	3,20-7,00	0,00-6,40	0,00-7,00	0,00-7,00		
desvio-padrão	1,16	2,06	2,15	1,81		
número de vasos na zona II **						
Média	4,98	2,85	2,73	3,52	0,230	0,989
Mediana	5,00	2,20	2,30	4,40		
mínimo-máximo	1,60-7,60	0,00-6,80	0,00-6,80	0,00-7,60		
desvio-padrão	1,70	3,12	2,83	2,72		
número de vasos na zona III **						
Média	5,18	3,38	4,80	4,45	0,154	0,989
Mediana	5,40	4,00	5,70	5,10		
mínimo-máximo	3,40-6,40	0,00-6,20	0,00-6,80	0,00-6,80		
desvio-padrão	1,11	2,29	2,27	2,04		
número de vasos na zona IV **						
Média	0,88	0,00	0,00	0,29	0,003	>0,999
Mediana	0,90	0,00	0,00	0,00		
mínimo-máximo	0,00-2,00	0,00-0,00	0,00-0,00	0,00-2,00		
desvio-padrão	0,83	0,00	0,00	0,62		
número de vasos no total *						
Média	4,18	2,76	3,09	3,34	0,095	0,999
Mediana	4,35	2,85	3,28	3,53		
mínimo-máximo	2,85-5,35	0,00-4,50	0,00-4,35	0,00-5,35		
desvio-padrão	0,93	1,50	1,35	1,37		

Teste de Kruskal-Wallis

* Contagem média

**Contagem média da soma das zonas I, II, III e IV

Para verificar a existência ou não de diferenças significantes entre o número de vasos sanguíneos encontrados nos quatro grupos, foi aplicado o

teste de Kruskal-Wallis na comparação de variáveis quantitativas de grupos independentes. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. O gráfico Boxplot mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 16).

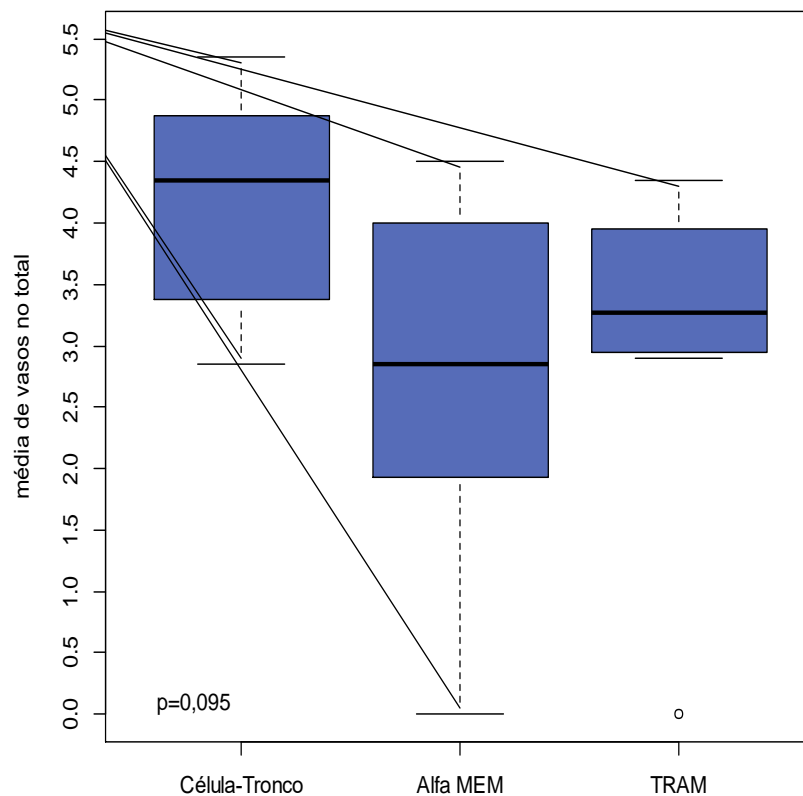


Figura 16. Boxplot do número de vasos sanguíneos no total dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.

Os resultados revelaram que os grupos não apresentam diferenças significantes entre o número de vasos sanguíneos encontrados no retalho TRAM ($p=0,095$).

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças significantes entre os grupos referentes aos vasos sanguíneos nas zonas I a IV do retalho, foram aplicados testes estatísticos.

Para as zonas I do retalho TRAM, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis na comparação de variáveis quantitativas de grupos independentes. O gráfico Boxplot mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 17). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

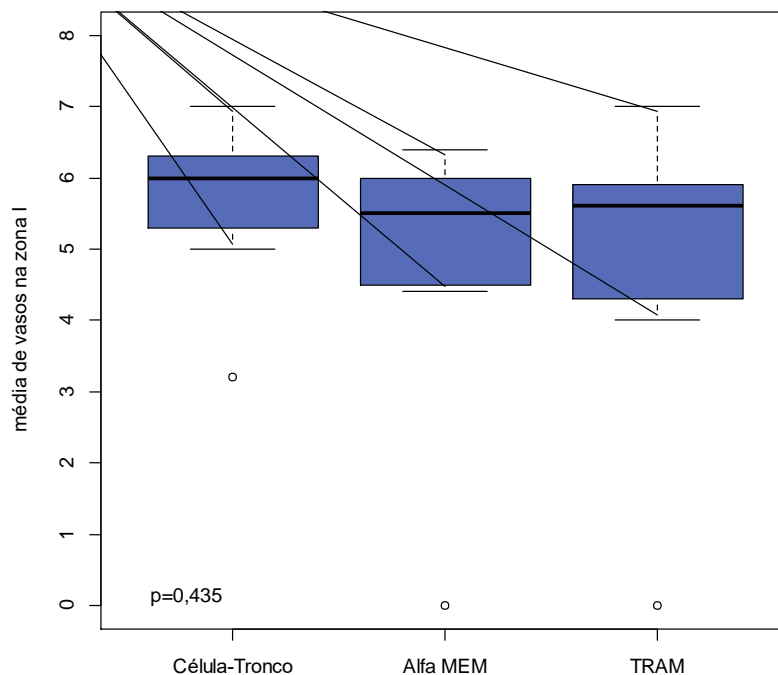


Figura 17. *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona I do retalho TRAM nos grupos.

Os resultados revelaram que os grupos não apresentam diferenças entre as médias de vasos encontrados na zona I do retalho TRAM ($p=0,435$).

Com o objetivo de verificar a existência ou não de diferenças significantes entre os dos grupos referentes aos vasos sanguíneos nas zonas II do TRAM, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis na comparação de variáveis quantitativas de grupos independentes. O gráfico Boxplot mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 18). O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

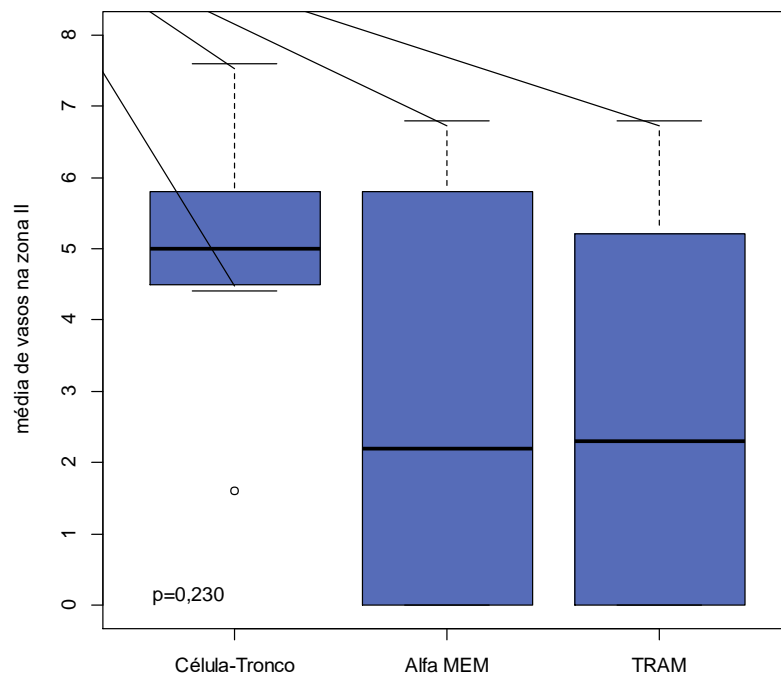


Figura 18. *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona II do retalho TRAM nos grupos.

Os resultados encontrados não mostraram diferença significativa no número de vasos encontrados na zona II do retalho TRAM entre os grupos ($p=0,230$).

Para determinar a existência ou não de diferenças significantes entre as médias dos grupos referentes aos vasos sanguíneos nas **zonas III** do retalho TRAM, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis na comparação de variáveis quantitativas de grupos independentes. O gráfico *Boxplot* mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos (Figura 19). O nível de significância estabelecido para a hipótese de nulidade foi de 5% ou 0,05.

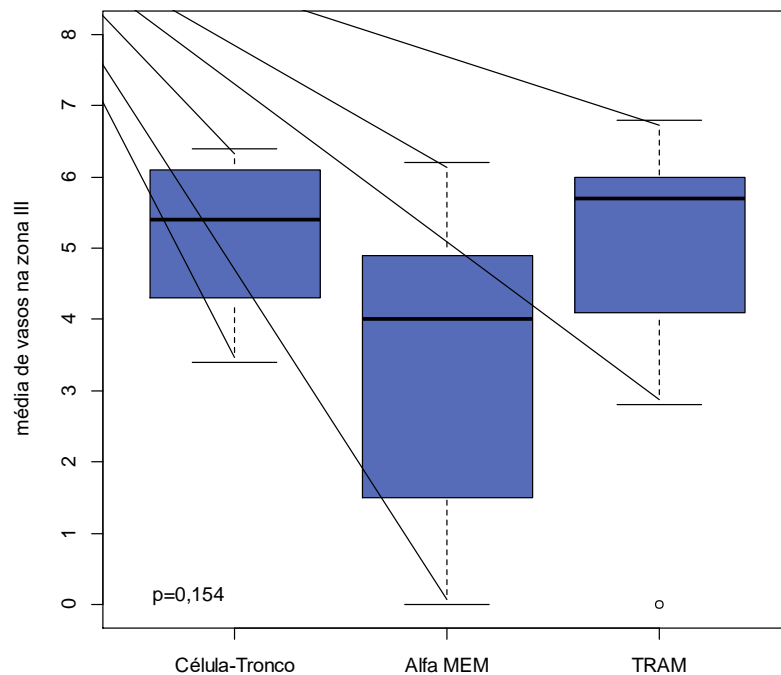


Figura 19. *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona III do retalho TRAM nos grupos.

Os resultados encontrados não mostraram diferença significativa no número de vasos encontrados na zona III do retalho TRAM entre os grupos ($p=0,154$).

Para as **zonas IV** do retalho TRAM, todos os grupos foram comparados para verificar a existência ou não de diferenças significantes entre o número de vasos sanguíneos. O gráfico *Boxplot* mostra o comportamento dessas informações em cada um dos grupos avaliados (Figura 20).

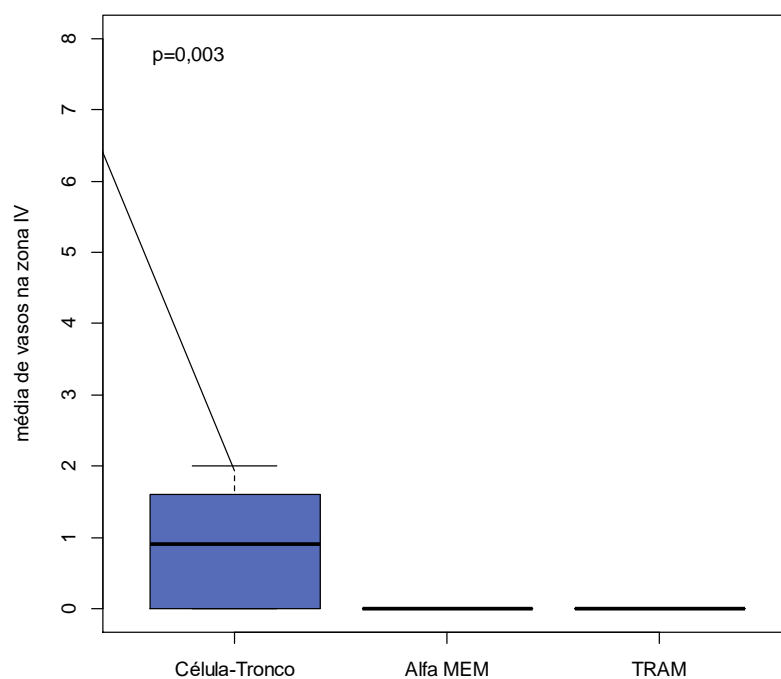


Figura 20. *Boxplot* da contagem média de vasos sanguíneos na zona IV do retalho TRAM nos grupos.

Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância estabelecido em 0,05. Os grupos TRAM e Alfa MEM não apresentaram nenhum vaso na zona IV do retalho TRAM, dispensando dessa forma qualquer comparação estatística entre eles. A média de vasos na zona IV do

grupo Célula-Tronco foi estatisticamente maior, quando comparado aos demais grupos ($p=0,003$).

As comparações pareadas entre os grupos, para as quatro zonas, mostraram diferença significativa no número de vasos apenas na zona IV do retalho TRAM (Apêndices).

5.3 CORRELAÇÃO ENTRE NECROSE E NÚMERO DE VASOS SANGUÍNEOS

Investigou-se a relação entre a porcentagem de necrose e o número de vasos sanguíneos no total (Figura 21).

Conforme sugere o diagrama de dispersão bidimensional, há evidência de substancial correlação decrescente entre porcentagem de necrose e o número de vasos no total, ou seja, quanto maior a porcentagem de necrose, menor o número de vasos no total.

Essa suspeita foi confirmada pela estimativa do coeficiente de correlação de Spearman (s) que foi de $-0,768$ ($p<0,001$).

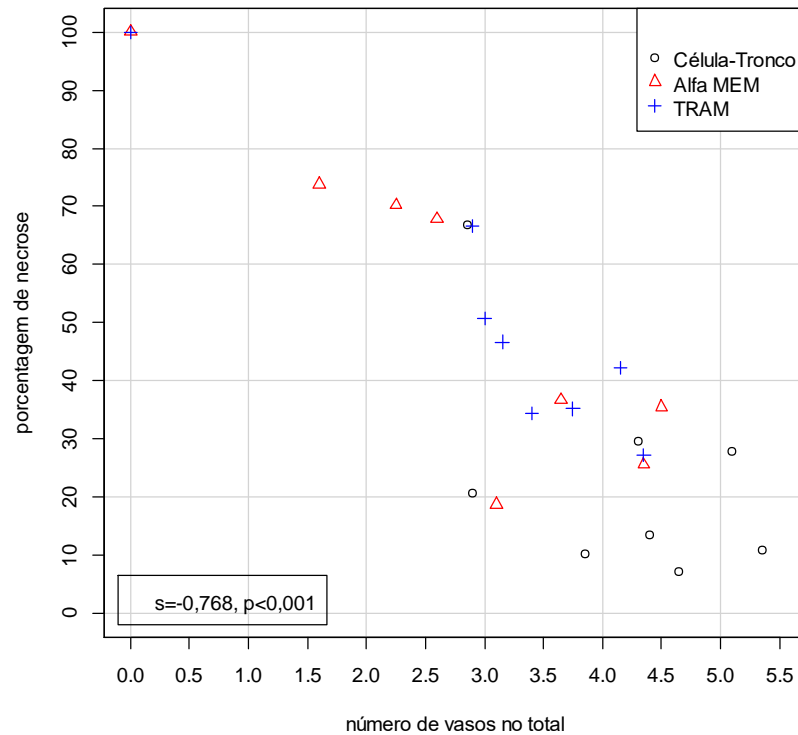


Figura 21: Diagrama de dispersão bidimensional entre porcentagem de necrose e número de vasos no total dos grupos Célula-Tronco, Alfa MEM e TRAM.

5.4 LOCALIZAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO NO RETALHO TRAM

A análise da localização e distribuição das células-tronco no retalho TRAM para as quatro zonas (I, II, III e IV) mostrou a presença de múltiplas células Dil positivas em todas as lâminas, em todas as zonas do retalho, dos animais do grupo Célula Tronco. Os grupos Alfa MEM e TRAM não apresentaram células com marcação fluorescente (Dil negativo), dispensando, dessa forma, qualquer comparação estatística entre os grupos (Apêndices – Tabela 16).

As células-tronco ou Dil positivas encontravam-se próximas e ao redor de vasos sanguíneos em 10 lâminas de 32 do grupo célula-tronco, em maioria (8 lâminas) na zona III e IV (Figura 22).

Não se observou a presença de células Dil positivas na parede de vasos sanguíneos.

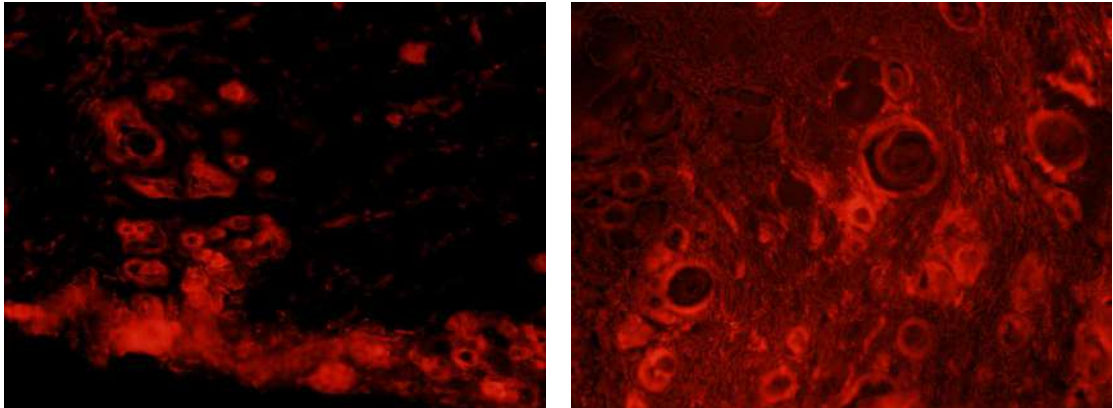


Figura 22. Células Dil + na microscopia de fluorescência. **A:** Aumento de 100X mostrando células-tronco Dil positivas na zona IV do retalho TRAM localizando-se ao redor dos vasos sanguíneos. **B:** aumento de 100 X em zona III do retalho.

6. DISCUSSÃO

O retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome (TRAM) é considerado uma opção para a reconstrução mamária com tecido autólogo (HARTRAMPF, SCHEFLAN, BLACK, 1982; HARTRAMPF & BENNET, 1987; KROLL *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2004; BOZOLA, 2005). O uso de tecido autólogo e a melhora do contorno abdominal são as principais vantagens do uso dessa técnica. O uso do TRAM, contudo, apresenta riscos de complicações relacionadas às alterações da vascularização do retalho (HARTRAMPF, 1988; KROLL *et al.*, 1998).

Vários estudos e modificações técnicas buscaram aumentar a vascularização desse retalho, para minimizar suas complicações (ISHII *et al.*, 1985; SEMPLE, 1994; CODNER & BOSTWICK, 1998). O aumento da vascularização e o conseqüente aumento da viabilidade do retalho TRAM têm importância maior em pacientes com fatores de risco para a isquemia, como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes melitus, obesidade, doenças vasculares, doenças do colágeno, radioterapia prévia, tabagismo e cirurgias abdominais prévias (HARTRAMPF, 1988; SEMPLE, 1994; HALLOCK & RICE, 1998; YUE *et al.*, 2013).

No campo experimental, vários autores estudaram possibilidades para o aumento da vascularização do retalho TRAM. (HALLOCK & RICE, 1995a; SEIFY, BILKAY E JONES, 2003; CLUGSTON *et al.*, 1995; KARACAOGLU *et al.*, 2002).

Durante a última década, as células-tronco surgiram na vanguarda da inovação tecnológica com um enorme potencial na medicina regenerativa e

cirurgia plástica (TEPPER *et al.*, 2003; BEHR *et al.*, 2010; SWATZ *et al.*, 2014; ZIMMERMANN *et al.*, 2015). As terapias baseadas em células-tronco continuam a evoluir e desempenhar um papel cada vez mais importante na necessidade crescente de reparação e substituição de tecidos. A perspectiva da utilização das células-tronco mesenquimais para aumentar a vascularização do retalho TRAM estimulou a elaboração do presente estudo. As células-tronco podem, resumidamente, ser divididas em dois grupos principais, com base no seu potencial para se diferenciarem. Células-tronco pluripotentes (embrionárias) com potencial para diferenciarem-se em todas as células do corpo e células-tronco multipotentes (adultas) que podem diferenciarem-se em várias, mas não todas, as linhagens celulares.

Em cirurgia plástica tradicionalmente utiliza-se tecido autólogo (pele, nervos, cartilagem, mucosa, osso, músculo e gordura), alogênico (pele de cadáver e osso) e materiais sintéticos e biomateriais para restaurar ou substituir tecidos. Essas abordagens, no entanto, podem ser limitadas principalmente pela morbidade da área doadora, oferta limitada de tecidos e materiais e reações imunológicas. As células-tronco podem constituir uma fonte ilimitada de tecido autólogo, fonte não imunogênica de tecidos não autólogos e aumentar a potencialidade de outros tecidos autólogos (BEHR *et al.*, 2010).

No presente estudo, optou-se pela utilização das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) para aumentar a viabilidade do retalho TRAM. Estudos como o de ZHENG *et al.* (2008) mostraram o potencial de neovascularização das células-tronco derivadas da medula óssea, porém o efeito pró-angiogênico das células-tronco derivadas do tecido adiposo apresentam um mecanismo diferente das

células derivadas da medula, com neoangiogênese, vasculogênese e liberação de fatores de crescimento e citocinas, principalmente o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator hipóxia-induzido 1 alfa (*hypoxia-inducible factor 1 α*), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator derivado de células estromais- 1 α (SDF-1 α) e a citoquina receptor tipo 4 (CXCR4) (ZHANG & TANG, 2014). Esse fato, combinado com as técnicas minimamente invasivas na extração, facilidade no isolamento e cultura de células-tronco derivadas do tecido adiposo, colocou esse tipo celular como preferencial para este estudo (SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; BEHR *et al.*, 2010).

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo apresentam marcadores de superfície que foram utilizados para identificá-las, neste estudo, como descrito por SCHÄFFLER & BÜCHLER (2007) e DOMINICI *et al.* (2006). As células apresentaram positividade para CD90, CD105, CD73 e negatividade para CD45, CD34. O CD90 é um marcador presente em células-tronco, o CD105 é uma glicoproteína de membrana presente nas células-tronco e o CD73 está presente em células-tronco mesenquimais. Para os marcadores negativos, o CD45 está presente na superfície de leucócitos e o CD34 está presente predominantemente nas células-tronco de linhagem hematopoiéticas. As células cultivadas também mostraram proliferação como células aderentes na cultura e apresentaram diferenciação em três tecidos (adiposo, ósseo e cartilaginoso). A soma dessas características possibilitou concluir que as células utilizadas no presente estudo tratava-se de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.

No presente estudo, utilizou-se a injeção direta de células-tronco nos tecidos após a terceira passagem ou terceira subcultura. Método semelhante foi utilizado em outros estudos (LU *et al.*, 2008; HASDEMIR *et al.* 2015; IZMIRLI *et al.*, 2016). A cultura em terceira passagem assegura que as células-tronco apresentem estabilidade genética, sem alterações cromossômicas presentes em culturas com várias passagens.

As células foram administradas com injeção intradérmica em quatro pontos do retalho (FREITAS *et al.*, 2010). ZHANG & TANG (2014) descreveram cinco formas de transplante das células tronco: injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa, com esponja de colágeno e associada à cola de fibrina. Comparando a eficácia das diferentes formas de transplante de células-tronco, para melhorar a viabilidade dos retalhos randômicos de pele, LEE *et al.* (2014) indicaram que o método de esponja de colágeno proporciona os melhores resultados, aumentando a vascularização. SUARTZ *et al.* (2014) utilizaram a via intravenosa e encontraram aumento da viabilidade do retalho randômico em ratos. No entanto, a administração intradérmica de ADSCs também afetou positivamente a viabilidade do retalho cutâneo, tal como demonstrado em outros estudos (LU *et al.*, 2008; HASDEMIR *et al.*, 2015). Neste estudo optou-se pela injeção intradérmica, pois o retalho não apresenta subcutâneo com tecido adiposo, apenas o panículo carnosos, fáscia e musculatura. A injeção intramuscular não foi possível, devido à colocação de barreira de silicone entre o retalho e a área doadora e a possível migração das células através do músculo bem vascularizado.

Utilizou-se a dose de dois milhões de células para cada animal. A dose foi igualmente dividida (5×10^5) para os quatro pontos centrais das zonas de vascularização do retalho TRAM, semelhante ao utilizado por

FREITAS *et al.* (2010) para o estudo da viabilidade com o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular). Na literatura encontraram-se doses variando entre duzentas mil e dez milhões de células (SCHLOSSER *et al.*, 2012; GAO *et al.*, 2011), mas não se encontrou nenhum estudo utilizando a terapia celular, intradérmica, para aumentar a viabilidade do retalho TRAM.

Optou-se pelo uso de células-tronco mesenquimais alogênicas provenientes de três animais doadores. Assim como no estudo de ZHENG *et al.* (2008) e SILVA *et al.* (2005), o uso de células alógenas foi possível devido ao estado imunoprivilegiado das células-tronco, capazes de imunomodular reações inflamatórias e até o processo de rejeição a transplantes.

As células foram transplantadas imediatamente após a sutura do retalho TRAM semelhante a outros estudos em retalhos cutâneos (IZMIRLI *et al.* 2016), embora estudos como o de YUE *et al.* (2013), que utilizando células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, descreveram um tempo de três dias prévios à realização do retalho e a isquemia, como tempo ideal para promover a neovascularização do retalho cutâneo.

O marcador fluorescente Dil foi utilizado para marcar as células-tronco e observar sua distribuição no retalho ou sua integração na parede de vasos sanguíneos. A mesma estratégia foi utilizada por LU *et al.* (2008) e GAO *et al.* (2011), que encontraram células marcadas dispostas ao redor de vasos sanguíneos e células na parede de vasos sanguíneos, sugerindo uma transdiferenciação das células-tronco em células endoteliais. KARATHANASIS *et al.* (2013), utilizando a proteína verde fluorescente (GFP) como marcador e anticorpo para o fator de Von Willebrand, puderam identificar as células na parede de vasos sanguíneos porém, não

descrevem a imunofenotipagem das células o que pode significar a presença de outros tipos celulares, além das células-tronco mesenquimais, como pré-adipocitos, células endoteliais progenitoras e leucócitos.

O presente estudo utilizou o modelo do retalho musculofasciocutâneo transverso do músculo reto do abdome (TRAM) descrito por DUNN & MANCOLL (1992). Como outros autores (DUNN, HUFF, MANCOLL, 1993; HALLOCK & RICE, 1995a; ELY, MILTERSTEINER, HOFF, 1997; ELY & FERREIRA, 2003), utilizou-se o pedículo vascular caudal direito, que no rato é o pedículo não dominante e representa melhor a realização do TRAM em humanos, nos quais se utiliza o pedículo superior, também não dominante (OZGENTAS, SHENAQ, SPIRA, 1994). Em humanos, seis a oito calibrosos vasos perfurantes são encontrados em média, originando-se de cada músculo reto do abdome e localizando-se na região periumbilical (BOYD, TAYLOR, CORLETT, 1984). No rato, os vasos perfurantes encontram-se em intervalos equidistantes, são ramos dos vasos epigástricos profundos craniais e, conseqüentemente, raramente são identificados próximo ao púbis (HALLOCK & RICE, 1995b). Apresentam-se longos e tortuosos devido à mobilidade do panículo carnosos (CLUGSTON *et al.*, 1995).

Durante a realização do TRAM optou-se por incluir uma lâmina de silicone entre o retalho e a área doadora (HALLOCK & RICE, 1995a; HALLOCK & RICE, 1998). Essa lâmina impediria a revascularização do retalho a partir da sua área doadora, como um enxerto cutâneo. Dessa forma, o retalho seria nutrido apenas pelo pedículo vascular dos vasos epigástricos caudais direitos, facilitando a interpretação dos resultados. Em estudo prévio realizado por FREITAS *et al.* (2010), também se observou que alguns animais apresentavam herniações de conteúdo abdominal que,

por vezes, estavam aderidas à parte interna do retalho, com uma visível revascularização deste a partir das vísceras. Dessa forma, a inclusão da lâmina de silicone também contribuiu para evitar essa intercorrência.

O tempo escolhido para o óbito induzido dos animais e início das avaliações foi de sete dias, semelhante ao tempo empregado em outros estudos com retalhos, em ratos (ZHANG *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2008; HASDEMIR *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2015; IZMIRLI *et al.*, 2016). O intervalo de sete dias possibilitou a análise da necrose sem deiscências e retrações cicatriciais. Foi possível obter a fluorescência do marcador à microscopia de fluorescência e assegurar um tempo suficiente para a diferenciação das células-tronco mesenquimais em células endoteliais (vasculogênese) como descrita nos estudos de LU *et al.* (2008), GAO *et al.* (2011) e KARATHANASIS *et al.* (2013).

Para as análises histológicas com contagem de vasos, foi necessário retirar amostras teciduais dos retalhos. ELY (2004) retirou três amostras, uma sobre o pedículo, outra da região distal (zona IV) e outra extra retalho (tecido viável). Em outro estudo, realizado por LINEAWEAVER *et al.* (2004), os autores utilizaram amostras das quatro zonas do retalho TRAM, para avaliação de expressão gênica e histológica. As zonas do retalho TRAM no rato correspondem às zonas do retalho no humano descritas por HARTRAMPF (1988), determinando a zona de maior vascularização (I) até a de menor vascularização (IV).

Embora com a possibilidade de necrose das zonas do retalho, causando dificuldades na avaliação morfométrica e imuno-histoquímica, optou-se pela retirada de fragmentos das zonas de I a IV, de modo semelhante a LINEAWEAVER *et al.* (2004). Os fragmentos necrosados

avaliados com coloração de hematoxilina-eosina não apresentavam vasos e a contagem foi considerada igual a zero.

No presente estudo, utilizou-se imuno-histoquímica com o marcador HHF 35, que forma um complexo antígeno-anticorpo ao redor do vaso sanguíneo, possibilitando a contagem dos vasos. O marcador HHF 35 (*human heart factor*) para a marcação de vasos sanguíneos tem uma grande sensibilidade, facilitando a análise morfométrica (Figura 29, Apêndices). Utilizou-se a avaliação morfométrica de cinco campos consecutivos, com aumento de 400x, da mesma forma que FREITAS *et al.* (2010).

No presente estudo, a porcentagem média de necrose do retalho TRAM foi estatisticamente diferente entre os grupos. A porcentagem de necrose do retalho TRAM no grupo tratado com células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (grupo III) foi significativamente menor que aquela observada nos grupos II (Alfa MEM) e I (TRAM). O grupo TRAM apresentou necrose semelhante ao grupo Alfa MEM. Esse resultado é semelhante ao obtido por LU *et al.* (2008), que embora utilizassem o retalho randômico dorsal, não observaram diferença na viabilidade do retalho nos grupos tratados com a injeção de meio de cultura.

A necrose do retalho encontrada principalmente nos grupos TRAM e Alfa MEM foi causada provavelmente pela lesão dos vasos perfurantes durante o TRAM, com isquemia e necrose principalmente das extremidades do retalho (zonas III e IV). O grupo II com o uso da solução de Alfa MEM (meio de cultura) foi utilizado para investigar um suposto efeito desse meio de cultura na viabilidade do retalho. Esse grupo não apresentou diferença significativa em relação ao grupo TRAM, no qual foi

utilizada a solução salina ($p=0,999$), mostrando que o meio de cultura não interferiu na viabilidade do retalho TRAM.

Embora a avaliação da necrose com o óbito induzido dos animais tenha sido realizada após sete dias, tempo aparentemente curto para a diferenciação das células-tronco em células endoteliais e vasos sanguíneos, os animais do grupo III apresentaram maior viabilidade do retalho. HASDEMIR *et al.* (2015) encontraram resultado semelhante, utilizando o mesmo número de células-tronco e o mesmo tempo de avaliação, no modelo de retalho cutâneo dorsal. SCHLOSSER *et al.* (2012) encontraram em seu estudo no modelo isquêmico uma grande reação angiogênica a partir do sétimo dia após a aplicação das células-tronco.

Neste trabalho, a porcentagem média de necrose do retalho TRAM no grupo controle (grupo I), com pedículo caudal, foi de 50,42%, semelhante à porcentagem encontrada por SEIFY, BILKAY, JONES (2003) que utilizaram o pedículo caudal direito e a porcentagem de necrose do retalho foi de 50%, mostrando a similaridade entre esses grupos controles.

As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) podem apresentar diversas formas de ação para o aumento da viabilidade de retalhos. Sua ação pode estar relacionada à transdiferenciação em células endoteliais e através de secreção de mediadores químicos e fatores de crescimento (YUE *et al.*, 2013; ZHANG & TANG, 2014). No presente estudo, aparentemente a viabilidade dos retalhos não ocorreu exclusivamente pelo aumento do número de vasos. O efeito parácrino das células tronco em área de isquemia pode ser um fator adicional e explicar a maior viabilidade do retalho através de mecanismos diversos.

UYSAL *et al.* (2009), em modelo de isquemia-reperfusão em murinos observaram diminuição da lesão de isquemia-reperfusão, principalmente através da ação de fatores de crescimento, especialmente o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), o Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF), e o Fator de Crescimento Transformante-Beta (TGF- β). GAO *et al.* (2011) mostraram que a utilização de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADSCs) poderia melhorar a viabilidade do retalho cutâneo em camundongos diabéticos via expressão de fator hipóxia induzido 1 α e VEGF.

YUE *et al.* (2013), utilizando um modelo de retalho pré-condicionado à hipóxia, demonstraram que o transplante pré-operatório de ADSCs, combinado com o pré-condicionamento hipóxico, efetivamente melhoram a viabilidade do retalho isquêmico em ratos por neovascularização associada com a produção e ativação do fator hipóxia induzido 1 α (HIF-1 α), juntamente com um aumento de VEGF.

A avaliação morfométrica dos vasos possibilitou comparar entre os grupos o número de vasos encontrados no retalho e estudar as diferenças entre os grupos quanto ao número de vasos encontrados nas zonas I a IV do TRAM.

ZHANG *et al.* (2001) utilizaram a análise de número de capilares através de coloração hematoxilina-eosina e encontraram uma média de quatro capilares por campo no retalho TRAM no grupo tratado com VEGF e um capilar no grupo controle. Utilizaram um aumento de 400x, porém não relataram o método de contagem e a área estudada. No presente estudo, a média de vasos totais encontrados no grupo célula-tronco foi de 4 vasos por campo e embora em número maior que nos outros grupos, a diferença não foi significativa.

O grupo III (célula-tronco) não apresentou diferenças significantes em relação aos grupos I (TRAM) e grupo II (Alfa MEM), no número total de vasos sanguíneos do retalho TRAM ($p=0,095$). HASDEMIR *et al.* (2015) não encontraram diferença significativa no número de vasos, embora os retalhos tratados com células tronco apresentassem maior viabilidade.

A avaliação em separado do número de vasos encontrados nas zonas do retalho TRAM mostrou aumento significativo de vasos no grupo Célula-Tronco apenas na zona IV, em relação aos grupos TRAM e Alfa MEM.

A zona I não apresentou diferença significativa entre os grupos. Nessa zona, o retalho TRAM apresenta a maior vascularização, porque ele se encontra em contato com o músculo reto do abdome direito, que não sofre descolamento durante a execução. Dessa forma, em geral, a zona I não apresenta problemas de vascularização e a igualdade em relação ao número de vasos entre os grupos pode ser esperada.

O grupo III apresentou número de vasos significativamente maior quando comparado com os grupos I ($p=0,001$) e grupo II ($p=0,001$) na zona IV do retalho. No estudo de FREITAS *et al.* (2010), os autores também encontraram uma diferença significativa do número de vasos da zona IV mostrando a importância do tratamento dessa zona isquêmica para a viabilidade total do retalho. Os retalhos dos animais que receberam as células-tronco mesenquimais tiveram notadamente diferenças na zona IV, quando examinados na microscopia óptica, mostraram a presença de vasos sanguíneos. Os animais do grupo I (TRAM) e do grupo II (Alfa MEM) não apresentaram vasos na zona IV do retalho TRAM e conseqüentemente, apresentaram necrose dessa área. A zona IV do retalho TRAM em humanos e em modelos experimentais é considerada uma área isquêmica.

A avaliação da fluorescência das células previamente marcadas com o Dil possibilitou investigar a presença das células-tronco após sete dias, sua distribuição no retalho e sua incorporação na parede dos vasos. A fluorescência foi encontrada apenas no grupo Célula-Tronco que apresentava as células marcadas. Embora o resultado tenha sido esperado, a avaliação das lâminas nos outros grupos foi importante para afastar a presença de autofluorescência dos tecidos.

No estudo de ZHENG *et al.* (2008), os autores encontraram o aumento da vascularização e diferenciação das células-tronco em células endoteliais. No presente estudo, embora tenha sido observado o aumento da vascularização da zona IV do TRAM e a presença de células fluorescentes próximas à parede de vasos sanguíneos, não foi encontrado células Dil positivas na parede de vasos sanguíneos e não foi possível afirmar que houve diferenciação das células-tronco em células endoteliais. Resultado semelhante foi encontrado por GAO *et al.* (2011), que relataram aumento do número de células-tronco ao redor dos vasos sanguíneos e poucas células na parede de vasos. HASDEMIR *et al.* (2015) utilizando a mesma via de transplante, a mesma quantidade de células e o mesmo tempo de avaliação, encontraram células-tronco marcadas com GFP (proteína verde fluorescente) no retalho mas não descreveram sua integração na parede de vasos. SCHLOSSER *et al.* (2012), utilizando células-tronco mesenquimais de medula em retalho isquêmico, observaram aumento da viabilidade, porém não observaram transdiferenciação das células em células endoteliais. As células, no quarto dia pós-operatório, se agruparam ao longo das paredes vasculares e uma grande reação angiogênica se iniciou no sétimo dia.

Embora não tenha sido encontrado um aumento significativo de vasos sanguíneos nas zonas I, II e III, em relação ao controle, houve aumento da viabilidade do retalho no grupo TRAM. O aumento da viabilidade total pode ser consequência da angiogênese da zona IV ou pela ação parácrina das células-tronco em todas as áreas do retalho. Estudos encontraram um aumento significativo de fator de crescimento do endotélio vascular, fator 1 alfa hipóxia-induzido (*hypoxia-inducible factor-1 α* - HIF-1 α) em retalhos isquêmicos e o aumento de expressão desses dois fatores em fibroblastos dérmicos (GAO *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2013).

Na literatura consultada não foi encontrado trabalho que correlaciona o aumento do número de vasos das zonas do retalho TRAM com a terapia celular.

Pôde-se observar que as correlações entre as porcentagens de necrose e o número de vasos do retalho mostraram uma correlação negativa, significativa em todos os grupos. Isso indica que, à medida que o número de vasos diminui, a porcentagem de necrose aumenta. Resultado semelhante foi encontrado por FREITAS *et al.* (2010).

Como perspectiva, novos estudos poderão responder aos questionamentos levantados neste estudo. Estudos posteriores com terapia celular podem correlacionar os níveis do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), e o Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF-1alfa) com a viabilidade do retalho TRAM.

Após o estudo de ZHENG *et al.* (2008), que utilizou células-tronco de medula óssea transfectadas com o VEGF no retalho randômico dorsal, o modelo de terapia gênica com o VEGF, nas células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo para aumento da viabilidade do retalho TRAM, pode ser estudado.

Outros estudos promissores podem ser realizados. A comparação da fração vascular estromal, com as células-tronco mesenquimais na viabilidade dos retalhos, a utilização das células progenitoras endoteliais e a utilização de células-tronco mesenquimais humanas em modelo experimental, semelhante ao utilizado por GAO *et al.* (2011), estudando os diferentes mecanismos de ação das células implantadas.

As observações apresentadas no presente estudo foram realizadas em modelo experimental e não devem ser sempre transpostas para a realidade clínica das reconstruções mamárias. Este estudo apenas sugere importantes correlações, com novas perspectivas para a problemática das complicações pós-operatórias.

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo aumentaram a viabilidade do retalho musculofasciocutâneo transversal do músculo reto do abdome e o número de vasos sanguíneos da zona IV, em ratos.

8. REFERÊNCIAS

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb;275(5302): 964-7.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for post natal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 Aug;85(3): 221-8.

Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Oct;126(4):1163-71.

Boyd JB, Taylor GI, Corlett R. The vascular territories of the superior epigastric and deep inferior epigastric systems. *Plast Reconstr Surg*. 1984 Jan;73(1):2-14.

Bozola AR. Reconstrução mamária tardia com expansão prévia da área da mastectomia e preenchimento com retalho TRAM desepidermizado. *Rev Bras Cir Plást*. 2005;20(2):95-101.

Clugston PA, Perry LC, Fisher J, Maxwell GP. A rat transverse rectus abdominis musculocutaneous flap model: effects of pharmacological manipulation. *Ann Plast Surg*. 1995 Feb;34(2):154-61.

Codner MA, Bostwick J III. The delayed TRAM flap. *Clin Plast Surg*. 1998 Apr;25(2):183-9.

De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett*. 2003a Oct;89(2-3):267-70.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003b;174(3):101-9.

Derby BM, Dai H, Reichensperger J, Cox L, Harrison C, Cosenza N, et al. Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: a mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthet Surg J*. 2014 Jan;34(1):142-153.

Dominici M1, 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.

Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconst Surg*. 1992 Aug;90(2):319-27.

Dunn RM , Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg*. 1993 Oct;31(4):352-7.

- Ely PB, d'Acampora AJ, Miltersteiner AR, Hoff FC. Dispositivo do tipo colar cervical para proteção de ferida operatória abdominal em ratos. *Acta Cir Bras.* 1997;12(Supl 2):S15-6.
- Ely PB, Miltersteiner AR, Hoff FC. Retalho miocutâneo transverso de músculo reto abdominal (TRAM flap) – modelo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 1997;12(Supl 2):75-8.
- Ely PB, Goldenberg S, d'Acampora AJ. Efeito da autonomização no retalho miocutâneo abdominal transverso de músculo reto abdominal – estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 1999;14(Supl 2):25.
- Ely PB, Ferreira LM. Transverse rectus abdominis musculocutaneous flap (TRAM flap) - experimental model in rats. *Acta Cir. Bras.* 2003;18(no.spe): 46-53.
- Ely PB. Nicotina no retalho musculocutâneo transverso do músculo reto do abdome, em ratos [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.
- Freitas ALP, Gomes HC, Lisboa BC, Arias V, Han SW, Ferreira LM. Effect of Gene Therapy with Vascular Endothelial Growth Factor after Abdominoplasty on TRAM Flap Viability in a Rat Model. *Plast Reconst Surg.* 2010 May;125(5):1343-51.
- Freitas ALP, Oliveira e Silva M, Matsumoto PMK, Han SW, Ferreira LM. Experimental model of obtaining tissue adipose, mesenchymal stem cells isolation and distribution in surgery flaps in rats. *Acta Cir Bras.* 2014; 29(Supl 2):29-33.

- Foroglou P, Karathanasis V, Demiri E, Koliakos G, Papadakis M. Role of adipose-derived stromal cells in pedicle skin flap survival in experimental animal models. *World J Stem Cells*. 2016 Mar 26;8(3):101-5.
- Gandolfo EA. Breast reconstruction with a lower abdominal myocutaneous flap. *Br J Plast Surg*. 1982 Oct;35(4):452-7.
- Gao W, Qiao X, Ma S, Cui L. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Cell Mol Med*. 2011 Dec;15(12):2575-85.
- Garcia EB, Ferreira LM, Sabino Neto M, Sallum N. Experimental model of cranially pedicled TRAM flap in rats. *Acta Cir Bras*. 2004;19 (Supl 1):59-64.
- Hallock GG, Rice DC. Evidence for the efficacy of TRAM flap delay in a rat model. *Plast Reconst Surg*. 1995a Nov;96(6):1351-7.
- Hallock GG, Rice DC. Physiologic superiority of the anatomic dominant pedicle of the TRAM flap in a rat model. *Plast Reconst Surg*. 1995b Jul;96(1):111-8.
- Hallock GG, Rice DC. Fate of the TRAM flap after abdominoplasty in a rat model. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Jun;101(7):1828-35.
- Han HH, Lim YM, Park SW, Lee SJ, Rhie JW, Lee JH. Improved skin flap survival in venous ischemia-reperfusion injury with the use of adipose-derived stem cells. *Microsurgery* 2015 Nov;35(8): 645-52.

Hartrampf CR Jr, Scheflan M, Black PW. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Reconstr Surg.* 1982 Feb;69(2):216-24.

Hartrampf CR Jr, Bennett GK. Autogenous tissue reconstruction in the mastectomy patient. A critical review of 300 patients. *Ann Surg.* 1987 May;205(5):508-19.

Hartrampf CR Jr. The transverse abdominal island flap for breast reconstruction. A 7-year experience. *Clin Plast Surg.* 1988 Oct;15(4):703-16.

Hasdemir M, Agir H, Eren GG, Aksu MG, Alagoz MS, Duruksu G, et al. Adipose-Derived Stem Cells Improve Survival of Random Pattern Cutaneous Flaps in Radiation Damaged Skin. *J Craniofac Surg.* 2015 Jul;26(5): 1450-5.

Ishii CH Jr, Bostwick J III, Rainet TJ, Coleman JJ III, Hester TR. Double-pedicle transverse rectus abdominis myocutaneous flap for unilateral breast and chest-wall reconstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1985 Dec;76(6):901-7.

Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 1999 May;103(9):1231-6.

Izmirli HH, Alagoz MS, Gercek H, Eren GG, Yucel E, Subasi C, et al. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Accelerate Neovascularization in Interpolation Flaps. *J Craniofac Surg.* 2016 Jan;27(1): 264-71.

Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ. Chemical delay: an alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg.* 2002 Jul;49(1):73-80.

Karathanasis V, Petrakis S, Topouridou K, Koliakou E, Koliakos G, Demiri E. Intradermal injection of GFP-producing adipose stromal cells promotes survival of random-pattern skin flaps in rats. *Eur J Plast Surg.* 2013 May;36(5):281-8.

Kroll SS, Gherardini G, Martin JE, Reece GP, Miller MJ, Evans GRD, et al. Fat necrosis in free and pedicled TRAM flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Oct;102(5):1502-7.

Lee DW, Jeon YR, Cho EJ, Kang JH, Lew DH. Optimal administration routes for adipose-derived stem cells therapy in ischaemic flaps. *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Aug;8(8): 596-603.

Lineaweaver WC, Lei M-P, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg.* 2004 Jun;239(6):866-73.

Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconst Surg.* 2008 Jan;121(1):50-8.

Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human pro-cessed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002 Jan;109(1):199-209.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004 May;22(3):377-84.

Ozgentas HE, Shenaq S, Spira M. Development of TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg*. 1994 Dec;94(7):1012-7.

Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg*. 1996 Dec;37(6):604-11.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. *Circulation*. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. 2004 Feb;109(5):656-63.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar;109(10):1292-8.

Robbins TH. Rectus abdominis myocutaneous flap for breast reconstruction. *Aust N Z J Surg*. 1979 Oct;49(5):527-30.

Schefflan M, Dinner MI. The transverse abdominal island flap: indications, contraindications, results and complications. *Ann Plast Surg*. 1983 Jan;10(1):24-35.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-27.

Schlosser S, Dennler C, Schweizer R, Eberli D, Stein JV, Enzmann V, et al. Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin. *Microvasc Res*. 2012 May;83(3):267-75.

Seify H, Bilkay U, Jones G. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Sep;112(4):1032-9.

Semple JL. Retrograde microvascular augmentation (turbocharging) of the single-pedicle TRAM flap through a deep inferior epigastric arterial and venous loop. *Plast Reconstr Surg*. 1994 Jan;93(1):109-17.

Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005 Jan;111(2):150-6.

Swatz CV, Gaiba S, França JP, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose-derived stem cells (ADSC) in the viability of random skin flap in rats. *Acta Cir. Bras*. 2014. vol.29 (supl.2):6-9.

- Taub PJ, Silver L, Weinberg H. Plastic surgical perspectives on vascular endothelial growth factor as gene therapy for angiogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2000;105(3):1034-42.
- Tepper OM, Galiano RD, Kalka C, Gurtner GC. Endothelial progenitor cells: The promise of vascular stem cells for plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2003 Feb;111(2):846-54.
- Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: imunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Sep;124(3):804-15.
- Veiga DF, Sabino Neto M, Ferreira LM, Garcia EB, Veiga Filho J, Novo NF, et al. Quality of life outcomes after pedicled TRAM flap delayed breast reconstruction. *Br J Plast Surg.* 2004 Apr;57(3):252-7.
- Yue Y, Zhang P, Liu D, Yang JF, Nie C, Yang D. Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg.* 2013 Feb;37(1):159-70.
- Xu N, Guo S, Wang Y, Sun Q, Wang C. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells promotes the survival of venous-congested skin flaps in rabbit ear. *Cell Biochem Biophys.* 2015 Mar;71(2): 557-63.
- Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, Guo M, Cui D, Dorsett-Martin W, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg.* 2001 Mar;46(3):314-19.

Zhang FG, Tang XF. New advances in the mesenchymal stem cells therapy against skin flaps necrosis. *World J Stem Cells*. 2014 Sep;6(4):491-6.

Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jan;121(1):59-69.

Zimmermann A, Pelegri AA, Peruzzo D, Martinez EF, de Mello e Oliveira R, Aloise AC, et al. Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015 Nov-Dec;30(6):1415-22.

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 Apr;7(2): 211-28.

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 Dec;13(12):4279-95.

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.icmje.org>.

COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) – Princípios éticos da experimentação animal. Disponível no endereço eletrônico: <http://www.meusite.com.br/cobea/index.htm>.

Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo: Ed. Manole; 2001. 248p.

Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília – DF; 1996. 24p.

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. Disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br/> – terminologia em saúde.

International Committee On Veterinary Gross Anatomical Nomenclature – Nomina anatômica veterinária. 3. ed. New York, Ithaca; 1983. 216p.

Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Barbosa MVJ, Ely PB, Blanes L, Bretos JLG. Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. São Paulo: Livraria Médica Paulista; 2008. 84p.

ABSTRACT

Introduction: Transverse rectus abdominis musculocutaneous (TRAM) flap is considered an important surgical option for breast reconstruction but may present necrosis, especially in patients with risk factors. Perspectives on cell therapy with adipose derived mesenchymal stem cells (ADSC) for neovascularization and reducing necrosis of TRAM flap, originated this study. **Objective:** The objective of this study was to determine the effect of adipose derived mesenchymal stem cell in TRAM flap's rat model viability. **Methods:** Twenty-four Wistar rats were distributed into three groups (n=8). The caudal pedicled TRAM flap was harvested in all animals and it was the only procedure in the group I (TRAM). In groups II (Alpha MEM) and III (Stem Cell), with the TRAM flap procedure was performed intradermal injection Alpha MEM medium culture and the Alpha MEM medium culture with two million mesenchymal stem cells with the fluorescent marker Dil, respectively. We evaluated the percentage of necrosis, neovascularization by immunohistochemistry with HHF-35 antibody and the distribution of stem cells in TRAM flap by fluorescence microscopy. **Results:** TRAM group, Alpha MEM group, and Stem Cell group showed a mean percentage of necrosis of 50,42%, 53,57%, and 23,36%, respectively (p=0,005). TRAM flap's immunohistochemical analysis showed a significant increase in number of vessels in the zone IV to group III. **Conclusion:** Adipose derived mesenchymal stem cells improved TRAM flap viability and the number of the vessels in the zone IV of flap, in rats.

APÊNDICES

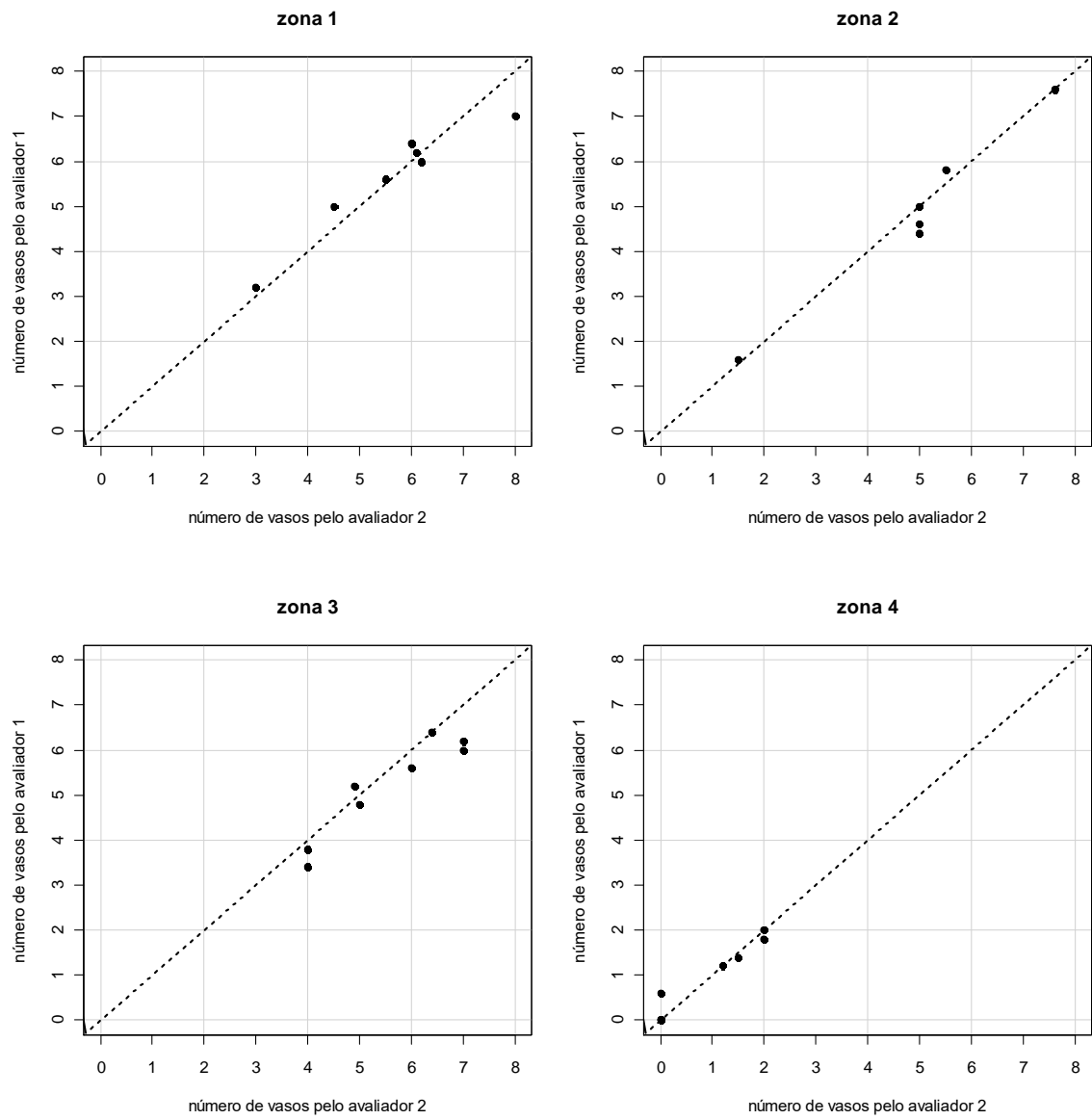


Figura 23. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo Célula Tronco, segundo as zonas do retalho.

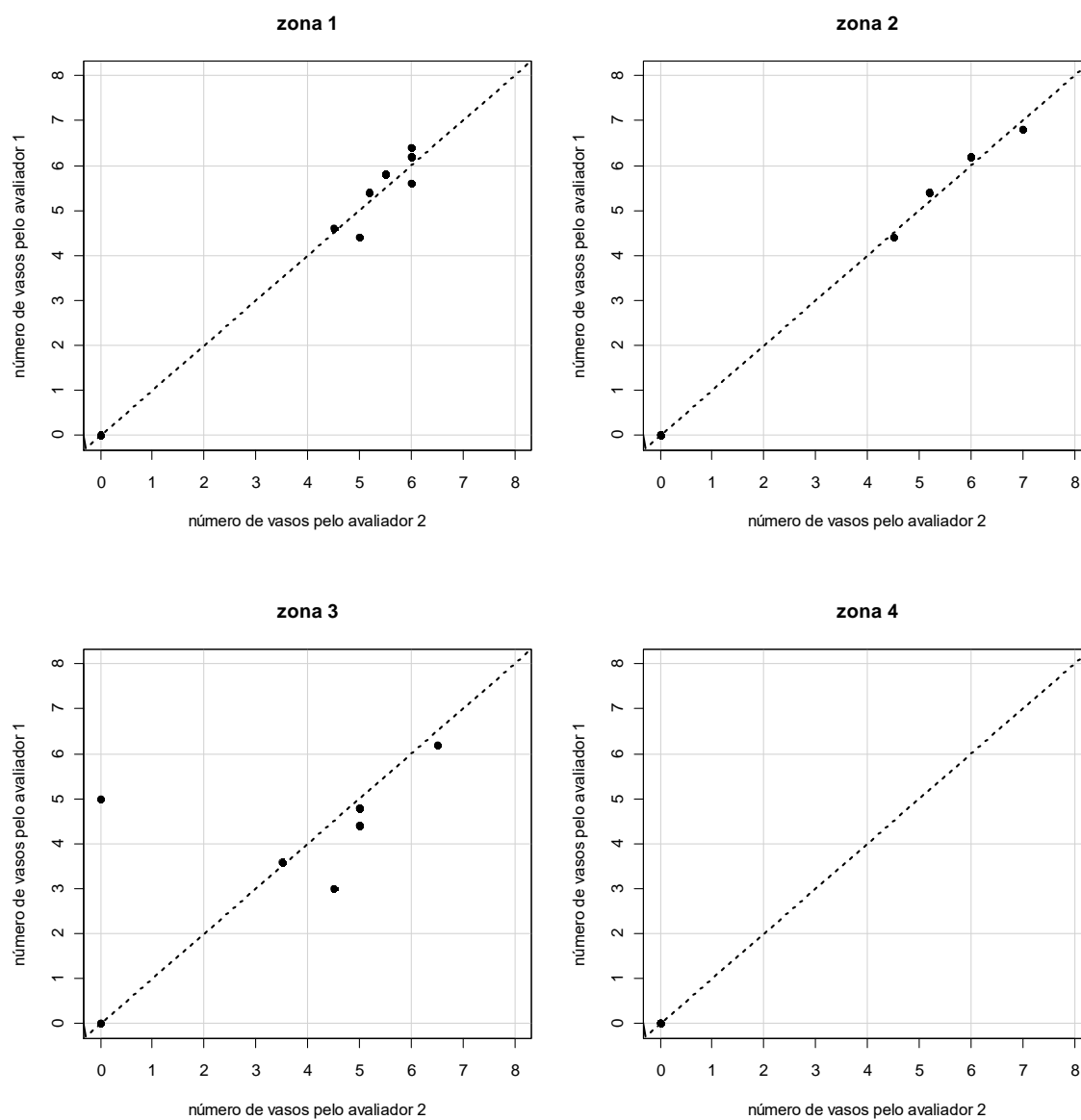


Figura 24. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo Alfa MEM, segundo as zonas do retalho.

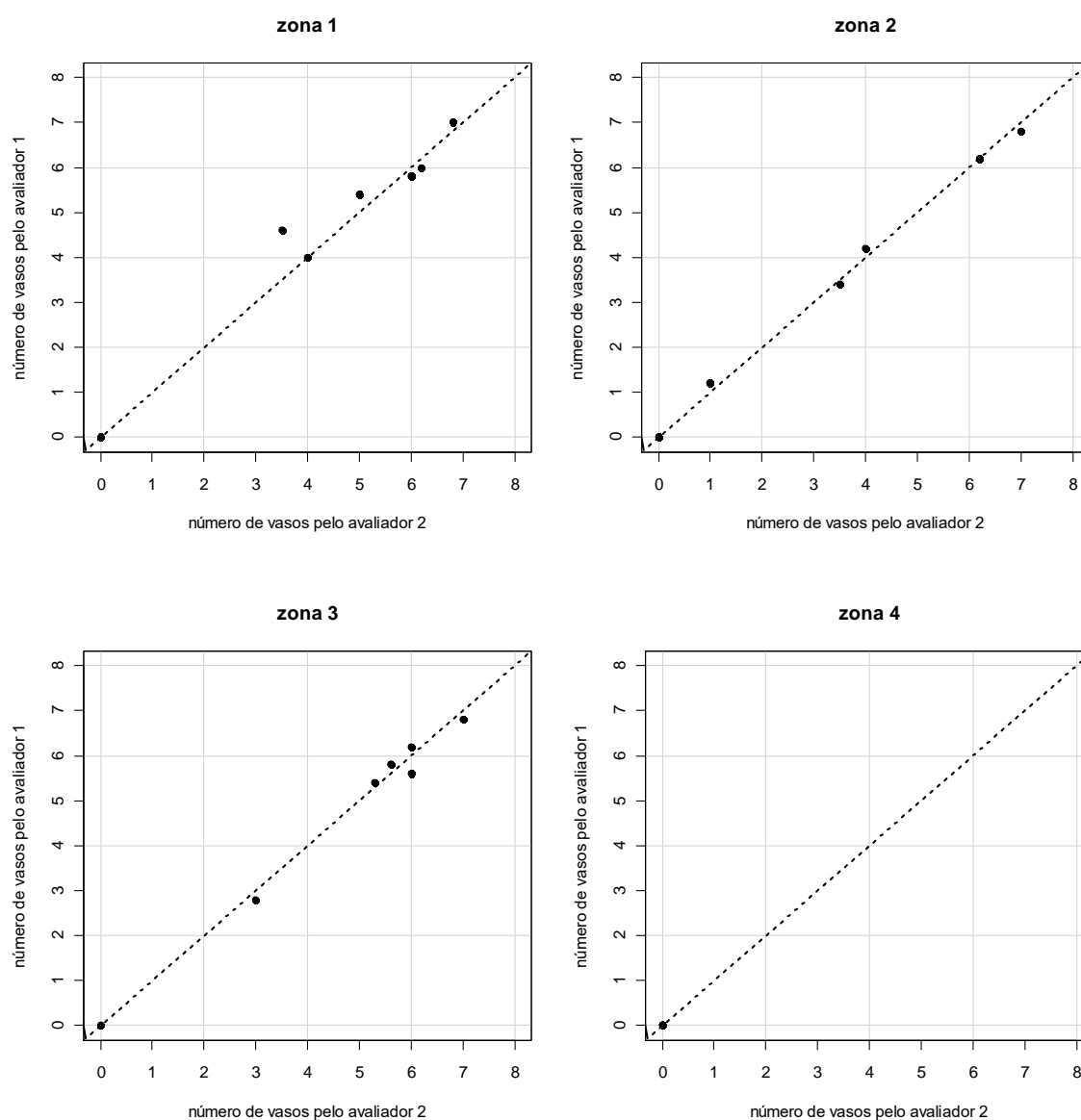


Figura 25. Diagramas de dispersão bidimensional do número de vasos entre os avaliadores no grupo TRAM, segundo as zonas do retalho.

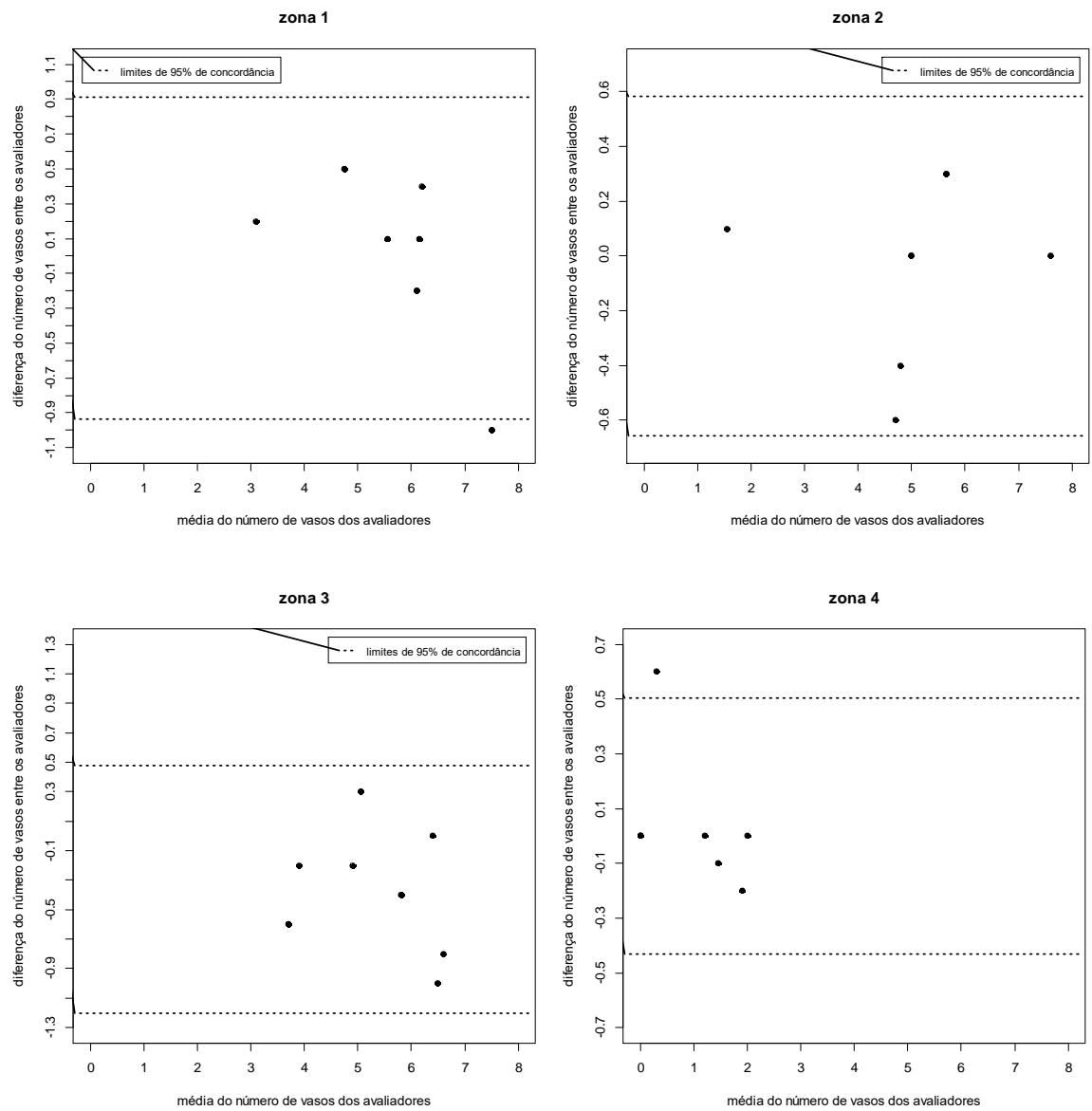


Figura 26. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo Célula-Tronco, segundo as zona do retalho.

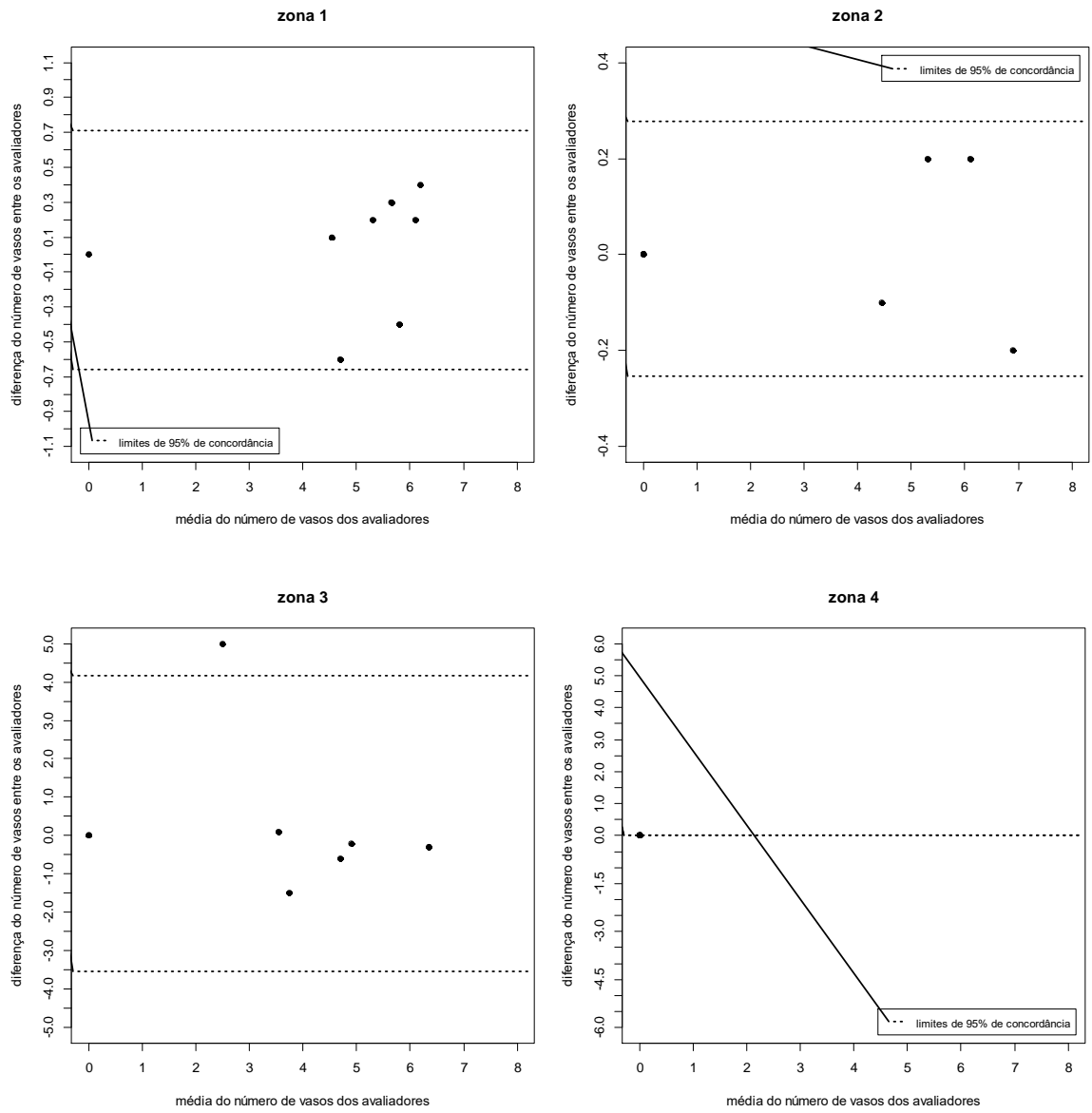


Figura 27. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo Alfa MEM, segundo as zonas do retalho.

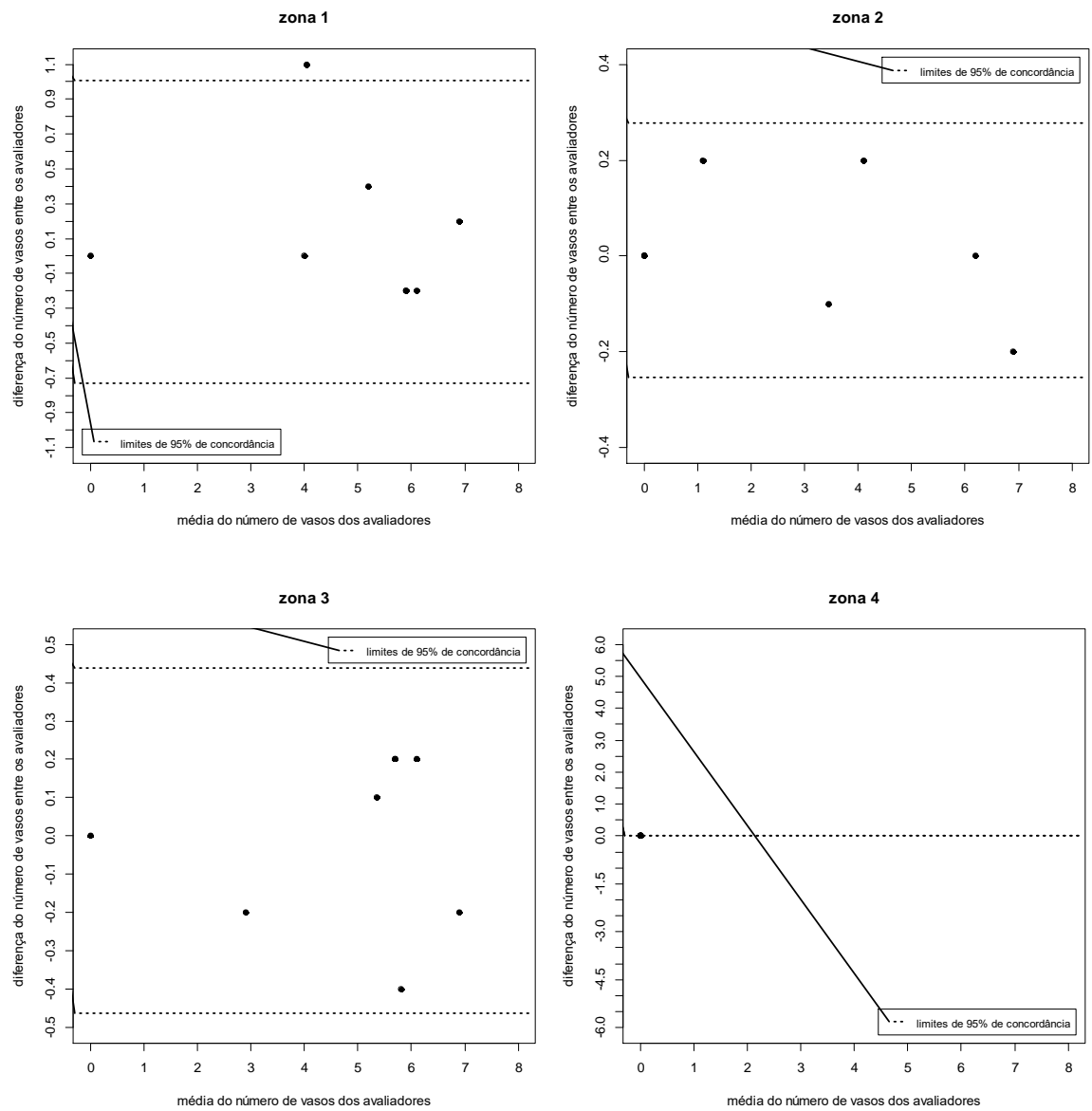
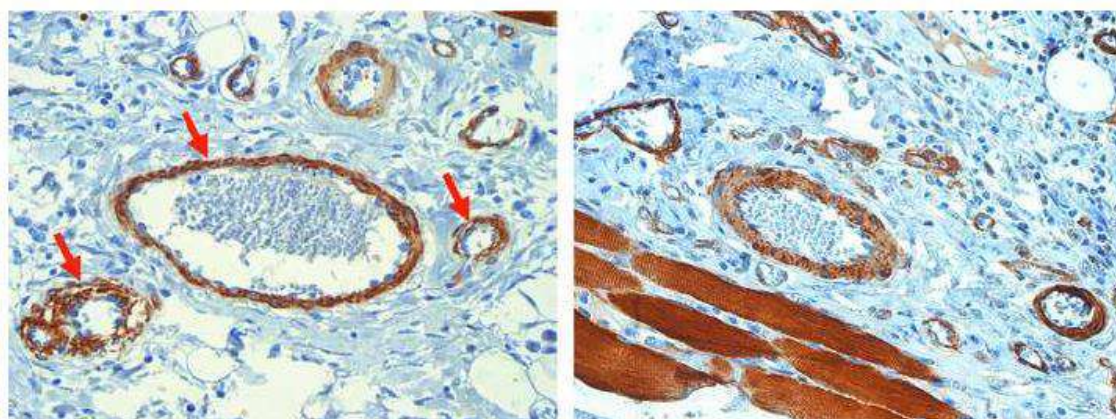


Figura 28. Diagramas de dispersão de Bland-Altman do número de vasos entre os avaliadores no grupo TRAM, segundo as zonas do retalho.



A

B

Figura 29. Marcador HHF-35 com aumento de 400X. **A:** as setas mostram a formação de um complexo antígeno-anticorpo ao redor dos vasos sanguíneos, possibilitando a contagem para análise de morfometria. **B:** Lâmina com aumento de 400 X mostrando a marcação dos vasos e fragmento de músculo da zona I.

TABELA 5 Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona I

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
Célula-Tronco	TRAM	Célula-Tronco = TRAM	0,288
Célula-Tronco	Alfa MEM	Célula-Tronco = Alfa MEM	0,273
TRAM	Alfa MEM	TRAM = Alfa MEM	0,972

TABELA 6 Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona II

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
Célula-Tronco	TRAM	Célula-Tronco = TRAM	0,126
Célula-Tronco	Alfa MEM	Célula-Tronco = Alfa MEM	0,167
TRAM	Alfa MEM	TRAM = Alfa MEM	0,871

TABELA 7 Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona III

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
Célula-Tronco	TRAM	Célula-Tronco = TRAM	0,985
Célula-Tronco	Alfa MEM	Célula-Tronco = Alfa MEM	0,093
TRAM	Alfa MEM	TRAM = Alfa MEM	0,097

TABELA 8 Resultados das comparações da contagem dos vasos entre os grupos na zona IV

Grupos comparados		Conclusão	Nível descritivo (p)
Célula-Tronco	TRAM	Célula-Tronco < TRAM	0,001
Célula-Tronco	Alfa MEM	Célula-Tronco < Alfa MEM	0,001
TRAM	Alfa MEM	TRAM = Alfa MEM	0,999

TABELA 9 Necrose do retalho no grupo TRAM

Rato	Porcentagem de Necrose	Área do retalho cm ²	Área de Necrose cm ²
8	46,71	7,01	3,27
9	42,31	5,27	2,23
10	34,5	6,22	2,15
12	50,79	5,67	2,88
15	66,54	5,41	3,6
17	100	6,8	6,8
21	27,3	5,75	1,57
24	35,19	7,87	2,77

TABELA 10 - Necrose do retalho no grupo Alfa MEM

Rato	Porcentagem de Necrose	Área do retalho cm ²	Área de Necrose cm ²
2	35,57	6,1	2,17
4	36,7	12,08	4,44
5	100	6,53	6,53
6	67,86	9,77	6,63
11	73,79	8,93	6,59
13	70,26	8,61	6,05
18	18,8	7,17	1,35
20	25,6	10,39	2,66

TABELA 11 Necrose do retalho no grupo Célula-Tronco

Rato	Porcentagem de Necrose	Área do retalho cm²	Área de Necrose cm²
1	7,16	8,65	0,62
3	10,98	12,29	1,35
7	66,74	8,51	5,68
14	27,83	9,34	2,6
16	20,77	6,98	1,45
19	10,24	9,57	0,98
22	13,62	10,79	1,47
23	29,57	9,94	2,94

TABELA 12 Contagem de vasos do grupo TRAM

Rato	Média				
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Total do retalho
8	5,8	0	6,8	0	3,15
9	7	6,8	2,8	0	4,15
10	4	4,2	5,4	0	3,4
12	4,6	1,2	6,2	0	3
15	6	0	5,6	0	2,9
17	0	0	0	0	0
21	5,4	6,2	5,8	0	4,35
24	5,8	3,4	5,8	0	3,75
	4,83	2,73	4,80	0	3,09

TABELA 13 Contagem de vasos do grupo Alfa MEM

Rato	Média				
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Total do retalho
2	5,6	6,2	6,2	0	4,5
4	6,2	5,4	3	0	3,65
5	0	0	0	0	0
6	5,4	0	5	0	2,6
11	6,4	0	0	0	1,6
13	4,6	0	4,4	0	2,25
18	4,4	4,4	3,6	0	3,1
20	5,8	6,8	4,8	0	4,35
	4,80	2,85	3,38	0	2,76

TABELA 14 Contagem de vasos do grupo Célula-Tronco

Rato	Média				Total do retalho
	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	
1	6,2	5,8	5,2	1,4	4,65
3	7	7,6	5,6	1,2	5,35
7	5	1,6	4,8	0	2,85
14	6,4	5,8	6,4	1,8	5,1
16	3,2	4,6	3,8	0	2,9
19	5,6	4,4	3,4	2	3,85
22	6	5	6	0,6	4,4
23	6	5	6,2	0	4,3
	5,675	4,975	5,175	0,875	4,18

TABELA 15 Resultados dos testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e de igualdade de variâncias (Levene)

	Grupo	valor de p do Shapiro-Wilk	valor de p de Levene
% Necrose	Célula Tronco	0,021	0,259
	Alfa MEM	0,457	
	TRAM	0,105	
zona 1	Célula Tronco	0,139	0,553
	Alfa MEM	0,005	
	TRAM	0,032	
zona 2	Célula Tronco	0,369	0,007
	Alfa MEM	0,015	
	TRAM	0,121	
zona 3	Célula Tronco	0,404	0,232
	Alfa MEM	0,205	
	TRAM	0,014	
zona 4	Célula Tronco	0,148	0,000
	Alfa MEM	-	
	TRAM	-	
Média Total do retalho	Célula Tronco	0,442	0,590
	Alfa MEM	0,724	
	TRAM	0,019	

TABELA 16 Fluorescência do marcador Dil nas zonas do TRAM do grupo Célula-Tronco

Rato	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4
1	++	+	++	++
3	+	++	+	++
7	++	+	++	+
14	+++	++	+++	++
16	+	++	++	+
19	++	++	+	++
22	++	+	+++	+
23	++	+	++	+

+ intensidade da fluorescência

+retalhos com necrose apresentando fluorescência

PROTOCOLO DO EXPERIMENTO

RATO NÚMERO: _____

GRUPO: _____

IDADE: _____

SEXO: _____

PESO: _____

PROCEDIMENTO DE CONFECÇÃO DO TRAM

DATA: ___/___/_____

ANESTESIA: _____

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: _____

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: _____

TERAPIA CELULAR

DATA: ___/___/_____

ANESTESIA: _____

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: _____

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: _____

DOSE EM CADA PONTO: _____ DOSE TOTAL: _____

OBSERVAÇÕES:

PROTOCOLO DO EXPERIMENTO

MENSURAÇÃO DA ÁREA DE NECROSE

DATA: ___/___/_____

ANESTESIA: _____

INÍCIO DO PROCEDIMENTO: _____

TÉRMINO DO PROCEDIMENTO: _____

FOTOGRAFIA DIGITAL NÚMERO: _____

ÁREA TOTAL DO RETALHO: _____

ÁREA DE NECROSE DO RETALHO: _____

PORCENTAGEM DE NECROSE: _____

ANÁLISE HISTOLÓGICA (avaliador 1)

DATA: ___/___/_____

VASOS DA ZONA I: _____

VASOS DA ZONA II: _____

VASOS DA ZONA III: _____

VASOS DA ZONA IV: _____

VASOS DO RETALHO: _____

ANÁLISE HISTOLÓGICA (avaliador 2)

DATA: ___/___/_____

VASOS DA ZONA I: _____

VASOS DA ZONA II: _____

VASOS DA ZONA III: _____


VASOS DA ZONA IV: _____

VASOS DO RETALHO: _____



ANEXOS

ANEXO 1- Comitê de Ética e Pesquisa


 Universidade Federal de São Paulo
 Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital São Paulo

São Paulo, 25 de maio de 2012
CEP Nº: 0148/12

Ilmo(a) Sr(a)
 Pesquisador(a): André Luiz Pires de Freitas
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia
 Pesquisadores associados: LYDIA MASAKO FERREIRA (orientadora)

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
 Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL DERIVADA DE TECIDO ADIPOSE NA VIABILIDADE DO RETALHO MUSCULOFASCIOTÂNICO ABDOMINAL TRANSVERSO DO MÚSCULO RETO DO ABDOME, EM RATOS :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos machos Wistar -(N=20)

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Avaliar a célula tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo na viabilidade do retalho musculofasciocutâneo abdominal transverso do músculo reto do abdome, em ratos.

RESUMO: Serão utilizados 30 ratos da linhagem Lewis, machos, adultos, com peso variando entre 250 e 300 gramas (g) com idade de três meses, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo (CEDEME). Os animais serão distribuídos aleatoriamente por sorteio computadorizado utilizando o programa de randomização por uma (Um Randomization – University of Connecticut Health Center), em três grupos de dez animais, sendo dois grupos controle e um grupo de experimento. Os animais serão mantidos no biotério da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, em gaiolas individuais de polipropileno, com ciclo claro/escuro, com controle de temperatura, ração própria comum e água ad libitum. No grupo I (grupo TRAM) os animais serão submetidos ao procedimento do retalho TRAM. Os animais do grupo II (grupo salina) serão submetidos ao procedimento do retalho TRAM, e injeção de solução salina. Nos animais do grupo III (grupo Célula Tronco), serão realizados o procedimento do retalho TRAM e injeção de célula tronco intramuscular. A anestesia será realizada com a aplicação intraperitoneal de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan na dose de 25 mg/kg. Os animais serão imobilizados em prancha cirúrgica, em decúbito dorsal, e a tricotomia da região ventral será realizada através de aparelho elétrico. O tecido adiposo será removido da região inguinal bilateral. Isolamento e Preparação das células tronco: Após a contagem de células com azul de Trypan, as células serão incubadas e somente culturas com células tronco isoladas da 4 passagem, serão utilizadas no estudo in vivo. As células da quarta passagem serão analisadas por citometria de fluxo com os anticorpos positivos para CD105, CD73 e CD90, e negativos para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79alfa ou CD19 e HLA-DR. As células deverão apresentar proliferação como células aderentes e capacidade de diferenciação in vitro em osteoblastos, adipócitos e condroblastos. O retalho será demarcado, na região ventral cranial, medindo cinco centímetros no sentido transversal, tomando-se a linha média como parâmetro e três centímetros no sentido longitudinal, distando um centímetro do processus xiphoides. Durante o procedimento do retalho TRAM será aplicada a solução salina no grupo II e a solução com as células tronco no grupo III. Neste último será aplicada a terapia celular com células tronco, em solução de PBS (phosphate buffered saline solution), via intramuscular, em dose única. Em todos os grupos, após um período de cinco dias do procedimento do retalho TRAM (ZHANG et al., 2001), os animais serão submetidos a anestesia, para avaliação da área de necrose do retalho. Todos os tecidos serão avaliados, pela microscopia óptica, com coloração de hematoxilina eosina e imunohistoquímica, com o uso do anticorpo HHF 35 (antiactina muscular específica, clone HHF 35 - human heart factor, Dako Corporation, California, USA), para avaliação da neovascularização. Serão realizadas fotografias fluorescentes usando o software (LuminaVision; V220 Olympus). As fotografias serão usadas para revelar se as células endoteliais dos capilares foram originadas das células tronco DiI-positivas, transplantadas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A escassez de estudos na literatura, sobretudo do efeito da terapia celular com células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo sobre a vascularização de retalhos, a possibilidade de se avaliar uma técnica de terapia celular com potencial efeito localizado e duradouro sobre células endoteliais progenitoras, estimularam a elaboração deste estudo, para determinar os efeitos na viabilidade do retalho TRAM, em ratos.

MATERIAL E MÉTODO: Descritos os procedimentos experimentais que serão realizados . O estudo será submetido à Comissão Interna de Biossegurança.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: A apresentação do orçamento detalhado permitiu a análise econômica viabilizando assim, a realização do projeto.

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 30 MESES

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 20/05/2013 e 15/05/2014

Página 1 de 2

Rua Botucatu, 672 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil

CEP N 0148/12



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 2- Anestésico

Zoletil 50

Zoletil 50 é indicado para anestesia e contenção de várias espécies animais, tanto selvagens quanto silvestres.



Cartucho acompanhado por uma bula, contendo 1 frasco-ampola com liofilizado e 1 frasco-ampola com 5 mL de diluente.



Fórmula

Tiletamina(cloridrato).....125,0 mg
 Zolazepam(cloridrato).....125,0 mg
 Excipiente.....q.s.p.....660,0 mg

Cada frasco ampola de diluente contém:

Água estéril.....5,0 mL

Posologia

Cães: 0,20 mL/Kg/IM ou 0,12 mL/Kg/EV.

Gatos: 0,15 a 0,20 mL/Kg/IM ou 0,10 mL/Kg/EV.

Suínos: 0,20 a 0,40 mL/Kg/IM ou 0,12 a 0,24 mL/Kg/EV.

Manutenção da anestesia: 1/3 a 1/2 da dose original.

Propriedades

Zoletil 50 associa um novo composto da família das feniciclidinas - a tiletamina - a um composto da família das benzodiazepinas - o zolazepam - na proporção de 1:1, permitindo uma anestesia geral eficaz, segura e com um mínimo de efeitos secundários. Ações decorrentes das propriedades conjugadas dos 2 compostos: Cataléptica rápida sem agitação seguida de um relaxamento; Analgésica: superficial, visceral; Anestesia cirúrgica: conservação dos reflexos faríngeos, laríngeos e das pálpebras; Sem depressão bulbar; Possibilidade de sialorréia; Despertar: calmo e sem agitação, longe de estímulos auditivos e visuais

violentos e reaparecimento rápido da coordenação motora. Fora de seu efeito anestésico, Zoletil 50 induz poucas manifestações sobre os diferentes sistemas do organismo; Sistema nervoso: nenhuma ação sobre os receptores adrenérgicos; Conservação dos reflexos laríngeos, faríngeos e das pálpebras; Sistema Digestivo: conservação da tonicidade lingual; Sistema Cardio-Vascular: hipertensão e taquicardia de indução; Nenhuma variação de pressão intra-ocular; Sistema Respiratório: polipnéia de indução (essencialmente cães); Sistema Reprodutor: nenhum efeito abortivo, teratogênico ou embriotóxico.

Vantagens

A combinação de Tiletamina (anestésico) e Zolazepam (tranquilizante) proporciona flexibilidade e segurança em diversos procedimentos.

Proporciona indução imediata.

Versatilidade: pode ser administrado por via intramuscular ou endovenosa; pode ser aplicado em diversas espécies animais, inclusive silvestres.

Despertar calmo e sem agitação.

Efeitos Colaterais

Não possui.

Contra Indicações

Zoletil é contra-indicado para animais nas seguintes condições:

Tratamentos com organofosforados sistêmicos;

Descompensações cardiorespiratórias;

Hipertensão grave;

Insuficiência pancreática.

Precauções

Aconselha-se prévia dieta líquida, de doze horas no mínimo. As doses adicionais do produto, a fim de se prolongar uma intervenção, devem ser dadas levando-se em conta o fato que a cinética de eliminação dos dois componentes são ligeiramente diferentes e que há risco de se favorecer um efeito da tiletamina com despertar mais agitado por parte do animal.

O uso da coleira antiparasitária não constitui, por si só, uma contra-indicação, recomenda-se, entretanto, que ela seja retirada 24 horas antes do uso do Zoletil 50.

Validade

24 meses após a data de fabricação.

ANEXO 3- Ração dos animais

Nuvilab CR-1

Composição do produto: Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos.

Níveis de garantia por quilograma do produto:

Umidade (máx)	12,50%
Proteína Bruta (min)	22,00%
Extrato Etéreo (min)	4,50%
Matéria Mineral (máx)	10,00%
Matéria Fibrosa (max)	8,00%
Cálcio (máx)	1,40%
Fósforo (min)	0,80%

Enriquecimento por Quilograma do Produto:

Vitaminas: Vitamina A 12.000,00 UI; vitamina D3 1.8000,00 UI; vitamina E 30,00 mg; vitamina K3 3,00 mg; vitamina B1 5,00 mg; vitamina B2 6,00 mg; vitamina B6 7,00mg; Vitamina B12 20,00 mcg; niacina 60,00 mg; ácido pantotênico 20,00 mg; ácido fólico 1,00mg; biotina 0,05 mg; colina 600,00 mg.

Microelementos Minerais: Ferro 50,00mg; zinco 60,00mg; cobre 10,00 mg; iodo 2,00 mg; manganês 60,00 mg; selênio 0,05mg; cobalto 1,50 mg.

Aminoácidos: Lisina 100,00 mg; metionina 300mg.

Aditivos: Antioxidantes 100,00mg

Indicação: Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National Institute of Health – USA

Uso: Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Apresentação: Peletizada (extrusada ou farelada sob consulta.

FONTES CONSULTADAS

Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Research*, 1999 Jun;8(2): 135-60.

Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica*. 5. ed. São Paulo: Saraiva; 2006.

Ferreira ABH. *Miniaurélio século XXI escolar*. 4. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira; 2001.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons; 1981, 321p.

Morales MM. *Terapias Avançadas*. 1. ed. São Paulo: Atheneu; 2007.

Neter J, Kutner MH, Nachtsheim CJ, Wasserman W. *Applied linear statistical models*. 4th ed. Boston: Irwin; 1996.

Siegel S. *Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006, 448p.