



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



MARCELA MIRANDA SALLES

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NA FRAÇÃO DE CÉLULAS
MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES
COM DOENÇA FALCIFORME**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



MARCELA MIRANDA SALLES

**AVALIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS NA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME**

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia como pré-requisito à obtenção do grau de
Mestre em Imunologia**

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Songeli Menezes Freire
Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Vitor Antônio Fortuna**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências da Biointeração no Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia com auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino (CAPES) e pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela coragem e força nesta jornada.

À minha família pela paciência e apoio em todos os momentos da vida.

Ao meu orientador, Prof^o Vitor pela oportunidade de conhecer sobre terapia celular através de seus brilhantes projetos. Sou grata pelos seus ensinamentos, perfeccionismo, exemplo científico e grande dedicação à pesquisa. É admirável sua postura e empenho na execuções dos trabalhos. Muito obrigada por tudo!

À minha orientadora Prof^a Songeli, pelo exemplo de profissionalismo e determinação acima de todas as circunstâncias.

Aos meus muitos amigos, que mesmo de longe acompanharam a construção deste trabalho, sempre torcendo pela minha vitória. Em especial, à minha amiga Eliane, pelo estímulo, colaboração e pelos momentos de descontração, mesmo em nossa rotina cansativa.

Sou grata à minha aluna de iniciação científica Queliane, que junto comigo abraçou este trabalho com total dedicação.

A todos os amigos do Labimuno, em especial a Rosa, Geraldo, Marivaldo e Adriano, pela disponibilidade e apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Às queridas secretárias do PPGIM, Dilcéia e Sônia, pela atenção e cuidado.

Aos funcionários do Labimuno, Chica, Zé, Manoel, Lú e Mário, pelo carinho.

À família da Farmácia Popular do Brasil, sou grata pela união, solidariedade, carinho e compreensão dos meus colegas, funcionários e pacientes durante todo esse tempo.

Aos médicos da equipe de ortopedia, em especial a Dr^o Gildásio Daltro pela confiança e respeito.

A todos os Professores da instituição, pela disponibilidade e pronta ajuda nos momentos de necessidade. Em especial ao Prof^o Roberto Meyer, exemplo de simplicidade e brilhantismo profissional, pela oportunidade de inserção em seu laboratório.

À professora Fabiana Paim, por permitir a execução de boa parte deste trabalho em seu laboratório e pelas palavras de incentivo.

À equipe do LBCM do IQ-USP, pela receptividade, atenção, paciência e ensinamentos preciosos.

Aos nossos pacientes, nossos exemplos de vida, pela boa vontade em ceder as amostras biológicas e confiança em nosso estudo.

Aos Professores examinadores desta dissertação, pela importante contribuição científica neste trabalho.

“ (..) Nunca deixe que lhe digam que não vale a pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém (..) ”

Quem acredita sempre alcança!”

(Renato Russo)

"Sempre que houver alternativas tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar. Opte pelo que gostaria de fazer, apesar de todas as consequências."
(Osho).

RESUMO

SALLES, M. M. **Avaliação e caracterização de células-tronco mesenquimais na fração de células mononucleares de medula óssea de pacientes com doença falciforme.** 2012. 150p. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIM). Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador.

A osteonecrose da cabeça femoral é uma complicação óssea comum em pacientes falciformes sendo decorrente dos eventos vaso-oclusivos frequentes nesta doença. O reparo anormal na região acometida pela necrose pode ser atribuído à neovascularização limitada e possíveis alterações no número e funcionalidade das células-tronco mesenquimais e ósseas neste ambiente isquêmico. Com este trabalho se avaliou a frequência e funcionalidade das células-tronco mesenquimais (CTMs) isoladas da fração de células mononucleares da medula óssea (CMMO) dos pacientes com doença falciforme (HbSS e HbSC). Esta população compõe a fração de células mononucleares que são injetadas de forma autóloga na cabeça do fêmur para tratamento da osteonecrose nesses indivíduos. O potencial clonogênico foi analisado por ensaio de Unidades Formadoras de Colônias-Fibroblastóides (CFU-F) na fração de células mononucleares. As CTMs isoladas e expandidas em cultivo foram caracterizadas por citometria de fluxo com os principais marcadores: CD105, CD90, CD146 e CD29. O potencial de diferenciação, a taxa de proliferação, a migração celular em câmara de Boyden, a detecção de citocinas no sobrenadante celular através do ELISA e a análise da expressão gênica, através da técnica de PCR quantitativo em tempo real, foram verificados sob condições normais e após o pré-condicionamento em hipóxia temporária por 48 horas. Os resultados demonstraram que a frequência das CFU-F na fração de células mononucleares dos pacientes portadores de anemia falciforme (n=12) está elevada na medula óssea quando comparadas à dos pacientes com osteonecrose do grupo controle (n=8) (p= 0,0409). As CTMs do grupo falciforme expandidas em cultura se apresentaram morfológica e imunofenotipicamente semelhantes àquelas do grupo controle. As CTMs dos pacientes falciformes se mostraram multipotentes, viáveis e proliferativas quando cultivadas em condições normais, perdendo a capacidade de diferenciação óssea após o efeito da hipóxia. Os mesmos resultados foram notados na análise da expressão gênica para marcadores ósseos de fase inicial (*RUNX2*, *ALPL* e *COLLAGEN I*). Concluímos que as CTMs presentes na fração de CMMO são viáveis, proliferativas e tem potencial de diferenciação multipotente em condições de normóxia, o que fundamenta o emprego da terapia celular no tratamento da osteonecrose no doente falciforme.

Palavras-chave: osteonecrose, doença falciforme, células-tronco mesenquimais, terapia celular.

ABSTRACT

SALLES, M. M. **Evaluation and characterization of mesenchymal stem cells in mononuclear cells fraction from bone marrow of patients with sickle cell disease.** 2012. 150p. Master's thesis (mestrado) - Post-Graduate Program in Immunology (PPGIM). Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador.

Osteonecrosis of the femoral head bone is a common complication in sickle cell patient, arising from frequent vaso-occlusive events in this disease. The abnormal repair in the affected region by necrosis can be attributed to limited neovascularization and possible changes in bone and mesenchymal stem cells number and function, in ischemic environment. With this work, we evaluate the frequency and function of mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from the fraction of bone marrow mononuclear cells (BMMC) of patient with sickle cell disease (HbSS and HbSC). This population makes up a mononuclear cells fraction that are injected in order autologous femoral head for osteonecrosis treatment in these individuals. The clonogenic potencial was analyzed by Colony Forming Unit-Fibroblast (CFU-F) assay in the fraction of mononuclear cells. MSCs isolated and expanded in culture were characterized by flow cytometry with the main markers: CD105, CD146, CD90, CD29. The potencial to differentiate, the cell proliferation, cell migration in Boyden chamber, the cytokines detection in cell supernatant by ELISA and gene expression by quantitative Real Time PCR technique were verified under normal conditions and after temporary hypoxia preconditioning for 48 hours. The results showed that the frequency of CFU-F in BMMC of patients with sickle cell anemia (n=12) is elevated in the bone marrow when compared to patients with osteonecrosis of the control group (n=8) (p=0, 0409). The MSCs of sickle cell patient expanded in culture are immunophenotypically and morphologically similar to those in the control group. The MSCs of sickle cell patients showed to be multipotent, viable and proliferative when cultivated under normal conditions, losing the ability to bone differentiate after hypoxic effect. The same results were noted in analysis of genic expression for early-stages bone markers (*RUNX2*, *ALPL*, *COLLAGEN I*). We conclude that MSCs presents in the fraction of BMMC patient are viable, proliferative and have multipotent differentiation potencial under normoxic conditions, which underlies the use of cell therapy in treatment of osteonecrosis in sickle cell patients.

Keywords: Osteonecrosis, sickle cell disease, mesenchymal stem cells, cell therapy

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg - micrograma

μL - microlitro

μM - micromolar

7-AAD: 7- amino-actinomicina-D (do inglês, 7-amino actinomycin D)

ALP: Fosfatase Alcalina (do inglês, Alkaline Phosphatase)

ALPL: gene responsável pela síntese da enzima Fosfatase alcalina

APAE: Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais

AVN: Necrose Avascular (do inglês, Avascular Necrosis)

BGLAP: gene responsável pela síntese da osteocalcina

BSS: Solução salina tamponada (do inglês, Buffer Saline Solution)

CD: Grupamento de diferenciação (do inglês, Cluster of Differentiation)

cDNA: DNA complementar

CFU-F: Unidades Formadoras de Colônias -Fibroblastos (do inglês, Colony Forming Unit-Fibroblast)

CFU-O: Unidades Formadoras de Colônias-Osteoblastos (do inglês, Colony Forming Unit-Osteoblast)

CMF: Solução salina livre de cálcio e magnésio (do inglês, Calcium Magnesium Free)

CMMO: Células mononucleares da medula óssea

COLLAGEN I: gene responsável pela síntese do colágeno

Ct: número de ciclos necessários para que a fluorescência ultrapasse o limiar do sinal referente ao acúmulo do DNA amplificado (do inglês, Threshold Cycle)

CTM: Célula-tronco mesenquimal

CTMs: Células-tronco mesenquimais

DAPI: 4´6´-Diamidino-2-fenilindol (do inglês, 4´6´-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)

DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco´s (do inglês, Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)

DMEM low glucose: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco´s com baixo teor de glicose (do inglês , Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium Low Glucose)

DMSO: Dimetil-sulfóxido

dNTP: Desoxiribonucleosídeo trifosfato

ENG: gene responsável pela síntese da Endogлина (CD105)

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (do inglês, Fluorescein isothiocyanate)

GAPDH: Gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase

HbA: Hemoglobina A

HbSC: Hemoglobinopatia SC (doença falciforme)

HbSS: Hemoglobinopatia SS (anemia falciforme)

HIF: Fator transcricional induzido pela hipóxia

IL-8: Interleucina-8

MCAM: Gene responsável pela síntese da Molécula de Adesão Celular Associada a Melanoma (CD146) (do inglês, Melanoma-Associated Cell Adhesion Molecule)

MEC: Matriz Extracelular

MO: medula óssea

PE: Phycoerythrin

qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real-quantitativo

RNA: Ácido Ribonucléico

RUNX2: Fator transcricional relacionado a Runt (do inglês, Runt-related transcription factor 2)

SDF-1 α : Fator derivado do estroma 1- α

SFB: Soro fetal bovino

TGF: Fator Transformador de Crescimento tipo β

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, Vascular Endothelial Growth Factor)

vWf: Fator de Von Willebrand

WHO: Organização Mundial de Saúde (do inglês, World Health Organization)

α -MEM: Meio mínimo essencial Eagle- alfa modificado (do inglês, Minimum Essential Medium Eagle- Alpha Modifications)

β -FGF: fator de crescimento de fibroblasto

Δ Ct: método da curva-padrão relativa ou método do Ct comparativo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Frequência do alelo β^S nas diferentes regiões do Brasil	17
Figura 2: Diagrama ilustrativo da fisiopatologia da necrose avascular óssea	25
Figura 3: Estágios do reparo ósseo após fratura	28
Figura 4: Processo automático de separação na centrífuga SEPAX	53
Figura 5: Modelo de estudo adaptado para hipóxia	58
Figura 6: Modelo de estudo para avaliação do padrão de migração das células-tronco mesenquimais <i>in vitro</i>	59
Figura 7: Registro Fotográfico do procedimento de decompressão óssea e injeção autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea para tratamento da osteonecrose da cabeça femoral	69
Figura 8: Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias-Fibroblásticas (CFU-F)	70
Figura 9 : Fotomicrografia da morfologia das CFUC-F	71
Figura 10: Gráfico comparativo entre o número de unidade formadora de colônias-fibroblastóide (Média \pm DP) em condições de normóxia e hipóxia temporária	72
Figura 11: Fotomicrografia representativa das CFU-F após 14 dias de cultivo e coradas com cristal violeta	73
Figura 12: Registro fotográfico representativo do ensaio de CFU-O	74
Figura 13: Fotomicrografia representativa da coloração em Alizarina Red e cristal violeta	75
Figura 14: Fotomicrografia representativa das culturas de CTMs provenientes do grupo controle e falciforme	77
Figura 15: Fotomicrografia representativa das culturas celulares após pré-condicionamento em hipóxia durante 48horas	77
Figura 16: Esquema ilustrativo do ensaio de proliferação celular	78
Figura 17: Gráfico da curva de proliferação das CTMs isoladas da medula óssea cultivadas em normóxia e após hipóxia temporária	79
Figura 18: Gráfico (perfil proliferativo) das CTMs isoladas da medula óssea de pacientes do grupo controle e falciformes sob normóxia e após hipóxia temporária	79
Figura 19: Gráfico da viabilidade celular nas condições de normóxia e após hipóxia temporária	81
Figura 20: Análise imunofenotípica para marcadores moleculares por citometria de fluxo.	82
Figura 21: Fotomicrografia representativa do ensaio de diferenciação adipogênica das culturas de CTMs.	84
Figura 22: Registro fotográfico representativo do ensaio de diferenciação osteogênica	85
Figura 23: Variação do perfil de indução osteogênica entre as diferentes culturas de CTMs	86
Figura 24: Marcação intracelular para Osteocalcina humana na cultura de CTMs HbSS #2	90
Figura 25: Marcação para Osteocalcina humana intracelular	91
Figura 26: Análise comparativa entre as curvas de distribuição de eventos marcados nas condições de normóxia (em roxo) e pré-condicionadas em hipóxia 48h (em verde).	92
Figura 27: Análise comparativa entre as médias das fluorescências para osteocalcina nas amostras ósteo-induzidas durante 7 dias (normóxia e hipóxia) e não-induzidas (controle).	93

Figura 28: Modelo de estudo para avaliação do padrão migratório das CTMs <i>in vitro</i> .	94
Figura 29: Fotomicrografia representativa do ensaio de migração celular <i>in vitro</i> .	94
Figura 30: Ensaio de 4 horas de migração com 5×10^4 células por inserto, incubadas sob normóxia (em roxo) ou hipóxia (em verde).	95
Figura 31: Fotomicrografia representativa da identificação do marcador Vimentina em culturas de CTMs de paciente falciforme (HbSC) através da técnica de imunocitoquímica	96
Figura 32A: Detecção de IL-8 nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde)	97
Figura 32B: Detecção de SDF-1 α nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde).	98
Figura 32C: Detecção de TGF- β nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde).	98
Figura 33: Expressão medida por qRT-PCR dos genes: <i>RUNX2</i> , <i>ALPL</i> , <i>COLLAGEN I</i> , <i>BGLAP</i> , <i>MCAM</i> , <i>ENG</i> , <i>HIF-1A</i> , <i>SDF1α</i> nas amostras ósteo-induzidas por 7 dias em normóxia e após hipóxia.	100

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Fatores de risco associados à necrose avascular óssea	24
Quadro 2: Origem e principais funções dos fatores de crescimento envolvidos na formação e reparo ósseo	30
Quadro 3: Relação de anticorpos primários e secundários usados na imunocitoquímica	60
Quadro 4: Apresentação dos kits de ELISA utilizados nas dosagens de citocinas nos sobrenadantes celulares	60
Quadro 5: Caracterização do grupo de estudo e respectivos dados laboratoriais	67
Tabela 1: Anticorpos utilizados na identificação imunofenotípica das CTMs	55
Tabela 2: Oligonucleotídeos sintéticos (iniciadores) utilizados para amplificação por qRT-PCR.	63

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	
LISTA DE QUADRO E TABELAS	
INTRODUÇÃO	
DOENÇAS FALCIFORMES: considerações gerais	16
FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS FALCIFORMES: da abordagem molecular às principais manifestações clínicas	17
NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL: visão geral	22
FISIOPATOLOGIA DA NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL	23
NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL: das alterações locais aos possíveis mecanismos de regeneração	26
ENVOLVIMENTO ÓSSEO NA DOENÇA FALCIFORME: enfoque na osteonecrose da cabeça femoral	31
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: aspectos moleculares, características funcionais <i>in vitro</i> e emprego na terapia celular <i>in vivo</i>	35
CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	38
PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FUNCIONAIS DAS CTMs EM CULTIVO: multipotencialidade e ação parácrina	40
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: APLICAÇÃO NA TERAPIA CELULAR	46
A INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NO COMPORTAMENTO DAS CTMs	48
OBJETIVOS	
OBJETIVO GERAL	51
OBJETIVO ESPECÍFICO	51
METODOLOGIA	
Obtenção da amostra biológica	51
Metodologia de fracionamento da medula óssea para obtenção de CMMO	52
Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias-Fibroblastóides (CFU-F) e Osteoblásticas (CFU-O)	53
Isolamento, cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais (CTM)	54
Criopreservação das CTM	54
Caracterização imunofenotípica e viabilidade celular em citômetro de fluxo	55
Ensaio de diferenciação celular <i>in vitro</i>	56
Deteção de Osteocalcina intracelular	57
Incubação em câmara de hipóxia	57
Ensaio de migração celular em câmara de Boyden	58
Imunofluorescência	59
ELISA	60
Isolamento de RNA	60
Síntese de cDNA	61
qRT-PCR	61
Análise Estatística	64
RESULTADOS	
Seleção dos pacientes e fracionamento da medula óssea para obtenção das células mononucleares	65
Avaliação do número de CFU-F na fração de CMMO em condições controle e hipóxia	65
Aspectos morfológicos após isolamento, cultivo e expansão das células-tronco mesenquimais	76
Avaliação da proliferação celular	76
Avaliação da viabilidade celular em citômetro de fluxo	80
Caracterização imunofenotípica por citômetro de fluxo	80
Ensaio da diferenciação celular <i>in vitro</i>	83
Deteção da Osteocalcina Intracelular	89
Ensaio de migração celular	93

Avaliação de marcadores celulares por imunofluorescência	95
ELISA	96
Análise da expressão gênica	98
DISCUSSÃO	101
CONCLUSÕES	109
PERSPECTIVAS	110
REFERÊNCIAS	110
MANUSCRITO	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA FALCIFORME: considerações gerais

Sob o termo de doenças falciformes estão descritas a homozigose da hemoglobina S, que configura a anemia falciforme (HbSS) e a associação desta proteína a outras hemoglobinas variantes (C, β^0 , β^+ , D, E) definindo assim outros importantes genótipos (HbSC, HbS β^0 , HbS β^+ , HbSD, HbSE) representativos da doença (CLEGG; WEATHERALL, 2001). A anemia falciforme e a HbS β^0 talassemia, confere um quadro de manifestações clínicas graves, com acometimento de órgãos-alvo e inflamação crônica sistêmica. Enquanto a hemoglobinopatia SC e HbS β^+ talassemia apresentam sinais clínicos mais brandos, apesar das manifestações clínicas existentes e morbidade significativa.

A doença falciforme foi relatada formalmente há cem anos, pelos médicos James Herrick e Ernest Irons, que notaram a presença de hemácias alongadas no esfregaço sanguíneo preparado a partir da amostra de um jovem paciente de origem caribenha, que apresentava sintomas como icterícia, fraqueza, dispnéia e úlceras de membros inferiores, conjunto de sinais, hoje, comuns ao diagnóstico clínico e laboratorial dos pacientes falciformes (SERJEANT, 2010).

Sabe-se que a doença falciforme é uma das condições clínicas de natureza monogênica mais comum do mundo. Essa desordem se apresenta como um problema de saúde pública relevante em 71% de 229 países mundiais. Acima de 330 mil crianças afetadas por hemoglobinopatias nascem anualmente, sendo 83% destas portadoras de desordens falciformes. Essas mesmas desordens são responsáveis por 3,4% do índice de óbitos em crianças até o quinto ano de vida (DARLISON; MODELL, 2008).

Em nosso país, o tráfico de escravos foi fator determinante para inserção do alelo β^S na população (NAOUM, 2000). A distribuição é heterogênea (Figura 1), com maior proporção nas regiões de maior miscigenação afro-descendente. Portanto, a frequência de heterozigotos para HbS é maior nas regiões norte e nordeste (6 a 10%), enquanto nas regiões sul e sudeste a prevalência é menor (2 a 3%). Estima-se o nascimento de uma criança com doença falciforme para cada mil recém-nascidos vivos (CANÇADO; JESUS, 2007).

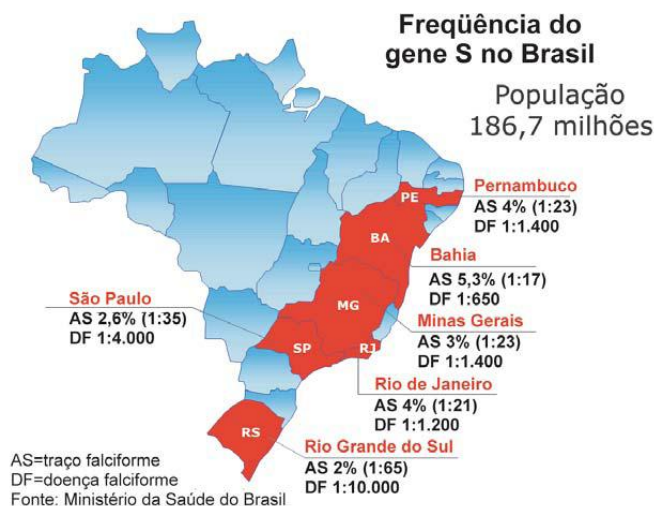


Figura 1- Freqüência do alelo β^S nas diferentes regiões do Brasil. (FONTE: CANÇADO; JESUS, 2007).

Mapeamento mais recente realizado entre os anos de 2001 e 2008, posiciona o estado da Bahia como líder no ranking nacional do número de casos de doença falciforme. A média de nascimentos no estado (1:700) supera o índice do país, que é de um para cada mil nascidos vivos portadores do gene S (APAE, 2008).

1.1.1. FISIOPATOLOGIA DAS DOENÇAS FALCIFORMES: da abordagem molecular às principais manifestações clínicas.

As doenças falciformes são provenientes de um distúrbio a nível molecular causado por uma única mutação (GAG \rightarrow GTC) no gene da β -globina, originando uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal A (HbA). Esta mutação leva à substituição de um ácido glutâmico por valina na posição 6 da cadeia beta, com conseqüente modificação da hemoglobina. Apesar de monogênica, a doença apresenta caráter multifatorial no contexto clínico expresso por uma grande diversidade de fenótipos (ZAGO; PINTO, 2007).

À nível molecular, a polimerização da hemoglobina S (HbS) é o evento primário indispensável na patogênese da doença falciforme. Este evento é dependente da concentração de HbS intra-eritrocítica, grau de desoxigenação celular, pH e presença da Hb fetal intracelular (HbF) (STUART; NAGEL, 2004).

Diferente das hemoglobinas A (HbA) e fetal (HbF), as moléculas de hemoglobina S, quando desoxigenadas, se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, os quais se associam em feixes dentro das hemácias, ocasionando a deformação característica em foice (ZAGO; PINTO, 2007).

Esse fenômeno conhecido como falcização, provoca múltiplas alterações na membrana da hemácia. Dentre as mais importantes estão o efluxo de potássio, aumento do cálcio intracelular e a exposição de moléculas de adesão da membrana celular. Todos esses efeitos somados levam à desidratação das hemácias, enrijecimento da membrana, maior adesão endotelial, processo inflamatório microvascular com envolvimento de leucócitos e plaquetas, depleção de óxido nítrico (NO) causando vasoconstricção, inflamação e ativação da cascata de coagulação (STEINBERG; BRUGNARA, 2003).

Todos os diferentes eventos envolvidos na patogênese culminam para a reação de vaso-occlusão devido à adesão endotelial aumentada acompanhada por processos inflamatórios crônicos e estresse oxidativo.

As interações anormais entre os eritrócitos e endotélio constituem fator iniciador no desenvolvimento de oclusões microvasculares na doença falciforme (ASLAN; FREEMAN, 2007).

Os eritrócitos falciformes expressam maior número de moléculas de adesão em relação aos eritrócitos normais. Diversas moléculas, solúveis ou localizadas na membrana, estão envolvidas no processo de adesão endotelial e com outras células, propagando o processo de vaso-occlusão (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009).

As hemácias expressam níveis aumentados de glicoproteínas do sistema de agrupamento sanguíneo Lutheran (LU) e LW, ligantes de alta afinidade à laminina, proteína da matriz endotelial. Além destas, há também a participação do ligante CD47, glicoproteína transmembrana derivada do sistema Rh presente nas hemácias, que funciona como receptor de trombospondina (TSP) que por sua vez permite a ligação do eritrócito ao endotélio e facilita a quimiotaxia de leucócitos (ASLAN; FREEMAN, 2007).

Os reticulócitos, células jovens presentes em grande quantidade no sangue periférico de pacientes falciformes, refletem a alta proliferação medular e desempenham papel importante no processo vaso-oclusivo. A ligação dos reticulócitos ao endotélio ocorre através dos receptores CD36 e a integrina VLA-4 (Very-Late-Activation-Antigen-4) aos seus respectivos ligantes trombospondina (TSP), VCAM-1 (molécula de adesão celular-vascular) e fibronectina existentes no leito endotelial ativado (KAUL; FINNEGAN; BARABINO, 2009).

Além das moléculas de adesão, as hemácias desidratadas e deformadas expõem na superfície a fosfatidilserina (PS), proteína carregada negativamente, que funciona como ligante entre a célula e o endotélio através de pontes de trombospondina ou receptor da vitronectina. A exposição da PS constitui um dos principais determinantes de aderência celular e da ativação da cascata de coagulação na crise vaso-oclusiva (CONRAN; COSTA, 2009).

A formação de multiagregados celulares, inerentes à patogênese da doença falciforme, envolve a participação de outras células além das hemácias e reticulócitos. Papel

fundamental é dado aos leucócitos na adesão endotélio-vascular, participação no estresse oxidativo e mecanismos inflamatórios (CONRAN; COSTA, 2009).

Os leucócitos parecem exercer papel multifatorial na vaso-oclusão, por serem células grandes e apresentarem relativa rigidez; o recrutamento destes para o leito microvascular reduz o fluxo sanguíneo local, após formação de agregados com hemácias falciformes e não falciformes, plaquetas, proteínas plasmáticas e moléculas de adesão na parede dos vasos sanguíneos (OKPALA, 2004).

Crises vaso-oclusivas recorrentes e isquemia tecidual induz uma resposta inflamatória contínua na doença falciforme. O processo de isquemia-reperfusão é dinâmico e responsável entre outras ações pelo recrutamento de leucócitos para circulação e sua migração através do endotélio para os tecidos lesados (KAUL *et al.*, 2009).

A ativação e migração dos leucócitos são induzidas por mediadores pró-inflamatórios como citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF encontradas em altos níveis no plasma dos pacientes falciformes. Esses fatores imunológicos ativam também as células endoteliais que respondem à influência aumentando a expressão de selectinas (E-selectina e P-selectina), moléculas de adesão celular vascular (VCAM-1) e moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) com função de ligantes leucocitários (ASLAN; FREEMAN, 2007).

Leucócitos ativados passam a expressar moléculas como CD36, CD64, integrinas, selectinas (L-selectina e ligante da P-selectina) que favorecem a adesão ao endotélio, recrutam plaquetas e outros leucócitos para o sítio de inflamação, além de secretarem espécies reativas de oxigênio provocando lesão tecidual (OKPALA, 2004).

A liberação de radicais de oxigênio altamente reativos causa dano oxidativo e toxicidade tecidual. Esse evento somado ao bloqueio mecânico exercido pelo agregado celular aumenta o risco de oclusão do lúmen, dano isquêmico órgão-alvo, dores e desenvolvimento das crises nos pacientes portadores da doença falciforme (OKPALA, 2004).

O sistema de coagulação apresenta alto grau de atividade nos pacientes falciformes. Fatores plasmáticos e plaquetas se mostram elevados nestes pacientes, mesmo em estado estável, piorando em eventos de crises agudas. Nesse ambiente, o Fator Tecidual (TF), componente da cascata de coagulação, se mostra elevado no plasma falciforme proveniente da produção pelas células endoteliais e monócitos ativados pela condição inflamatória crônica (HEBBEL *et al.*, 2009).

Nota-se ainda no processo vaso-oclusivo, o papel desempenhado pelas plaquetas e micropartículas plaquetárias no plasma dos pacientes falciformes.

As plaquetas estão aumentadas e ativadas na doença falciforme, o que confere maior expressão de moléculas de adesão ao endotélio, ligação a proteínas solúveis e formação de agregados heterocelulares (CONRAN; COSTA, 2009).

As plaquetas ativadas dos pacientes com doença falciforme expressam maior quantidade de P-selectina (CD62p), que favorece a ligação ao endotélio e aos neutrófilos via PSGL-1 (ligante da P-selectina) e a integrina CD61, receptor de vitronectina. Além disso, as plaquetas estimuladas pela presença das citocinas inflamatórias, liberam multímeros de von Willebrand estocados nos grânulos- α que favorecem a ligação entre outras plaquetas, endotélio e o eritrócito falciforme via receptor da vitronectina e receptor do complexo Gp1b-IX-V (ZAGO; PINTO, 2007).

É provável que o papel das plaquetas e fatores de coagulação, via interação direta ou via formação de agregados celulares contribuam para perpetuação da inflamação crônica e para a ativação endotelial na oclusão vascular presente na enfermidade (ASLAN; FREEMAN, 2007).

O estado inflamatório crônico associado à doença falciforme é decorrente de diversos fatores que se interligam e se retroalimentam, formando um ciclo inflamatório permanente (ZAGO; PINTO, 2007).

O endotélio exerce um papel crítico na propagação e perpetuação do estado inflamatório crônico na doença falciforme (CONRAN; COSTA, 2009).

A inflamação retratada na doença tem caráter sistêmico e multifatorial. Níveis aumentados de mediadores inflamatórios são vistos em pacientes falciformes tanto no estado basal quanto durante episódios vaso-oclusivos (HEBBEL *et al.*, 2009).

Eventos freqüentes de vaso-oclusão, processo de isquemia-reperfusão recorrente com conseqüente ativação e injúria endotelial vascular, induzem a uma resposta inflamatória contínua no indivíduo falciforme, que se potencializa pela produção elevada de citocinas pró-inflamatórias, suprimento de óxido nítrico reduzido e alto grau de estresse oxidativo (CONRAN *et al.*, 2009).

Episódios de isquemia-reperfusão são provenientes do processo reversível da vaso-oclusão e correspondem ao dano endotelial ou órgão-alvo, causado pela reoxigenação dos tecidos isquêmicos, pela produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxilas (OH) e peroxinitrato ($ONOO^-$), e conseqüente inflamação tecidual (CONRAN; COSTA, 2009).

Os danos causados por radicais oxidativos vão da peroxidação lipídica da membrana, destruição celular com hemólise aumentada até ativação nuclear do fator transcricional NF- κ B (ASLAN; FREEMAN, 2007). A ativação endotelial decorre como conseqüência do conjunto dessas ações e reflete na expressão exacerbada de moléculas de adesão, tais como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, que se ligam com maior afinidade aos agregados heterocelulares propiciando novos eventos vaso-oclusivos e propagação do ciclo de injúria-reperfusão (MACK *et al.*, 2008).

O estresse oxidativo apresenta grande relevância na patogênese falciforme. De acordo com Aslan e Freeman (2007) pacientes portadores da doença apresentam níveis plasmáticos aumentados de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como peróxido de hidrogênio e superóxidos, que supera o reduzido aporte antioxidante.

Isso pode ser atribuído a alta expressão de enzimas produtora de espécies reativas como a Xantina Oxidase (XO) e NADPH oxidase, encontradas respectivamente no endotélio vascular e nos leucócitos ativados, somada aos mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos reduzidos e ao potencial de auto-oxidação da hemoglobina S na presença de oxigênio (GRANGER; WOOD, 2007).

O estresse oxidativo exerce papel importante em inúmeros mecanismos patofisiológicos na doença falciforme, contribuindo para hemólise, adesão de eritrócitos, plaquetas e leucócitos ao endotélio, ativação da arginase com depleção de óxido nítrico (NO) e conseqüente prejuízo na vasodilatação sistêmica (CONRAN; COSTA, 2009).

A hemólise e estresse oxidativo contribuem, de forma sinérgica, ao promover danos vasculares na doença falciforme. Como resultado da hemólise crônica, a disponibilidade de NO é diminuída em virtude do seqüestro feito pela hemoglobina livre e EROs, somada a reduzida concentração de L-arginina plasmática, substrato usado na síntese de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MACK; KATO, 2008).

O óxido nítrico, por sua vez, regula o relaxamento dos vasos e também possui ação antioxidante, antitrombótica e redutora da adesão endotelial (KRAJEWSKI *et al.*, 2008).

Atua ainda como potente antagonista da inflamação. Este efeito é em parte atribuído a ativação do inibidor do fator transcricional NF- κ B (I κ B α), e a estabilização do complexo NF- κ B/ I κ B α . O fator transcricional NF- κ B regula a expressão de uma variedade de genes envolvidos na resposta inflamatória, tais como a apresentação de moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina) no endotélio ativado (ASLAN; FREEMAN, 2007).

Portanto, a conseqüente redução da biodisponibilidade de NO facilita a vasoconstrição e aumenta a ativação plaquetária, assim como a função das moléculas de adesão endoteliais, eritrocitárias e em leucócitos, culminando com o estabelecimento do processo da vaso-occlusão freqüentemente observado na doença falciforme (CONRAN *et al.*, 2009).

Os fenômenos vaso-oclusivos são caracterizados como obstruções microvasculares em um ou mais locais, acompanhada de inflamação, dor e incapacitando o paciente na execução das atividades laborais.

As oclusões microvasculares atingem áreas específicas como ossos longos, quadris, esterno, coluna vertebral e pélvis, normalmente com envolvimento em múltiplos locais. Os mediadores inflamatórios ativam os nervos aferentes nociceptivos, evocando por sua vez a resposta dolorosa (STUART; NAGEL, 2004).

Além das manifestações clínicas categorizadas em subfenótipo vaso-oclusivo, existem ainda inúmeras complicações vasculopáticas associadas ao subfenótipo da hemólise vascular aumentada e seqüestro de NO. Dentre as principais manifestações do fenótipo da hiperhemólise, pode-se elencar o priaprismo, úlceras maleolares, hipertensão pulmonar e acidente vascular cerebral (KATO *et al.*, 2007).

1.2. NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL: visão geral

Necrose avascular óssea, também conhecida como necrose asséptica ou isquêmica são algumas denominações dadas à síndrome clínica descrita como osteonecrose. Conceitualmente, necrose avascular é definida como necrose massiva do osso ou medula óssea, com envolvimento sistêmico multifocal, geralmente relacionada a fatores de risco específicos e achados radiológicos confirmatórios (LAFFORGUE, 2006).

Considerando a distribuição anatômica vascular, a cabeça femoral é uma das regiões com maior susceptibilidade ao aparecimento da necrose isquêmica. A morte celular e a destruição dos elementos medulares são acompanhadas pela deposição de um tecido granulomatoso com potencial regenerativo limitado, favorecendo ao aparecimento do colapso ósseo e destruição da cartilagem com perda da função e mobilidade do órgão afetado (KERACHIAN *et al.*, 2006).

A osteonecrose da cabeça femoral é uma desordem comum, com índice de novos casos variando entre 15 a 20 mil por ano nos Estados Unidos. É responsável por até 18% dos procedimentos de artroplastia total de quadril, realizados anualmente na América do Norte (JONES *et al.*, 2008).

A doença é prevalente em adultos jovens, parcela economicamente ativa da população, sendo que 30-70% destes apresentam osteonecrose bilateral com maior incidência ao redor dos 40 anos de idade (SODY; KIRCHHOFF, 2008).

Embora a etiologia da doença ainda não esteja elucidada, inúmeros fatores de risco estão envolvidos na patogênese, tais como uso de corticosteróides em alta concentração, alcoolismo, vasculites, tromboembolismo, trauma mecânico, doenças auto-imunes, coagulação intravascular, cicatrização óssea, aumento da pressão intracortical, hemorragia intramedular e hemoglobinopatias (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

Atualmente, tem-se o conceito de que a necrose avascular é o resultado final de uma combinação de fatores mecânicos e biológicos que levariam a circulação intra-óssea da cabeça femoral a um quadro isquêmico, seja decorrente de fenômenos tromboembólicos ou pela estase venosa por diminuição do fluxo sanguíneo.

A história natural da osteonecrose é variável, mas depende primariamente do tamanho da lesão do segmento infartado e seu local de ocorrência. A dor geralmente é insidiosa com

graus de intensidade variando entre leve a intensa principalmente na região trocantérica, aumentada após sobrecarga durante a deambulação (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

O tratamento da necrose avascular deve se basear em um diagnóstico precoce, no consistente estadiamento da doença, na eliminação dos fatores de risco bem como na tentativa de preservar ao máximo a cabeça femoral. As alternativas terapêuticas são paliativas e variam entre ações farmacológicas para alívio das dores até intervenção cirúrgica nas fases mais complicadas.

O tratamento conservador inicia-se com a prevenção e afastamento ou diminuição de todos os fatores de risco. O controle dos sintomas que inclui a proteção contra a sobrecarga de peso nas articulações, o uso de antiinflamatórios não-hormonais, analgésicos, estatinas, bifosfonatos, oxigenação hiperbárica e fisioterapia, além da observação sistemática desse quadril (ORBAN *et al.*, 2009).

Considerando a osteonecrose uma doença progressiva, a terapia conservadora não impede sua evolução para o desgaste total das articulações e perda da esfericidade da cabeça femoral. Sendo assim, ao longo do tempo a necessidade de intervenções cirúrgicas se torna imperativa.

Devido à maior frequência de eventos em pacientes jovens, intervenções que preservem a cabeça femoral ou retardem a artroplastia são bem quistas. Entre esses procedimentos, está a osteotomia, descompressão do centro da necrose e enxertos ósseos (ORBAN *et al.*, 2009)

Em suprimento às diversas falhas nos tratamentos já existentes, a terapia celular desponta como nova opção conservativa, baseada nas propriedades regenerativas das células progenitoras e seus benefícios naturais na reversão da lesão isquêmica do tecido ósseo (JONES *et al.*, 2008).

Geralmente os procedimentos envolvendo células-tronco autólogas são pouco invasivos e apresentam baixa morbidade, além disso, oferecem a vantagem da manutenção da arquitetura original da cabeça do fêmur, portanto se torna a melhor alternativa para tratamento da necrose avascular em estágios iniciais em pacientes jovens (JONES *et al.*, 2008).

1.2.1. FISIOPATOLOGIA DA NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL

A necrose avascular é uma entidade clínica multifatorial e etiologicamente indefinida. Terminalmente é manifestada pela morte de células ósseas causada pelo prejuízo no suprimento vascular relacionado a variáveis traumáticas ou não-traumáticas (KERACHIAN *et al.*, 2006).

Devido à morte do tecido ósseo, o processo de reparo se torna prejudicado, refletindo no aparecimento de eventuais alterações na estrutura óssea, levando ao colapso, dores nas articulações e perda da mobilidade (KERACHIAN *et al.*, 2006).

Geralmente é desencadeada por uma série de fatores de risco, sendo denominada necrose avascular secundária (Quadro 4). Porém em alguns casos, não há relação com uma condição específica e assim é considerada necrose avascular primária ou idiopática (ORBAN *et al.*, 2009).

Quadro 1- Fatores de risco associados à necrose avascular óssea (FONTE: adaptado de ASSOULINE-DAYAN <i>et al.</i>, 2002).			
Secundária a:			
Traumas	Enfermidades intestinais	Desordens vasculares/tecido conjuntivo	
Fratura da cabeça femoral	Doenças inflamatórias crônicas intestinais	LES	
Epifisiólise	Pancreatites	Polimiosite	
Deslizamento do colo femoral	Neoplasias	Polimialgia Reumática	
Compressão da epífise	Desordens infiltrativas da medula	Doença de Reynaud	
Queimaduras	Doenças infecciosas	AR	
Trauma vascular	HIV	Espodilite Anquilosante	
Enfermidades hematológicas	Osteomielite	Síndrome de Sjogren	
Doença falciforme	Meningococemia	Arterite de células gigantes	
Talassemias	Fatores ambientais	Tromboflebite	
Policitemia vera	Alcoolismo	Embolia gordurosa	
Coagulação intravascular disseminada	Condições disbáricas (síndrome de Caisson)	Síndrome de Ehler- Danlos	
Hemofilia	Fumo	Iatrogênicos	
Distúrbios endocrinológicos/metabólicos	Problemas Ortopédicos	Corticoterapia	
Hipercolesterolemia/Hipertrigliceridemia	Gestação	Exposição à radiação	
Gota	Doença de Cushing	Hemodiálise	
Hiperparatireoidismo	Falência renal crônica	Cirurgia à laser	
Diabetes associada a obesidade	Doença de Gaucher	Primária (Idiopática)	
		Transplante de órgãos	

Independente dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da patologia, a isquemia óssea é o mecanismo final, a qual pode estar relacionada com injúria direta (necrose pós-trauma), obliteração luminal nos vasos (vasculopatias e tromboembolia) e extraluminal na medula óssea (Figura 2) (LAFFORGUE, 2006).

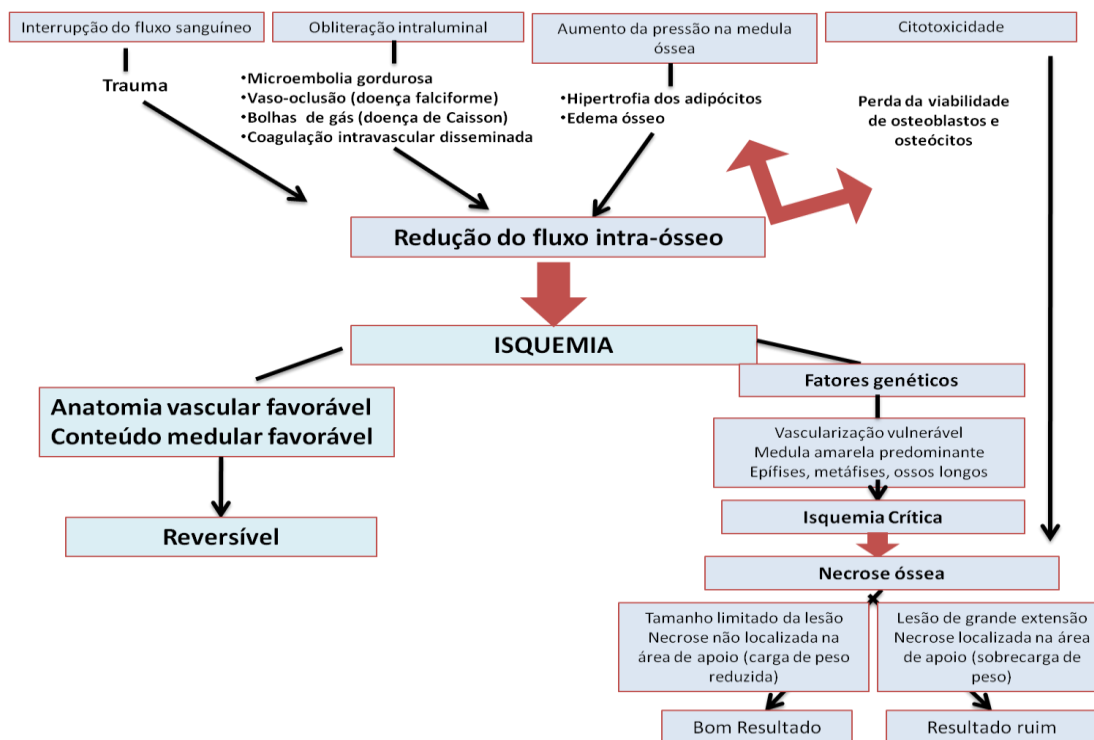


Figura 2- Diagrama ilustrativo da fisiopatologia da necrose avascular óssea (FONTE: adaptado de LAFORGUE, 2006).

Além das hipóteses existentes, o possível comprometimento das células-tronco mesenquimais e ósseas, na região da osteonecrose, poderia contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença.

Em trabalho realizado por Hernigou e Beaujean (1997), foram detectadas anormalidades na medula óssea obtida da crista ilíaca dos pacientes portadores de osteonecrose da cabeça femoral. Nesse estudo verificou-se que o número de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-Fs), correspondente à quantidade de células-tronco mesenquimais que potencialmente originariam osteoblastos maduros, se mostrou menor em pacientes portadores de osteonecrose.

Em estudo posterior, Hernigou e colaboradores (1999) investigaram o comportamento celular na região vizinha à área acometida pela necrose na cabeça femoral. A medula foi obtida através da punção das áreas proximal e intertrocanter do fêmur. O número de CFU-Fs estava reduzido nos pacientes portadores de osteonecrose após corticoterapia em comparação aos pacientes pertencentes ao grupo controle. Resultados sugerem que a ausência de células-tronco mesenquimais no local prejudica a regeneração óssea e leva ao mal prognóstico com conseqüente colapso da cabeça femoral.

Além do número insuficiente de progenitores osteogênicos na região da necrose, a atividade e potencial de diferenciação óssea das células-tronco mesenquimais são fatores relevantes para o desenvolvimento da doença.

A diferenciação anormal das células-tronco mesenquimais tem participação na patofisiologia da osteonecrose não-traumática e essa incapacidade pode variar conforme o fator de risco iniciador da doença (LEE *et al.*, 2006).

Histologicamente nota-se na osteonecrose a morte celular, devido à falta do suprimento sanguíneo. Esse comprometimento vascular é atribuído a alguns mecanismos como: injúria ou pressão excessiva em artérias, interferência mecânica do suprimento arterial e/ou obstrução do fluxo venoso (CHILDS, 2005).

Todos estes eventos levam à interrupção circulatória e conseqüente hipóxia às estruturas ósseas. A hipóxia persistente têm ação direta sobre as células ósseas, levando ao aumento da permeabilidade da membrana celular aos fluidos externos e a perda de eletrólitos para o meio. O conteúdo intracelular é extravasado e as enzimas são liberadas precipitando a autodigestão e a destruição das demais células ósseas e endoteliais (CHILDS, 2005).

Nos primeiros dias após o insulto ósseo-vascular, mudanças histológicas mínimas podem ser notadas. Após algumas semanas, o tecido de granulação inflamatório se desenvolve na interface entre o tecido necrótico e saudável com conseqüente calcificação (LAFFORGUE, 2006).

O processo de reabsorção e remodelamento do osso trabecular morto, conhecido como “substituição insidiosa” confere a fragilidade ao tecido. A tentativa de reparo é prejudicada devido à neovascularização limitada e remodelamento ósseo comprometido, o que leva ao surgimento do colapso subcondral e degeneração das superfícies cartilaginosas adjacentes (CHILDS, 2005).

O resultado final é a necrose persistente, perda das propriedades biomecânicas, aparecimento de microfraturas decorrentes do estresse e sobrecarga de peso, ocasionando dor incapacitante e deformidade epifiseal irreversível (LAFFORGUE, 2006).

Inúmeros mecanismos fisiopatológicos que propiciam isquemia óssea têm sido postulados para a osteonecrose, porém nenhum deles pode explicar a incapacidade no reparo ósseo após a instalação da lesão e sua evolução para o colapso e osteoartrites.

Cientes dos fatores de risco predisponentes ao aparecimento da doença, os profissionais de saúde podem assistir aos pacientes nas fases iniciais, evitando assim pior prognóstico e complicações irreversíveis.

1.2.2. NECROSE AVASCULAR DA CABEÇA FEMORAL: das alterações locais aos possíveis mecanismos de regeneração.

O termo “necrose avascular” geralmente se refere à necrose óssea relacionada a fatores sistêmicos, dos quais o paradigma é a necrose avascular da cabeça femoral (LAFFORGUE, 2006).

A circulação limitada nas epífises ósseas aponta para a alta incidência de osteonecrose na cabeça femoral. As epífises dos ossos longos são cobertas por tecido cartilaginoso avascular. Como resultado, o suprimento sanguíneo é inexistente nestas áreas que se tornam susceptíveis à insuficiência circulatória (BOSS; BEJAR; PELED, 2005).

Assim como ocorre nas epífises dos diversos ossos longos, a deficiência circulatória na cabeça femoral compromete o processo de regeneração óssea dependente da vascularização e distribuição normal de oxigênio no local.

Diferenças cruciais são notadas ao comparar a substituição do tecido morto por células viáveis após uma fratura óssea e um evento necrótico avascular (BOSS; MISSELEVICH, 2003).

O processo de reparo relacionado a uma fratura óssea tem como característica a liberação de fatores de crescimento e citocinas que ativam macrófagos e osteoclastos para reabsorção de detritos necróticos e estimula a fibrogênese, angiogênese, condrogênese e osteogênese (BOSS; MISSELEVICH, 2003).

A osteogênese, formação do tecido ósseo, é fortemente estimulada durante as injúrias tais como as fraturas. Diferente da regeneração em outros tecidos e órgãos humanos, o processo de reparo no sistema ósseo ocorre com a formação de um novo tecido ao invés da cicatrização fibrosa. E esse reparo típico do sistema ósseo adulto é semelhante à organogênese, processo de desenvolvimento tecidual embrionário, ao envolver a formação do calo ósseo através da combinação da ossificação endocondral e intra-membranosa (DESCHASEAUX; SENSEBÉ; HEYMANN, 2009).

O reparo das fraturas pela produção do calo ósseo ocorre em quatro etapas seqüenciais: formação do hematoma, formação do calo tênue, formação do calo rígido e remodelamento ósseo (Figura 3) (CARANO; FILVAROFF, 2003).

O estímulo inicial é a injúria no osso e o conseqüente comprometimento vascular que leva à ativação da cascata de coagulação com a formação de um hematoma que bloqueia a área da fratura, funcionando como um coágulo tampão (CARANO; FILVAROFF, 2003).

Em seguida, células inflamatórias, ósteo-progenitores e fibroblastos são recrutados para o local. A liberação de fatores de crescimento, citocinas e agentes inflamatórios por essas células exercem papel essencial na angiogênese e reparo local (CARANO; FILVAROFF, 2003).

Por fim, após a fase aguda inflamatória, sucede a deposição do tecido de granulação que é gradualmente substituído pela cartilagem fibrosa nas epífises ósseas, enquanto no periósteo inicia-se a formação direta da matriz ou ossificação intramembranosa (calo externo) (CARANO; FILVAROFF, 2003).

A ossificação prossegue com a deposição de cálcio e hidroxiapatita formando o tecido lamelar contínuo em substituição ao calo ósseo pré-existente, o tamanho do calo ósseo é

reduzido gradualmente e o suprimento vascular reestabelecido no local afetado, caracterizando então a última etapa do reparo denominada remodelamento ósseo (CARANO; FILVAROFF, 2003).

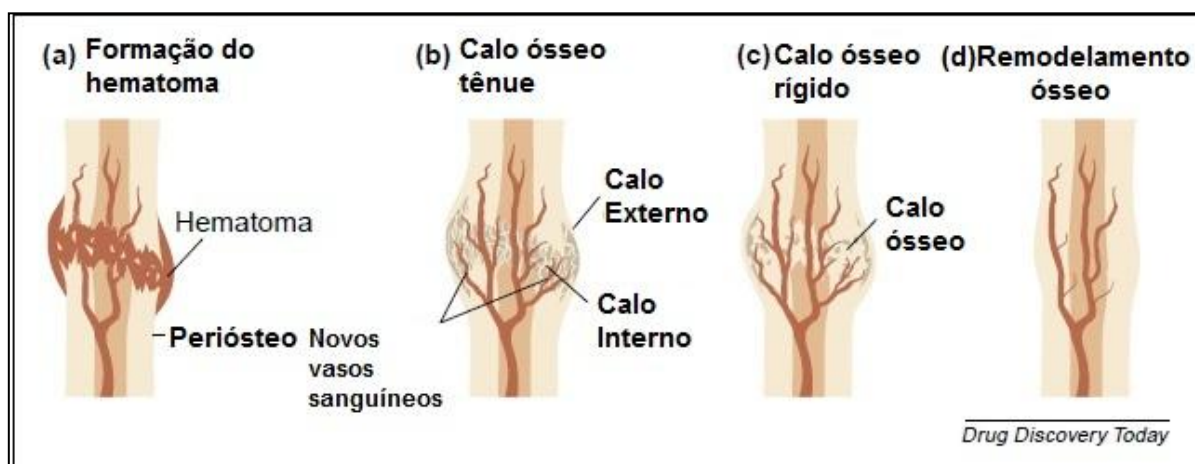


Figura 3- Estágios do reparo ósseo após fratura. (FONTE: adaptado de CARANO; FILVAROFF, 2003).

Em modelos animais de necrose avascular induzida, verifica-se que a regeneração óssea, após o evento isquêmico, difere em alguns aspectos do reparo após fratura comum.

No osso avascular, o tecido morto é substituído por células viáveis através de um processo lento e ineficaz denominado “substituição insidiosa” (BOSS; BEJAR; PELED, 2005).

A sobreposição gradual do tecido necrótico por células ósseas vivas na região avascular envolve fases interligadas. A infiltração neutrofílica caracteriza a fase aguda em tempo curto; a qual é seguida pela fase crônica representada pela invasão dos macrófagos e osteoclastos que lentamente farão a reabsorção do tecido necrótico local (BOSS; BEJAR; PELED, 2005).

Após alguns dias ou semanas, o tecido de granulação se desenvolve na interface entre o osso saudável e necrótico, e secundariamente inicia a calcificação. Essa resposta fisiológica é positiva na contenção da lesão e promoção da regeneração, porém apresenta efetividade limitada na necrose avascular (LAFFORGUE, 2006).

A neovascularização é inadequada e o remodelamento ósseo é extremamente limitado e restrito ao local acometido. O resultado final é a persistência de um tecido frágil e com propriedades mecânicas anormais, susceptível a fraturas por estresse ou sobrecarga, o que pode levar a dores incapacitantes e deformidade epifiseal irreversível (LAFFORGUE, 2006).

Em descrição anatômica normal, verifica-se nos ossos a presença de múltiplas artérias internas e veias externas responsáveis pela manutenção vascular tecidual (JOHNSON *et al.*, 2004).

O sangue rico em oxigênio entra nos ossos longos através de quatro artérias principais que são interligadas por uma rica rede vascular anastomizada: artéria-nutriente, periosteal, metafiseal e epifiseal, denominadas conforme a localização e região de suprimento (LAROCHE, 2002).

A vascularização existente no fêmur, em especial, pode ser classificada em nível de macrocirculação (conexão com a circulação sistêmica) e microcirculação no osso cortical, medular e esponjoso (JOHNSON *et al.*, 2004).

Em geral, a microcirculação medular é fechada, com ampla anastomose em rede de sinusóides medulares, os quais apresentam membrana interna altamente permeável composta por uma única camada de células endoteliais, suportadas em parte por uma membrana vascular (adventícia), pericitos e células reticulares (JOHNSON *et al.*, 2004).

Essa rede vascular fornece os nutrientes e fatores indutores necessários para o estímulo de células mesenquimais e condrócitos respectivamente à osteogênese e condrogênese, de forma a manter um centro de ossificação funcional. Portanto, o desenvolvimento dessa rede de vasos é essencial para a homeostase óssea (OREFFO; KANCZLER, 2008).

Nas regiões normalmente vascularizadas, a osteogênese relacionada ao remodelamento ósseo ao longo da vida adulta é beneficiada, diferente do processo encontrado na necrose avascular da cabeça femoral.

Angiogênese e osteogênese estão intimamente acopladas durante o desenvolvimento e regeneração óssea. Os vasos suprem oxigênio e fornecem moléculas críticas para estimulação da diferenciação óssea das células mesenquimais no estroma medular (CLEMENS *et al.*, 2009).

Durante a cicatrização de feridas e reparo dos tecidos isquêmicos, células endoteliais e precursores participam ativamente no processo de regeneração. Os principais fatores angiogênicos incluem *Fibroblast Growth Factor* (Fator de crescimento de Fibroblastos – FGF), *Platelet-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado de Plaquetas- PDGF) e *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de crescimento endotelial vascular- VEGF), todos também envolvidos no processo de osteogênese e reconstrução óssea (MOONEY; HSIONG, 2006).

A angiogênese assim como a estimulação mecânica constitui uma pré-condição para indução na regeneração óssea. Os fatores angiogênicos, com destaque para o VEGF são reguladores das atividades dos osteoblastos e osteoclastos ao longo do processo de formação e remodelamento ósseo (MOONEY; HSIONG, 2006).

Osteoblastos e osteoclastos possuem receptores para VEGF, como também produzem este fator em resposta a vários estímulos ou ao próprio fator secretados (CARANO; FILVAROFF, 2003).

Além disso, o VEGF também induz a produção óssea *in vitro* e *in vivo*, com atividade atribuída em parte ao recrutamento e estimulação dos osteoblastos. A inibição do VEGF, ao contrário, diminui a diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (CARANO; FILVAROFF, 2003).

Outros fatores osteo-indutores cruciais no desenvolvimento embrionário, reparo e formação óssea são pertencentes à superfamília das proteínas morfogenéticas do *Transforming Growth Factor-β* (Fator de crescimento e transformação- TGF-β), que incluem proteínas estruturalmente e funcionalmente relacionadas, tais como TGF-β e *Bone Morphogenetic Protein* (Proteína morfogenética óssea - BMP) (MOONEY; HSIONG, 2006).

O TGF-β é encontrado em muitos tecidos, mas em maior quantidade no osso, cartilagem e plaquetas. Esse fator influencia inúmeras atividades celulares, incluindo desde o crescimento, diferenciação até síntese da matriz extracelular. É liberado pelas plaquetas após formação do coágulo no momento do reparo de fraturas osseas. E está provavelmente envolvido com a formação do tecido periosteal no período inicial pós-fratura. Seu efeito pleiotrópico principal é a estimulação da proliferação de células-tronco mesenquimais. (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002).

Quanto à ação das proteínas BMPs pertinentes à superfamília do TGF-β, destacamos as BMP-2, BMP-4 e BMP-7, que são conhecidas pela participação na cicatrização óssea através da estimulação da diferenciação osteo-condrogênica das células progenitoras mesenquimais (LIEBERMAN; DALUISKI; EINHORN, 2002). Além destes fatores angiogênicos e osteocondutores, existem ainda outras proteínas com potenciais semelhantes cujo papel na regeneração óssea é fundamental. As principais estão relacionadas no quadro abaixo:

Quadro 2- Origem e principais funções dos fatores de crescimento envolvidos na formação e reparo ósseo		
FATOR	FONTES	FUNÇÃO
Insulin-like growth factors (IGFs)	Osteoblastos, condrócitos e matriz óssea	Promove a proliferação e diferenciação de osteoprogenitores.
Fibroblast growth factors (FGF)	Macrófagos, células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos	Estimulam a proliferação de células mesenquimais, condrócitos e osteoblastos. Participam da angiogênese.
Platelet-derived growth factor (PDGF)	Plaquetas, células endoteliais, monócitos e osteoblastos	Atua como mitógeno para células mesenquimais e osteoblastos. Promove a quimiotaxia de macrófagos.
Epithelial-growth factor (EGF)	Células epiteliais e fibroblastos	Induz o desenvolvimento de células endoteliais. Estimula a angiogênese.

A formação óssea contínua depende da cooperação de inúmeros fatores, tais como: tipos celulares específicos (Ex: células-tronco mesenquimais, progenitores endoteliais e osteoclastos), matriz extracelular e componentes para ossificação, expressão de moléculas

solúveis (citocinas, fatores de crescimento, hormônios e vitaminas) e vários estímulos mecânicos (DESCHASEAUX; SENSEBÉ; HEYMANN, 2009).

1.2.3. ENVOLVIMENTO ÓSSEO NA DOENÇA FALCIFORME: enfoque na osteonecrose da cabeça femoral.

Alterações ósseas são comumente encontradas em pacientes portadores da doença falciforme. As inúmeras manifestações se apresentam na forma de eventos agudos, tais como crises de dor e osteomielite, e/ou crônicos, com incapacidade e perda da mobilidade, presentes na necrose óssea avascular.

Clinicamente, dores intensas, provenientes dos fenômenos vaso-oclusivos isquêmicos, são compartilhadas entre as diversas complicações ósseas. O mecanismo desencadeante da dor é sempre complexo e heterogêneo consoante o local de ocorrência. Topograficamente, as lesões ocorrem em regiões pouco vascularizadas e com maior vulnerabilidade à vaso-oclusão, tais como cavidade medular e epífises ósseas (ZAGO; PINTO, 2007).

Crises vaso-oclusivas recorrentes acometem a todos os pacientes falciformes desde a infância até a vida adulta com conseqüente injúria em diversos órgãos e inflamação crônica. Entre as desordens ósseas ocasionadas por processos isquêmicos, a osteonecrose representa a entidade clínica mais preocupante quanto à gravidade e a piora progressiva (ZAGO; PINTO, 2007).

Teorias são propostas para os mais diversos estímulos desencadeantes da osteonecrose. Porém, os mecanismos envolvidos na patogênese da necrose avascular da cabeça femoral na doença falciforme ainda não estão totalmente esclarecidos.

A osteonecrose na doença falciforme é decorrente de eventos vaso-oclusivos freqüentes que resultam no infarto das superfícies articulares e cabeça de ossos longos como fêmur e úmero (ALMEIDA; ROBERTS, 2005).

É uma das complicações ósseas mais comuns com incidência variando entre 10-30% nos pacientes falciformes e geralmente apresenta acometimento bilateral (ACURIO; FRIEDMAN, 1992). A doença é mais prevalente entre os genótipos SS e SC, podendo também ocorrer em pacientes com co-herança de genes para talassemias alfa ou beta (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

Marcadores de risco como a co-herança do traço alfa-talassêmico, valor de hematócrito elevado, baixo nível de hemoglobina fetal e crises de dores freqüentes estão positivamente associados com a osteonecrose. Atividade fibrinolítica reduzida, ativação da coagulação e alta viscosidade sanguínea estão relacionadas ao aumento de eventos vaso-oclusivos que podem predispor à necrose avascular da cabeça femoral (AKINYoola *et al.*, 2009).

Considerando a osteonecrose na doença falciforme como uma desordem sistêmica, nenhum dos marcadores biológicos sozinhos pode explicar as diferenças na expressão clínica e prognóstico destes pacientes. Provavelmente, existam outros elementos que contribuam para o surgimento dessa manifestação óssea.

Em virtude da diversidade clínica e gravidade das complicações entre os pacientes falciformes, estudos atuais baseados em técnicas de biologia molecular têm sido realizados visando detectar genes, polimorfismos e moduladores genéticos determinantes do risco para cada comorbidade (DRISS *et al.*, 2009).

Em estudo conduzido por Moreira Neto et al (2006), foi avaliada a possível correlação entre o polimorfismo do gene da enzima Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR) 677 C>T e a frequência de complicações vasculares em pacientes falciformes. O total de 54 pacientes falciformes, apresentando necrose avascular, acidente vascular cerebral, síndrome torácica aguda e retinopatia, foi avaliado e destes 1,8% apontaram homozigose para o polimorfismo estudado, enquanto 34% mostraram heterozigose para este gene. A presença do MTHFR C677T foi associada com a ocorrência de comprometimento vascular nas manifestações estudadas, porém não houve associação quando cada complicação foi considerada separadamente.

Complicações vasculares são provenientes de episódios vaso-oclusivos, que define um dos subfenótipos (vaso-oclusão) envolvidos na patogênese da doença falciforme. Neste subfenótipo figuram algumas comorbidades como a síndrome torácica aguda, crises de dor e necrose avascular óssea. Estudos genéticos mostram que esses fenótipos parecem ser modulados por polimorfismos em genes que estão envolvidos na inflamação, interação celular, moduladores de estresse oxidativo e na biologia do óxido nítrico (DRISS *et al.*, 2009).

Em coorte realizada por Baldwin et al (2005), foi hipotetizado que a presença ou ausência de osteonecrose em pacientes falciformes seria influenciada pela variabilidade genética em genes expressos nos tecidos vascular e ósseo. Para essa avaliação, os autores analisaram a possível correlação entre o fenótipo da osteonecrose e polimorfismos em 66 genes envolvidos na função vascular, estresse oxidativo, inflamação e biologia endotelial. Os resultados apontaram sete polimorfismos nos genes BMP6, TGFBR2, TGFBR3, EDN1, ERG, KL, ECE1 e ANXA2 com destaque para os genes Klotho (KL), Anexina A2 (ANXA2) e Proteína morfogênica óssea 6 (BMP6) com maior associação significativa com a osteonecrose nos pacientes falciformes. Esses genes são importantes na morfologia óssea, metabolismo e doenças vasculares. Os resultados do estudo podem prover informações sobre a patogênese da necrose avascular e mapeamento dos pacientes com maior risco de desenvolvimento da doença.

Pacientes sintomáticos compartilham de sinais como fortes dores e perda da mobilidade das articulações afetadas. Em grau avançado, a osteonecrose da cabeça femoral pode ser facilmente diagnosticada em imagens radiográficas que mostram achatamento da cabeça do fêmur, área subcondral lucente e destruição das superfícies articulares (ALMEIDA; ROBERTS, 2005).

A osteonecrose sintomática na doença falciforme tem progressão clínica e radiográfica substancial dentro de um curto período de tempo. E quando não tratada pode evoluir com o colapso da cabeça femoral, condição irreversível, em menos de cinco anos após aparecimento dos primeiros sinais (HERNIGOU *et al.*, 2003).

As terapias existentes são paliativas, escassas, dispendiosas e não regenerativas. Atualmente, a técnica padrão empregada é a descompressão óssea, um processo agressivo e limitado que alivia as dores ósteo-articulares apenas no estágio inicial, mas não é eficaz na remissão da lesão de acordo com achados radiológicos (STYLES *et al.*, 1996).

A descompressão óssea apenas retarda o tempo de intervenção cirúrgica (artroplastia) e não impede a progressão quando realizada em pacientes em estágio mais avançado (MUKISI; BASHOUN; BURNY, 2009).

O agravamento da necrose avascular da cabeça do fêmur é rápido e em última instância exige tratamento cirúrgico representado pela artroplastia total de quadril.

A artroplastia é uma técnica que propõe a substituição completa da região necrosada por próteses ou implantes artificiais. As próteses implantadas apresentam meia-vida encurtada relativa à mobilidade e função do órgão substituído, o que exige inúmeras revisões e eventuais intervenções para reposicionamento da prótese deslocada (JONES *et al.*, 2008).

Além do alto custo, as artroplastias oferecem alto risco de morbi-mortalidade aos pacientes falciformes, pois consistem num processo invasivo em que se expõe o doente falciforme a eventuais complicações trombóticas, contaminações secundárias e necessidade de transfusões sanguíneas (ACURIO; FRIEDMAN, 1992).

Diferente das alternativas paliativas supracitadas, a terapia celular propõe a recuperação ou substituição completa dos tecidos lesados, através da capacidade pluripotente das células progenitoras mesenquimais e/ou seus efeitos parácrinos na secreção de fatores de crescimento e angiogênicos (JONES *et al.*, 2008).

Baseados nas propriedades regenerativas e modulatórias das células-tronco mesenquimais, estudos prospectivos vêm sendo realizados com uso autólogo da fração de células mononucleares da medula óssea para o tratamento da osteonecrose na doença falciforme.

Estudo inicial conduzido por Hernigou et al (2002) verificou-se a eficácia da injeção autóloga de células mononucleares obtidas da medula óssea em pacientes submetidos à terapia de descompressão padrão. O seguimento envolveu 116 pacientes portadores de osteonecrose por diferentes fatores etiológicos. O aspirado medular, proveniente de punção na crista íliaca

superior, foi submetido à centrifugação específica para redução de volume e concentração das células progenitoras antes da injeção local. O material resultante era analisado quanto à celularidade (quantidade das células progenitoras estromais) e posteriormente injetado após a descompressão óssea. Os resultados foram analisados sob os aspectos radiográficos, redução dos sintomas de dor, recuperação da mobilidade e função da articulação afetada. Os benefícios da técnica foram evidentes nos estágios iniciais da necrose avascular e foram atribuídos ao maior número de células progenitoras mesenquimais transplantadas para região da necrose. Pacientes que tinham maior número de progenitores transplantados tinham melhor resultado regenerativo.

O reduzido número de células progenitoras com potencial osteogênico associado à alteração na vascularidade medular na região da necrose estão correlacionados à patogênese da osteonecrose da cabeça do fêmur. A diminuição das células mesenquimais na região proximal da necrose femoral, em decorrência da isquemia local, impede a recuperação completa do tecido comprometido e determina a evolução negativa com a perda da arquitetura da cabeça femoral (HERNIGOU *et al.*, 1999). Visando suprir esse déficit celular e restaurar a vasculatura comprometida, o uso de células progenitoras estromais consiste em uma modalidade terapêutica reparadora que preserva a integridade da cabeça femoral evitando a progressão para o colapso (HERNIGOU *et al.*, 2009).

Seguimento prospectivo realizado, entre os anos de 1980 e 1987, acompanhou a evolução natural da osteonecrose em pacientes falciformes após o início dos primeiros sintomas. O estudo observacional avaliou 64 pacientes, totalizando 92 quadris com diferentes estágios de gravidade da osteonecrose (estágio I a IV) pela classificação de Steinberg. Com o final do seguimento, análises da progressão clínica e radiográfica mostraram colapso em 87% dos quadris anteriormente classificados nos estágios I e II no início do estudo. Esses achados sugeriram que procedimentos operatórios conservativos devem ser instituídos nos estágios iniciais da doença, na tentativa de prevenir o agravamento da necrose e a conseqüente artroplastia total de quadril (HERNIGOU *et al.*, 2003).

Para reverter o curso natural da necrose vascular secundária à doença falciforme, recente estudo intervencionista propôs o transplante autólogo de células-tronco presentes na fração de células mononucleares da medula óssea para tratamento da osteonecrose seguida da técnica usual de descompressão. Nessa série, foram avaliados 116 pacientes sintomáticos, sendo 38 destes portadores da osteonecrose secundária à doença falciforme, em estágios I (24 quadris) e II (32 quadris) pela classificação de Steinberg. Resultados comparativos mostraram que apenas 12,5% das necroses em estágio inicial evoluíram para colapso após injeção autóloga, diferente dos dados em estudo anterior sem intervenção terapêutica em que 87% evoluíram para o colapso femoral. Esses achados confirmam que o transplante autólogo de células progenitoras da medula óssea é um tratamento efetivo nos estágios

iniciais da osteonecrose, além de ser uma prática segura e satisfatória para os pacientes falciformes (HERNIGOU *et al.*, 2008).

A combinação da técnica comum de descompressão óssea e injeção autóloga da fração de mononucleares da medula óssea se mostrou eficaz em diversos ensaios clínicos. Os resultados clínicos positivos estimulam os profissionais no emprego dessa alternativa na prática ortopédica.

Estudo semelhante voltado para o tratamento da osteonecrose em pacientes falciformes vem sendo desenvolvido no Brasil. Encorajados pelos resultados positivos obtidos em outros ensaios, Daltro e colaboradores (2008) conduziram o primeiro ensaio clínico adotando a injeção autóloga para tratamento da necrose da cabeça femoral secundária à doença falciforme no estado da Bahia. Pacientes (N=8) com osteonecrose em estágios iniciais foram submetidos ao procedimento de implante autólogo de células mononucleares conforme a técnica descrita por Hernigou e colaboradores. Os resultados desse estudo confirmam achados anteriores sobre a eficácia da terapia celular na remissão da dor, melhora na capacidade funcional e maior satisfação pós-operatória declaradas pelos pacientes conforme avaliação do Hip Harris score.

1.3. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: Aspectos moleculares, características funcionais *in vitro* e emprego na terapia celular *in vivo*.

Células-tronco e progenitoras isoladas a partir do tecido adulto representam uma importante promessa na terapia de diversas condições patológicas. As células-tronco adultas detêm a capacidade de auto-replicação por longos períodos além da manutenção do potencial de diferenciação através da vida do organismo (CANCEDDA *et al.*, 2003).

As células-tronco adultas foram inicialmente identificadas em tecidos caracterizados pela alta taxa de turnover celular, como a medula óssea. Recentemente, essas células têm sido isoladas a partir de órgãos adultos previamente conhecidos pela capacidade de auto-renovação limitada, o que oferece perspectivas de novas estratégias terapêuticas para reparo de danos teciduais (CANCEDDA *et al.*, 2003).

As células-tronco adultas podem ser encontradas em diversos tecidos, como cérebro, pulmões, coração, rins e baço. Porém, a medula óssea permanece sendo a melhor fonte caracterizada e escolhida na obtenção destas células (THIEMERMANN; HUSEIN, 2010).

A medula óssea adulta contém uma população heterogênea de células, incluindo células hematopoiéticas, macrófagos, eritrócitos, fibroblastos, adipócitos e células endoteliais. Além destas, a medula óssea contém um subtipo de células precursoras não-hematopoiéticas que apresentam como característica principal a multipotencialidade. Estas células são comumente denominadas *células-tronco do estroma medular* ou *Células-Tronco*

Mesenquimais (CTMs), no inglês *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) (THIEMERMANN; HUSEIN, 2010).

As células-tronco mesenquimais são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, originadas a partir do folheto germinativo mesodermal, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e possivelmente, mas ainda parte de assunto controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Inicialmente as CTMs foram nomeadas como precursoras de fibroblastos da medula óssea por Friedenstein, o qual descreveu seu isolamento e suas propriedades como o caráter clonogênico, adesão ao substrato e aparência fibroblastóide ou em formato de espículas distribuídas em monocamadas *in vitro*, o que definiu como Unidades Formadoras de Colônias de Fibroblastos (CFU-F). As células aderentes eram heterogêneas e ficavam inativas por dois a quatro dias até iniciarem a rápida proliferação. Ao longo das passagens, as células se tornavam homogeneamente fibroblastóides e foram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos, ambos *in vitro* e *in vivo* (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Na medula óssea, as CTMs são componentes importantes do nicho hematopoiético, contribuindo com o suporte estromal através da sustentação direta do microambiente e com a secreção de fatores parácrinos envolvidos na proliferação, função e diferenciação das Células-Tronco Hematopoiéticas (CTHs) (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008). Constituem uma população rara na medula óssea, cuja frequência varia entre 0,01% a 0,0001% do total de células nucleadas. Apesar da rara presença, estas células podem proliferar efetivamente, mantendo seu caráter de células-tronco *in vivo*. A perda progressiva do potencial de diferenciação devido à senescência ocorre após cerca de 40 duplicações (KRAMPERA *et al.*, 2007).

As células estromais da medula óssea são raras e heterogêneas, sendo uma mistura de progenitores em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem mesodérmica e somente parte destas apresenta-se multipotentes e auto-renováveis (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Já foram descritas pelo menos três tipos celulares em cultura, identificadas conforme potencial proliferativo e morfologia. Assim existem as células tipo I, que são fusiformes e crescem rapidamente, as células tipo II que são achatadas e crescem lentamente e mais recentemente denota-se sobre as células RS (células pequenas rapidamente auto-renováveis). As células RS são progenitoras primitivas e possuem o maior potencial para auto-renovação e multipotencialidade. São distinguíveis das células maduras a partir da identificação de marcadores de superfície e proteínas específicas, tais como receptor-2 de

VEGF, receptor de tirosina-quinase, CD117 (c-kit) entre outros (PROCKOP, 2009 e BOBIS *et al.*, 2006).

A mesma heterogeneidade é vista nas colônias celulares isoladas da medula óssea em ensaio clonogênico *in vitro*. Essa característica é notada desde a diversidade morfológica até o potencial de replicação celular numa mesma cultura.

Quando isoladas da medula óssea e cultivadas em baixa densidade, colônias discretas de células fibroblastóides aderentes são formadas e cada clone se origina de uma única célula precursora, caracterizando assim uma unidade formadora de colônia de fibroblastos (CFU-F). A enumeração das colônias *in vitro*, sugere a frequência de CFU-F contidas entre as células estromais na medula óssea *in vivo*. Essas mesmas colônias se apresentam morfológicamente diferentes, contendo uma hierarquia de progenitores incluindo células-tronco esqueléticas multipotentes e progenitores comprometidos, impossíveis de distinção devido à ausência de marcador específico (KUZNETSOV; BIANCO, 2009).

Diversos órgãos adultos, além da medula óssea, podem servir como fontes de células-tronco mesenquimais, tais como o tecido adiposo, fígado, placenta, líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, polpa dentária, tecido muscular e outros. Interessantemente, as características fenotípicas, capacidade proliferativa e multipotencialidade das células-tronco mesenquimais variam conforme o tecido original, e isto pode ser atribuído à influência dos fatores locais, refletindo a importância do nicho em estabelecer o fenótipo das células-tronco e suas interações (MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Apesar da relevância clínica atribuída às células-tronco mesenquimais, o entendimento completo sobre sua biologia ainda permanece inconsistente. Além disso, a ausência de um único marcador de superfície específico para identificação desta população celular aliada às inúmeras variações na terminologia limita o progresso das pesquisas relacionadas (THIEMERMANN; HUSEIN, 2010).

Na tentativa de padronizar a caracterização das células humanas mesenquimais estromais multipotentes entre os diversos grupos científicos, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) propôs alguns critérios mínimos a serem seguidos para identificação desta população celular:

- Adesão celular a superfície (plástico) em condições padrões de cultivo;
- Expressão positiva dos marcadores CD105, CD90, CD73 em 95% da população celular e ausência de marcação para CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-II (células positivas $\leq 2\%$) através da técnica de citometria de fluxo.
- Serem capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos quando cultivados em condições padrões de indução *in vitro*.

Esses requisitos supracitados propostos por Dominici et al (2006) são adotados internacionalmente pelos diversos grupos de pesquisas científicas e permitem a padronização dos preparos celulares além de comparações diretas entre os diferentes estudos, facilitando o uso das células desde os testes pré-clínicos até o emprego na terapia celular.

A facilidade de isolamento e expansão destas células, *in vitro*, aliada à sua multipotencialidade, ação parácrina e propriedade imunossupressora torna as células-tronco mesenquimais, alvo para diversas aplicações na medicina regenerativa com vantagem sobre as células-tronco embrionárias em relação à ausência de considerações éticas e a não formação de teratomas.

Contudo, os mecanismos biológicos que elucidem esse papel terapêutico das células-tronco mesenquimais não estão totalmente esclarecidos. Na tentativa de explicar as atividades de diferenciação, proliferação, migração celular e secreção parácrina responsáveis pela regeneração e recuperação do dano tecidual, se faz necessário a criação de modelos *in vitro* que simulem as patologias a serem tratadas *in vivo* pela terapia celular.

1.3.1. CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DAS CTMs

As CTMs constituem uma população heterogênea de células quanto à morfologia, fisiologia e expressão de antígenos de superfície. Até o momento, nenhum marcador específico foi identificado (BOBIS *et al.*, 2006 ; KRAMPERA *et al.*, 2007).

Essas células apresentam um grande número de moléculas de adesão, proteínas da matriz extracelular, receptores para citocinas e fatores de crescimento, associados com sua função e interação com a matriz estromal (BOBIS *et al.*, 2006).

Conforme os critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional par Terapia Celular, as células-tronco mesenquimais são identificadas pela presença positiva dos marcadores CD105, CD73 e CD90 e ausência dos antígenos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008). Além desses marcadores já conhecidos, as CTMS também expressam uma variedade de antígenos presentes em outros tipos celulares, tais como CD106, CD166, CD29, CD117, CD44, Sca-1 e Stro-1 (BOBIS *et al.*, 2006).

O marcador Stro-1, atualmente considerado o antígeno mais apropriado para identificação da população de CTMS, não é específico para esse tipo celular e ainda apresenta a desvantagem da perda de sua expressão ao longo das passagens (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008).

Outro antígeno em destaque é o CD146/MCAM (melanoma-associated cell adhesion molecule) presente em um subtipo específico de CTMS, classificadas como células

subendoteliais dos sinusóides da medula óssea ou células adventícias reticulares ou simplesmente pericitos. Essa molécula pertence à superfamília das imunoglobulinas, também expressa em subtipos endoteliais e outros tipos celulares restritos. Em trabalho realizado por Sacchetti et al (2007) , verificou-se que o marcador CD146 foi expresso pelas células clonogênicas estromais e esta expressão é retida em cultura pelas células progenitoras primitivas, mas perdida após diferenciação osteogênica. Células estromais CD146⁺ são auto-renováveis, secretam angiopoietina-1 e conseqüentemente suportam adequadamente o microambiente hematopoiético.

As CTMs são também conhecidas por apresentarem um conjunto de receptores de superfície associados com adesão célula-célula e célula-matriz, tais como as integrinas $\alpha 5\beta 3$ e $\alpha 5\beta 5$, ICAM-1, ICAM-2, LFA-3 e L-selectina (BOBIS *et al.*, 2006).

As CTMs expressam receptores de citocinas : IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R e IL-7R. Essas células também produzem um arsenal típico de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento tais como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF (Fator Inibidor da Leucemia), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), SCF (Stem Cell Factor), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos), flk-3L, a última implicada principalmente na hematopoese. Entre as quimiocinas produzidas se encontram CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL1. Outros receptores também identificados na superfície são β FGF-R, PDGF-R, TGF- β R, Thy-1, INF- γ R e TNF-R (KODE *et al.*, 2009).

O perfil fenotípico das CTMs pode variar, *in vitro*, conforme as condições de cultivo, origens das amostras e período de tempo (passagem celular/estágios de maturação). Alguns antígenos podem ser encontrados nas CTMs recém-isoladas, porém sua expressão desaparece em cultura. Esse fenômeno é visto para os receptores de quimiocinas, marcadores de superfície e algumas moléculas de adesão (BOBIS *et al.*, 2006).

As CTMs de outras espécies animais não expressam obrigatoriamente as mesmas moléculas presentes nas células de origem humana. Alguns marcadores negativos para CTMs humanas, como CD34, têm expressão variável para população de células-tronco mesenquimais murinas. É importante notar também, que diferenças na expressão de muitas moléculas de superfície podem ser influenciadas por fatores secretados por células vizinhas nas passagens iniciais e a expressão *in vitro* de alguns marcadores pelas CTMs nem sempre correlaciona com seu padrão de expressão *in vivo* (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Diante da diversidade de moléculas de superfície e heterogeneidade celular, o uso de um único marcador não possibilita a identificação das CTMs. Logo, a associação de diferentes antígenos, formando um painel de anticorpos para detecção fenotípica é essencial para o isolamento, purificação e cultivo dessas células *in vitro*. Técnicas moleculares com

diferentes metodologias (citometria de fluxo, imunocitoquímica, análise gênica e outras) trazem maior especificidade e auxiliam na identificação mais precisa dessas células.

1.3.2. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS E FUNCIONAIS DAS CTMs EM CULTIVO: multipotencialidade e ação parácrina.

PLASTICIDADE CELULAR

A diferenciação celular ocorre normalmente já no útero materno nos primeiros estágios da gravidez, em um processo conhecido como organogênese. São vários processos envolvidos na diferenciação celular, porém existem três fenômenos fundamentais como a interação célula-célula, divisão celular e regulação gênica (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Quando submetidas a estímulos apropriados em cultura, as CTMs podem se diferenciar terminalmente em diversos tipos de células de origem mesenquimal. O potencial de diferenciação *in vitro* destas células tem sido testado em diversos estudos, onde as condições ideais de cultura, os estímulos adequados e os métodos para identificação do fenótipo diferenciado vêm sendo determinados.

As CTMs são capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Além da identificação morfológica e fenotípica, a habilidade de células clonais em formar esses três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar CTMs e distingui-las dos precursores comprometidos nas linhagens: óssea, adipocítica e condrogênica (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

A diferenciação das CTMs em determinadas linhagens, *in vitro*, demanda tratamento com fatores específicos. Além disso, outras influências são cruciais ao longo da transformação da cultura de células, entre essas se podem citar a densidade celular, nutrientes basais, citocinas, fatores de crescimento, organização espacial, forças mecânicas, matrizes e biomateriais (BOBIS *et al.*, 2006). Outros fatores como a idade do doador de células, presença ou estágio de doenças podem influenciar (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

O método clássico para diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos *in vitro*, envolve a incubação da monocamada celular em alta confluência em meio de cultura contendo ácido ascórbico, dexametasona e β -glicerolfostato (β -GP) durante 2 a 3 semanas (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Cada componente usado no meio indutor exerce seu efeito específico ao longo da diferenciação das CTMs. A dexametasona é um glicocorticóide sintético essencial para diferenciação das células progenitoras em ósseas. Embora seu mecanismo de ação não esteja bem elucidado, sabe-se que a dexametasona ativa vias transcricionais envolvidas na

osteogênese, tais como a via *RUNX2* e BSP. Além da ação na diferenciação, a dexametasona atuando juntamente com o ácido ascórbico aumenta a produção do colágeno tipo I (VATER; STIEHLER; KASTEN, 2010).

Outros importantes fatores envolvidos na regulação osteogênica são: TGF, IGF, PDGF, FGF-2 e PTHrp (Peptídeo relacionado ao Paratormônio). Essas proteínas regulam a formação da matriz óssea e a expressão dos sinais necessários para o remodelamento através da ativação da osteoclastogênese (BOBIS *et al.*, 2006).

Ainda sob a ótica molecular, a participação de alguns fatores transcricionais é imprescindível para o início da osteogênese. O *Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* tem sido considerado como o regulador master responsável pela diferenciação osteogênica inicial. O *RUNX2* atua sinergisticamente com o TGF- β na up-regulação da IL-11 que reduz a adipogênese e em contrapartida promove a osteogênese e condrogênese das células-tronco mesenquimais (RASTEGAR *et al.*, 2010).

O *RUNX2* é regulado intracelularmente por alguns fatores externos tais como BMP-2 e BMP-6, responsáveis pela ativação da osteogênese nas CTMs. A down-regulação do *RUNX2* também pode ocorrer através do processo de desacetilação e degradação por enzimas específicas Smurf1 e Smurf 2, induzidas pela por citocinas inflamatórias como o TNF (KOLF; CHO; TUAN, 2007).

Seguindo a ontogenia, a expressão do *RUNX2* é notada nas células progenitoras mesenquimais existentes no início do desenvolvimento do esqueleto. Os níveis de *RUNX2* gradualmente aumentam ao longo dos estágios de diferenciação osteoblástica, com máxima expressão verificada em osteoblastos maduros (JAVED *et al.*, 2011).

RUNX2 controla a diferenciação osteogênica das CTMs através da sua ligação na região promotora de genes-alvo regulatórios, considerados marcadores dos diferentes estágios de diferenciação óssea tais como : receptor de TGF-b, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e II, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, receptor da vitamina D, galectina-3, sialoproteína óssea e colagenase (JAVED *et al.*, 2011).

Além da ação do *RUNX2*, existem outros fatores que participam do processo da osteogênese como *OSTERIX*, *Δ FosB*, *FRA-1*, *AJ18*, *OSF1*, *MSX2*, *DLX5* e *TWIST*, com funções positivas e negativas sobre o desenvolvimento ósseo (BOBIS *et al.*, 2006). Entre estes se destaca o fator *OSTERIX*, regulado positivamente pela ligação do *RUNX2*, a uma região promotora do gene *OSTERIX*, cujo papel na osteodiferenciação induzida é crucial (JAVED *et al.*, 2011).

O fator transcricional *OSTERIX*, assim como *RUNX2*, quando expresso em células induzidas, promove o aparecimento dos marcadores osteogênicos e tardios (JAVED *et al.*, 2011). Dessa forma, o *RUNX2*, *OSTERIX* e outras proteínas regulatórias associadas são

importantes para direcionar o comprometimento osteogênico das CTMs e portanto o uso destes pode conferir inúmeras aplicações clínicas importantes.

As CTMs também podem ser induzidas à osteogênese, *ex-vivo*, quando expostas à ação de moléculas solúveis tais como BMPs, TGF- β , EGF, VEGF, FGF e Wnts (RASTEGAR *et al.*, 2010). Esses fatores secretados e suas vias de sinalização promovem ou suprimem a expressão e/ou função de fatores transcricionais essenciais para diferenciação osteoblástica (JAVED *et al.*, 2011).

Quando as CTMs se diferenciam completamente em osteoblastos passam a apresentar nova morfologia cubóide ao invés da fibroblastóide clássica (STIEHLER; VATER; KASTEN, 2010).

Após esse período, nota-se a formação de agregados ou nódulos ósseos e maior expressão da fosfatase alcalina juntamente com acúmulo de cálcio ao longo do tempo. Esses nódulos são marcados positivamente pelas técnicas de Alizarina Red S e Von Kossa, em ensaios experimentais. Entretanto, essas condições indutoras não refletem diretamente os sinais fisiológicos recebidos pelas CTMs, *in vivo*, durante a osteogênese (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

A diferenciação adipocítica, *in vitro*, é um processo que ocorre em várias etapas, caracterizada pela seqüência de eventos desde a divisão dos pré-adipócitos até sua confluência. Quando as células progenitoras mesenquimais se diferenciam em adipócitos, perdem seu formato fibroblastóide e passam a se apresentar esféricas e expressando diversos tipos de proteínas da MEC, incluindo fibronectina, laminina e colágenos tipos I, III, IV, V e VI (STIEHLER; VATER; KASTEN, 2010).

Para promover a diferenciação adipogênica, as CTMs são cultivadas em meio contendo isobutil-metilxantina (IBMX), dexametasona, insulina e indometacina. As células passam a apresentar formato distinto, acúmulo de vacúolos lipídicos internos e expressão de marcadores específicos para adipócitos tais como *peroxisome proliferation-activated receptor γ 2* (PPAR- γ 2), *lipoprotein lípase* (LPL) e *fatty acid-binding protein-4 aP2* (FABP4/aP2). Os vacúolos intracelulares são corados com Oil Red em ensaios histológicos (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

Comprovada sua plasticidade após conversão nas linhagens adipogênicas e osteogênicas, estudos posteriores demonstraram que as CTMs são capazes de se diferenciar também em tenócitos, miócitos, neurônios, células endoteliais, condrócitos e outros tipos celulares, sob condições apropriadas em cultura (CHAMBERLAIN *et al.*, 2007).

A diferenciação condrogênica de CTMs, *in vitro*, comumente utilizada como método para avaliação da multipotencialidade, mimetiza o desenvolvimento da cartilagem *in vivo* (KOLF; CHO; TUAN, 2007).

A condrogênese é um evento que ocorre em várias etapas que envolvem desde o comprometimento das células-tronco mesenquimais até a agregação celular e a diferenciação em condrócitos (RASTEGAR *et al.*, 2010).

A conversão das CTMs, *in vitro*, tem sido estudada através da exposição a fatores de crescimento, co-cultivo com cartilagem e ativação de genes específicos como *SRY-box 9* (*Sox 9*) promotores da diferenciação condrogênica (RASTEGAR *et al.*, 2010).

Durante a diferenciação condrogênica as CTMs perdem sua forma fibroblastóide, passando a se apresentar largas e arredondadas. As células são rodeadas por matriz abundante, formando uma rede organizada de colágeno (predomínio de colágeno tipo II) associado a proteoglicanos e glicosaminoglicanos de alto peso molecular (STIEHLER; VATER; KASTEN, 2010).

Protocolos para ensaios de indução condrogênica, *in vitro*, prevêm a centrifugação das células para formação do *pellet* (micromassa) em tubo cônico e seu cultivo em meio rico em TGF- β . O *pellet* celular desenvolve uma multicamada e deposição de matriz rica em glicosaminoglicanos que se torna evidente após coloração com os corantes histológicos azul de toluidina ou alcian blue (MIDDLETON *et al.*, 2007).

Inúmeras moléculas estão envolvidas na diferenciação das CTMs na linhagem condrogênica, incluindo TGF- β , BMPs, ligantes de Wnts e o fator de crescimento e diferenciação (GDF). TGF- β exerce papel importante na indução condrogênica, e seu efeito é sinergisticamente aumentado quando em associação com BMP-2 (KOLF; CHO; TUAN, 2007).

O potencial de diferenciação varia conforme a heterogeneidade característica das células-tronco mesenquimais. Estudos clonais demonstram que população de CTMs isoladas a partir da medula óssea não é funcionalmente equivalente e contém células-tronco/progenitoras e precursores relacionados a diferentes linhagens teciduais (PHINNEY; PROCKOP, 2007).

Ainda não é claro se há uma única célula multipotente que origina cada célula mesenquimal em cultura ou se existe uma mistura de progenitores comprometidos com diferentes linhagens. Inicialmente, acreditava-se que as CTMs poderiam se diferenciar em apenas em tecidos de origem mesodermal, porém, estudos em larga escala sobre a biologia mesenquimal revelaram mudança nesse dogma (BOBIS *et al.*, 2006).

Vários estudos mostraram que as células precursoras estromais multipotenciais podem também se diferenciar em linhagens germinativas não relacionadas, através do processo denominado transdiferenciação. Sendo assim, as CTMs podem se diferenciar em tecidos neuroectodérmicos e endodérmicos além dos mesodérmicos já bem estabelecidos (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

EFEITOS PARÁCRINOS

Além da multipotencialidade apresentada pelas células-tronco mesenquimais, outro efeito benéfico que fundamenta seu uso na terapia celular é atribuído à secreção parácrina/autócrina de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas envolvidas no reparo tecidual.

Inúmeros estudos utilizando transplante de células-tronco mesenquimais cultivadas em animais demonstram que os efeitos terapêuticos destas não podem ser explicados apenas pela capacidade de diferenciação tecidual. Desta forma, as CTMs exercem efeitos benéficos através da secreção de fatores bioativos no local da injúria (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008).

Os fatores bioativos secretados pelas CTMs têm propriedades angiogênicas, anti-fibróticos, e anti-apoptóticas que limitam a extensão do tecido danificado e restabelece o suprimento sanguíneo no local afetado (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008). A quantidade e variedade de fatores tróficos variam conforme o estágio de desenvolvimento celular e refletem diretamente seu status funcional e a influência do microambiente local. Cada fator secretado governa o estado fisiológico e metabólico da própria célula, exercendo também ação autócrina (CAPLAN, 2006).

Sabe-se que as células-tronco mesenquimais se dirigem para diferentes órgãos injuriados, como pulmão, miocárdio, pâncreas, pele e osso para auxiliar na regeneração destes tecidos. A ação de reparo efetuada pelas CTMs vai além da substituição de células danificadas no local, diferenciação ou integração no tecido, mas envolve também o contato célula-célula e secreção parácrina (TOLAR *et al.*, 2010).

Em resposta a injúrias, independente da causa e órgão afetado, as células-tronco mesenquimais liberam grandes quantidades de moléculas bioativas, tais como citocinas, substâncias pró-angiogênicas, antioxidantes, fatores tróficos e outras proteínas (ex: peptídeo hormonal stanniocalcina) capazes de mediar reparo produtivo pela resposta limitante ao estresse e apoptose, e pelo recrutamento de células imunes e reparadoras na região circundante (PROCKOP *et al.*, 2009).

Há modelos naturais, *in vivo*, que comprovam esse paradigma de reparo indireto pelas CTMs. A provisão do estroma medular e o sustento das células-tronco hematopoiéticas (CTH) pelas CTMs traduzem seu efeito trófico *in loco*. Os efeitos tróficos, nesse caso, correspondem àquelas ações mitóticas, quimiotáticas e moduladoras da diferenciação que emanam das CTMs como bioativos e afetam as células vizinhas (CTH) sem causar modificação nas próprias CTMs secretoras. Assim, o suporte da hematopoiese via produção das citocinas hematopoiéticas pelas CTMs, tais como G-CSF, SCF, M-CSF e IL-6 exemplifica este efeito no estroma medular (CAPLAN, 2006).

Evidências crescentes suportam a hipótese que mecanismos parácrinos mediados por fatores liberados pelas células-tronco adultas exercem um papel essencial no processo reparativo após mobilização ou injeção das células no coração infartado. CTMs produzem e secretam uma variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que podem potencialmente estar envolvidas no reparo cardíaco. Além disso, o estresse e ambiente hipóxico/isquêmico aumentam a produção destes fatores pelas CTMs (GNECCHI; ZHANG; DZAU, 2008).

Além disso, os processos inflamatórios e de fibrose que ocorrem no período pós-infarto, o metabolismo cardíaco, a contratilidade cardíaca e a regeneração cardíaca endógena também podem sofrer influência positiva dos efeitos parácrinos desses fatores (CAPLAN, 2006).

Nas doenças isquêmicas como no acidente vascular cerebral, a aplicação das CTMs na fase aguda e subaguda do evento é proteger os neurônios em risco, enquanto após este período, as terapias visam principalmente aumentar a capacidade de regeneração endógena do sistema nervoso central e conseqüentemente diminuir as seqüelas funcionais (OTERO *et al.*, 2009).

Então a ação das células-tronco da medula óssea consiste em proteger os neurônios que ainda restam, ao invés de substituir os que já foram perdidos em uma determinada lesão ou patologia. E esse efeito se dá através da liberação dos fatores tróficos produzidos pelas células, que melhoram o funcionamento dos neurônios, promovem maior sobrevivência dos mesmos, diminuem a inflamação e aumentam a vasculogênese (OTERO *et al.*, 2009).

Finalmente, as CTMs produzem inúmeros fatores com propriedades biológicas, com alguns deles atuando diretamente suprimindo o reconhecimento antigênico e reduzindo a proliferação dos linfócitos T e B, promovendo a sobrevivência das células-tronco hematopoéticas e a realização da hematopoiese normal (CAPLAN, 2006).

As CTMs também se apresentam como fonte natural de fatores solúveis envolvidos na angiogênese. Essas células secretam uma variedade de fatores pró-angiogênicos incluindo angiopoietina-1 (Ang1), VEGF, PDGF, b-FGF, FGF-7, além de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF. Todas essas moléculas atuam sinergisticamente nas células endoteliais promovendo a vasculogênese, recrutamento de células progenitoras endoteliais e angiogênese (JORGENSEN; LAZENNEC, 2008).

Em caso de isquemia ou dano tecidual grave, as CTMs podem ser atraídas para o local (através da quimioatração por citocinas cujos receptores estão presentes na superfície das CTMs) por sinais inflamatórios emitidos a partir do local injuriado. As CTMs iniciam a secreção de fatores bioativos que inibem a formação de fibrose, bloqueiam a apoptose das células locais, estimulam a angiogênese, ativam a proliferação dos progenitores e induzem sua diferenciação nas unidades regenerativas necessárias ao reparo do tecido (CAPLAN,

2006). Portanto, os efeitos tróficos das CTMs podem ser aplicados clinicamente como alternativa promissora.

1.3.3. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS: APLICAÇÃO NA TERAPIA CELULAR

A multipotencialidade e a facilidade de isolamento e expansão em cultura das CTMs, suas propriedades imunomodulatórias, capacidade de migração e secreção trófica torna-as importante alvo para o tratamento de diversas doenças, através da infusão intravenosa ou administração no local da lesão.

Com base nos efeitos imunossupressores, *in vitro* e *in vivo*, já relatados em diversos estudos, as CTMs estão sendo utilizadas para tratar ou prevenir doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) durante transplante alogênico de medula óssea. A DECH é uma forma de rejeição, onde as células transplantadas (linfócitos T reativos) reagem contra os antígenos do hospedeiro, iniciando um ataque aos órgãos como pele, fígado, trato digestivo e outros. A associação das CTMs ao enxerto implantado confere a modulação dessa rejeição. Além disso, estas células produzem citocinas podem suportar hematopoiese e potencialmente aumentar a revitalização da medula óssea após quimioterapia ou radioterapia (GIORDANO *et al.*, 2007).

Em ensaio clínico multicêntrico realizado por Le Blanc e colaboradores (2008), verificou-se a segurança e eficácia da aplicação intravenosa de CTMs isoladas em culturas de diferentes doadores em pacientes portadores de DECH aguda de grau 2 a 4 corticóide-refratária. Os resultados demonstraram que mais da metade dos pacientes portadores da doença responderam ao tratamento com CTMs, com menores taxas de rejeição e maior sobrevida. Nenhum paciente apresentou efeito adverso durante ou imediatamente após a infusão das CTMs. E as respostas positivas não estavam relacionadas com a idade nem HLA do doador das CTMs, o que confirma achados anteriores sobre a efetividade da terapia celular para pacientes com DECH refratária esteróide-resistente.

Em doenças cardiovasculares em que intervenções cirúrgicas ou farmacológicas sejam insuficientes na reversão do quadro, o uso das células-tronco mesenquimais representa um potencial terapêutico interessante.

Assim como em outras doenças degenerativas, o potencial da terapia celular usando células-tronco para se diferenciar em miócitos cardíacos viáveis e reduzir tecido fibroso é um prospecto atrativo, com o objetivo de reverter remodelamento ventricular, prevenir falha cardíaca e aliviar a necessidade de transplante cardíaco (THIEMERMANN; SALEM, 2010).

Apesar de controverso, o uso das CTMs na regeneração cardíaca após infarto ou outras complicações cardiovasculares vem sendo bem difundido na medicina atual. O mecanismo de ação da terapia com células-tronco mesenquimais isoladas aparenta ser derivado da

secreção de citocinas imunomoduladoras e fatores pró-angiogênicos e anti-apoptóticos (SOUZA *et al.*, 2010).

Fatores de crescimento autócrinos ou parácrinos como VEGF secretados pelas CTMs promove a reconstrução da rede vascular miocárdica. Juntamente com outros fatores angiogênicos liberados (tais como b-FGF) induz a arteriogênese e melhora a isquemia cardíaca. Tais fatores podem influenciar as células adjacentes e exercer seus efeitos por meio de diversos mecanismos, sendo a proteção miocárdica e a neovascularização os dois mais estudados (SOUZA *et al.*, 2010).

Baseado nos resultados positivos obtidos no tratamento cardíaco pós infarto, alguns grupos têm testado a utilização de CTMs e células mononucleares da medula óssea em ensaios clínicos para tratar outras enfermidades do coração. Ensaio (fase 1) pioneiro realizado no Brasil por Vilas-Boas *et al.* (2010) propôs a avaliação da segurança e eficácia da injeção intracoronária de células mononucleares da medula óssea na recuperação do miocárdio de pacientes portadores de insuficiência cardíaca devido a doença de chagas. Os dados iniciais desse estudo demonstraram que a terapia com células mononucleares derivadas da medula óssea é factível, segura e aparentemente eficaz quanto aos critérios clínicos analisados para avaliação da insuficiência cardíaca avançada (qualidade de vida, função ventricular, capacidade funcional do paciente e categorização funcional da doença-NYHA). O mecanismo terapêutico e a resposta em longo prazo permanecem obscuros nesse ensaio, sendo necessária a realização de novo estudo com desenho mais apropriado com inclusão de grupo controle (placebo) para comparação dos resultados.

Diferente do mecanismo parácrino sugestivo para os resultados da terapia celular em modelo cardíaco, o potencial de diferenciação em diversas linhagens teciduais configura a ação das CTMs nas enfermidades ósseas.

Durante a regeneração da fratura, células multipotentes indiferenciadas são recrutadas para o local da injúria e sob influência das citocinas regulatórias iniciam a proliferação e diferenciação em condrócitos e células ósseas aptos ao reparo tecidual. Geralmente, a maior parte das fraturas em condições normais inicia cicatrização espontânea, porém, em alguns casos onde exista insuficiência vascular e infecções locais, a regeneração óssea se torna comprometida.

A terapia celular para reparo das fraturas tem sido testada com sucesso em modelos animais. O uso de CTMs expandidas em cultura e semeadas em diferentes biomateriais (biocerâmicas, hidroxiapatita e outros) aplicadas na forma de implantes na região óssea lesada apresentou resultados promissores na regeneração de defeitos ósseos. Clinicamente os sinais de regeneração após o uso de biomateriais semados com células progenitoras são vistos progressivamente na forma de integração com o osso pré-existente e até geração vascular na região (UNDALE *et al.*, 2009).

O papel crítico das CTMs foi enfatizado em ensaio clínico de fase III realizado por Hernigou e colaboradores (2005) para avaliação da segurança e eficácia da injeção percutânea de células mononucleares da medula óssea em fraturas nonunions diafisal tibial. A medula óssea foi obtida por aspiração a partir da crista íliaca dos pacientes, concentrada no separador e então injetada na tíbia de 60 pacientes recrutados para o estudo. Os dados demonstraram correlação positiva entre o volume do calo ósseo após 4 meses do procedimento e o número de CFU-F *in vitro*. A melhora clínica foi verificada nos pacientes que apresentaram maior número de colônias fibroblásticas estromais nos ensaios experimentais. Apesar da ausência do grupo controle (placebo) comparativo neste estudo, confirmou-se a efetividade e segurança da terapia celular no reparo de defeitos ósseos de difícil cicatrização.

Além das aplicações terapêuticas supracitadas, as CTMs isoladas a partir da medula óssea representam uma população celular interessante e promissora para o tratamento de diversas enfermidades tais como doenças ósseas metabólicas, úlceras dérmicas, diabetes mellitus, desordens neurológicas, doenças inflamatórias e auto-imunes e outras.

1.4. A INFLUÊNCIA DA HIPÓXIA NO COMPORTAMENTO DAS CTMS: Simulação da isquemia *in vitro*.

Vários fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento da necrose avascular, porém a isquemia local é o desfecho determinante. Essa interrupção abrupta do suprimento de oxigênio e nutrientes pode atuar como um estímulo primário para regeneração óssea.

A ausência de oxigênio local exerce efeito na ativação do fator transcricional induzido pela hipóxia (HIF1), presente em diversas células. O HIF1 é uma molécula heterodimérica, composta por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , sendo a primeira altamente responsiva e estabilizada pela hipóxia. Sob baixas tensões de oxigênio, o HIF-1 α se acumula no citoplasma e posteriormente é translocado para o núcleo celular, onde sofre dimerização com a subunidade HIF-1 β . Esse dímero é responsável pela ativação dos diversos genes responsivos à hipóxia, tais como produtores das proteínas envolvidas na maturação celular (eritropoietina e transferrina), metabolismo energético (transportador de glicose 1 e 3), proliferação, viabilidade celular (IGF e p21) e angiogênese (VEGF e endotelina-1) (WAN *et al.*, 2010).

Sob condição de hipóxia, a atividade dos genes codificadores de VEGF, VEGFR1 (receptor de VEGF nas células), PLGF (fator de crescimento derivado da placenta) e SDF-1 α (Fator derivado do estroma), aumenta em resposta à ativação do fator transcricional HIF-1, no intuito de suprir a demanda de oxigênio nas áreas não perfundidas e recrutar células progenitoras para o reparo ósseo (CLEMENS *et al.*, 2009).

Além da ativação de genes angiogênicos para reversão da isquemia no osso, a hipóxia interfere diretamente na proliferação, diferenciação, secreção de citocinas e fatores de crescimento pelas células osteoprogenitoras.

Considerando as propriedades biológicas e o emprego terapêutico das células-tronco mesenquimais, inúmeros trabalhos vêm sendo realizados no intuito de elucidar o comportamento destas células frente às baixas tensões de oxigênio presentes nos diversos nichos teciduais. A influência da hipóxia vai além do estímulo inicial à formação de novos vasos, mas também exerce papel determinante na sobrevivência celular após injeções autólogas, enxertos locais e inserção de biomateriais celularizados.

Em estudo realizado por Müller e colaboradores (2008), avaliaram-se as propriedades biológicas das células-tronco mesenquimais sob condição de hipóxia (1-3%O₂), *in vitro*, semelhante ao ambiente da osteonecrose (corticóide induzida) *in vivo* em que posteriormente seriam injetadas. Os resultados encontrados revelaram lenta proliferação e menor diferenciação óssea quando cultivadas em hipóxia. Ao contrário, a secreção parácrina de fatores osteogênicos (IGF e IGFBP) e VEGF foi mantida, mesmo sob baixa concentração de oxigênio.

Em estudo semelhante realizado com CTMs murinas, Liu et al (2010) verificaram o aumento da expressão de receptores (CXCR4 e CXCR7) específicos para o fator de migração SDF-1 α após pré-condicionamento da cultura em baixa tensão de oxigênio. O aumento dos receptores na superfície celular foi correlacionado diretamente com o maior potencial migratório, de sobrevivência e adesão nos ensaios *in vitro*, alterações importantes atribuídas aos efeitos da hipóxia.

A diferenciação osteogênica também é alvo de análises sobre a influência da hipóxia em diversos ensaios laboratoriais. Potier e colaboradores (2007) verificaram a down-regulação de genes nas CTMs humanas, envolvidos na osteogênese após serem submetidas a 1% de oxigênio em jarra de anaerobiose durante 48 horas. A redução dos transcritos *cbfa/Runx2*, osteocalcina e colágeno tipo I após o pré-condicionamento da cultura em hipóxia temporária sugeriu fortemente a inibição da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais. Outro efeito importante visto nesse estudo foi o aumento da produção de fatores angiogênicos (VEGF, β -FGF, TGF-3), a nível transcricional e protéico, responsáveis pela modulação da hipóxia e conseqüente reversão indireta da isquemia.

A supressão de marcadores osteogênicos como ALP (fosfatase alcalina) e osteocalcina após hipóxia transiente também foi vista em modelo *in vitro* estudado por Gruber et al (2008). As células ósseas humanas cultivadas durante 72 horas em baixa tensão de oxigênio (1%) apresentaram redução no potencial osteogênico frente ao estímulo com BMP-6, além disso, tiveram resposta metabólica diminuída e alterações morfológicas. Porém, as mudanças no perfil celular após a hipóxia temporária foram gradualmente substituídas pela

resposta normal das células quando cultivadas em normóxia durante 7 dias. Os resultados sugeriram que a reoxigenação, portanto a formação de vasos sanguíneos no tecido pode ser um fator essencial para o processo de osteointegração das células e consolidação da terapia.

As alterações moleculares decorrentes da ação da hipóxia nas células variam conforme modelo de estudo experimental, tempo de exposição, tipo celular analisado, origem da amostra, atmosfera escolhida e outros parâmetros. Diante disso, publicações contendo vastos achados concordantes e também controversos são freqüentemente reportadas.

Basciano et al (2011) demonstrou em modelo *in vitro* com células-tronco mesenquimais humanas, que a hipóxia (5%) transiente mantém as células em estado indiferenciado e em paralelo aumenta a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento de diversas linhagens mesodermis e outras. Consoante com esse estudo, Grayson et al (2007) mostrou que CTMs humanas também apresentaram aumentada proliferação celular sob reduzidas concentrações de oxigênio ao longo de sete passagens, resultando em 30 vezes maior número de células que as culturas cultivadas em normóxia. Expressão aumentada do fator Oct-4 e conexina 43 também foram encontrados para as mesmas células após hipóxia, confirmando o efeito mantenedor da auto-renovação, adesão e multiplicação celular.

A participação da hipóxia também já foi atrelada a apoptose e indução da quiescência *in vitro* em estudos anteriores. A disfunção mitocondrial levando o aumento da caspase-3 é sugerida como o mecanismo de apoptose das CTMs após hipóxia prolongada (DAS *et al.*, 2009).

A existência de unidades formadoras de colônia (CFU-F) em quantidade considerável na medula da cabeça femoral e crista ilíaca de pacientes falciformes portadores de osteonecrose já está bem estabelecida (HERNIGOU et al 2002; HERNIGOU et al 1999). Porém, todos os ensaios *in vitro* realizados até o momento com as CTMs falciformes foram conduzidos sob altas tensões de oxigênio (21%), o que exclui os efeitos determinantes do microambiente hipóxico, semelhante ao isquêmico na necrose avascular *in vivo*, no comportamento celular. Além disso, relatos específicos sobre o potencial osteogênicos das células falciformes em ensaios laboratoriais, em atmosfera normal ou reduzida de oxigênio, são inexistentes.

Assim, em nosso trabalho verificamos o perfil e comportamento destas células após hipóxia temporária em modelo *in vitro*, simulando o ambiente isquêmico da cabeça femoral, encontrado pelas CTMs após injeção local da fração de mononucleares. Nosso intuito é auxiliar na fundamentação da técnica de terapia celular já empregada em nosso grupo de pesquisa e complementar os achados sobre as células-tronco mesenquimais falciformes existentes na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar e avaliar funcionalmente as células-tronco mesenquimais da medula óssea dos pacientes falciformes contidas na fração de células mononucleares utilizada como enxerto autólogo no tratamento da osteonecrose da cabeça femoral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência das células-tronco mesenquimais e osteoprogenitores na fração de células mononucleares da medula óssea dos pacientes falciformes;
- Verificar a viabilidade celular, capacidade proliferativa e migratória das células-tronco mesenquimais falciformes sob condições de normóxia e hipóxia;
- Caracterizar marcadores fenotípicos e de multipotencialidade nas células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes;
- Detectar fatores angiogênicos (IL-8 e TGF- β) e quimiotático SDF-1 α nos sobrenadantes das CTMs dos pacientes falciformes em normóxia e após hipóxia.

3. METODOLOGIA

3.1 -Obtenção da amostra biológica:

Os experimentos e ensaios foram realizados com 28 amostras biológicas obtidas em procedimentos cirúrgicos de punção de medula óssea (MO) conduzidos no Complexo-Hospital Universitário Professor Edgar Santos (C-HUPES), na cidade de Salvador-BA. As amostras foram categorizadas em grupo de estudo (n= 20) e grupo controle (n=8), conforme descrito abaixo:

Grupo estudado: pacientes falciformes (genótipos HbSS e HbSC) portadores de necrose avascular asséptica da cabeça femoral, com diagnóstico radiográfico e clínico registrado em prontuário, sem história prévia de traumatismo.

Grupo controle: pacientes portadores de osteonecrose da cabeça femoral, comprovados em exames radiográficos e queixas clínicas registradas em prontuário, não portadores de hemoglobina S em eletroforese (HbA).

Todos os pacientes envolvidos nesse estudo foram selecionados conforme os seguintes **critérios de inclusão**:

- Portadores de necrose avascular asséptica da cabeça femoral, com diagnóstico radiográfico e clínico registrado em prontuário, a serem submetidos ao procedimento de injeção autóloga de CMMO para tratamento de osteonecrose;
- Em estado de saúde estável, sem crises agudas dolorosas nos dias anteriores à cirurgia;
- Não portador de talassemias ou deficiência na Glicose-6-fosfato desidrogenase;
- Não gestante;
- Não usuários de medicamentos ou complexos vitamínicos, exceto ácido fólico em caso do grupo de estudo.

Os pacientes foram acompanhados no ambulatório Magalhães Neto, pertencente ao C-HUPES, pela equipe médica especializada em ortopedia coordenada pelo Prof. Dr. Gildásio de Cerqueira Daltro.

Todo material coletado foi obtido após autorização dos pacientes, através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, pertencente à Universidade Federal da Bahia (registro CEP nº 126/09).

3.2 -Metodologia de fracionamento da medula óssea para obtenção das células mononucleares:

Foram utilizados 2 procedimentos de fracionamento baseados em gradiente de densidade de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) para obtenção das células mononucleares. Para o protocolo clínico, foi utilizado um sistema fechado de separação por centrifugação em equipamento certificado SEPAX (Biosafe SA, Eysins, Switzerland) e kit CS-900 de separação celular (Biosafe SA, Eysins, Switzerland) (figura 4). Este sistema foi desenvolvido para o processamento de sangue e/ou seus componentes de forma rápida e estéril. O uso do sistema automatizado garantiu alto padrão de recuperação e viabilidade celular pós- operação além de impedir eventuais contaminações microbianas comuns ao procedimento manual.

Alternativamente, a fração de CMMOS foi obtida em sistema aberto no laboratório dentro de uma cabine de fluxo laminar horizontal. A medula óssea coletada (5-10ml) em tubo falcon contendo heparina sódica (5000 U.I./ml) foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, para separação do plasma. Em seguida, a amostra foi reconstituída com o mesmo volume

de solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF 1x). A suspensão celular foi adicionada lentamente ao polímero de separação Ficoll- Paque™ 1,077g/L (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) e submetida a centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos. O anel de células mononucleares existente na interface após centrifugação foi separado e lavado uma vez com solução salina.



Figura 4- Processo automático de separação na centrífuga SEPAX (Biosafe SA, Eysins, Switzerland)

3.3 -Ensaio de Unidades Formadoras de Colônias –Fibroblastóides (CFU-F) e osteoblásticas (CFU-O):

A contagem do número de unidades formadoras de colônias-fibroblástóides foi realizada conforme protocolo padrão (PROCKOP; GREGORY, 2007). Cerca de 1×10^6 de células mononucleares de cada paciente foram cultivadas em triplicata em frasco de cultivo de 25 cm² com meio DMEM high glucose (4500mg/l Glucose) (Sigma Aldrich®, USA) + 10% Soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) (meio de cultura basal proliferativo). Após 14 dias de cultivo, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (BSS 1x) (KH₂PO₄ 1,1 mM, 6,1 mM glicose, pH 7.4), fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal de violeta (1 mg/ml) para evidenciação e contagem das colônias. Considerou-se como colônias de progenitores mesenquimais- fibroblastóides, aquelas que possuíam acima de 50 células. O número de colônias foi contado macroscopicamente e correlacionado ao número de CFU-F presentes nas amostras de CMMO.

Após o período de 14 dias, o ensaio de CFU-O foi realizado. O meio de cultura basal proliferativo foi substituído pelo meio indutor osteogênico constituído por DMEM Low Glucose 1x (Sigma Aldrich®, USA) suplementado com 10% SFB, 10⁻⁸M dexametasona

(Sigma Aldrich®, USA), 50µg/ml ácido ascórbico-2 fosfato (Fluka, Sigma Aldrich®, USA) e 10mM β-glicerolfosfato (Sigma Aldrich®, USA) conforme protocolo adotado (PROCKOP; GREGORY, 2007) e mantidas por mais 10 dias. Finalizado o período da indução osteogênica (10 dias), as colônias foram lavadas com solução de BSS 1x, seguidas de fixação com paraformaldeído a 4% durante 10 minutos e coradas em 1% Alizarina Red S, pH 4,1, para evidenciação dos depósitos de cálcio da matriz óssea. Para melhor visualização das colônias, as culturas foram contra-coradas com o corante histológico cristal de violeta.

3.4 -Isolamento, cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais (CTMs):

As células-tronco mesenquimais foram isoladas e cultivadas usando protocolo padrão (PROCKOP; GREGORY, 2007). A fração de CMMO foi incubada sobre superfície plástica na densidade inicial de plaqueamento entre $1-3 \times 10^7$ células após contagem de células viáveis usando o corante de exclusão Azul de Trypan (Gibco®, Invitrogen, EUA) em Câmara de Neubauer (**Laboroptik®, Germany**). As células viáveis foram distribuídas em poços de 9 cm² com meio *Minimum Essential Medium Eagle- Alpha Modifications* 1x (α-MEM) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB e antibióticos, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 4 dias até atingirem 70-80% da confluência. O sub-cultivo foi realizado após lavagem 3x com solução salina livre de cálcio e magnésio (CMF 1x) e descoladas da superfície plástica com solução de 1,25mg/ml tripsina-EDTA (Gibco®, Invitrogen, EUA). Em seguida, a suspensão celular foi distribuída em novas placas/garrafas ou diretamente utilizada em ensaios experimentais.

As culturas foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase (Leica Microsystems Inc., USA) para verificação morfológica das células.

3.5 -Criopreservação das CTMs:

As células em suspensão na densidade de 1×10^6 células/ml foram congeladas em meio crioprotetor contendo 90% de SFB e 10% de DMSO (Dimetil Sulfoxido) (Sigma-Aldrich®,USA). Em cada criotubo foram distribuídos 1 ml de suspensão celular em meio de criopreservação. Em seguida, os criotubos fechados foram transferidos para um sistema de congelamento (Mr. Frosty) com uso de isopropanol e caracterizado pelo

decaimento gradual da temperatura (1°C/minuto). O Mr. Frosty contendo os criotubos com as CTMs foi mantido em congelador a -70°C. Após o término do congelamento, as amostras foram armazenadas em reservatório de Nitrogênio líquido.

3.6 -Caracterização imunofenotípica e viabilidade celular em citômetro de fluxo:

A identificação dos marcadores de superfície das CTMs e a viabilidade em cultura foram avaliadas através de ensaios de citometria de fluxo.

Para caracterização das CTMs, cerca de $1-3 \times 10^5$ células foram marcadas com diferentes anticorpos conjugados aos fluorocromos PE e FITC. As células em suspensão foram distribuídas num total de três tubos para citometria, conforme a tabela 1 abaixo:

Tubos	Marcação/condições	Descrição
1	Autofluorescência	Suspensão celular em salina não marcada com anticorpos.
2	CD105PE/CD90FITC	Suspensão celular marcada com 10µl de anticorpo murino anti-CD105PE e 10µl de anticorpo murino anti-CD90FITC.
3	CD146PE/CD29FITC	Suspensão celular marcada com 10µl de anticorpo murino anti-CD146PE e 10µl de anticorpo murino anti-CD29FITC.

Os anticorpos analisados foram anti-CD105-PE (eBioscience, CA, USA), anti-CD90-FITC (eBioscience, CA, USA), anti-CD146-PE (BD Pharmingen®) e anti-CD29-FITC (eBioscience, CA, USA). As células em suspensão foram centrifugadas, o sobrenadante celular desprezado e os precipitados celulares, em cada tubo, marcados com 10ul de cada anticorpo. As células foram incubadas com os anticorpos por 30 minutos, a seguir foi adicionado 1ml de solução salina CMF1x suplementado com 3% de soro fetal bovino para redução de ligações inespecíficas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Descartou-se o sobrenadante e as células precipitadas foram ressuspensas em solução salina CMF1x e submetidas à leitura imediata no citômetro. Alternativamente, a ressuspensão das células foi feita com solução fixadora contendo 4% de paraformaldeído (*BD FACS Lysing Solution, Beckton Dickinson and Company Biosciences, USA*) diluída de 1:10 em água destilada para realização da leitura no dia posterior.

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o corante 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (BD Pharmingen™), um marcador ácidos nucleicos que pode ser usado em substituição ao iodeto de propídio, para exclusão de células não viáveis por citometria de fluxo.

Para esse ensaio, realizou-se tripsinização das culturas celulares nas condições de normóxia e hipóxia sob análise comparativa. A suspensão de células em ambas as condições foram marcadas durante 20 minutos com o corante e logo em seguida procedeu-se a leitura no citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA) . A amostra foi adquirida e detectada em canal FL3, correspondente à emissão de fluorescência na região vermelha do espectro de luz (650nm).

Todas as amostras foram adquiridas no mesmo citômetro de fluxo (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA) e analisadas no software BD Cell Quest pro software, avaliando-se 50.000 eventos por tubo/condição. Os resultados obtidos foram expostos na forma de histograma.

3.7 - Ensaio de diferenciação celular *in vitro*:

A multipotencialidade característica das CTMS foi avaliada em ensaios de diferenciação osteogênico e adipogênico, *in vitro*, seguindo o protocolo específico já estabelecido na literatura (PROCKOP; GREGORY, 2007).

Para avaliar a diferenciação osteogênica, inicialmente foram plaqueadas 5×10^4 células em $1,9 \text{ cm}^2$ em triplicatas em placas de 24 poços. Após as células atingirem a confluência parcial, trocou-se o meio de proliferação para o meio indutor osteogênico constituído conforme protocolo adotado por PROCKOP e GREGORY (2007). O meio indutor era substituído duas vezes na semana e a cultura mantida até 21 dias.

No final do período da diferenciação osteogênica, a cultura foi lavada e fixada com paraformaldeído 4%, em seguida coradas com 1% Alizarina Red S (Sigma Aldrich®, USA) (pH 4,1) que evidencia a deposição da matriz calcificada. O procedimento rotineiramente foi realizado em triplicata e os resultados registrados em imagens fotográficas.

Para avaliar o potencial de diferenciação adipogênica, cerca de 5×10^4 células foram plaqueadas em $1,9 \text{ cm}^2$ em placa de 24 poços. Após atingirem a semi-confluência, as células foram submetidas ao meio indutor adipogênico (DMEM high glucose 1x, 10% soro fetal bovino, 10^{-8} M dexametasona, $100 \mu\text{M}$ indometacina, $2,5 \mu\text{g/ml}$ insulina e $500 \mu\text{M}$ IBMX) preparado conforme protocolo adotado (PROCKOP; GREGORY, 2007). O meio indutor foi trocado duas vezes na semana, até a conversão satisfatória das CTMS em adipócitos. Após o período de conversão ideal, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% e coradas com uma solução saturada de Oil Red O para evidenciação das gotículas de gordura presentes na cultura.

3.8- Detecção da Osteocalcina Intracelular:

Para análise molecular da diferenciação osteogênica, cerca de $2-3 \times 10^5$ CTMS foram cultivadas em meio osteoindutor, durante 7 dias ou mantidas em condições controle. Após 7 dias de cultivo, as células foram lavadas com CMF1x, tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e tratadas com solução fixadora (contendo paraformaldeído) durante 10 minutos. Em seguida, as células foram permeabilizadas (solução de saponina 0,6% com soro fetal bovino) e adicionou-se 10 uL do anticorpo murino anti-Osteocalcina humana conjugado a PE (R&D systems®) conforme protocolo recomendado pelo fabricante. As células marcadas foram ressuspensas em volume pequeno da solução salina CMF 1X para leitura no FACS.

A aquisição dos eventos foi feita após detecção de sinal em FL2 em citômetro (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA) correspondente à emissão de fluorescência da phycoerythrin (PE). Os resultados obtidos foram expostos na forma de histograma.

3.9 -Incubação em câmara de hipóxia:

Alguns ensaios foram realizados após pré-condicionamento em condições de normóxia e hipóxia durante 48h. O condicionamento em atmosfera hipóxica foi desenvolvido em jarra de anaerobiose (figura 5A) contendo um gerador de atmosfera (Anaerobac®-Probac do Brasil). Este gerador produz uma atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico, em um sistema hermeticamente fechado, onde as culturas foram mantidas durante 48 horas. A hipóxia foi confirmada pelo uso da fita indicadora externa, que detecta a presença (figura 5B) e redução de oxigênio (figura 5C) através da mudança de coloração de azul para branca. A incubação ocorreu em estufa a 37°C, conforme recomendações do fabricante. Após esse intervalo de tempo, as culturas foram usadas nos ensaios experimentais.

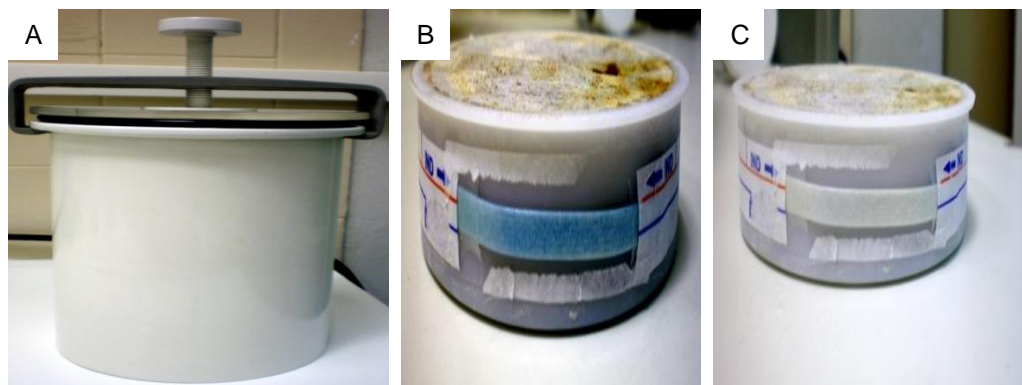


Figura 5- **Modelo de estudo adaptado para hipóxia.** (A) Jarra de anaerobiose hermeticamente fechada; (B) gerador de anaerobiose na presença de oxigênio, fita indicadora azul; (C) gerador de anaerobiose na ausência de oxigênio, fita indicadora na cor branca.

3.10- Ensaio de migração celular em câmara de Boyden:

O potencial migratório das células-tronco mesenquimais foi avaliado através do ensaio, *in vitro*, em câmaras de Boyden com poros de 8µm (Millicell Cell Culture Insert, Millipore, USA) (Figura 6).

Após condicionamento em hipóxia durante 48 horas, as células-tronco mesenquimais foram tripsinizadas e distribuídas sob a membrana semipermeável na parte superior do inserto, na densidade de 5×10^4 células totais. Na parte inferior utilizou-se meio de cultura α - MEM 1x suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Em paralelo, as células da mesma cultura foram mantidas sob condição padrão de incubação a 37°C, em estufa de CO₂ a 5% durante o mesmo período de tempo.

Ao final do período determinado, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e melhor evidenciadas com corante histológico. O número total de células que atravessou em direção ao meio quimioatratador foi contado na parte inferior da membrana em quatro campos randômicos e assim obtida a média. Esse valor foi multiplicado pela área total do inserto já definida pelo fabricante (0,33 cm²).

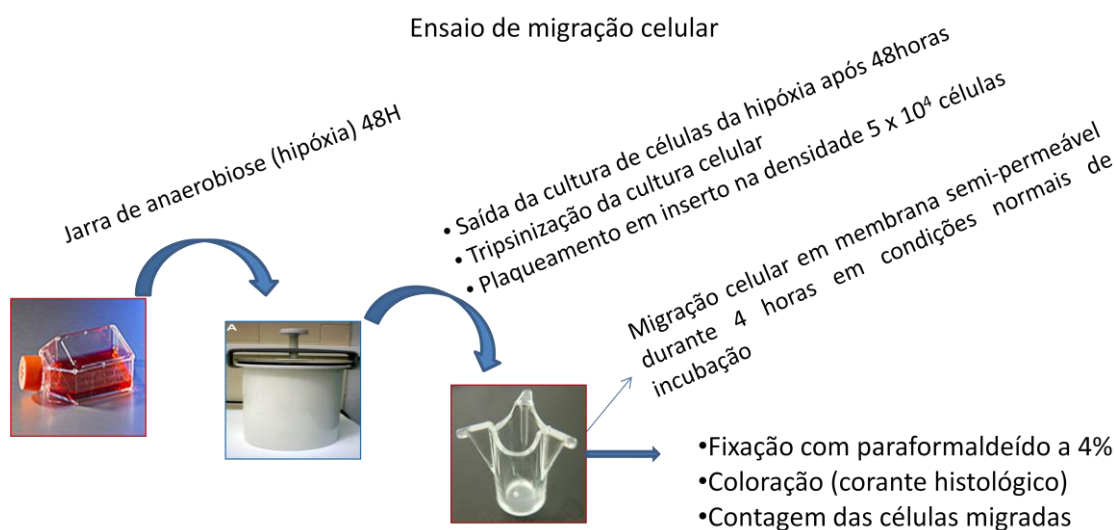


Figura 6 - Modelo de estudo para avaliação do padrão de migração das células-tronco mesenquimais *in vitro*.

3.11- Imunofluorescência:

As CTMS foram sub-cultivadas e distribuídas em lamínulas de vidro. Após cultivo, as monocamadas foram processadas para imunofluorescência. Inicialmente, as monocamadas foram fixadas com solução de paraformaldeído a 4% durante 10 minutos, seguindo-se à permeabilização com solução de 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich®) em CMF1x. Após esse período, o anticorpo primário diluído (quadro 1) foi adicionado em solução de bloqueio contendo 0,1% Triton X-100, 3% soro fetal bovino em CMF e mantidas a 4° C *overnight* em câmara úmida. Após esse período, as lamínulas foram lavadas com a solução 0,1% Triton X-100 e seguiu-se a marcação com os anticorpos secundários diluídos em solução de bloqueio (quadro 1) durante 1 hora de incubação, ao abrigo da luz a 37°C em câmara úmida.

Para evidenciar o núcleo das células, foi usado DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) na diluição de 1:10. As lamínulas foram montadas em meio Prolong Antifade Vectashield® (Vector, USA) e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus®) usando filtro específico ou microscópio confocal SP5 (Leica).

Quadro 3- Relação de anticorpos primários e secundários usados na imunocitoquímica

Anticorpos primários	Antígeno	Espécie (Produção)	Fornecedor	Diluição
	Von Willebrand factor	Coelho	Sigma Aldrich ®	1:400
	Vimentina	Coelho	Vector Laboratories	1:400
	CD31	Camundongo	R&D Systems	1:50
Anticorpos secundários	IgG anti-mouse (H+L)	Cavalo	Vector Laboratories	1:200
	IgG anti-habbit (H+L)	Cabra	Vector Laboratories	1:200

3.12- ELISA:

Sobrenadantes de CTMS em cultivo sob as condições de hipóxia e normóxia foram coletados e submetidos à detecção de citocinas e fatores angiogênicos (IL-8, SDF-1 α , TGF- β) através da técnica de imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) (quadro 2).

Para realização do ensaio, inicialmente os sobrenadantes foram centrifugados a 2500 rpm, durante 10 min a 4°C, para sedimentação e eliminação de possíveis debris celulares em suspensão. As amostras foram mantidas a -20°C até o dia da realização do ensaio.

Quadro 4- Apresentação dos kits de ELISA utilizados nas dosagens de citocinas nos sobrenadantes celulares.

Antígeno	Limite de detecção		Fornecedor
	Mínimo (pg/ml)	Máximo (pg/ml)	
SDF-1 α	31,25	2000	R&D systems
TGF- β	62,5	4000	Invitrogen
IL-8	12,5	800	Invitrogen

3.13- Isolamento de RNA:

Para obtenção do RNA, a monocamada celular aderida ao frasco de cultura foi lavada com solução salina BSS 1x para retirada do meio de cultura. Em seguida adicionou-se o tampão de extração (Lysis Buffer RLT, Qiagen®) contendo o agente redutor beta-mercaptoeptanol (Sigma-Aldrich®). O conteúdo retirado foi transferido para um criotubo estéril e congelado a -70°C, até o momento de uso.

A etapa de extração do RNA foi realizada com uso de minicolunas (RNeasy Mini Kit, Qiagen®) com membrana de sílica que tem a função de reter apenas o conteúdo de RNA enquanto o material contaminante é eliminado nas lavagens seqüenciais. A concentração e pureza do RNA obtido foram avaliadas por leitura espectrofotométrica a 260nm em espectrofotômetro de nanovolume (Nanodrop). O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm, considerando-se como pureza satisfatória uma relação próxima de 2,0. A integridade do RNA estava conservada na maioria das amostras. Diferenças nas concentrações das amostras foram normalizadas pela redução de seus volumes por centrifugação a vácuo.

3.14- Síntese de cDNA:

Todos os RNAs isolados serviram como molde na síntese dos respectivos DNAs complementares (cDNA), através de uma reação realizada pela enzima transcriptase reversa. A síntese dos cDNAs foi realizada conforme as seguintes etapas: 1µg do RNA molde foi submetido a tratamento com 2 µL DNase I (1U/ µL) em tampão específico, a 37°C por 10min e posteriormente a 75°C por mais 5 minutos. Para cada amostra de RNA tratado foram adicionados 3 µL da mistura (mix) contendo: 1 µL de dNTPs (10mM), 0,5 µL de OligodT (0,5 µg/ µL) e 0,5 µL de Random primer (100ng/µL). A mistura foi incubada a 65°C por 10 min e logo depois colocada no gelo. Os nucleotídeos utilizados na reação continham as 4 bases (púricas e pirimídicas) fosfatadas: desoxiadenosina trifosfatada- dATPs, dexositimidina trifosfatada-dTTPs, desoxicitidina trifosfatada-dCTPs e desoxiguanosina trifosfatada- dGTPs. Após a imersão em gelo, adicionou-se à reação 6 µL do mix da enzima transcriptase reversa Super Script III (ImProm-II, Promega, USA), composto por: tampão de síntese a uma concentração final de 5x, DTT (0,1M), RNase OUT (40U/ µL) e a enzima Super Script III (200UI/ µL). A reação foi incubada a 25°C por 10 min, 50°C por 2h e 75°C por 15min. Após este período, a enzima foi inativada com RNase H (5U/ µL) em incubação a 37°C por 30 minutos e a 72°C por 10 min. Finalmente, as amostras de cDNA foram diluídas de 1:3 com água Milli-Q e armazenadas a -20°C para posterior utilização em ensaio de qRT-PCR.

3.15- qRT-PCR:

Com o intuito de determinar a melhor concentração para cada primer, realizou-se o teste de eficiência com o uso de uma mistura de cDNAs diluída em série. As concentrações finais variaram entre a máxima de 800nM e a mínima de 100nM, sendo escolhidas as concentrações de 200nM para os primers MCAM e BGLAP e 400nM para os demais genes. As reações foram realizadas em triplicata, usando 3 µl do cDNA de interesse diluído de 1:30, adicionando-se 3µl do primer de interesse e 6µl do Syber® Green Dye

(Applied Biosystems®). As reações ocorreram em placas de 96 poços colocadas em Termociclador (7300 SDS, Applied Biosystems®). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase), 95°C por 10 minutos (ativação da DNA Polimerase), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 minuto (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon). A análise inicial dos dados foi feita através do programa 7300 System SDS Software, Applied Biosystems®, por meio do qual um *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene foi estabelecido. Assim, a partir da intersecção do *threshold* com a curva de amplificação, obtém-se o Ct (*Threshold cycle*) da amostra.

Para análise final da expressão gênica, adotou-se o cálculo de expressão relativa pelo método de Pfaffl, considerando a variação dos Cts (Cycle Threshold) para cada amostra e a eficiência dos primers (diferente de 100%). A expressão do transcrito na amostra alvo foi analisada em relação a uma amostra referência (controle ou não tratada). A diferença entre os valores do Cts da amostra referência e a amostra tratada, gerou o coeficiente Δ CT. O mesmo cálculo da variação dos Cts foi aplicado para os transcritos endógenos (ou constitutivos) nas mesmas amostras, usados como normalizadores. A normalização foi feita utilizando 2 genes endógenos (GAPDH e β -ACTINA), que juntos forneceram dados computados na geração de um valor correspondente à estabilidade de pelo menos 1 deles.

As sequências dos iniciadores (primers) para análise da expressão gênica foram obtidas no banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). As similaridades dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente diante da sua similaridade aos dados de RNAm humanos através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)/ Human genome. A tabela 2 apresenta a relação dos primers escolhidos para análise.

Tabela 2- Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados para amplificação por qRT-PCR.

As sequencias estão representadas na direção 5'→ 3'. Fwd: *Forward*, Rev: *Reverse*.

Genes		Seqüências
SDF1	Fwd	CATTGACCCGAAGCTAAAGTG
	Rev	TTTCTGGGCAGCCTTTCTC
COLLAGEN I	Fwd	CACACGTCTCGGTCATGGTA
	Rev	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG
ALPL	Fwd	AGCCCAGAGATGCAATCG
	Rev	CTATCCTGGCTCCGTGCTC
BGLAP	Fwd	CCTCCTGCTTGGACACAAAG
	Rev	TGAGAGCCCTCACACTCCTC
RUNX2	Fwd	CCATAACCGTCTTCACAAATCC
	Rev	AATGCGCCCTAAATCACTG
MCAM	Fwd	ACTTCCACCTCCACCAGCTC
	Rev	GTCTGCGCCTTCTTGCTC
ENG	Fwd	CTGAGGACCAGAAGCACCTC
	Rev	TCCATGTCCTCTTCCTGGAG
HIF1A	Fwd	GAAGTGGCAACTGATGAGCA
	Rev	GCGCGAACGACAAGAAA
Genes constitutivos (normalizadores)		
GAPDH	Fwd	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
	Rev	TGTTGCTGTAGCCAAATTCG
β-ACTIN	Fwd	GGCACCCAGCACAATGAAG
	Rev	CCGATCCACACGGAGTACTTG

3.16- Análise Estatística:

As análises estatísticas e representações gráficas foram realizados através do software GraphPad Prism 5 (GraphPad, USA). Para avaliação da freqüência de unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (CFU-F) foi utilizado o teste T-student e pós-teste Mann Whitney com nível de significância de 5%. Os dados correspondentes à taxa de proliferação celular foram expressos pela média \pm DP e analisados pelo teste T-student pareado (*p < 0,05). Para avaliação da osteocalcina intracelular, foi escolhido o teste One-Way ANOVA e pós-teste de múltipla comparação Bonferroni. Para a análise dos valores obtidos no ELISA imunoenensaio, foi utilizado o teste T-student pareado, com nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4.1- Seleção dos pacientes e fracionamento da medula óssea para obtenção das células mononucleares:

O material biológico utilizado neste trabalho consistiu da medula óssea aspirada da crista ilíaca de 28 pacientes (Figura 7A) portadores de osteonecrose da cabeça femoral categorizados em grupo controle e falciformes conforme o genótipo definido em eletroforese de hemoglobina (Quadro 5). No total foram incluídos 12 pacientes homocigóticos para o alelo β^s (HbSS), 8 pacientes do genótipo SC (HbSC) e 8 pacientes com padrão de hemoglobina normal (HbA). A média de idade entre os pacientes com anemia falciforme (HbSS) variava entre $29,1 \pm 10,52$ anos. Para os pacientes HbSC, a idade variava entre $42,1 \pm 11,34$ anos. A média de idade dos pacientes HbA variava entre $51 \pm 11,2$ anos. Algumas informações indisponíveis em prontuário não puderam ser contempladas em nosso trabalho (lacunas não preenchidas no Quadro 5).

O processo de fracionamento da medula óssea, quando realizado em sistema fechado de separação por centrifugação SEPAX e kit CS-900, permitiu a obtenção de 50 ml de células mononucleares suspensas em solução fisiológica suplementada com 2% de albumina humana sérica. A suspensão celular foi coletada em uma bolsa plástica estéril e direcionada ao centro cirúrgico para injeção no local da osteonecrose. O volume do conteúdo injetado no centro da lesão variou entre 30 a 35 ml de suspensão celular (Figura 7B).

O número total das células mononucleares foi avaliado em câmara de Neubauer através da contagem manual na presença do corante de exclusão vital Azul de Trypan. O número total de células mononucleares isoladas ao fim do procedimento foi dependente do volume da amostra inicial. O rendimento médio em geral foi de $2,1 \times 10^7 \pm 1,46$ células mononucleares por mililitro de suspensão celular após separação por Ficoll®.

4.2 - Avaliação do número de CFU-F na fração de CMMO em condições controle e em hipóxia

A frequência de colônias fibroblastóides nas células mononucleares totais foi verificado em ensaio de CFU-F (Figura 8A), conforme protocolo adotado. Apesar do pequeno número amostral, notou-se a maior frequência de colônias nas amostras dos pacientes com anemia falciforme (HbSS) em comparação àquelas oriundas do grupo controle (HbA) ($p=0,0409$)

(Figura 8B). Não houve diferença significativa entre a frequência de CFU-F na medula óssea de pacientes HbSC e a do grupo controle.

Morfológicamente, a maior parte das unidades formadoras de colônias apresentou células pequenas com formato fibroblastóide ou fusiforme com prolongamentos citoplasmáticos alongados, quando cultivadas em condições controle (normóxia) (Figura 9).

Após o pré-condicionamento em hipóxia temporária, houve redução no número de CFU-F quando comparado à condição controle (normóxia) ($p= 0,0078$) (Figura 10).

A morfologia celular foi alterada nas colônias submetidas ao pré-condicionamento em hipóxia. As células passaram a se apresentar disformes, largas, achatadas e hipertróficas (Figura 11).

Ao final de 10 dias de cultivo em meio indutor osteogênico em condições controle, observou-se o aparecimento de regiões densas, representativas de nódulos de mineralização, que foram evidenciados pela coloração com Alizarina Red S. Após pré-condicionamento em hipóxia, observou-se tendência à decréscimo na frequência de colônias com deposição da matriz óssea em cultura (Figuras 12/13).

Quadro 5- Caracterização do grupo de estudo e respectivos dados laboratoriais

CFU-F : Idade x fatores de risco						Dados Hematológicos e Bioquímicos (pré-cirúrgicos)								Medicamentos em uso	Sintomatologia Atual
Paciente	Idade	Sexo	Genótipo	Fator de risco /diagnóstico final	CFU/1 x10 ⁶ CMMO	Hb (g/dl)	Ht (%)	PLT (x10 ³)	TP (%)	TTPa (")	Glic (mg/dl)	Uréia (mg/dl)	Creat (mg/dl)		
1	15	F	HbSS	ON cabeça do fêmur direito	36,0	92	26,1	428	90	25	70	16	0,6	Ácido fólico	
2	18	F	HbSS	ON femur direito Ficat 3	21,5	8,1	27	314	100	-	-	18	0,7	Acido fólico	Nega dor
3	25	M	HbSS	ON bilateral	11,0	9,2	27	303	71		101	14	1,1	HU,ac folico, tramal, fluoxetina	Após 2 meses relatou melhora da dor
4	25	M	HbSS	ON bilateral	34,5	11,5	35,5	215	84	33,8	81	26	2,6	HU e ácido fólico	Relata redução da dor
5	26	M	HbSS	ON femur direito Ficat 2	21,0	9	24	322	64		77	22	0,6	Tegretol e ac fólico	
6	26	M	HbSS	ON cabeça femoral	17,3	11,5	33,7	403	115	54,3	69,4	23,8	0,66	HU e acido fólico	
7	28	F	HbSC	ON cabeça femoral bilateral	4,0	11,5	36,4	660	100	31	93	16	1	Ácido fólico	
8	31	F	HbSS	ON cabeça do fêmur esquerdo	5,3									Ácido fólico e ACO injetável	
9	31	F	HbSC	ON bilateral/ Ficat 3 (D)	1,3	11,4	33,7	243	91	34	112	16	0,8	Dipirona e amitriptilina	Após 2 meses ainda se queixava da dor
10	33	M	HbSS	ON bilateral/ implante no D	2,7	8,6	28	425	80	35	76	15	0,7	HU e ácido fólico	
11	39	M	HbA	Ficat 2 (E)/Ficat 3 (D) implante no E	28,0	15,8	49	265			82	45	0,7	Rivotril e atenolol	Relata dor desde o procedimento
12	40	F	HbSC	ON femur E Ficat 3	6,7	10,3	29,2	379	89	23	81	18,7	0,6	ácido fólico	
13	42	M	HbSS	Ficat 2 (E)/Ficat 3 (D) implante no E	3,0	10,4	31,2	246			80	34	0,8	acido fólico	

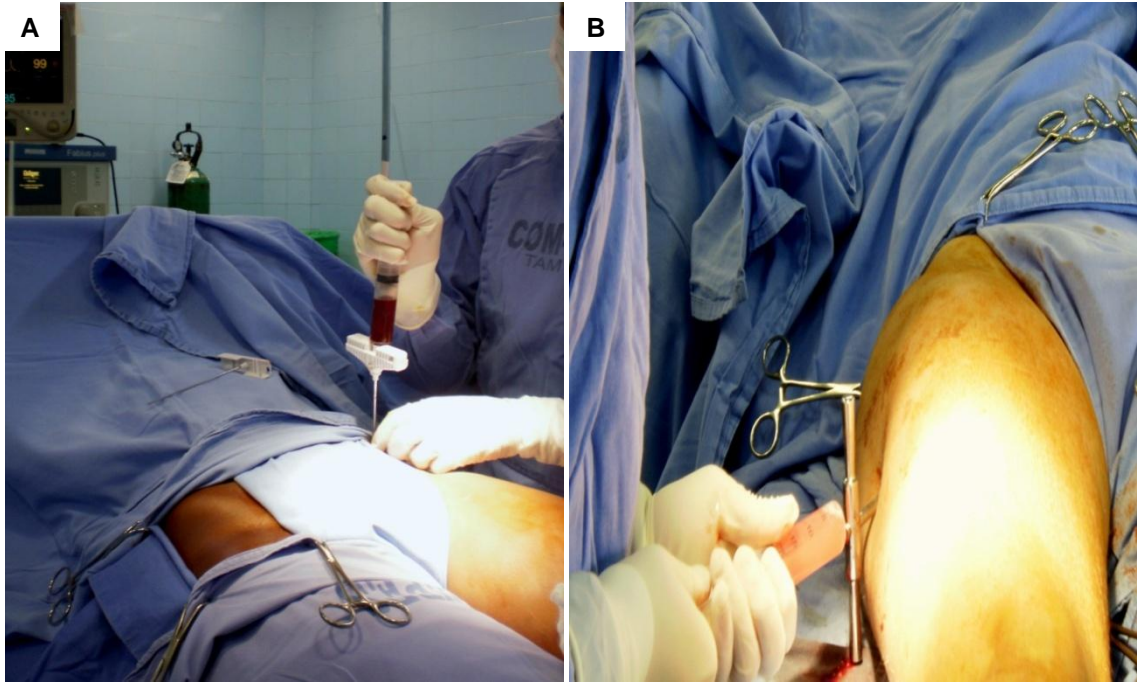


Figura 7- Registro Fotográfico do procedimento de descompressão óssea e injeção autóloga da fração de células mononucleares da medula óssea para tratamento da osteonecrose da cabeça femoral. (A) Punção da medula óssea da crista ilíaca. (B) Injeção da fração de células mononucleares da medula óssea na região da cabeça femoral.

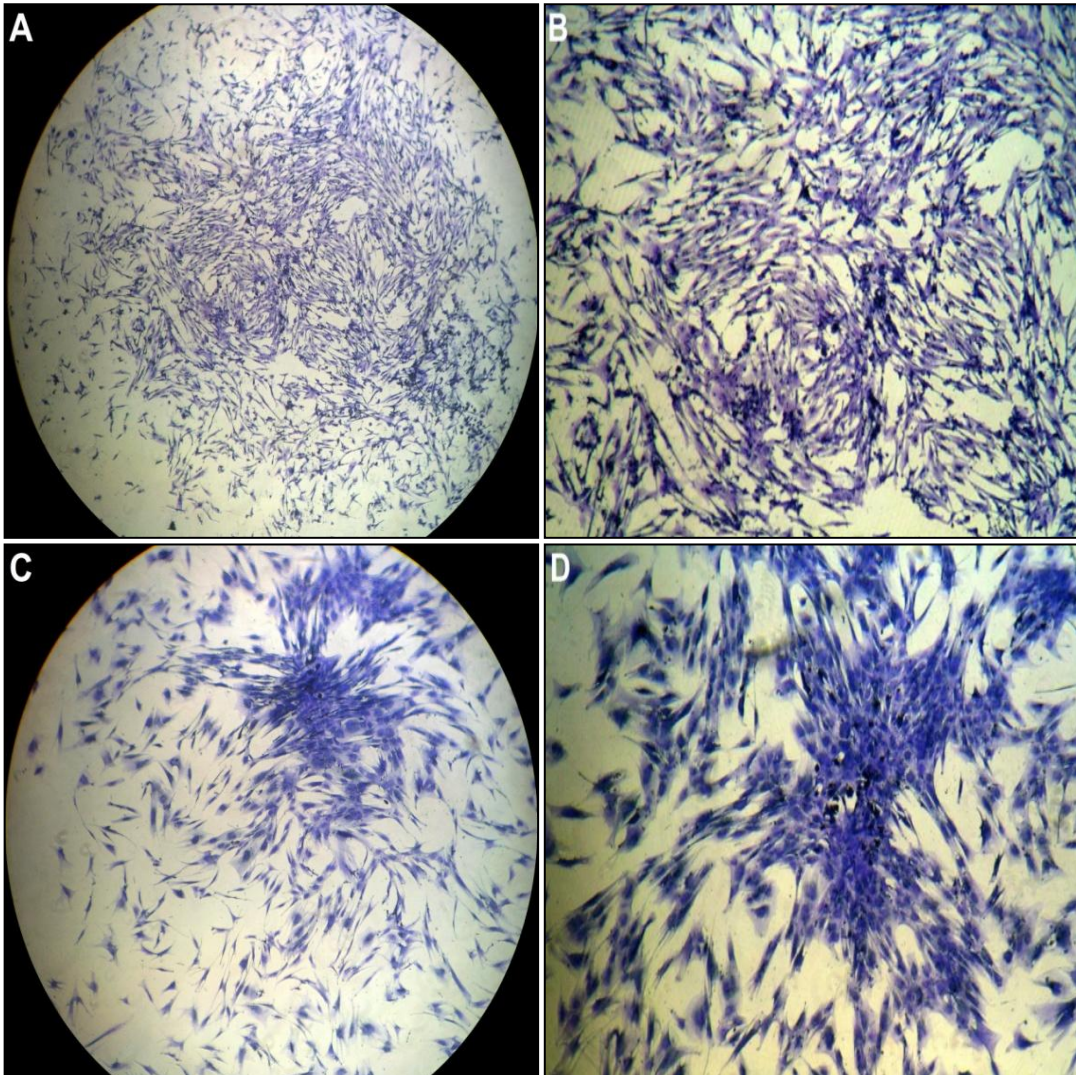


Figura 9- **Fotomicrografia da morfologia das CFUC-F.** Células organizadas em forma de colônias isoladas a partir das CMMO dos pacientes do grupo controle (A e B) e HbSS (C e D). Imagens vistas em objetiva de 4x sem zoom (A,C) e com zoom ótico (B,D) (18,9mm) respectivamente.

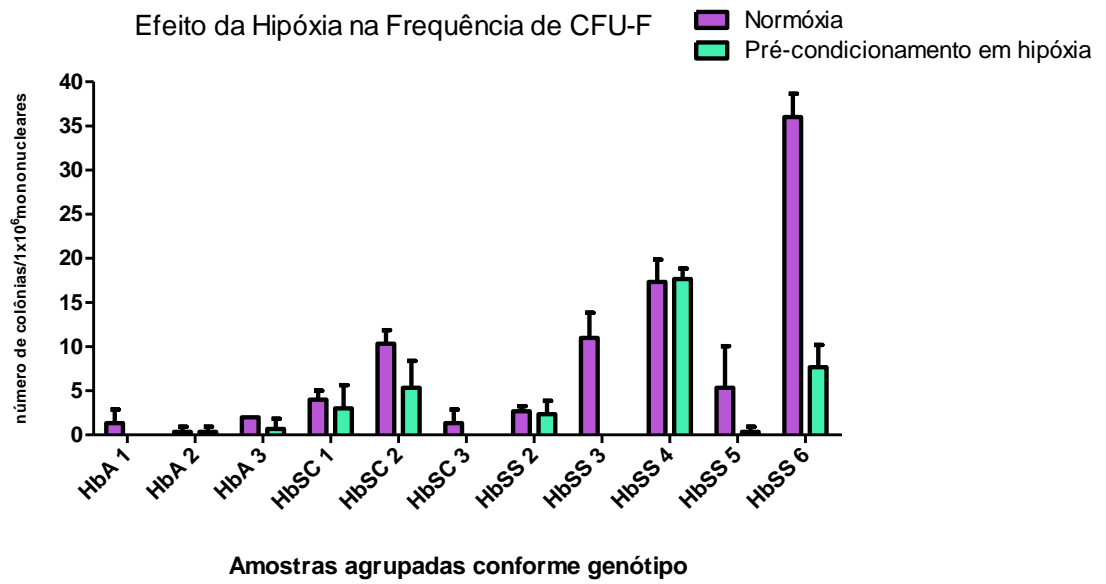


Figura 10- Gráfico comparativo entre o número de unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (Média ± DP) em condições de normóxia e hipóxia temporária. Dados obtidos a partir de onze experimentos independentes. (t-Teste e pós-teste de Wilcoxon $**p = 0,0078$).

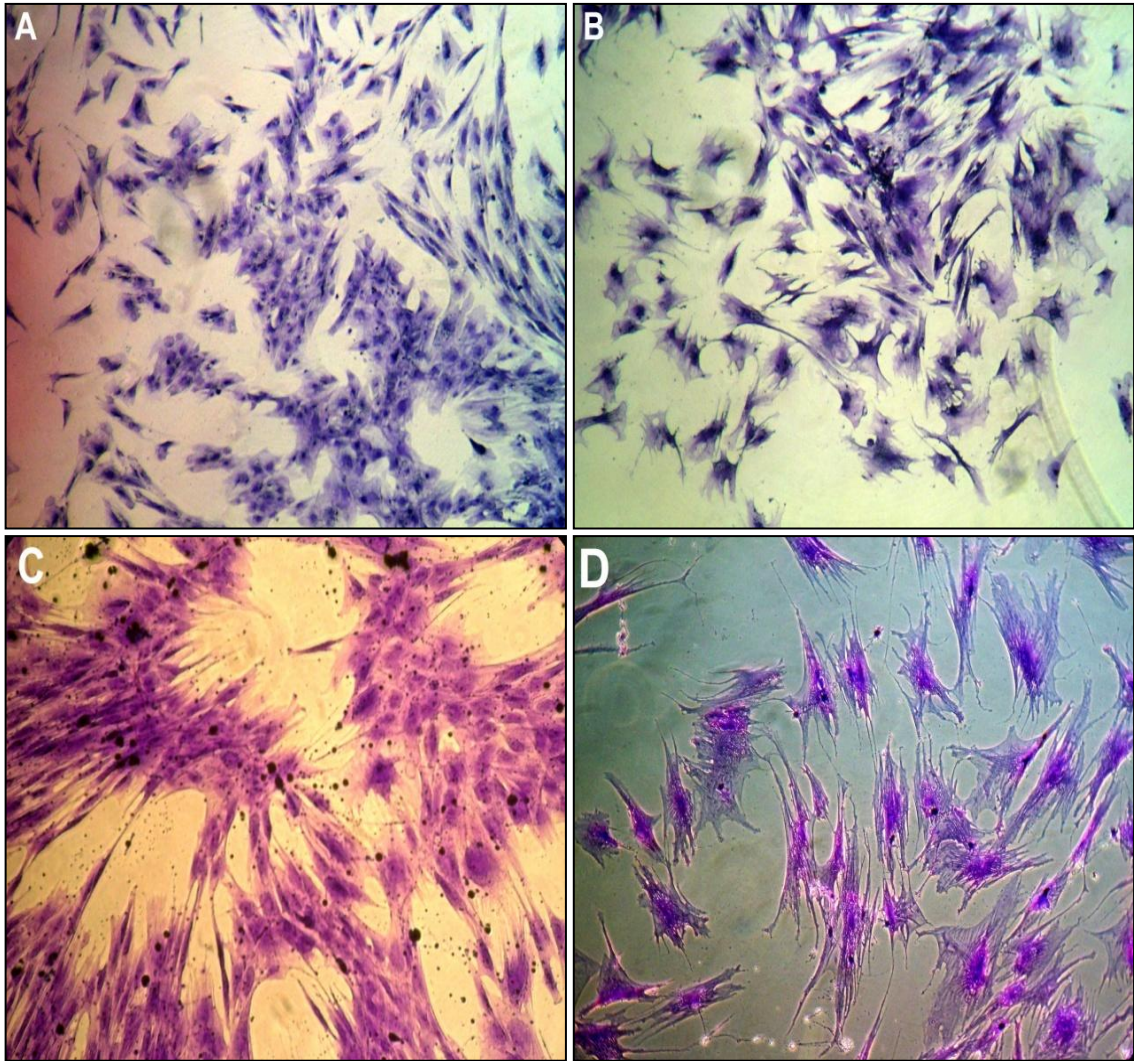


Figura 11- Fotomicrografia representativa das CFU-F após 14 dias de cultivo e coradas com cristal violeta. Colônias HbSC e HbSS em normóxia (A/C) e hipóxia (B/D) respectivamente. Imagens registradas em objetivas de 10x.

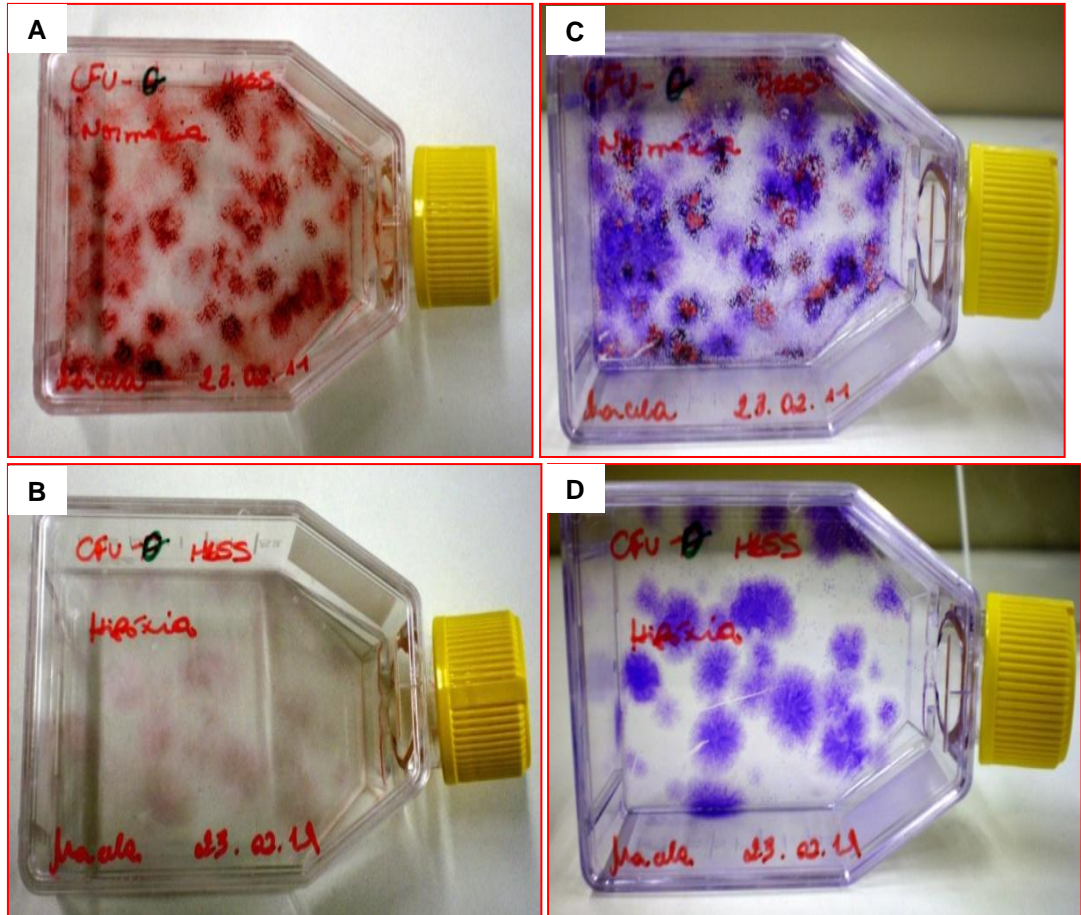


Figura 12- Registro fotográfico representativo do ensaio de CFU-O. Colônias isoladas a partir da amostra das CMMO de paciente falciforme (HbSS), em normóxia (A) e após pré-condicionamento em hipóxia (B) coradas em Alizarina Red S e contra-coradas com corante histológico cristal violeta (C e D).

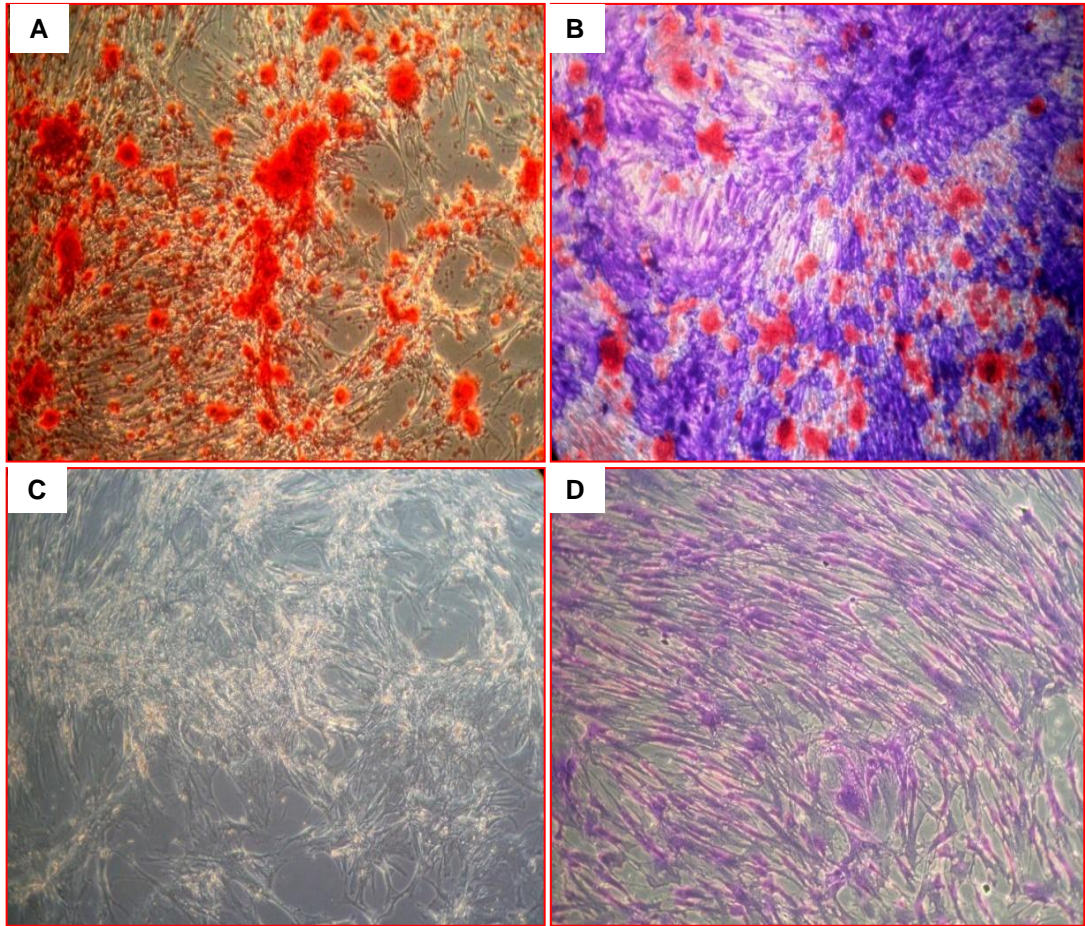


Figura 13- **Fotomicrografia representativa da coloração em Alizarina Red S e cristal violeta.** Colônias isoladas a partir da amostra das CMMO de paciente falciforme (HbSS). Deposição da matriz calcificada (A e B) evidenciada em vermelho. Resposta negativa após pré-condicionamento em hipóxia (C e D). (Aumento de 10x).

5.3 - Aspectos morfológicos após isolamento, cultivo e expansão de células-tronco mesenquimais (CTMs):

As culturas foram rotineiramente observadas ao microscópio invertido. As células-tronco mesenquimais mostravam-se tipicamente fibroblastóides quando cultivadas em condições normais. Diversidade quanto ao tamanho das células foi notada ao longo das passagens, caracterizando uma população de células-tronco mesenquimais heterogênea.

Não houve diferença morfológica entre as CTMs de pacientes HbA (Figura 14A) e CTMs de pacientes HbSS observadas ao microscópio invertido (Figura 14B).

Alterações morfológicas foram notadas após pré-condicionamento das culturas de CTMs em hipóxia por 48 horas. As células se tornaram hipertróficas, achatadas, com núcleos irregulares e citoplasma contendo vacúolos e granulações inespecíficas (Figura 15).

5.4 - Avaliação da proliferação celular:

O número total de CTMs foi avaliado em função do tempo e condições de cultivo através da contagem com azul de Trypan, conforme esquematizado na figura 16.

Observa-se que o número de CTMs cultivadas em normóxia teve sua taxa de proliferação constante, com aumento do número total de células após 7 dias. Entretanto após pré-condicionamento em hipóxia, as CTMs apresentaram uma taxa de proliferação reduzida em comparação com as culturas em normóxia (Figura 17).

As diferentes amostras (pacientes controle e falciformes) apresentaram comportamento semelhante quanto ao perfil proliferativo nas duas condições de incubação (Figura 18).

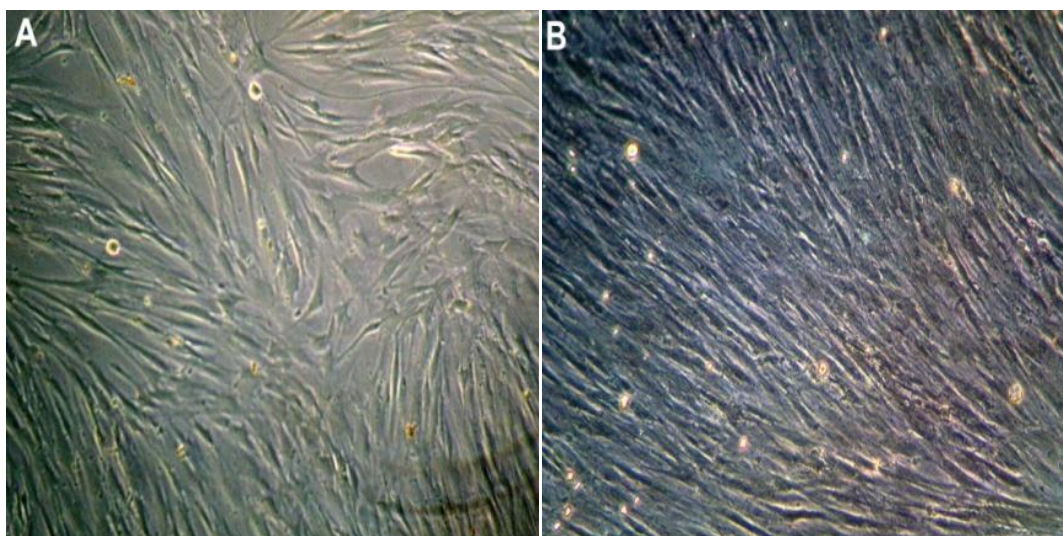


Figura 14 – (A) Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs HbA em pré-confluência. (B) Fotomicrografia da cultura de células-tronco mesenquimais, em alta confluência, proveniente de amostra de medula óssea de paciente falciforme (HbSS) (aumento de 20X).

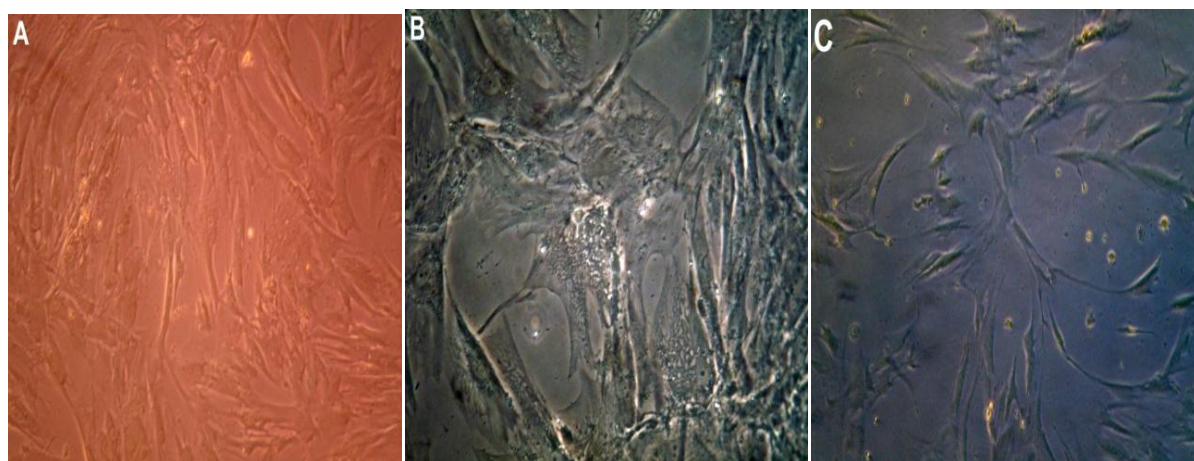


Figura 15- Fotomicrografia representativa das culturas celulares após pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas. (A) CTMs HbA. (B) CTMs HbSS. (C) CTMs HbSC (aumento de 20X).

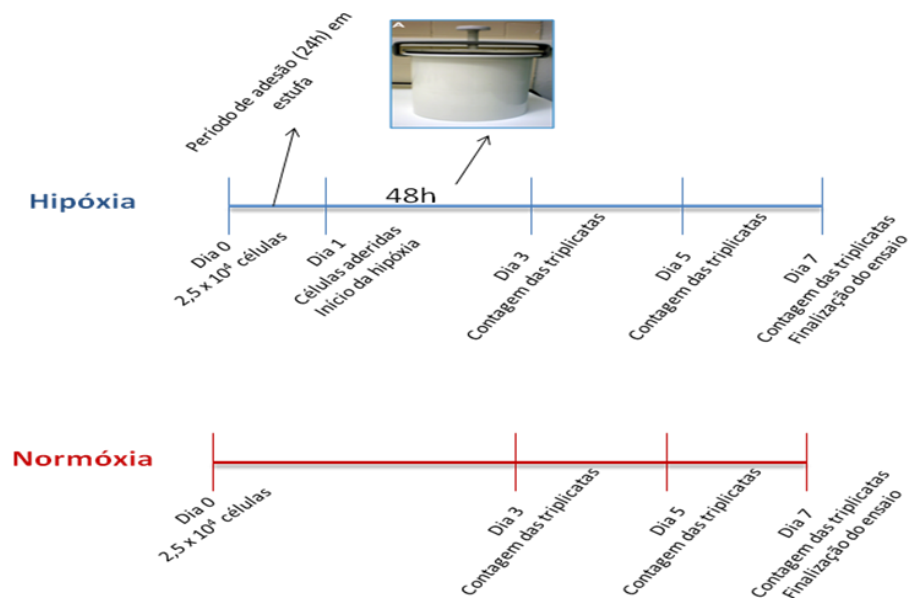


Figura 16- **Esquema ilustrativo do ensaio de proliferação celular.** Em azul, a linha do tempo representa as etapas realizadas para as culturas destinadas à incubação em hipóxia. Em vermelho, a linha do tempo apresentando as etapas do ensaio em normóxia.

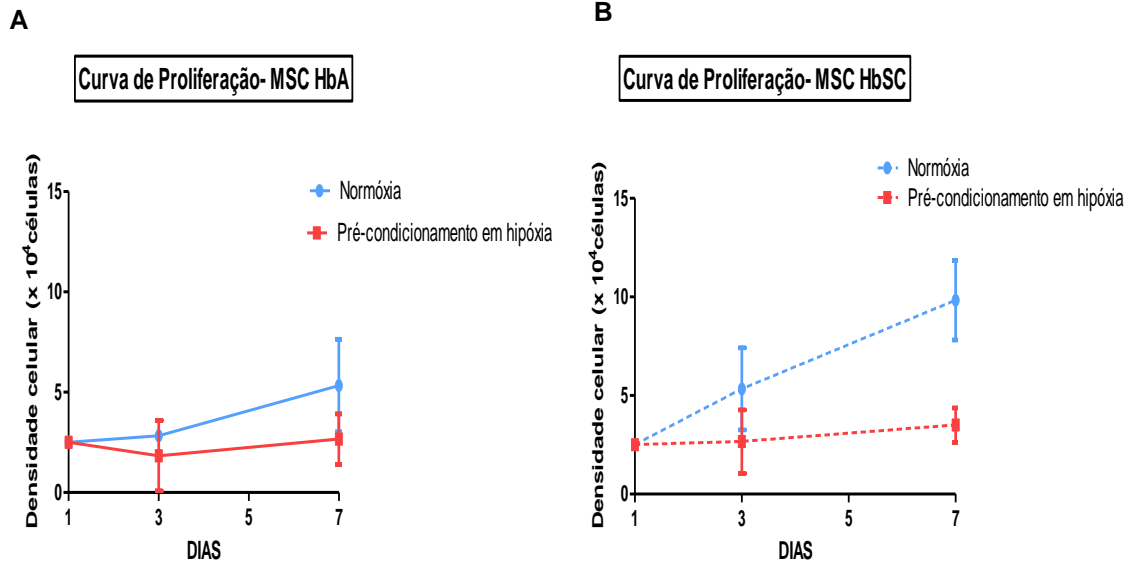


Figura 17- **Curva de proliferação das CTMs isoladas da medula óssea de (A) paciente controle e (B) falciforme (HbSC) nas duas condições de incubação ao longo de 7 dias totais.** Experimentos representativos (n=8). Dados apresentados como média \pm DP.

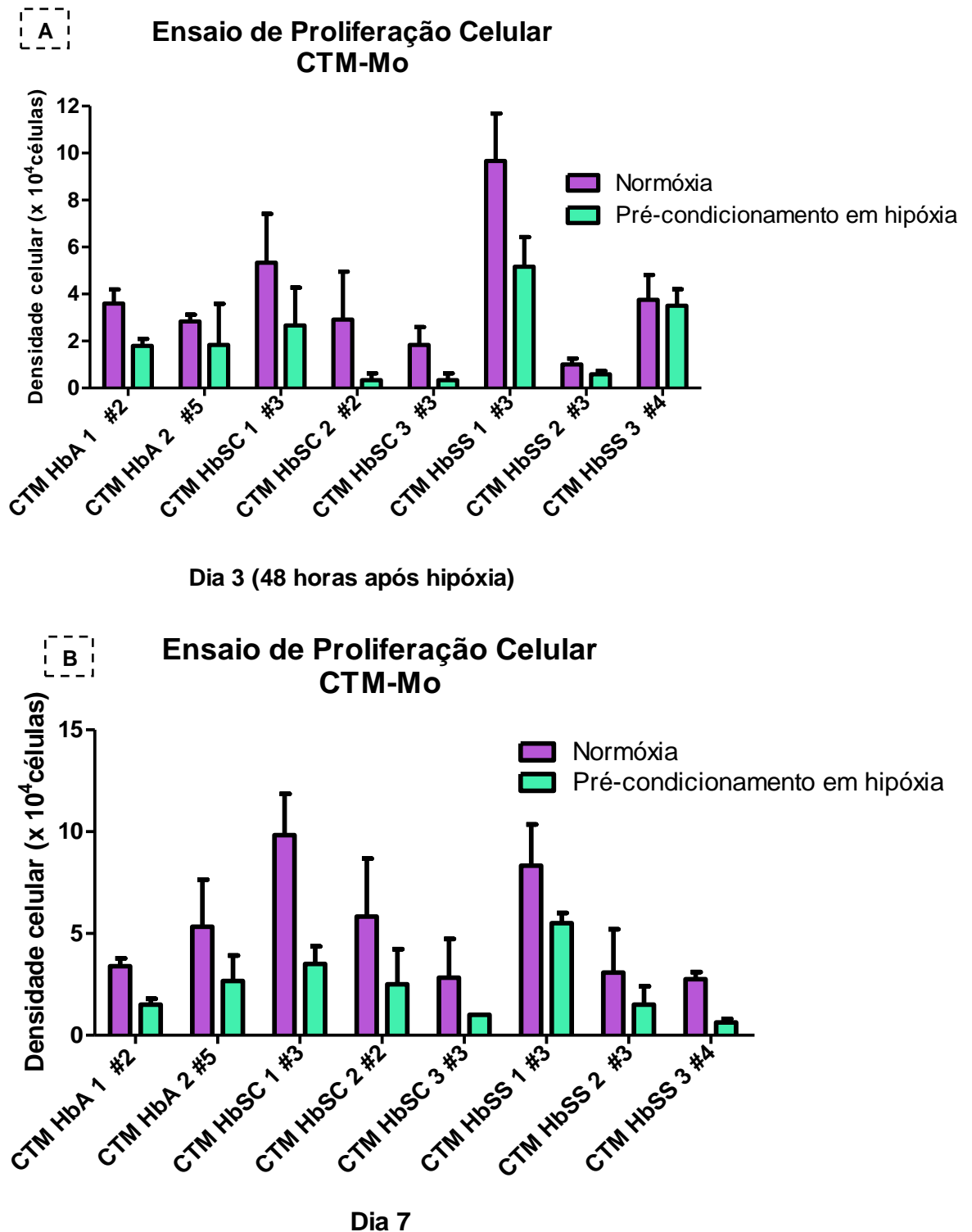


Figura 18- Perfil proliferativo das CTMs de pacientes controle e falciformes sob duas condições de incubação (normóxia e após hipóxia temporária). (A) Contagem (triplicata) após 3 dias do plaqueamento inicial (** $p=0,0074$). (B) Contagem (triplicata) após 7 dias do plaqueamento inicial (** $p=0,0012$). Dados apresentados como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$ (teste T-student pareado).

5.5 - Avaliação da Viabilidade celular em citômetro de fluxo:

A avaliação da viabilidade das células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes foi realizada por citometria de fluxo após incubação com o corante 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD). Nesse ensaio foi possível verificar a integridade da membrana plasmática em normóxia e após hipóxia temporária .

A análise individual dos histogramas revela a presença de duas populações delimitadas nos gráficos como gate M1 e gate M2. Essas populações corresponderam respectivamente às células viáveis (fluorescência baixa ou negativa) e não-viáveis (fluorescência alta ou células positivas para 7-AAD). O número de eventos adquiridos em cada gate foi analisado no software BD Cell Quest e estão expressos na Figura 19.

Pode-se observar que existem células viáveis após o pré-condicionamento temporário em hipóxia.

5.6 - Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo

As culturas foram analisadas por citometria de fluxo para os antígenos de superfície CD105, CD29, CD146 e CD90, conjunto conhecido como marcador de CTMs . Devido a ausência de um marcador específico para as células-tronco mesenquimais, utilizou-se a associação destes quatro antígenos para identificação, seguindo os critérios internacionais estabelecidos por Dominici et al (2006).

A população de CTMs foi marcada com maior intensidade para os antígenos CD105 (endoglina), CD90 (Thy-1) e CD29, e fracamente positiva para CD146 (MCAM), marcador de células subendoteliais dos sinusóides da medula óssea (pericitos).

As CTMs HbA (Figura 20A) e CTMs HbSS (Figura 20B) apresentaram mesmo perfil para os marcadores de superfície, em concordância com o padrão já estabelecido na literatura.

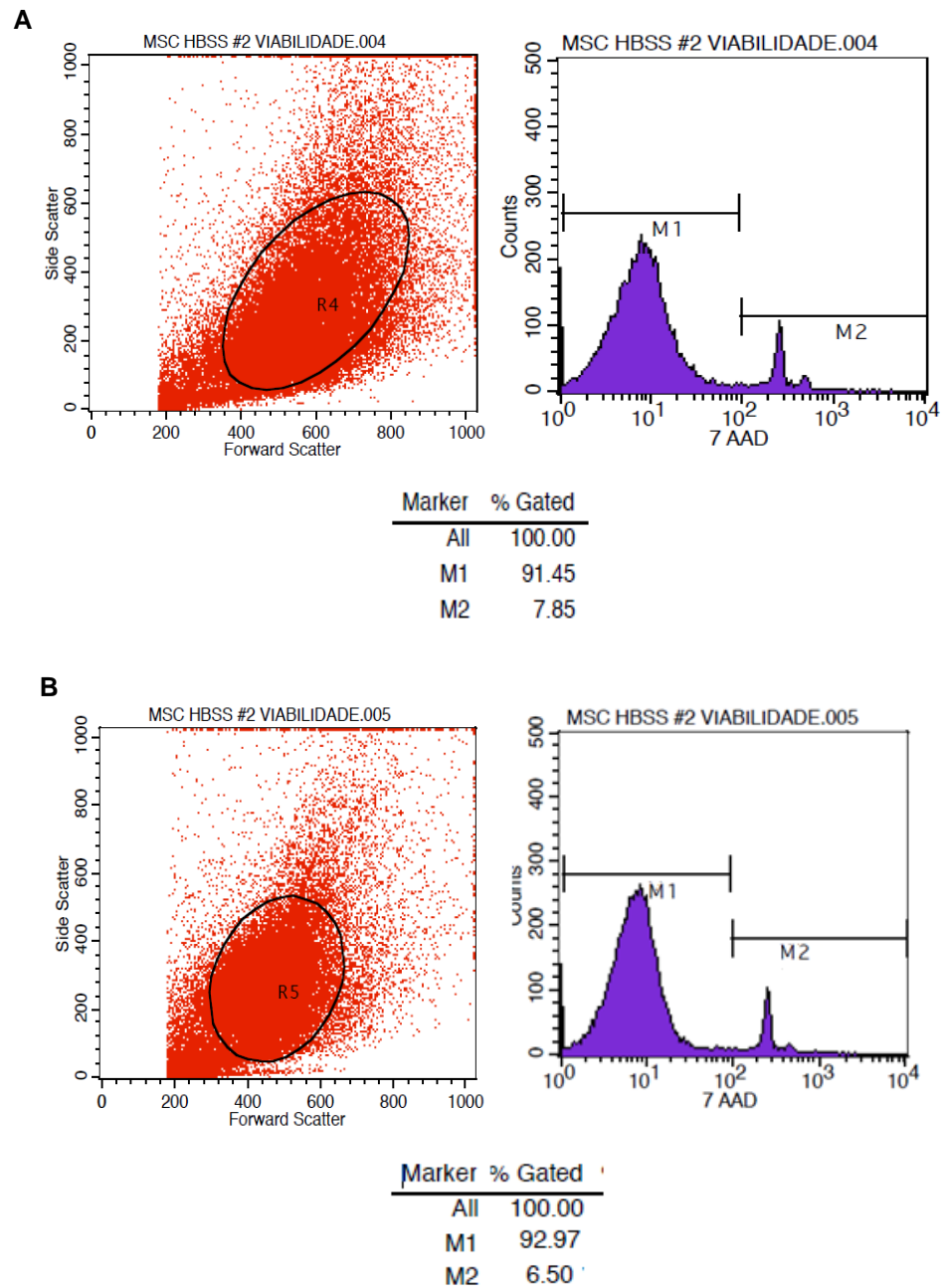


Figura 19- Cultura de CTMs HbSS #2 tratadas com 7-AAD nas condições de normóxia **(A)** e após hipóxia temporária **(B)**. M1: frequência percentual das células não marcadas (viáveis); M2: frequência percentual de células positivas para 7-AAD.

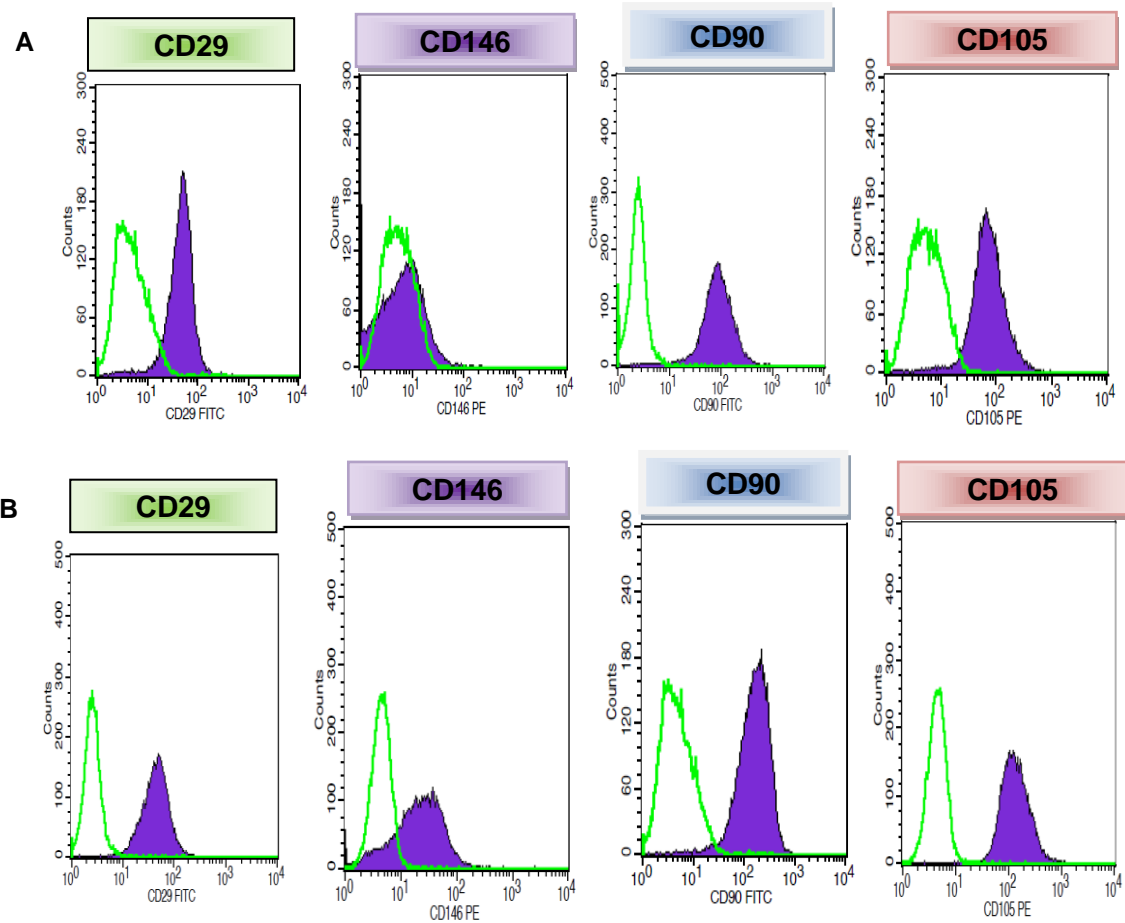


Figura 20- Análise imunofenotípica para marcadores moleculares por citometria de fluxo. Os histogramas mostram a expressão das moléculas CD146, CD105, CD90 e CD29 (em roxo), comparado com as células não marcadas (auto-fluorescência) (em verde). (A) CTMs HbA #4 (B) CTMs HbSS #4. Experimento representativo de n=8

4.7 - Ensaio de diferenciação celular *in vitro*:

A multipotencialidade das CTMs dos pacientes falciformes foi avaliada em ensaios de diferenciação osteogênica e adipogênica *in vitro*, de acordo com os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores (2006).

Para conversão em adipócitos, as células foram cultivadas em meio indutor adipogênico e coradas em Oil Red, corante para evidenciação de gotículas de gordura intracelular (Figura 21).

A osteogênese das CTMs foi demonstrada pela deposição da matriz calcificada corada em Alizarina Red S (Figura 22).

Quanto à capacidade de diferenciação, as culturas de células-tronco mesenquimais isoladas a partir de pacientes falciformes se comportaram de forma semelhante àquelas pertencentes aos pacientes do grupo controle (HbA).

Variabilidade inter-amstral (diferentes respostas à osteoindução) foi notada quanto à diferenciação osteogênica após pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas (Figura 23).

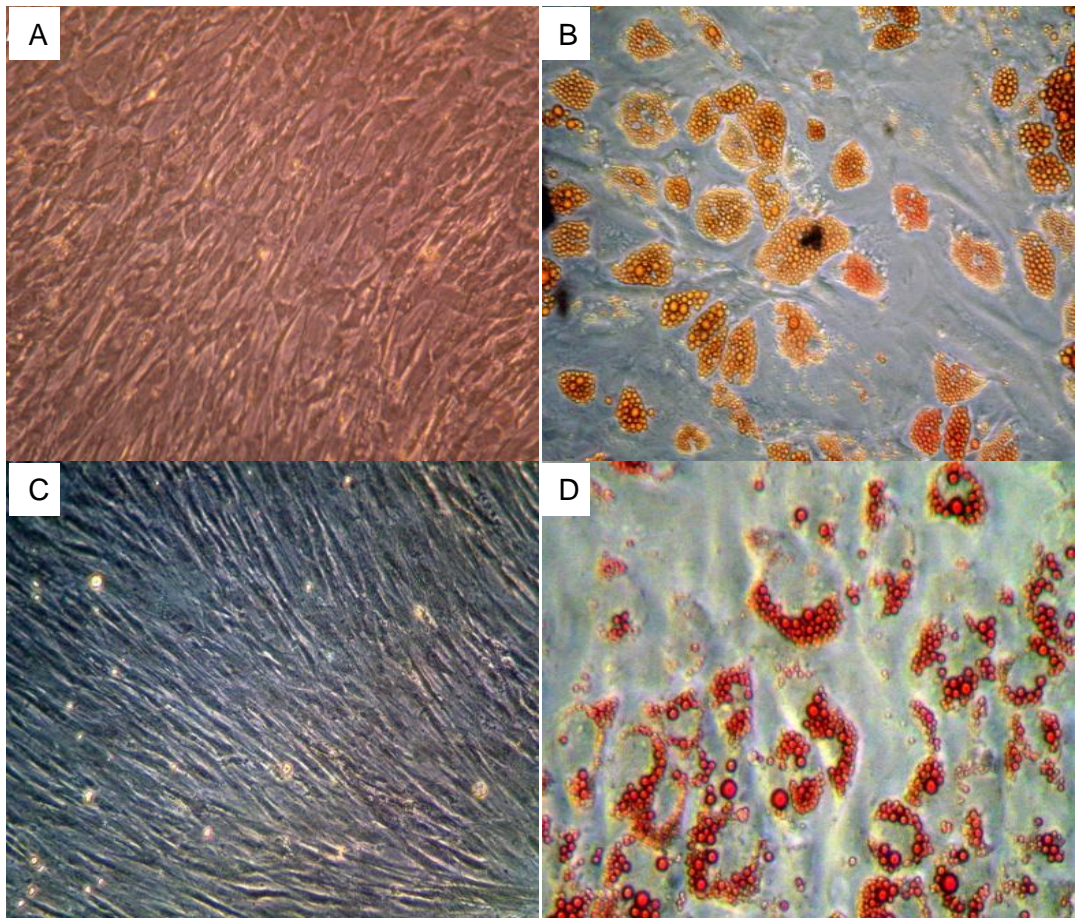


Figura 21- **Fotomicrografia representativa do ensaio de diferenciação adipogênica das culturas de CTMs.** (A) CTMs HbA cultivadas em meio basal. (B) CTMs HbA convertidas em adipócitos e coradas em Oil Red, evidenciando gotículas lipídicas refringentes (em laranja), objetiva 20x. (C) CTMs HbSS cultivadas em meio basal. (D) CTMs HbSS convertidas em adipócitos coradas em Oil Red, evidenciando gotículas lipídicas refringentes (em laranja), objetiva 20x.

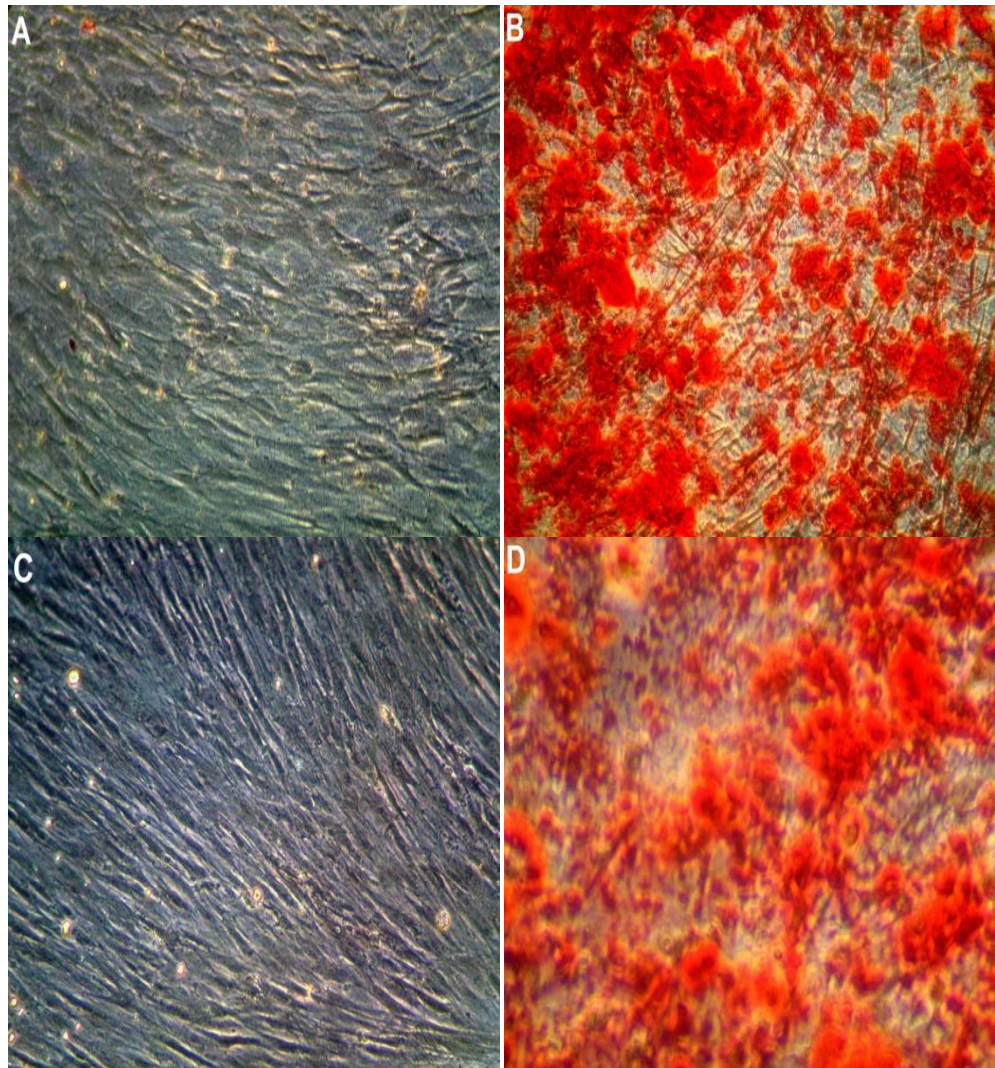


Figura 22- Registro fotográfico representativo do ensaio de diferenciação osteogênica das culturas de CTMs HbA (A/B) e HbSS (C/D). Coloração em Alizarina Red S, evidenciando os depósitos de cálcio na matriz óssea. Aumento de 20x.

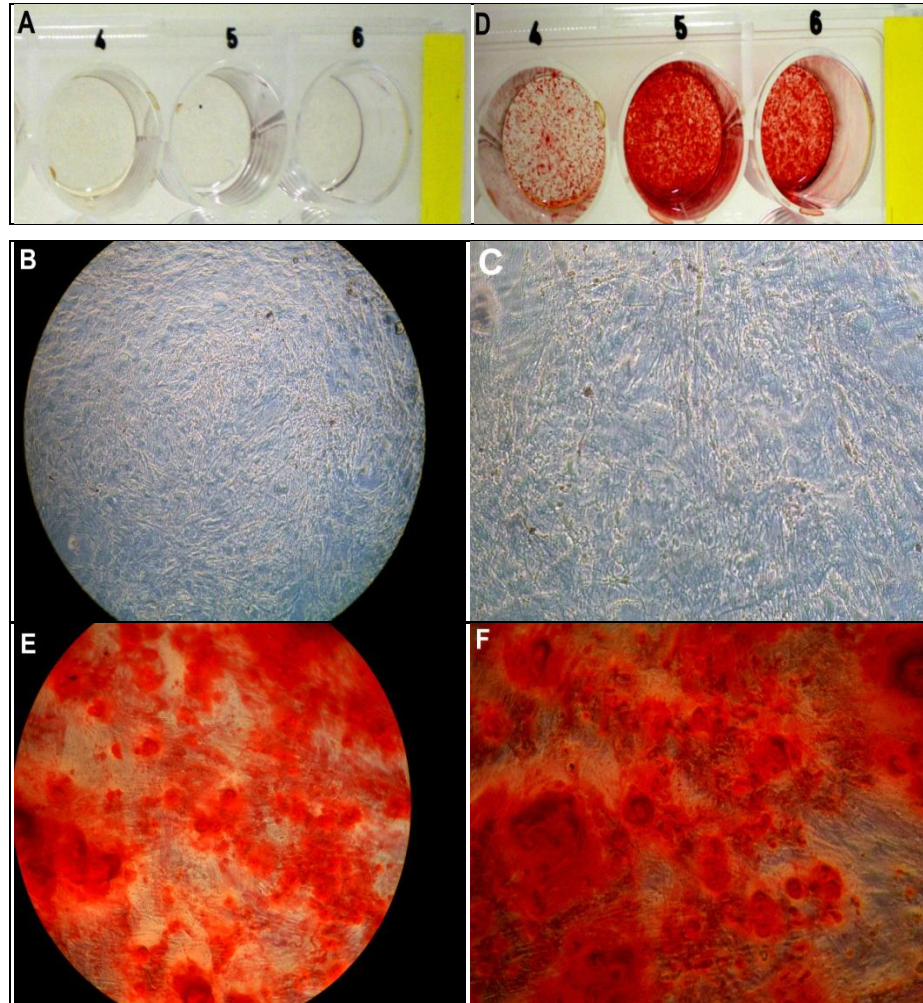


Figura 23.1 - **Varição do perfil de indução osteogênica entre as diferentes culturas de CTMs.** Resposta negativa à diferenciação osteogênica realizada após o pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas, nota-se ausência de depósitos de cálcio na matriz após coloração em Alizarina Red S após 21 dias de indução. (A) Monocamada de CTMs HbSS #2 em placa de cultura com 24 poços, não reagente para Alizarina Red S. (B) e (C) Imagens da mesma cultura registradas respectivamente nas objetivas 10x e 20x. (D) Diferenciação positiva para CTMs HbSS #2 cultivadas em monocamada durante 21 dias em meio indutor em condições padrões de cultivo e atmosfera normal de oxigênio (normóxia). (E) e (F) Imagens registradas respectivamente nas objetivas de 10x e 20x.

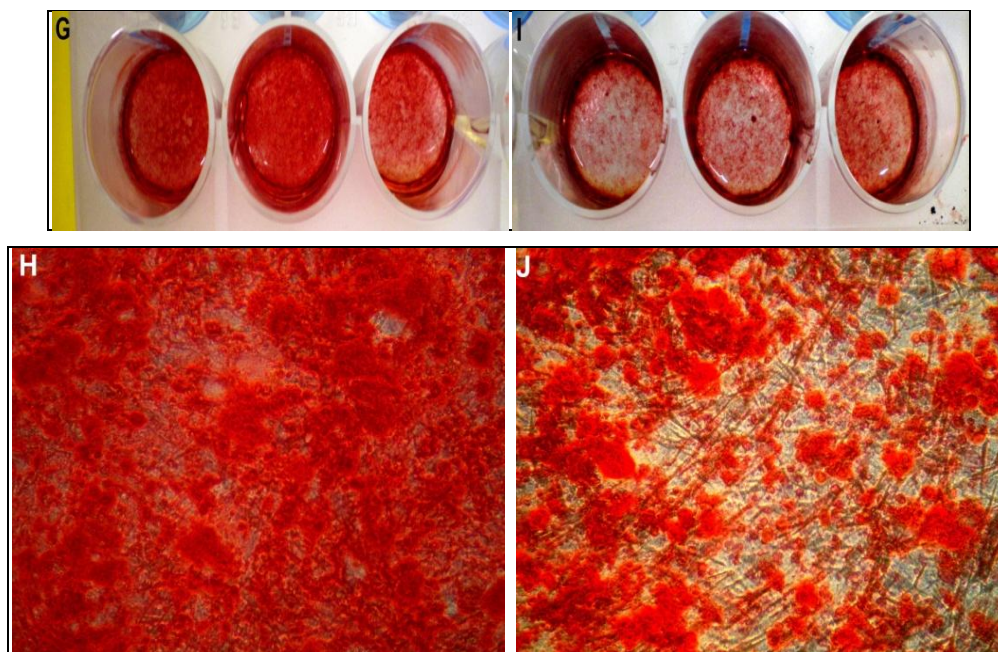


Figura 23.2 - **Varição do perfil de indução osteogênica entre as diferentes culturas de CTMs.** (G) CTMs HbA #2 crescida em monocamada e coradas em Alizarina Red S após pré-condicionamento por 48 horas em hipóxia seguida de indução por 21 dias. (H) Imagem da mesma cultura em objetiva de 20x. (I) CTMs HbA #2 paralelamente cultivada em condições padrões de cultivo e concentração normal de oxigênio (normóxia) em meio indutor durante 21 dias. (J) Imagem da mesma cultura de CTMs HbA #2 registrada em objetiva de 20x.

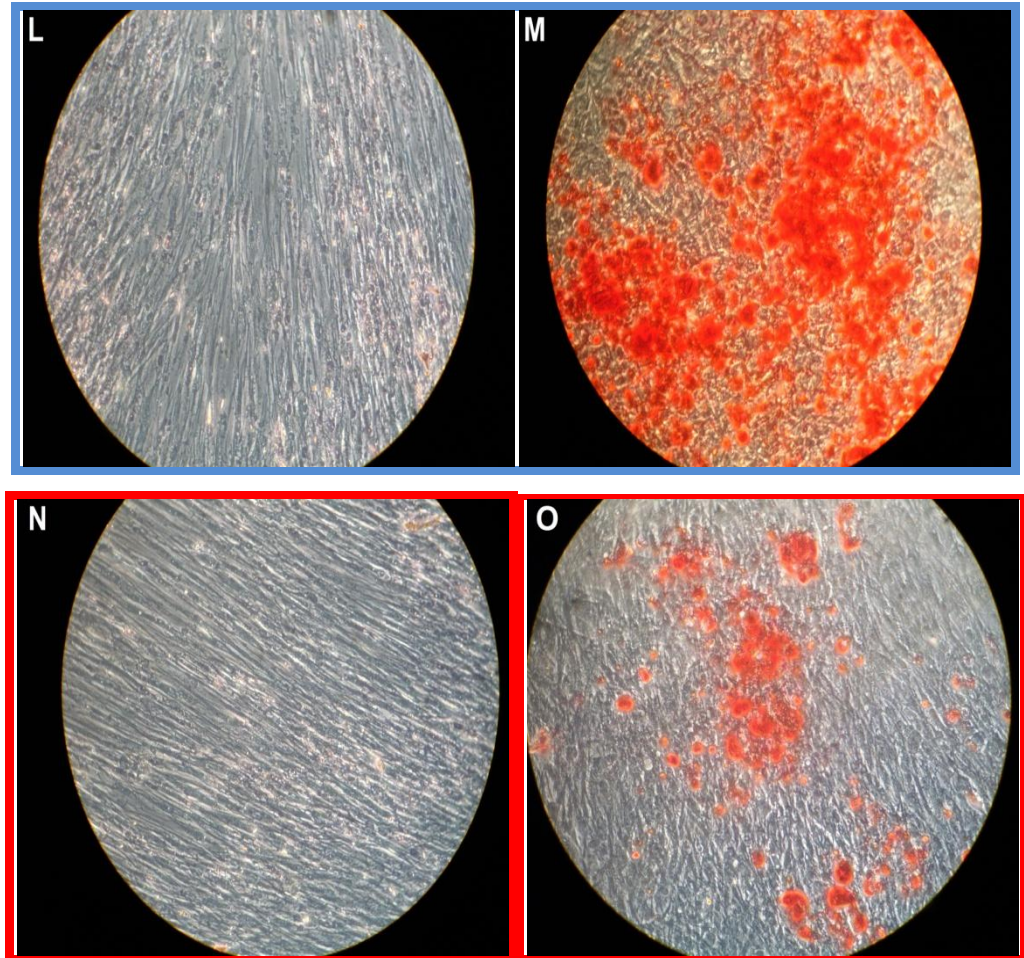


Figura 23.3 - **Varição do perfil de indução osteogênica entre as diferentes culturas de CTMs.** Cultura de CTMs HbSS #3 cultivadas em meio basal após pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas (L) e normóxia (N). Osteogênese das CTMs HbSS #3 após hipóxia (M) e normóxia (O). (Imagens em aumento de 20x).

4.8 - Deteccão da Osteocalcina Intracelular:

A conversão osteogênica das CTMs também foi avaliada através da identificação da proteína intracelular Osteocalcina, marcador ósseo tardio produzido por células ósteo-comprometidas ou osteoblastos.

A Figura 24 apresenta os gráficos de deteção de osteocalcina. Nota o deslocamento entre as curvas da cultura celular marcada com anticorpo anti-Osteocalcina humano e a respectiva autofluorescência (células não-marcadas). A Osteocalcina foi detectada nas células induzidas e não-induzidas (controle), o que demonstra conteúdo natural mínimo (basal) desta proteína intracelular nas CTMs (n=4), conforme expresso pelo valor de D (teste KS).

A presença da proteína foi notada ao comparar o deslocamento entre a curva correspondente à cultura celular marcada, submetida ao processo de indução osteogênica, e a curva referente à condição controle (não-induzida em meio osteogênico) igualmente marcada com anticorpo anti-Osteocalcina humana. Não se observou deslocamentos entre as curvas, mesmo após a ósteo-indução *in vitro* durante 7 dias (n=4) (Figura 25).

A comparação entre as curvas geradas pelos eventos pertinentes às células cultivadas em normóxia e hipóxia não apresentaram deslocamento considerável (Figura 26) para as diferentes amostras analisadas (n=5). Os valores de expressão D do teste estatístico Kolmogorov-Sminorv (teste KS) demonstram quantitativamente a intensidade de fluorescência entre a curva de distribuição da cultura marcada em normóxia em comparação à curva da cultura pré-condicionada em hipóxia.

A figura 27 apresenta o gráfico comparativo entre as médias de intensidade de fluorescência para cada condição de incubação das diferentes amostras (n=4). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as marcações para osteocalcina entre as amostras induzidas durante 7 dias (em normóxia e hipóxia) e não-induzidas (controle).

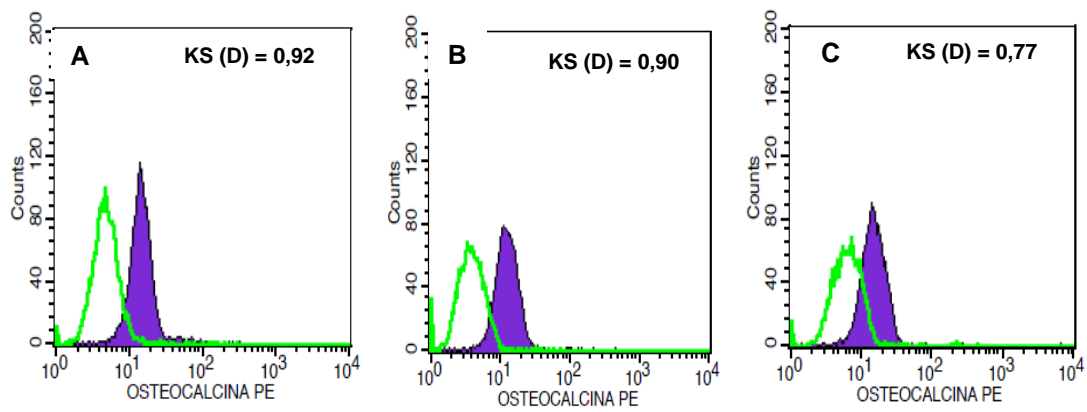


Figura 24- **Marcação intracelular para Osteocalcina humana na cultura de CTMs HbSS #2.** Deslocamento entre as curvas de distribuição da cultura celular marcada (em roxo) e as respectivas autofluorescências (em verde). (A) Curva da cultura celular condição basal (controle) não ósteo- induzida (em roxo). (B) Cultura celular ósteo-induzida durante 7 dias em normóxia. (C) Cultura celular pré-condicionada em hipóxia durante 48h seguidas de ósteo-indução até 7 dias (em roxo). Experimento representativo (n=4).

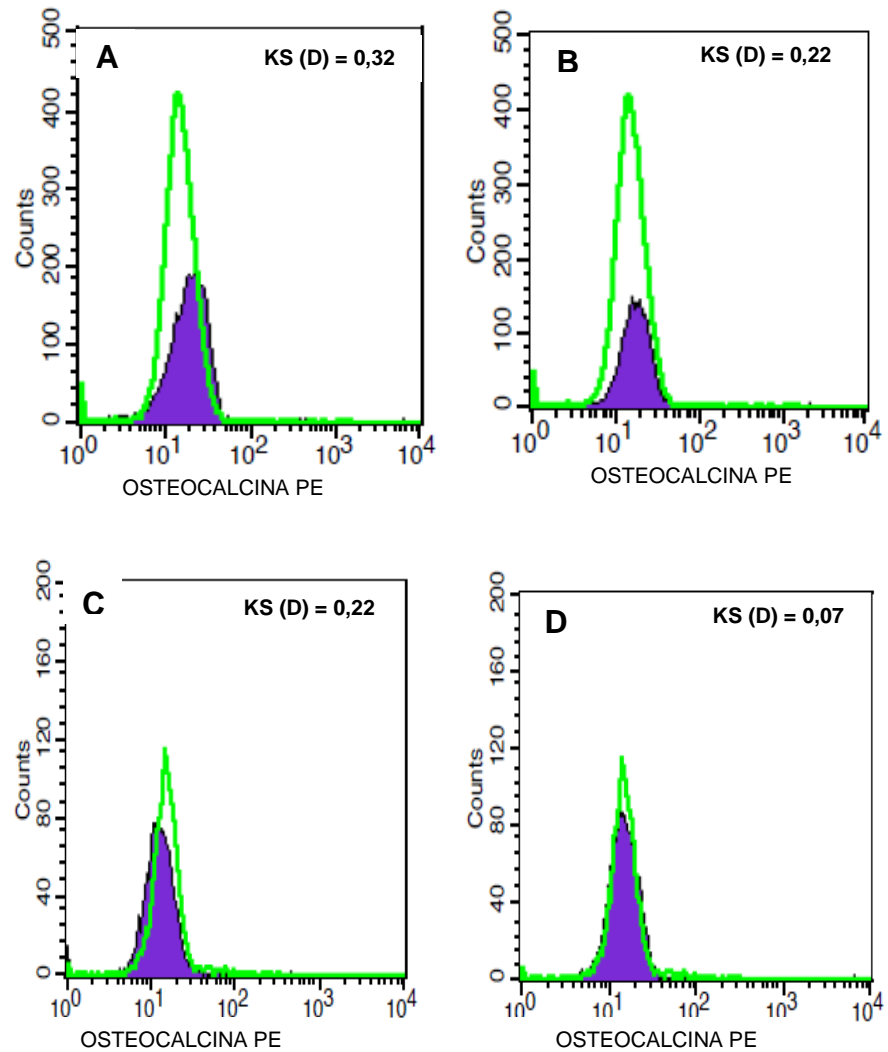


Figura 25- **Marcação para Osteocalcina humana intracelular.** (A) Cultura de **CTMs HbA #4** ósteo-induzidas durante 7 dias em normóxia (em roxo) e condição controle (em verde). (B) Cultura de **CTMs HbA #4** ósteo-induzidas durante 7 dias pré-condicionadas em hipóxia (em roxo) e condição controle (em verde). (C) Cultura de **CTMs HbSS #2** ósteo-induzidas durante 7 dias em normóxia (em roxo) e condição controle (verde). (D) Cultura de **CTMs HbSS #2** ósteo-induzidas durante 7 dias pré-condicionadas em hipóxia (em roxo) e condição controle (verde). Resultados não demonstram deslocamento considerável após 7 dias de indução. Experimentos representativos (n=5).

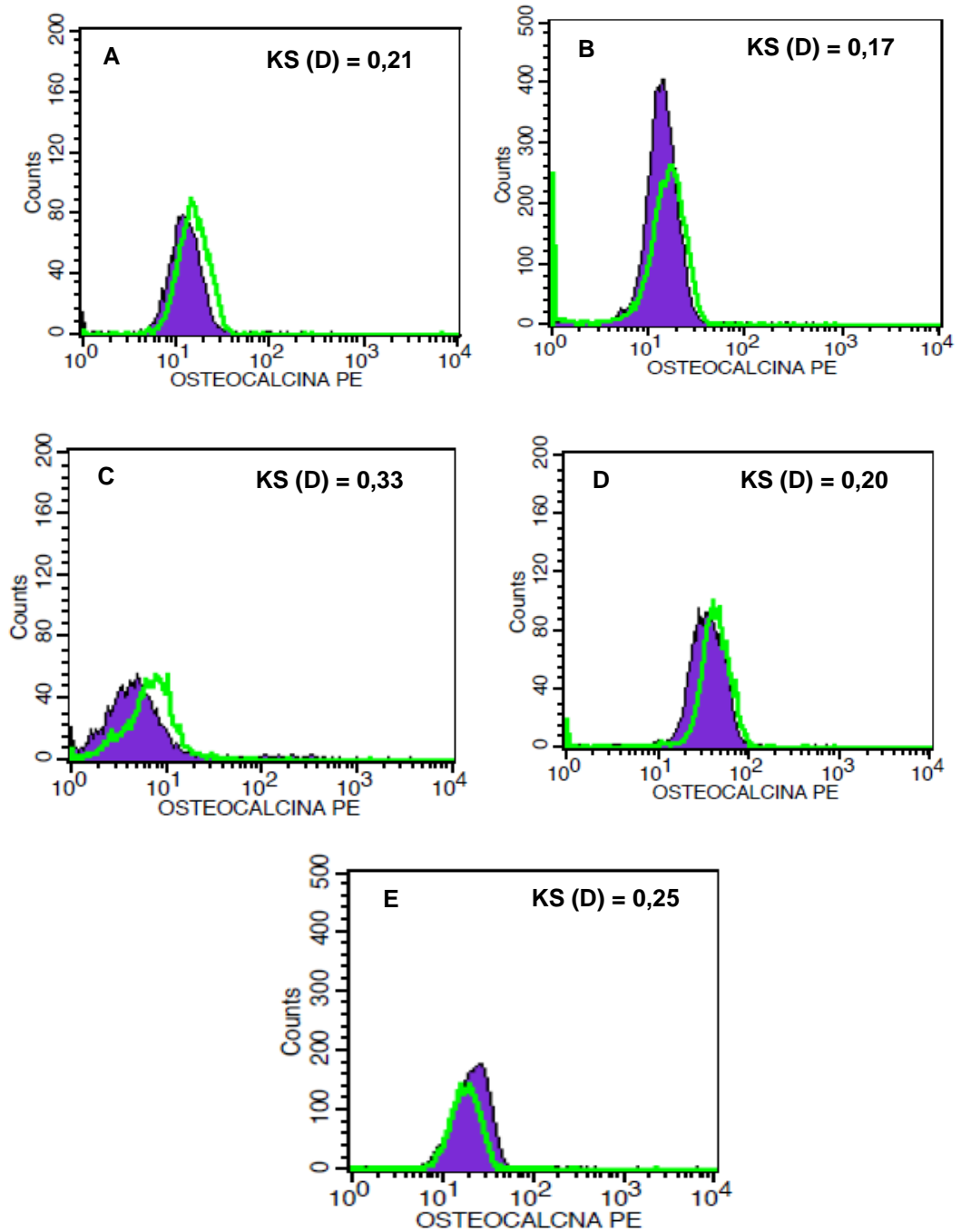


Figura 26 - Análise comparativa entre as curvas de distribuição de eventos marcados nas condições de normóxia (em roxo) e pré-condicionadas em hipóxia 48h (em verde). (A) CTMs HbSS #2 (B) CTMs HbSC #4 (C) CTMs HbSS #2 (D) CTMs HbSS #2 (E) CTMs HbA #4.

Intensidade de Fluorescência- Osteocalcina-PE

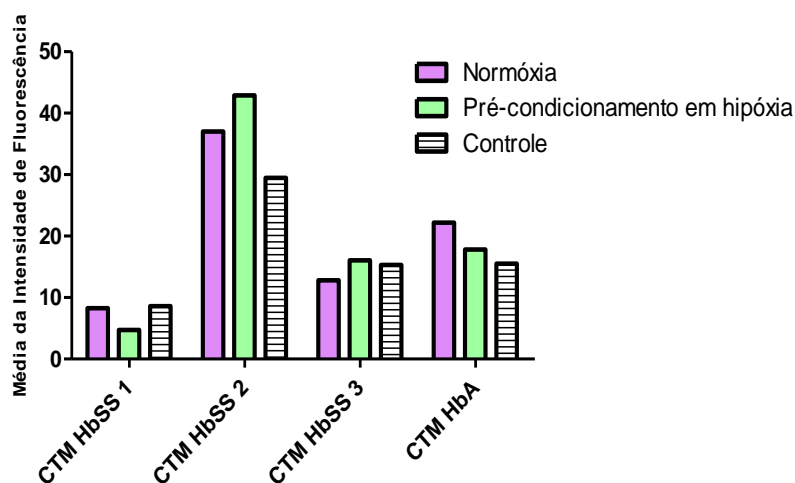


Figura 27- **Análise comparativa entre as médias das fluorescências para osteocalcina nas amostras ósteo-induzidas durante 7 dias (normóxia e hipóxia) e não-induzidas (controle).** Não se observaram diferenças significativas entre os valores para cada condição ($p = 0,9303$) (One-way ANOVA, pós-teste de múltipla comparação Bonferroni) $n = 4$ experimentos.

4.9 - Ensaio de migração celular em câmara de Boyden:

A capacidade de migração das células-tronco mesenquimais, isoladas a partir das amostras falciformes, foi avaliada através do ensaio em câmara de Boyden sob duas condições de incubação (hipóxia e normóxia). O princípio experimental é baseado na migração das células através de uma membrana semipermeável em direção a fatores quimiotáticos adicionados no compartimento inferior da câmara.

A avaliação foi realizada com as células recém retiradas da hipóxia (48h) e acompanhadas durante a migração em normóxia por 4 horas conforme esquematizado na Figura 28.

Os resultados demonstraram capacidade migratória normal para as CTMs oriundas de pacientes falciformes sob condições de normóxia e após o pré-condicionamento em hipóxia (Figura 29).

O número amostral reduzido impediu a análise estatística dos nossos experimentos de migração, conforme demonstrado na figura 29.

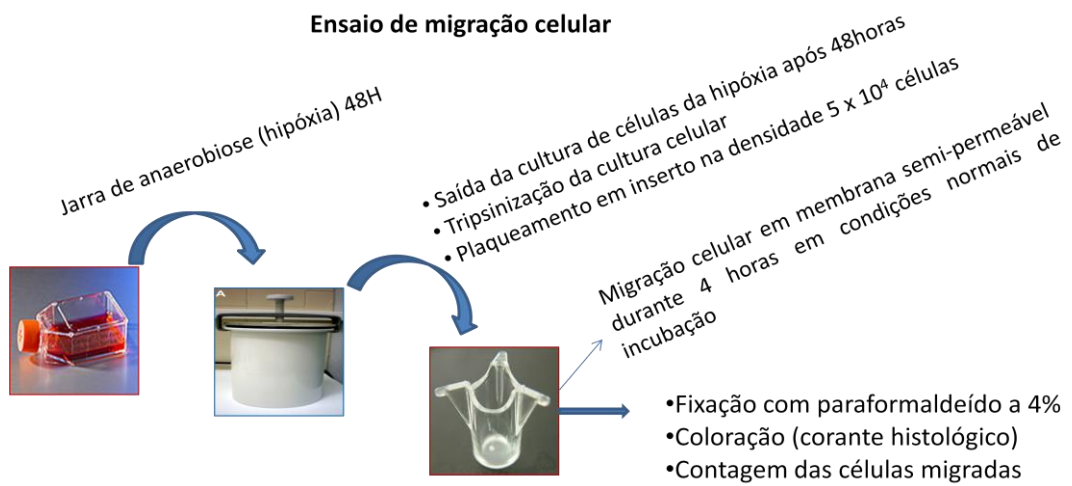


Figura 28- Modelos de estudo para avaliação do padrão migratório das CTMs *in vitro*.

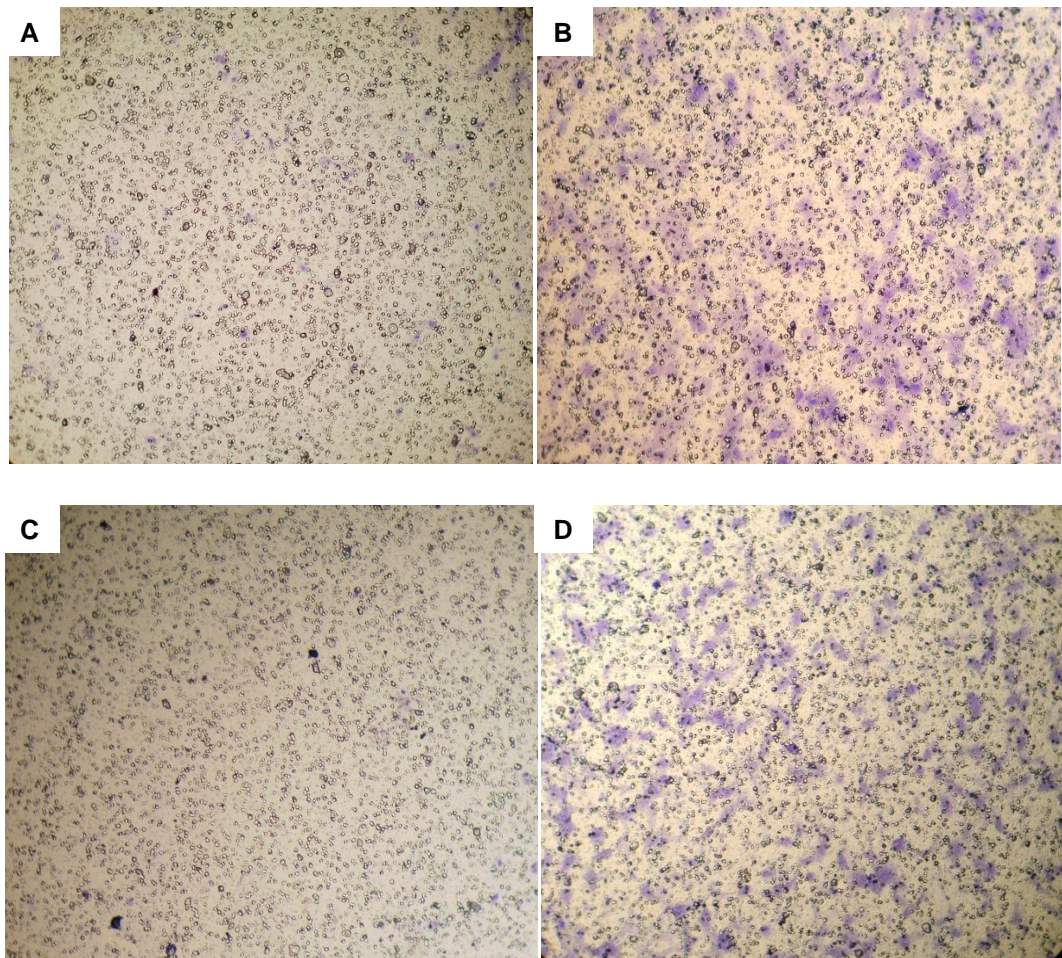


Figura 29- Fotomicrografia representativa do ensaio de migração celular *in vitro*. Células migradas através da membrana de $8\mu\text{m}$ em câmara de Boyden (inserto transwell). **CTMs HbSS #2**: (A) controle negativo e (B) controle positivo em normóxia, (C) e (D) controle negativo e positivo em hipóxia durante **4 horas**, respectivamente (Aumento de 10x).

**Ensaio de migração celular
Contagem celular após 4 horas de incubação**

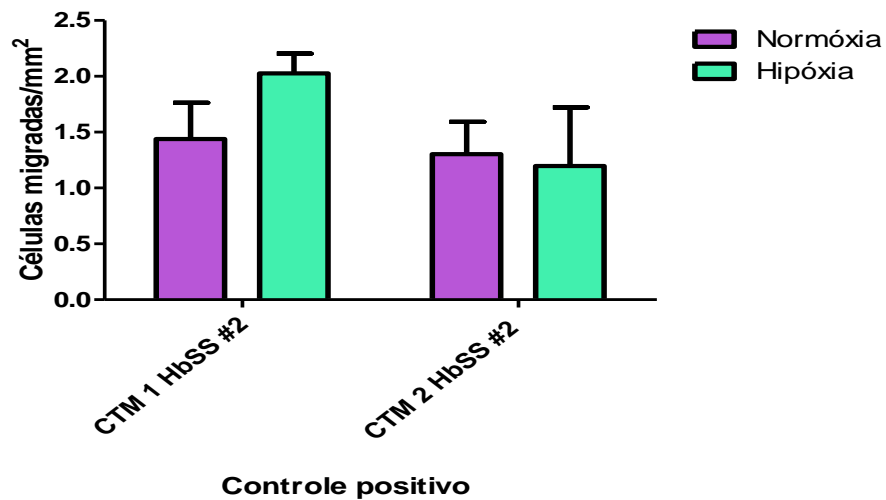


Figura 30- Ensaio de 4 horas de migração com 5×10^4 células por inserto, incubadas sob normóxia (em roxo) ou hipóxia (em verde). Experimento realizado em duplicata, com contagem de 4 campos randômicos para cada inserto de controle positivo (média \pm DP).

4.10 - Avaliação de marcadores celulares por Imunofluorescência:

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para localizar proteínas características na população de CTMs em estudo.

As CTMs apresentaram marcação positiva para Vimentina, proteína da família de filamentos intermediários, presentes no citoesqueleto das células de origem mesenquimal. Observou-se que a proteína vimentina foi detectada na maioria das células cultivadas, porém com um padrão difuso. Os controles negativos marcados com os anticorpos secundários e DAPI apresentaram apenas o núcleo corado em azul (Figura 31).

Não se observou imunoreatividade para CD31 (PECAM) e nem para a proteína Fator de Von-Willebrand, marcadores típicos de células endoteliais e plaquetas (dados não mostrados).

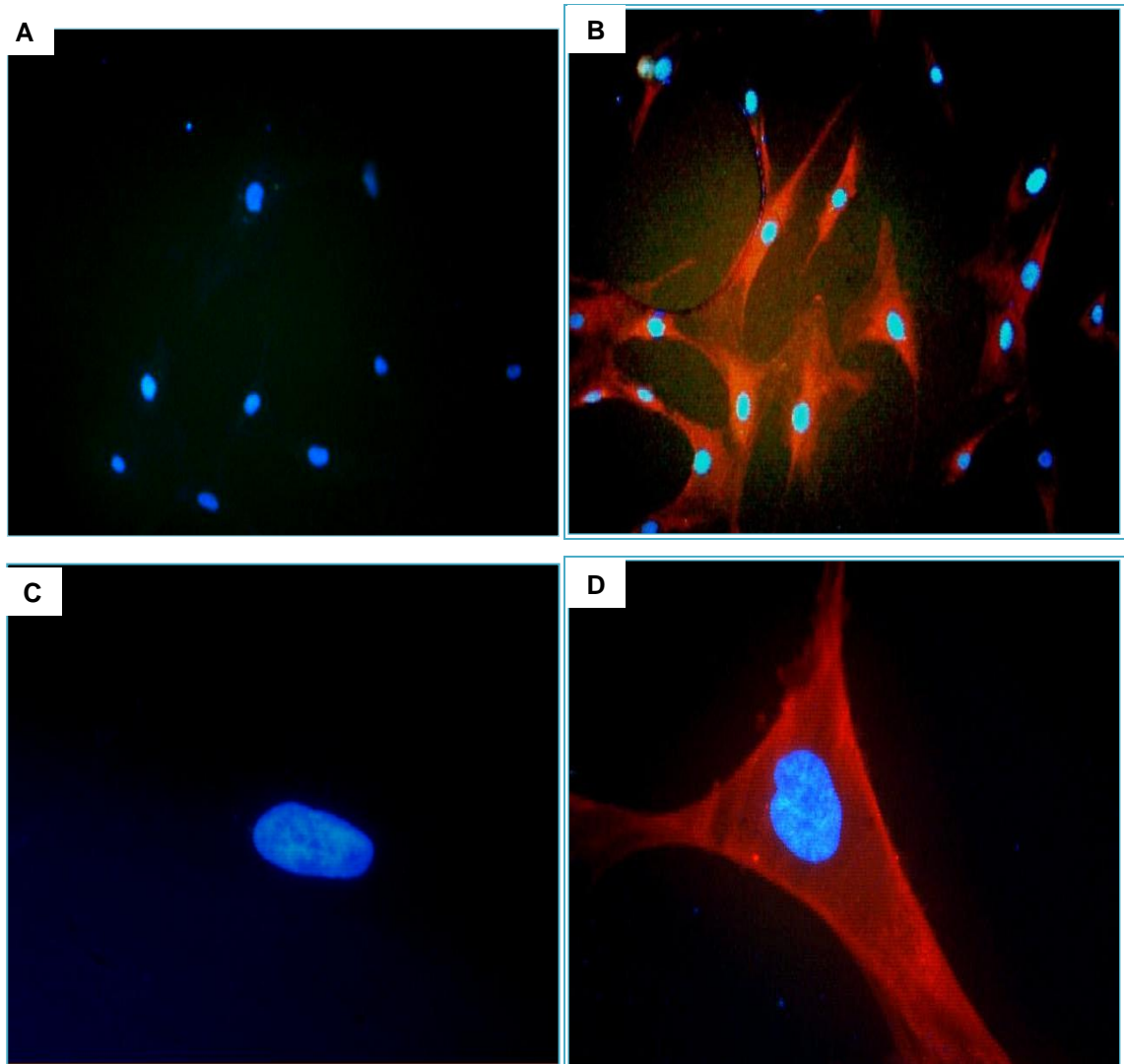


Figura 31- Fotomicrografia representativa da identificação do marcador Vimentina em culturas de CTMs de paciente falciforme (HbSC) através da técnica de imunocitoquímica. (A) e (C) Controle negativo, aumento de 20x e 100x respectivamente. (B) e (D) anti-Vimentina positivo, aumento de 20x e 100x respectivamente. Núcleos corados com Dapi (em azul).

4.11. - ELISA:

Os sobrenadantes de CTMs em cultivo sob as condições de hipóxia e normóxia foram coletados e submetidos à detecção dos fatores angiogênicos IL-8 e TGF- β e do fator quimiotático SDF-1 α através da técnica de imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) indireto (sanduíche).

Os resultados apontaram níveis elevados de IL-8 nos sobrenadantes de CTMs cultivadas em normóxia e após hipóxia. Observou-se que o pré-condicionamento com hipóxia provocou alterações nas concentrações de IL-8, porém não se observou diferenças significativas entre as concentrações desta citocina nos sobrenadantes das CTMs em normóxia e hipóxia ($p = 0,7545$) (Figura 32A).

Nos sobrenadantes das CTMs em normóxia, foi possível verificar níveis maiores do fator SDF-1 α (teste T-student pareado com significância de 5%, $*p < 0,05$) (Figura 32B).

Baixas concentrações de TGF- β foram detectadas nos sobrenadantes das CTMs nas duas condições (normóxia e hipóxia). Observou-se uma tendência de maior concentração destas citocinas nos sobrenadantes após o efeito da hipóxia, porém sem diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,1028$) (Figura 32C).

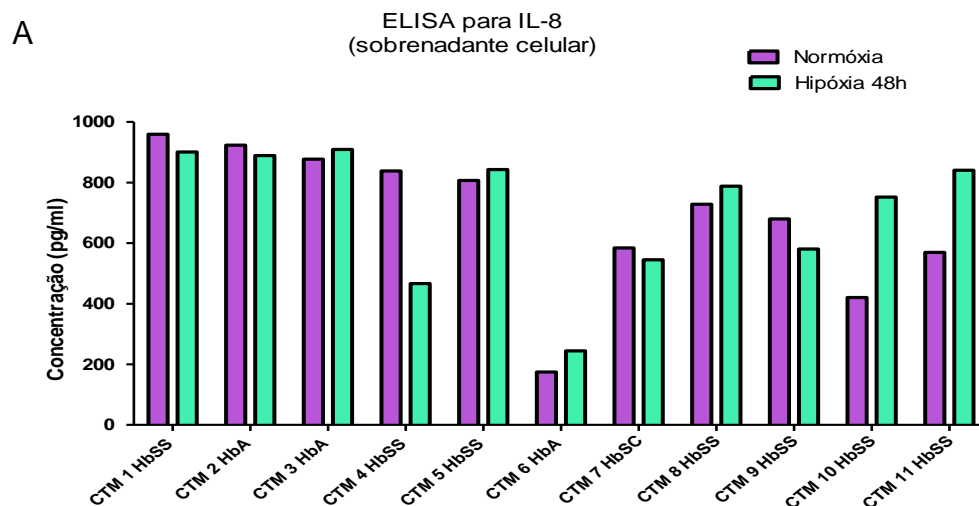


Figura 32A - Detecção de IL-8 nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde). Diferenças estatisticamente não significativas entre as duas condições ($n = 11$). (teste T-student pareado $p = 0,7545$).

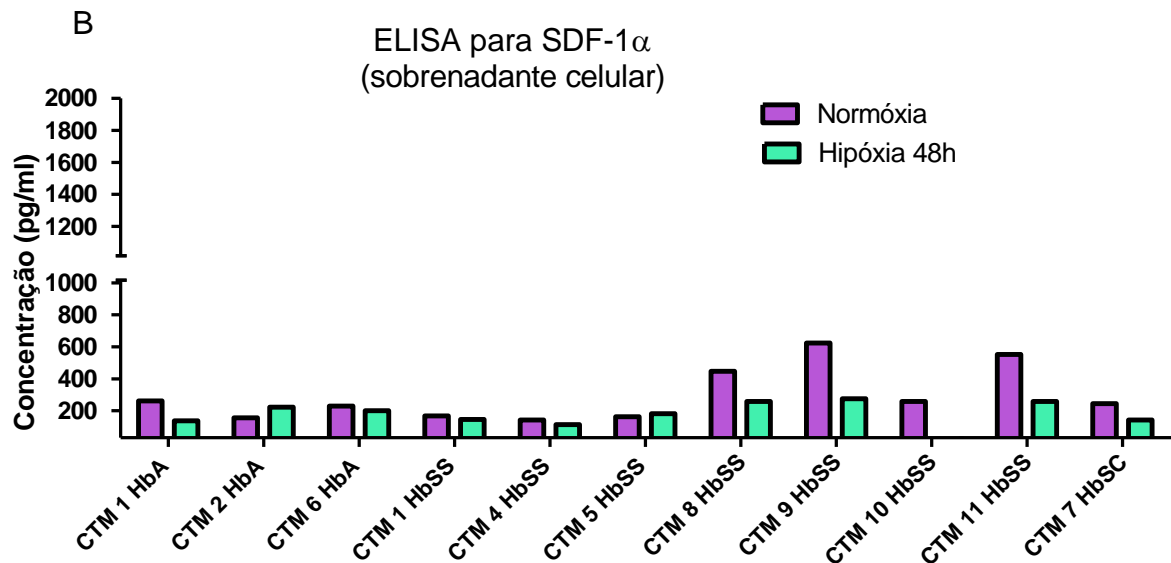


Figura 32B- Detecção de SDF-1 α nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde). (teste T-student pareado * $p=0,0164$, $n=11$).

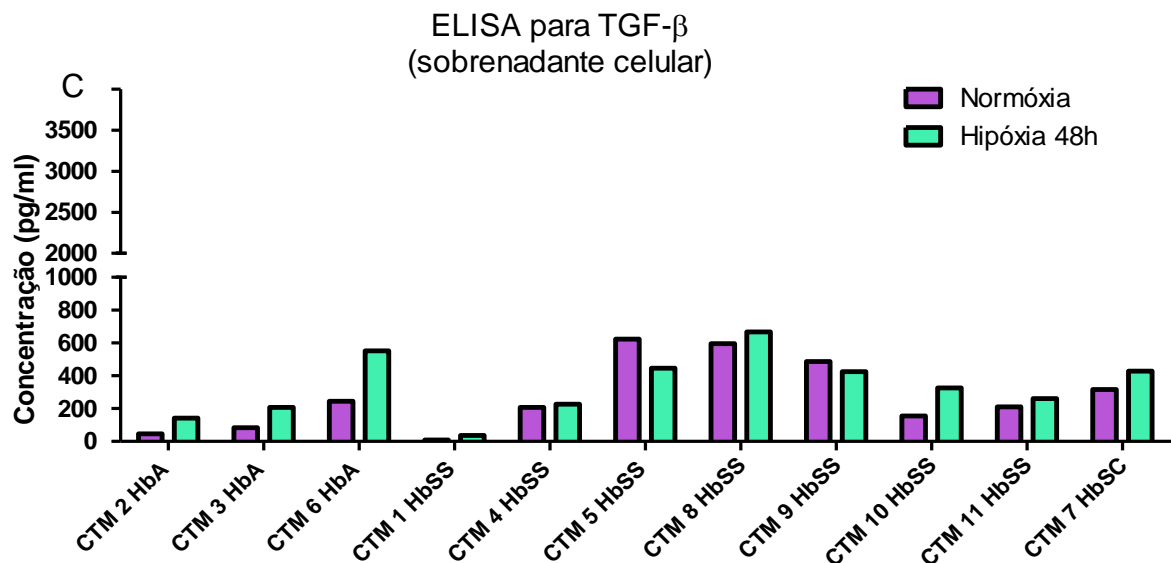


Figura 32C - Detecção de TGF- β nos sobrenadantes das culturas de CTMs em normóxia (em roxo) e após hipóxia (em verde). Diferenças estatisticamente não significantes entre as duas condições ($n=11$). (teste T-student pareado $p=0,1028$).

4.12. - Análise da expressão gênica:

Com o intuito de avaliar a expressão dos transcritos gênicos envolvidos na diferenciação óssea foi avaliado nas CTMs em condições controle e após hipóxia, a análise quantitativa

dos genes *COLLAGEN I*, *ALPL*, *BGLAP*, *RUNX2*, *MCAM*, *ENG*, *SDF1* e *HIF1A* foi conduzida através da técnica de qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real).

A presença dos transcritos gênicos foi demonstrada através de gráficos de expressão relativa. A comparação foi feita entre os genes de interesse das amostras tratadas (7 dias em meio osteo-indutor) em normóxia e após o pré-condicionamento em hipóxia temporária. Os resultados foram normalizados em função dos genes endógenos *GAPDH* e β -*ACTIN*. Devido à similaridade no desempenho dos genes endógenos, adotamos o *GAPDH* para exposição dos nossos resultados.

Após 7 dias em meio indutor osteogênico, foi possível verificar aumento na expressão de transcritos nas CTM de pacientes falciformes, nas condições normais de cultivo.

Para o fator transcricional Runx 2, verificou-se aumento na ordem de 8 vezes em relação à cultura controle (células não induzidas em meio osteogênico). O mesmo perfil de aumento foi notado para os outros marcadores da osteogênese: *ALPL* (aproximadamente 4 vezes maior expressão) e *COLLAGEN I* (5 vezes mais expresso). Diferente dos outros marcadores ósseos, o gene *BGLAP* (Osteocalcina) teve sua expressão reduzida após efeito ósteo-indutor por 7 dias. Verificou-se aumento dos níveis de expressão para os genes *MCAM*, *HIF-1A*, e *SDF-1* após indução osteogênica. Nenhum efeito foi notado para o gene *ENG*, responsável pela síntese do antígeno de superfície Endogлина (CD105), usado na identificação da população de células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento por 48 horas em hipóxia levou à redução na expressão dos transcritos envolvidos na diferenciação osteogênica em fase inicial: *RUNX2*, *ALPL* e *COLLAGEN I*. Não houve alteração na expressão dos genes *BGLAP* e *MCAM* quando comparados a expressão na amostra controle.

Mesmo perfil de redução na expressão foi visto para os genes *HIF-1A*, e *SDF-1* após hipóxia.

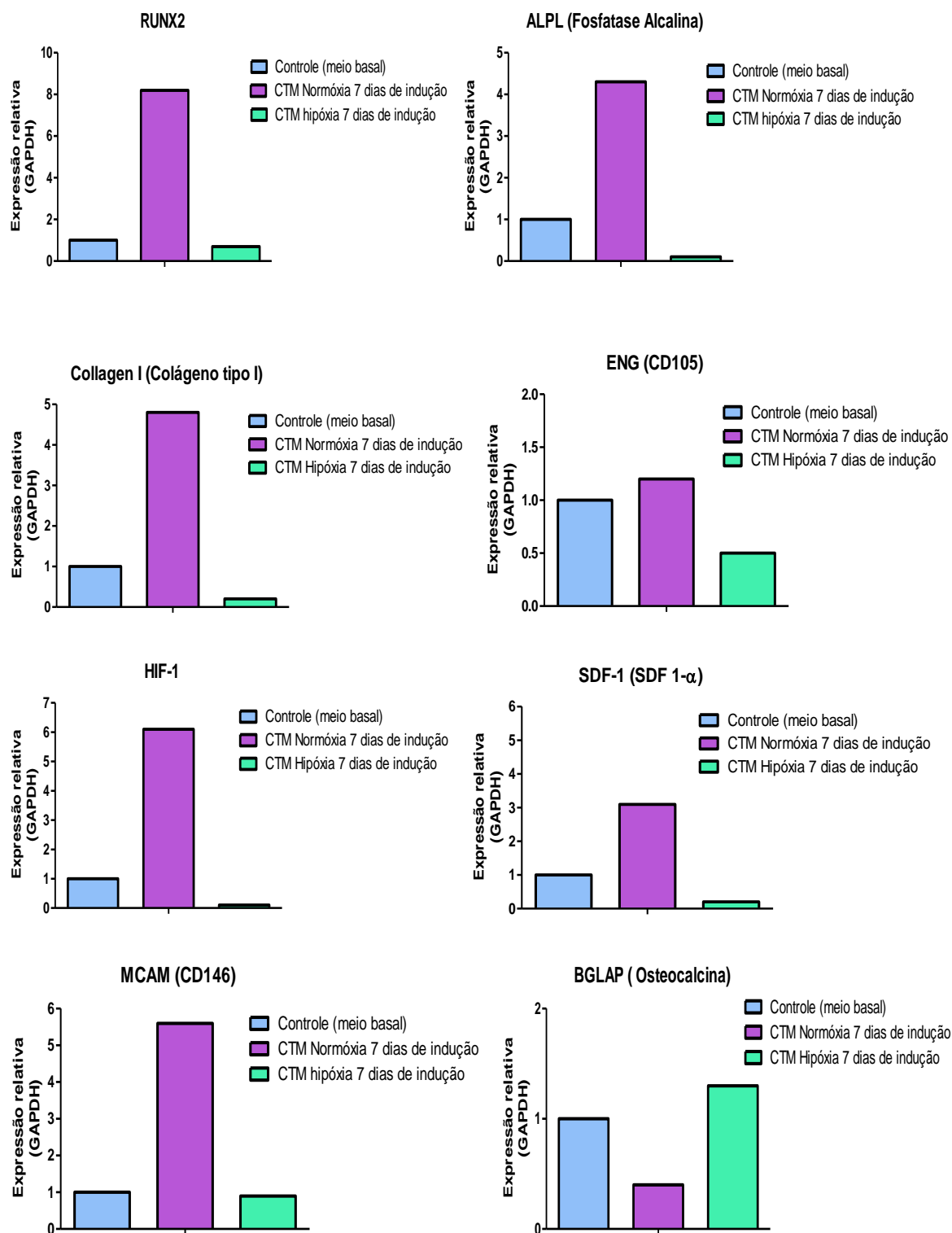


Figura 33- Expressão medida por qRT-PCR dos genes: *RUNX2*, *ALPL*, *COLLAGEN I*, *BGLAP*, *MCAM*, *ENG*, *HIF-1A*, *SDF1* nas amostras ósteo-induzidas por 7 dias em normóxia e após hipóxia.

5. DISCUSSÃO

A osteonecrose é uma das complicações ósseas mais comuns nos pacientes falciformes, com incidência variando entre 10-50% e geralmente apresenta acometimento bilateral (KUTLAR, 2007). A doença é mais prevalente entre os genótipos SS e SC, podendo também ocorrer em pacientes com co-herança de genes para talassemias alfa ou beta (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

A osteonecrose na doença falciforme é decorrente de eventos vaso-oclusivos freqüentes que resultam no infarto das superfícies articulares e cabeça de ossos longos como fêmur e úmero (ALMEIDA; ROBERTS, 2005).

Esses eventos vaso-oclusivos levam à interrupção circulatória e conseqüente hipóxia às estruturas ósseas. O processo de reparo é limitado e insidioso, atribuído à neovascularização prejudicada e possivelmente às alterações na freqüência e funcionalidade das células-tronco mesenquimais (CTMs) e ósseas no local.

Com base nas potenciais anormalidades das CTMs, Hernigou e colaboradores (1999) investigaram o comportamento celular na região vizinha à área acometida pela necrose na cabeça femoral. A medula foi obtida através da punção das áreas proximal e intertrocânter do fêmur. O número de CFU-Fs estava reduzido nos pacientes portadores de osteonecrose após corticoterapia ($1,88 \pm 4,02$) em comparação aos pacientes pertencentes ao grupo controle (voluntários saudáveis) ($32,7 \pm 15,9$) e falciformes portadores de osteonecrose ($30,9 \pm 30,1$). Resultados sugerem que a ausência de células-tronco mesenquimais no local prejudica a regeneração óssea e leva ao mau prognóstico com conseqüente colapso da cabeça femoral.

Em estudo anterior realizado pelo mesmo grupo, foi detectada a freqüência diminuída de CFU-F, que potencialmente originariam osteoblastos maduros, na medula óssea isolada da crista ilíaca dos pacientes portadores de osteonecrose por álcool ou corticóide induzida (HERNIGOU *et al.*, 1997).

As CTMs constituem uma população celular rara na medula óssea, cuja freqüência varia entre 0,01% a 0,0001% do total de células nucleadas. Apesar da rara presença, estas células podem proliferar efetivamente, mantendo seu caráter de células-tronco *in vivo*. A perda progressiva do potencial de diferenciação devido à senescência ocorre após cerca de 40 duplicações (KRAMPERA *et al.*, 2007).

No presente estudo foi avaliada a freqüência de CFU-F na fração de células mononucleares da medula óssea de pacientes portadores de osteonecrose em decorrência da doença falciforme.

Nos resultados apresentados, foi verificada maior freqüência de CFU-F na medula óssea dos pacientes falciformes ($22,72 \pm 23,85$) (HbSS) com osteonecrose da cabeça femoral quando comparada com a freqüência na medula óssea de pacientes do grupo controle ($7,6 \pm 10,41$) (HbA) (portadores de osteonecrose por outros fatores de risco).

Não se notou diferenças significativas entre a freqüência de CFU-F na medula óssea de pacientes falciformes do genótipo SC quando comparada a freqüência destas colônias na medula óssea dos pacientes do grupo controle (HbA) (Figura 8).

Os resultados obtidos possivelmente estão relacionados com o estresse hematopoiético, característico da anemia falciforme, decorrente da hemólise aumentada associada ao desequilíbrio entre fatores de crescimento (SCF, IL-6, GMC-SF) e reguladores (TGF- β) de células progenitoras no nicho medular (CROIZAT; NAGEL, 1999; KUZNETSOV *et al.*, 2009). Considerando que as CFU-F compartilham a mesma origem na medula óssea e seu papel *in vivo* está na sustentação direta da hematopoiese neste microambiente, é possível que a alta freqüência encontrada seja reflexo da maior necessidade de suporte estromal às células hematopoiéticas nos pacientes com anemia falciforme. A maior freqüência de CFU-F estaria relacionado à maior proliferação, sobrevivência e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas, no intuito de suprir a depleção contínua das hemácias no sangue periférico. No caso dos pacientes pertencentes ao genótipo SC, a presença da heterozigose implica em menor taxa de polimerização de hemoglobina S intracelular, conseqüentemente menor falcização e hemólise intravascular, resultando em uma anemia hemolítica menos grave (KATO *et al.*, 2009). Em decorrência dessa anemia mais branda, a hematopoiese na medula óssea destes pacientes ocorre com menor intensidade quando comparado com a anemia falciforme, o que reflete na menor proliferação de progenitores estromais e hematopoiéticos *in vivo*. A menor freqüência de CFU-F nos pacientes HbSC estaria em acordo com os nossos achados.

A baixa freqüência de CFU-F na medula óssea dos pacientes do grupo controle (HbA), pode ser atribuída aos fatores de risco iniciadores (abuso de álcool, uso de corticosteróides em altas concentrações, idiopática) da osteonecrose e decisivos no prognóstico da doença, em concordância com os trabalhos anteriormente publicados (HERNIGOU *et al.*, 1997; HERNIGOU *et al.*, 1999).

A necrose avascular óssea na doença falciforme atinge pacientes jovens nas fases ativas de desenvolvimento (adolescência e adultos jovens), diferente da osteonecrose secundária a outros fatores de risco, que geralmente acomete indivíduos adultos ao redor dos 40 anos de idade. A população em nosso grupo controle tem idade média variando entre $51 \pm 11,2$ anos enquanto média de idade da população falciformes em estudo varia entre $29,1 \pm 10,52$ anos. Já é conhecido na literatura, que a freqüência das CFU-F na medula é inversamente proporcional ao aumento na idade do doador (STOLZING *et al.*, 2008; VERFAILLIE *et al.*,

2008). Logo, é possível que a idade dos pacientes em nosso estudo seja uma variável determinante quanto à diferença entre as frequências de CFU-F comparadas nos dois grupos (HbA e HbSS).

Verificamos uma tendência a redução no número de CFU-F após pré-condicionamento em hipóxia, quando comparado a incubação em normóxia, porém sem diferenças estatisticamente significativas. A tensão de oxigênio em nosso modelo de estudo variou entre 1-2% após 6-8 horas de incubação em jarra hermeticamente fechada, conforme descrição do fabricante. Essa atmosfera gerada *in vitro* supera as baixas tensões de oxigênio no nicho medular (~7%) e provavelmente tenha sido impeditivo ao desenvolvimento normal das CFU-F (MA *et al.*, 2010).

Morfologicamente, as células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes (HbSS e HbSC) cultivadas em condição controle (normóxia) apresentaram formato típico fibroblastóide, semelhante à cultura de células-tronco do grupo controle (HbA), e descrito previamente na literatura. Devido à escassez de trabalhos nesta área, não existem relatos na literatura sobre as características morfológicas das CTMs isoladas da medula óssea de pacientes falciformes.

Dados conflitantes estão presentes na literatura sobre a ação da hipóxia na proliferação, auto-renovação, metabolismo e diferenciação das CTMs. A resposta à hipóxia varia conforme a técnica empregada, tempo em incubação, tensão de oxigênio escolhida e tipo celular.

O papel do oxigênio como agente sinalizador intracelular é alvo de muitas pesquisas atuais. A tensão de oxigênio fisiológica no corpo humano está abaixo dos níveis atmosféricos, variando conforme os nichos entre 1% nas cartilagens (tecido avascular), 5-7% na medula óssea até 10-13 % nas artérias, pulmões e fígado (MA *et al.*, 2010). Baseado nessas informações, estudos investigam se as CTMs cultivadas sob baixas tensões de oxigênio apresentam melhor sobrevivência e taxa proliferativa quando comparadas às culturas em condições controle (normóxia).

Em trabalho publicado por Hung e colaboradores (2011), notou-se aumento da proliferação celular e capacidade de diferenciação óssea nas CTMs cultivadas sob baixa tensão de oxigênio durante 7 dias. Porém a diferenciação adipogênica e condrogênica foi reduzida após o efeito da hipóxia. Os autores ainda identificaram aumento na expressão de genes da pluripotência (Oct-4, Nanog, Klf4, Sall4 e TERC) e maior síntese de fatores de crescimento como VEGF no meio de cultura. A manutenção da capacidade de auto-renovação sem perder a multipotencialidade das CTMs, transforma a hipóxia em estratégia interessante para engenharia tecidual óssea.

Resultados concordantes foram obtidos anteriormente por Grayson et al (2007) que notou aumento na proliferação celular sob reduzidas concentrações de oxigênio ao longo de sete

passagens (30 vezes maior número de células que no cultivo em normóxia). Alta expressão do fator Oct-4 também foi vista nas CTMs cultivadas em hipóxia, confirmando o efeito mantenedor da auto-renovação e multiplicação celular.

Em nosso modelo de estudo, houve diminuição na taxa de proliferação das CTMs pertencentes ao grupo controle e CTMs dos pacientes falciformes após o pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas. Foi notada a redução na velocidade de proliferação quando comparada às CTMs cultivadas em condições normais (normóxia). Os gráficos da Figura 18 apresentam o efeito imediato no perfil proliferativo da hipóxia (logo após a retirada da jarra de anaerobiose) e após 7 dias respectivamente.

Após o pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas, as células-tronco mesenquimais falciformes e do grupo controle apresentaram alterações morfológicas (células hipertróficas, presença de vacúolos no citoplasma e núcleo irregular) reversíveis, ao longo do cultivo em condições normais (normóxia). Nossos dados se assemelham aos achados por Holzwarth et al (2010) com cultura de células-tronco mesenquimais humanas após pré-condicionamento em hipóxia (1-3%) por 7 dias. Os autores encontraram mudanças morfológicas nas culturas de CTMS quando comparadas àquelas cultivadas paralelamente em normóxia (21%), e essas alterações somadas à redução da capacidade proliferativa e acúmulo na fase G1 do ciclo celular foram considerados sinais sugestivos de quiescência celular.

As baixas tensões de oxigênio podem afetar características fundamentais de vários tipos celulares. Em estudo realizado com células-tronco mesenquimais isoladas do cordão umbilical após efeito de agentes mimetizadores de hipóxia, verificou-se alterações morfológicas como perda do formato fibroblastóide e ganho do aspecto achatado e citoplasma vacuolizados, além da redução na taxa de proliferação destas CTMs em cultura, e aumento do número de células na fase G0/G1 (ZENG *et al.*, 2011).

Em ambos os estudos, é notório o efeito da hipóxia nas alterações morfológicas e redução na taxa de proliferação, condizentes com nossos resultados. Ainda não há relatos descritos sobre o perfil proliferativo das CTMs da fração de CMMO de pacientes falciformes.

Apesar da redução na taxa de proliferação, a viabilidade celular após o pré-condicionamento das CTMs dos pacientes falciformes em hipóxia é mantida, como verificado na Figura 19. Diferentes de outros tipos celulares as células-tronco mesenquimais podem sobreviver em ambientes hipóxicos por vários dias, suportadas pela up-regulação de algumas vias de sobrevivência e aumento do metabolismo glicolítico (DAS *et al.*, 2009). Essa característica é crítica na aplicação clínica destas células em ambientes isquêmicos como na região da osteonecrose. Logo, pode-se sugerir que as CTMs isoladas da fração de CMMO dos pacientes falciformes a serem injetada de forma autóloga na região da necrose femoral permanecerão viáveis.

As CTMs constituem uma população heterogênea de células quanto à morfologia, fisiologia e expressão de antígenos de superfície. Até o momento, nenhum marcador específico e único foi identificado (BOBIS *et al.*, 2006 e KRAMPERA *et al.*, 2007).

Conforme os critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular, as células-tronco mesenquimais são identificadas pela presença positiva dos marcadores CD105, CD73 e CD90 e ausência dos antígenos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICCI *et al.*, 2006 e NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008).

No presente trabalho, as CTMs isoladas da fração de CMMO de pacientes falciformes foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de superfície, através da técnica de citometria de fluxo. Apesar da heterogeneidade típica destas células em cultura, a população de CTMS isoladas da fração de mononucleares da medula óssea falciforme (HbSS e HbSC) expressaram positivamente os antígenos CD105, CD146, CD90 e CD29 compondo o fenótipo característico das células-tronco mesenquimais.

As CTMs são capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Além da identificação morfológica e fenotípica, a habilidade de células clonais em formar esses três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar CTMs e distingui-las dos precursores comprometidos nas linhagens: óssea, adipocítica e condrogênica (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Quando cultivadas em meio indutor, as CTMs isoladas da fração de células mononucleares da medula óssea de pacientes falciformes (HbSS e HBSC) apresentaram-se multipotentes, com capacidade de diferenciação nas linhagens mesodermiais osteogênicas e adipogênicas semelhante ao grupo controle (HbA). Nossos resultados demonstraram a deposição da matriz calcificada corada com Alizarina Red S pelas CTMs falciformes após 21 dias sob o estímulo do meio ósteo-indutor. A conversão em adipócitos foi notada através das mudanças morfológicas na população de CTMs e síntese de lipídios intracelulares evidenciados com solução saturada de Oil Red. Os achados sugerem que a CTMs isoladas da CMMO de pacientes com osteonecrose são multipotentes *in vitro*, após indução em condições normais de cultivo (normóxia).

Resposta variável quanto à diferenciação osteogênica após hipóxia foi notada em nossos ensaios com CTMs em cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída à heterogeneidade celular da população de CTM e possivelmente à variabilidade entre diferentes indivíduos (ZIPORI *et al.*, 2011).

É possível que dentro de uma mesma cultura de CTMs existam células com diferentes potenciais de diferenciação, caracterizadas em tri-potentes (osteogênese, condrogênese e adipogênese), bi-potentes (osteogênese-adipogênese ou osteogênese-condrogênese) e mono-potentes em menor frequência (BIANCO *et al.*, 2008). Logo, pode-se sugerir que a

resposta variável das CTMs ao meio osteogênico após hipóxia possa estar relacionada à heterogeneidade clonal das CTMs.

Em nosso trabalho, verificamos também o potencial de diferenciação óssea das CFU-F isoladas da fração de CMMO de pacientes falciformes em condições normais e após hipóxia temporária, através do ensaio de CFU-O. As unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (CFU-F) foram responsivas ao meio indutor osteogênico apenas quando cultivadas em normóxia. A capacidade de diferenciação osteogênica destas células progenitoras estromais foi perdida após pré-condicionamento em hipóxia (1-2%) temporária (48 horas). O mesmo efeito foi verificado a nível molecular, através da técnica de qRT-PCR. Nossos resultados demonstraram redução na expressão de transcritos envolvidos na osteodiferenciação de estágio inicial como *ALP*, *COLLAGEN I* e *RUNX2*.

O mesmo efeito foi notado por Potier e colaboradores (2007) que verificaram a down-regulação de genes nas CTM humanas, envolvidos na osteogênese após serem submetidas a 1% de oxigênio em jarra de anaerobiose durante 48 horas. A redução dos transcritos *cbfa/Runx2*, osteocalcina e colágeno tipo I após o pré-condicionamento da cultura em hipóxia temporária sugeriu fortemente a inibição da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais. Outro efeito importante visto nesse estudo foi o aumento da produção de fatores angiogênicos (VEGF, β -FGF, TGF- β 3), a nível transcricional e protéico, responsáveis pela modulação da hipóxia e conseqüente reversão indireta da isquemia.

A supressão de marcadores osteogênicos como ALP (fosfatase alcalina) e osteocalcina após hipóxia transiente também foi vista em modelo in vitro estudado por Gruber et al (2008). As células ósseas humanas cultivadas durante 72 horas em baixa tensão de oxigênio (1%) apresentaram redução no potencial osteogênico frente ao estímulo com BMP-6, além disso, tiveram resposta metabólica diminuída e alterações morfológicas. Porém, as mudanças no perfil celular após a hipóxia temporária foram gradualmente substituídas pela resposta normal das células quando cultivadas em normóxia durante 7 dias. Os resultados sugeriram que a reoxigenação, portanto a formação de vasos sanguíneos no tecido pode ser um fator essencial para o processo de osteointegração das células e consolidação da terapia.

No presente estudo, não foi verificada alteração na expressão do gene *BGLAP* após efeito da hipóxia. Este gene é responsável pela síntese da proteína Osteocalcina, secretada na matriz extracelular a partir do 16º dia (NAKAMURA *et al.*, 2009). Como esse marcador está presente apenas na fase tardia da mineralização, acima de 2 semanas, é provável que nosso período de indução osteogênica (7 dias) tenha sido insuficiente na ativação deste gene, como mostrado na figura 33, na barra “normóxia 7 dias de indução”.

As análises de expressão relativa demonstraram redução nos níveis dos genes *HIF1A*, *ENG* e *SDF-1* após o efeito da hipóxia. Esperava-se o aumento da transcrição do gene *HIF1A*, após o estímulo da hipóxia, conforme já relatado na literatura (WAN *et al.*, 2010 e CLEMENS *et al.*, 2009;). Porém, sabe-se que a ativação deste gene pode advir de outros estímulos como alcalinização intracelular, presença de espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento (b-FGB, IGF e insulina) adicionados ao meio de cultura e outros (LAZARO *et al.*, 2006), o que provavelmente explica a maior expressão do *HIF1A* em condições de normóxia.

A ausência de oxigênio local exerce efeito na ativação do fator transcricional induzido pela hipóxia (HIF1), presente em diversas células. O HIF1 é uma molécula heterodimérica, composta por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , sendo a primeira altamente responsiva e estabilizada pela hipóxia. Sob baixas tensões de oxigênio, o HIF-1 α se acumula no citoplasma e posteriormente é translocado para o núcleo celular, onde sofre dimerização com a subunidade HIF-1 β . Esse dímero é responsável pela ativação dos diversos genes responsivos à hipóxia, tais como produtores das proteínas envolvidas na maturação celular (eritropoietina e transferrina), metabolismo energético (transportador de glicose 1 e 3), proliferação, viabilidade celular (IGF e p21) e angiogênese (VEGF e endotelina-1) (WAN *et al.*, 2010).

Surpreendentemente, em nossos resultados foi demonstrada a redução da expressão deste fator transcricional nas amostras de CTMs após efeito da hipóxia. Então, pode-se especular que as CTMs na região da osteonecrose (isquêmica) não expressam HIF1A e por conseqüência os níveis de proteínas ósteo-angiogênicas como VEGF e endotelina-1 estariam reduzidos. Logo, o comprometimento da neovascularização na necrose femoral pode estar relacionado aos reduzidos fatores de crescimento e angiogênicos no microambiente afetado. São necessários modelos animais para que esta hipótese seja avaliada.

Além disso, o fator transcricional HIF1A regula a transcrição do SDF-1A e CXCR4 e conseqüentemente controla a síntese da quimiocina SDF-1 α , potente fator de mobilização de progenitores da medula óssea para local de injúria tecidual (DAS *et al.*, 2009). A baixa expressão do transcrito da quimiocina SDF-1 α , encontrada em nossos resultados, pode ser reflexo da reduzida ativação do HIF1A nas CTMs falciformes após hipóxia.

O SDF-1 α está presente em altas concentrações nos locais de injúria tecidual e serve como potente quimioatraente no recrutamento de células circulantes (endoteliais e hematopoiéticas) e CTMs residentes nas proximidades da lesão que apresentem o receptor CXCR4 expresso na superfície, as quais são necessárias para o reparo ou regeneração órgão-específico (KITAORI *et al.*, 2009).

Expressão reduzida deste gene nas CTMs falciformes após efeito da hipóxia *in vitro*, pode estar correlacionada com a síntese diminuída desta quimiocina no local da necrose avascular *in vivo*, verificado no reparo ósseo comprometido.

O mecanismo de migração *in vivo* utilizado para a população de CTM até o local da injúria permanece desconhecido. Porém, estudos demonstram que as CTMs apresentam diversos receptores de superfície (CXCR4, CXCR5, CCR2, CCR3, CCR4, PDGF-R, IGF-R e outros) para diferentes quimiocinas e citocinas envolvidas no recrutamento para o tecido lesado (LOPEZ *et al.*, 2007).

As CTMs dos pacientes falciformes apresentaram capacidade migratória quando avaliadas em condições normais e após hipóxia. Não houve diferenças significativas quanto ao número de células migradas entre as duas condições. Apesar da escassez de amostras (n=2), nossos resultados são consistentes e demonstram que as células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes são viáveis e aptas à migração, respondendo aos estímulos *in vitro*, independente das condições de normóxia ou hipóxia. Apesar das discrepâncias entre os modelos *in vitro* e os fenômenos biológicos *in vivo*, podemos inferir que a presença de um gradiente de fatores quimioatrativos na região isquêmica seria o determinante do direcionamento destas células para o tecido lesado.

As CTMs expressam receptores de citocinas : IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R e IL-7R. Essas células também produzem um arsenal típico de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento tais como IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF (Fator Inibidor da Leucemia), G-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos), SCF (Stem Cell Factor), M-CSF (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos), flk-3L, a última implicada principalmente na hematopoiese. Entre as quimiocinas produzidas se encontram CXCL4, CXCL9, CXCL10 e CXCL1 (KODE *et al.*, 2009).

Nossos resultados demonstram que as CTMs dos pacientes falciformes são capazes de secretar citocinas nos sobrenadantes celulares nas condições normais de cultivo e após hipóxia. Caracterizando a funcionalidade destas células quanto às propriedades parácrinas típicas da população de células tronco-mesenquimais normais e fundamentando seu uso na medicina regenerativa.

É a primeira vez que se caracterizam as células-tronco mesenquimais de pacientes falciformes em cultura. Nosso trabalho tem caráter inovador e traz informações imprescindíveis sobre o perfil destas células envolvidas na regeneração óssea a nível experimental.

6. CONCLUSÕES:

- A frequência de CFU-F é maior na amostra de MO dos pacientes falciformes quando comparada ao grupo controle (HbA);
- A medula dos pacientes falciformes apresentam precursores osteogênicos (CFU-O) com capacidade de deposição óssea, sob condições padrão de cultivo (normóxia);
- As CTMs isoladas da fração de CMMO de pacientes falciformes quando expandidas em cultura se apresentam morfológica e imunofenotipicamente semelhantes às CTMs do grupo controle (HbA);
- As CTMs dos pacientes falciformes se mostraram viáveis, multipotentes e proliferativas em condições padrão de cultivo (normóxia);
- As células-tronco mesenquimais de pacientes falciformes foram capazes de migrar e secretar citocinas sob condições de normóxia e após hipóxia;
- O pré-condicionamento temporário em hipóxia provocou alterações morfológicas, redução na mineralização óssea dos precursores osteogênicos (CFU-O), diminuição da proliferação celular e da expressão de transcritos envolvidos na osteodiferenciação.

7. PERSPECTIVAS

Resultados preliminares indicaram alterações moleculares nas CTMs dos pacientes falciformes quando submetidas à hipóxia temporária, contudo os possíveis mecanismos envolvidos na resposta celular (quiescência, apoptose ou desdiferenciação) e vias envolvidas (ex: proteínas de choque térmico, aumento de p53/p21) ainda não foram elucidados e serão alvo de nossas próximas análises. Considerando a limitação amostral em nosso trabalho, se faz necessário a ampliação do número de amostras, repetições dos ensaios e utilização de melhores técnicas.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Imunologia (LABIMUNO) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) e ao Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e, ao Serviço de Hemetologia e Ortopedia e Traumatologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos da UFBA.

REFERÊNCIAS

- ACURIO, M.T.; FRIEDMAN, R. J. Hip arthroplasty in patients with sickle cell haemoglobinopathy. **J Bone Joint Surg Am**, v. 74-B, n.3, p. 367-371, 1992.
- AKINYOOLA, A. L.; ADEDIRAN, I. A.; ASALEYE, M.C.; BOLARINWA, A. R. Risk factors for osteonecrosis of the femoral head in patients with sickle cell disease. **International Orthopaedics**, v.33, p. 923-926, 2009.
- ALMEIDA, A.; ROBERTS, I. Bone involvement in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, n.129, p. 482-495, 2005.
- APAE SALVADOR. Mapeamento revela distribuição da doença falciforme. **Boletim informativo da Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais de Salvador-BA**, Salvador, v. 12, n. 57, abr-jun. 2008.
- ASLAN, M.; FREEMAN, A. B. Redox-dependent impairment of vascular function in sickle cell disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 1469–1483, 2007.
- ASSOULINE-DAYAN, Y.; CHANG, C.; GREENSPAN, A. Pathogenesis and Natural History of Osteonecrosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 32, p. 94-124, 2002.
- BALDWIN, C.; NOLAN, V.G.; WYSZYNSKI, D. F.; QIAN-LI, M.; SEBASTIANINI, P.; EMBURY, H. S.; BISBEE, A.; FARREL, J.; FARRER, L.; STEINBERG, M. H. Association of klotho, bone morphogenic 6, annexin A2, polymorphisms with sickle cell osteonecrosis. **The American Society of Hematology**, v. 106, p. 372-375.
- BASCIANO, L.; NEMOS, C.; FOLIGUET, B.; ISLA, N.; CARVALHO, M.; TRAN, N.; DALLOUL, A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC cell Biology**, p. 1-12, 2011.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting history, concept, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical Applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, v. 44, p. 215-230, 2006.
- BOSS, J. H.; BEJAR, J. ; PELED, E. Vasculature deprivation – induced osteonecrosis of the rat femoral head as a model for therapeutic trials. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, p. 2-24, 2005.
- BOSS, J.H; MISSELEVICH, I. Osteonecrosis of the Femoral Head of Laboratory Animals: The Lessons Learned from a Comparative Study of Osteonecrosis in Man and Experimental Animals. **Vet Pathol**, v. 40, p. 345-354, 2003.

- BYDŁOWSKI, P. S.; DEBES, A. A.; MASELLI, M. F. L.; JANZ, L. F. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v. 31 p. 25-35, 2009.
- CANÇADO D. R.; JESUS, A. J. A doença falciforme no Brasil. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 29, p. 203-206, 2007.
- CANCEDDA, R.; BIANCHI G.; DERUBEIS A.; QUARTO R. Cell Therapy for Bones Disease: A Review of Current Status. **Stem Cells**, v. 21, p. 610-619, 2003.
- CAPLAN, A.I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, p. 1076-1084, 2006.
- CARANO, A. D. R.; FILVAROFF, H. E. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 980-989, 2003.
- CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stemcells**, v. 25, p. 2739–27492, 2007.
- CHILDS, G., S. Osteonecrosis: Death of Bone Cells. **Orthopaedic Nursing**, v. 24, p. 295-303, 2005.
- CLEMENS, T.; RIDDLE, R.C.; KHATRI, R.; SCHIPANI, E. Role of hypoxia-inducible factor 1- α in angiogenic- osteogenic coupling. **J Mol Med**, v. 87, p. 583-590, 2009.
- CROIZAT , H.; NAGEL, L. R. Circulating Cytokines Response and the Level of Erythropoiesis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**, v. 60, p.105–115, 1999.
- CONRAN, N.; COSTA F. F. Hemoglobin disorders and endothelial cell interactions. **Clinical Biochemistry**, v. 42, p. 1824–1838, 2009.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO F. C.; COSTA F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. **Informa Healthcare USA**, v. 33, p. 1-16, 2009.
- DALTRO, G. C; FORTUNA, V. A.; ARAÚJO, M. A. S.; LESSA, P. I. F.; ASSIS-SOBRINHO, U.; BOROJEVIC, R. Femoral Head necrosis treatment with autologous stem cell in sickle cell disease. **Acta Ortop. Bras**, n. 16, v.1, p. 23-27, 2008.
- DAS, R.; JAHR, H.; OSCH, J.V.M, G.; FARREL, E. The Role of Hypoxia in Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches. **Tissue Engineering**, p. 1-10, 2009.
- DESCHASEAUX, F.; SENSÉBE, L.; HEYMANN, D. Mechanisms of bone repair and Regeneration. **Cell Press**, v. 15, p. 417-429, 2009.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S. ; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.
- DRISS, A.; ASARE, K.O.; HIBBERT, J.M.; GEE, B.E.; ADAMKIEWICZ T.V.; STILES J.K. Sickle Cell Disease in the Post Genomic Era: A Monogenic Disease with a Polygenic Phenotype. **Genomic Insights**, v. 2009, n.2, p. 23–48, 2009.

FRENETTE, S. P.; ATWEH, F. G. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 850-858, 2007.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, R. I. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Cellular Physiology**, p. 27-35, 2007.

GNECCHI, M.; ZHIPING, Z.; AIGUO, N.; VICTOR, D.J. Paracrine mechanisms in Adult Stem Cell Signalling and Therapy. **Circulation Research**, v.103, p. 1204-1219, 2008.

GRANGER, N. D.; WOOD, K. C. Sickle Cell Disease: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Metabolites. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 926-932, 2007.

GRAYSON, W.L.; ZHAO, F.; BUNNELL, B.; MA, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue information of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 948-953, 2007.

GRUBER, R.; KANDLER, B.; HERMANN, A; FISCHER, M.B.; WATZEK, G. Bone Cell Responsiveness to Growth and differentiation factors Under Hypoxia in vitro. **The international Journal of Oral & Maxillofacial implants**, v .23, p. 417-426, 2008.

HEBBEL, P. R.; VERCELLOTTI, M. G.; NATH, A. K. A Systems Biology Consideration of the Vasculopathy of Sickle Cell Anemia: The Need for Multi-Modality Chemo-Prophylaxis. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 271–292, 2009.

HERNIGOU P.; BEAUJEAN, F.; LAMBOTTE, C., J. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 81, p. 349-355, 1999.

HERNIGOU, A.; POIGNARD, F.; BEAUJEAN, F.; ROUARD, H. Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions. **The Journal of Bone & Joint Surgery American**, v.87, p. 1430-1437, 2005.

HERNIGOU, P.; BACHIR, D.; GALACTEROS, F. The Natural History of Symptomatic Osteonecrosis of the Femoral Head in Adults with Sickle Cell Disease. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, n.3, v. 85-A, 2003.

HERNIGOU, P.; BEAUJEAN, F. Abnormalities in the Bone Marrow of the Iliac Crest in Patients Who Have Osteonecrosis Secondary to Corticosteroid Therapy or Alcohol Abuse. **J Bone Joint Surg Am**, v.79, p. 1047-1053, 1997.

HERNIGOU, P.; BEAUJEAN, F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 405, p.14-23, 2002.

HERNIGOU, P.; DALTRO, G. C.; FILLIPINI, P.; MUKASA, M. M.; MANICOM, O. Percutaneous Implantation of Autologous Bone Marrow Osteoprogenitor Cells as Treatment of Bone Avascular Necrosis Related to Sickle Cell Disease. **The Open Orthopaedics Journal**, v. 2, p. 62-65, 2008.

HERNIGOU, P.; POIGNARD, A.; ZILBER, S.; ROUARD, H.; Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. **Indian J Orthop**, v. 43, p. 40-45, 2009.

HOLZWARTH, C.; VAEGLER, M.; GIESEKE, F.; PFISTER, S.M.; HANDGRETINGER, R.; KERST, G.; MULLER, I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. **BMC Cell Biology**, p. 1-11, 2010.

HONGBAO, L.; XUE, W.; GE, G.; LUO, X.; YANG, L.; XIANG, H.; DING, X.; TIAN, P.; TIAN, X. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 e CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSC. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.401, p. 509-515, 2010.

HUNG, S. P.; HO, J.H.; SHIH, Y. V.R.; LO, T.; LEE, O. K. Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.30, p. 260-266, 2011.

JAVED, A.; HAYNAN, C.; GHORI, F.Y. Genetic and Transcriptional Control of Bone Formation. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 22, p. 283-293, 2010.

JOHNSON, E. O.; SOULTANIS, K.; SOUCACOS, P.N. Vascular anatomy and microcirculation of skeletal zones vulnerable to osteonecrosis: vascularization of the femoral head. **Orthop Clin N Am**, v. 35, p. 285-291, 2004.

JONES. B. K.; SESHADRI, T.; KRANTZ, R.; KEATING, A.; FERGUSON C. P. Cell-Based Therapies for Osteonecrosis of the Femoral Head. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 14, p. 1081-1087, 2008.

KANCZLER, M., J.; OREFFO, C., O., R. Osteogenesis and Angiogenesis: The Potential for engineering bone. **European Cells and Materials**, v. 15, p. 100-114, 2008.

KATO A J. G.; GLADWIN, A T. M.; STEINBERG, H. M. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood Rev**, v. 21, n.1, p. 37-47, 2007.

KATO, G. J.; HEBBEL, P. R.; STEINBERG, H. M.; GLADWIN, T. M. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **British Journal of Haematology**, v. 129, p. 465-481, 2009.

KAUL, K. D.; FINNEGAN, E.; BARABINO , A. G. Sickle Red Cell - Endothelium Interactions. **Microcirculation**, v. 16, n.1, p. 97-111, 2009.

KERACHIAN, A., M.; HARVEY J., E., ; COURNOYER, D.; CHOW T., K., T.; SÉGUIN, C. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Vascular Hypotheses. **Endothelium**, v. 13, p. 237-244, 2006.

KITAORI, T.; ITO, H.; SCHWARZ, E. M.; TSUTSUMI, R.; YOSHITOMI, H.; OISHI, S.; NAKANO, M.; FUJI, N.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, T. Stromal Cell-Derived Factor 1/CXCR4 Signaling Is Critical for the Recruitment of Mesenchymal Stem Cells to the Fracture Site During Skeletal Repair in a Mouse Model. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**, v. 60, n. 3, p. 813-823, 2009.

KODE, A. J.; MUKHERJEE, S.; JOGLEKAR, V. M.; HARDIKAR, A. A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. **Cytotherapy**, v. 11, p. 377-391, 2009.

KOLF, M. C.; ELIZABETH, CHO E.; TUAN, S. R. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 1-10, 2007.

KRAJEWSKI, L. M.; HSU, L. L.; GLADWIN, T. M. The proverbial chicken or the egg? Dissection of the role of cell-free hemoglobin versus reactive oxygen species in sickle cell pathophysiology. **AJP-Heart Circ Physiol**, v. 295, p. 4-7, 2008.

KRAMPERA, M.; FRANCHINI M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfus**, v. 5, p. 120-129, 2007.

KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M.H.; BIANCO, P.; ROBEY, P. Enumeration of colony-forming units- fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. **Stem Cell Res**, v.1, p. 83-94, 2009.

KUTLAR, A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. **Hemoglobin**, v. 31, n. 2, p. 209-224, 2007.

LAFFORGUE, P. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 500–507, 2006.

LAROCHE, M. Intraosseous circulation from physiology to disease. **Joint Bone Spine**, v. 69, p. 262-269, 2002.

LAZARO, L. M. HIF1- α : hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor? **FASEB Journal**, v. 20, p. 828-832, 2006.

LAZZENEC, G.; JORGENSEN, C. Concise Review: Adult Multipotent Stromal cells and Cancer : Risk or Benefit? **Stem cells**, v.26, p.1387-1394, 2008.

LE BLANC, K.; FRASSONI, F.; BALL, L.; LOCATELLI, F.; ROELOFS, H.; LEWIS, I.; LANINO, E.; SUNDBERG, B.; BERNARDO, E. M.; REMBERGER, M.; DINI, G.; EGELER, M. R.; BACIGALUPO, A.; FIBBE, W.; RINGDÉN, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **Lancet**, v. 371, p. 1579–1586, 2008.

LEE, S., L.; LEE, S., J.; ROH L., H.; KIM, H., C.; JUNG, S., J.; SUH, T., K. Alterations in the Differentiation Ability of Mesenchymal Stem Cells in Patients with Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Comparative Analysis According to the Risk Factor. **Journal of Orthopaedic Research**, p. 604-609, 2006.

LIEBERMAN, R., J.; DALUISKI, A.; EINHORN, A., T. The Role of Growth Factors in the Repair of Bone : Biology and Clinical Applications. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 84, p. 1032-1044, 2002.

LOPEZ, A.P.; MARAIS, E.; GALLAY, N.; LANGONNÉ, A.; DELORME, B.; HERAULT, O.; CHARBORD, P.; DOMENECH, J.; The In Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities. **TISSUE- SPECIFIC STEM CELLS**, v. 25, p. 1737-1745, 2007.

MA, T.; GRAYSON, W.L.; FROHLICH, M.; NOVAKOVIK, G. V.; Hypoxia and Stem Cells-based engineering of mesenchymal tissues. **Biotechnol Prog**, v. 25, n.1, p. 32-42, 2009.

MACK, K. A. ; MCGOWAN, R. V. ; TREMONTI, K. C. ; ACKAH, D. ; BARNETT, C.; MACHADO, F. M.; GLADWIN, T. M.; KATO, J. G. Sodium nitrite promotes regional blood flow in patients with sickle cell disease: a phase I/II study. **Br J Haematol**, v.142, n. 6, p. 971–978, 2008.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P.C. ; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cell reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, p. 2204-2213, 2006.

MEIRELLES, S. L.; CAPLAN, I. A.; NARDI, B. N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 2287–2299, 2008.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 86, p. 480-487, 2008.

MOONEY, D.J.; HSIONG, S.X. Regeneration of vascularized bone. **Periodontology**, v. 41, p. 109-122, 2006.

MOREIRA NETO, F.; LOURENÇO, D.M; NOGUTI, M. A. E; MORELLI, V. M.; GIL, I. C.P.; BELTRÃO, A. C. S; FIGUEIREDO, M. S. The clinical impact of MTHFR polymorphism on the vascular complications of sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, p. 1291-1295, 2006.

MUKASA, M. M.; MANICOM, O.; ALEXIS, C.; BASHOUN, K.; DONKERWOLCKE, M.; BURNY, F. Treatment of Sickle cell disease's hip necrosis by core decompression: A prospective case-control study. **Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research**, v. 95, p. 498-504, 2009.

MULLER, I.; VAEGLER, M.; HOLZWARTH, C.; TZARIBRATCHEV, N.; PFISTER, S. M.; SCHUTT, B.; REIZE, P., GREIL, J.; HANDGRETINGER, R.; RUDERT, M. Secretion of angiogenic proteins by human multipotent mesenchymal stromal cells and their clinical potential in the treatment of avascular osteonecrosis. **Leukemia**, p.1-8, 2008.

NAKAMURA, A.; DOHI, Y.; AKAHANE, M.; OHGUSHI, H.; NAKAJIMA, H.; FUNAOKA, H.; TAKAKURA, Y. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering**, v. 15, n. 2, p. 169-180, 2009.

NAOUM, P. C. Prevalência e controle da hemoglobina S. **Rev.bras.hematol.hemoter**, v. 22, p. 142-148, 2000.

OKPALA ,I. The intriguing contribution of white blood cells to sickle cell disease – a red cell disorder. **Blood Reviews**, v. 18, 65–73, 2004.

ORBAN H. M.; CRISTESCU V.; DRAGUSANU M. Avascular necrosis of the femoral head. **Maedica A Journal of Clinical Medicine**, v. 4, p.26-34, 2009.

OTERO, R. M.; GUIMARÃES, A. G.; COELHO, P. M. P.; FREITAS, G. R. Terapia celular no acidente vascular cerebral. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, v.31, p. 99-103, 2009.

PHINNEY, G. D.; PROCKOP, J. D. Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. **Stem Cells**, v. 25, p. 2896–2902, 2007.

POTIER, E.; FERREIRA, E. ; ANDRIAMANALIJAONA, R. ; PUJOL, J. P.; OUDINA, K.; AVRAMOGLU, L. D.; PETITE, H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and factor expression. **Bone**, v. 40, p. 1078-1087, 2007.

PROCKOP, D. J.; GREGORY, C. A. Fundamentals of culture and characterization of mesenchymal stem/progenitor cells (MSCs) from bone marrow stroma. **Culture of Human Stem Cells**, Freshney, 2007.

PROCKOP, D.J. Repair of tissues by Adult Stem/ Progenitor Cells (MSCs): Controversies, Myths and Changing Paradigms. **Molecular Therapy**, v. 17, n.6, p. 939-946, 2009.

RASTEGAR, F.; SHENAG, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B.; HE, B.; CHEN, L.; ZUO, G.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, R. E.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J.; KIM, H. S.; ZHOU, J.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.; LUO, J.; LUO X.; QIN J.; REID R. R.; LUU H. H.; HAYDON C. R.; DENG, Z.; HE, T. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. **World J Stem Cells**, v. 26, p. 67-80, 2010.

SACCHETTI, B.; FUNARI, A.; MICHIEZI, S.; CESARE, S.; PIERSANTI, S.; SAGGIO, I.; TAGLIAFICO, E.; FERRARI, S.; ROBEY, G. P.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Self-Renewing

Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, v. 131, p. 324–336, 2007.

SALEM, K. H.; THIEMERMANN C. Mesenchymal Stromal Cells: Current Understanding and Clinical Status. **Stem Cells**, v. 28, p. 585–596, 2010.

SERJEANT, G. One hundred years of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 151, p. 425-429, 2010.

SODY, M. S.; KIRCHHOFF, C.; MAYER, W.; GOEBEL, M.; JANSSON, V. Avascular necrosis of the femoral head: inter- and intraobserver variations of Ficat and ARCO classifications. **International Orthopaedics**, v. 32, p. 283–287, 2008.

SOUZA, C. F.; NAPOLI, P.; HAN, S.W.; LIMA, V.C.; CARVALHO, A.C.C. Células-Tronco Mesenquimais: Células ideais para a Regeneração Cardíaca? **Rev Bras Cardiol Invasiva**, v. 18, p. 344-353, 2010.

STEINBERG, H. M.; BRUGNARA, C. Pathophysiological-based approaches to treatment of sickle cell disease. **Annu. Rev. Med**, v. 54 p. 89-112, 2003.

STOLZING, A.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; SCUTT, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cell: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Aging and development**, v.129, p. 163-173, 2008.

STUART, J. M. ; NAGEL, L. R. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343–1360, 2004.

TOLAR, J.; LE BLANC, K.; KEATING, A.; BLAZAR, B. R. Concises Review: Hitting the right Spot with Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cells**, v. 28, p. 1446-1455, 2010.

UNDALE, H. A.; WESTENDORF, J. J.; YASZEMSKI, J. M.; KHOSLA, S. Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. **Mayo Foundation for Medical Education and Research**, v. 84, p. 893-902, 2009.

VATER, C.; KASTEN P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 463–477, 2010.

VERFAILLIE, C. M.; ROOBROUCK, V.D.; MONTOYA, F.U. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. **Experimental Cell Research**, v. 314, p. 1937-1944, 2008.

VILAS-BOAS, F.; FEITOSA, S. G.; SOARES, B. P. M.; PINHO, A. J.; MOTA, C. A. A.; ALMEIDA, G. J. A.; ANDRADE, V. M.; CARVALHO, G. H.; OLIVEIRA, D. A.; SANTOS, R. R. Bone Marrow Cell Transplantation in Chagas' Disease Heart Failure: Report of The First Human Experience. **Arq Bras Cardiol**, v. 96, p. 325-331, 2011.

WAN, C.; SHAO, J.; SHAWN, G. R; RIDDLE, R.C.; LONG, F.; JOHNSON, R. S.; SCHIAPANI, E.; CLEMENS, T. Role of HIF1- α in skeletal development. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, v.1192, p. 322-326, 2010.

WEATHERALL, J. D.; CLEGG, B. J. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, p. 704-712, 2001.

ZAGO, A. M.; PINTO, C. S. A. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. Hemoter**, v. 29, p. 207-214. 2007.

ZENG, H. L. ; ZHONG, Q. I. ; QIN, Y.L. ; BU, Q. Q.; HAN, X.A.; JIA, H. T.; LIU, H. W. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **BMC Cell Biology**, p. 12-32, 2011.

ZIPORI, D.; FISCHER, M. P.; LEVIN, S. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. **Stem Cell Rev and Rep**, v. 7, p.560-568, 2011.

MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido ao BMC Cell Biology Journal.

Medula óssea de pacientes falciformes portadores de osteonecrose contém células-tronco mesenquimais funcionais e em frequência aumentada.

SALLES, M. M.¹, SOUZA, E. S.¹, FREIRE, S. M.¹, DALTRO, G. C.², SANTOS, Q. O.¹, PEDRAL, G.¹,
, ROSA, F. P.¹, BOROJEVIC, R.⁴, MEYER, R.¹, FORTUNA, V. A.¹

¹ Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, Salvador- BA

² Complexo Hospital Universitário Professor Edgard Santos, C-HUPES, Salvador-BA

³ Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ.

Endereço para correspondência:

Vitor Antônio Fortuna

Universidade Federal da Bahia- UFBA

Instituto de Ciências da Saúde-ICS

Laboratório de Imunologia - LABIMUNO

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n- Vale do Canela, Salvador, BA, 40110-100 - Brasil

E-mail: vitor_fort@yahoo.com.br

Tel: 3235-9682 ramal: 246

RESUMO

A osteonecrose da cabeça femoral é uma complicação óssea comum em pacientes falciformes, decorrente dos freqüentes eventos vaso-oclusivos típicos desta hemoglobinopatia. O reparo limitado na região acometida pela necrose pode ser atribuído à neovascularização limitada e possíveis alterações no número e funcionalidade das células-tronco mesenquimais e ósseas neste ambiente hipóxico. Com este trabalho se avaliou a freqüência e funcionalidade das células-tronco mesenquimais isoladas da fração de mononucleares da medula óssea dos pacientes falciformes. Esta população compõe a fração de células mononucleares que são injetadas de forma autóloga na cabeça do fêmur (região isquêmica) para tratamento da osteonecrose nesses indivíduos. As células mononucleares foram obtidas da crista ilíaca dos pacientes falciformes dos genótipos HbSS e HbSC apresentando necrose avascular na cabeça femoral. As células-tronco mesenquimais contidas nessa fração foram isoladas conforme protocolo padrão e avaliadas quanto à freqüência de unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (CFU-F) e sua capacidade de diferenciação em progenitores osteoblásticos em ensaio de CFU-O, morfologia em cultura, potencial de diferenciação osteo-adipogênico, caracterização imunofenotípica, viabilidade e taxa de proliferação em condições de normóxia e após pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas simulando a região da osteonecrose.

Os resultados demonstraram que as CTMs dos pacientes falciformes estão elevadas na medula óssea quando comparado aos pacientes controle (HbA) ($p= 0,0409$). Estas células possuem morfologia típica fibroblastóide e expressam os marcadores de superfícies CD105, CD146, CD90, CD29, característicos da população de células-tronco mesenquimais. As CTMs dos pacientes falciformes se mostraram multipotentes, viáveis e proliferativas quando cultivadas em condições normais (normóxia), perdendo a capacidade de diferenciação óssea após o efeito da hipóxia. A determinação do perfil celular *in vitro*, contribui para o aperfeiçoamento da terapia autóloga em pacientes falciformes com osteonecrose.

INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, originadas a partir do folheto germinativo mesodermal, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e possivelmente, mas ainda parte de assunto

controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Na medula óssea, as CTMs são componentes importantes do nicho hematopoiético, contribuindo com o suporte estromal através da sustentação direta do microambiente e com a secreção de fatores parácrinos envolvidos na proliferação, função e diferenciação das Células-Tronco Hematopoiéticas (CTH) (NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008).

A multipotencialidade e a facilidade de isolamento e expansão em cultura das CTMs, aliada às suas propriedades imunomodulatórias, capacidade de migração e secreção trófica torna-as importante alvo para o tratamento de diversas doenças, principalmente nas enfermidades ósseas como na osteonecrose da cabeça femoral.

Necrose avascular óssea, também conhecida como necrose asséptica ou isquêmica são algumas denominações dadas à síndrome clínica descrita como osteonecrose. Conceitualmente, necrose avascular é definida como necrose massiva do osso ou medula óssea, com envolvimento sistêmico multifocal, geralmente relacionado a fatores de risco específicos e achados radiológicos confirmatórios (LAFFORGUE, 2006).

A circulação limitada nas epífises ósseas aponta para a alta incidência de osteonecrose na cabeça femoral. As epífises dos ossos longos são cobertas por tecido cartilaginoso avascular. Como resultado, o suprimento sanguíneo é inexistente nestas áreas que se tornam susceptíveis à insuficiência circulatória (BOSS; BEJAR; PELED, 2005).

A tentativa de reparo é prejudicada devido à neovascularização limitada e possíveis alterações no número (HERNIGOU *et al.*, 1999) e função das células progenitoras ósseas (LEE *et al.*, 2006), o que leva ao surgimento do colapso subcondral e degeneração das superfícies cartilaginosas adjacentes.

O processo de reabsorção e remodelamento do osso trabecular morto, conhecido como “substituição insidiosa” confere alta fragilidade ao tecido. O resultado é a necrose persistente, perda das propriedades biomecânicas, aparecimento de microfraturas decorrentes do estresse e sobrecarga de peso, ocasionando dor incapacitante e deformidade epifiseal irreversível (LAFFORGUE, 2006).

Na doença falciforme, osteonecrose é decorrente de fenômenos vaso-oclusivos freqüentes que resultam no infarto das superfícies articulares e cabeça de ossos longos como fêmur e úmero (ALMEIDA; ROBERTS, 2005).

É uma das complicações ósseas mais comuns com incidência variando entre 10-50% nos pacientes falciformes e geralmente apresenta acometimento bilateral (KUTLAR, 2007). A doença é mais prevalente entre os genótipos SS e SC, podendo também ocorrer em pacientes com co-herança de genes para talassemias alfa ou beta (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

Geralmente atinge pacientes jovens nas fases ativas de desenvolvimento (adolescência e adultos jovens) e em exercício das atividades laborais. A osteonecrose sintomática na doença falciforme tem progressão clínica e radiográfica substancial dentro de um curto período de tempo. E quando não tratada pode evoluir com o colapso da cabeça femoral, condição irreversível, em menos de cinco anos após aparecimento dos primeiros sinais (HERNIGOU *et al.*, 2003).

As terapias disponíveis para o tratamento da osteonecrose são paliativas, escassas, dispendiosas e não regenerativas. Além disso, não impedem a evolução negativa da necrose para colapso subcondral da cabeça do fêmur.

Diferente das alternativas paliativas supracitadas, a terapia celular propõe a recuperação ou substituição completa dos tecidos lesados, através da capacidade multipotente das células progenitoras mesenquimais e/ou seus efeitos parácrinos na secreção de fatores de crescimento e angiogênicos (JONES *et al.*, 2008).

Baseados nas propriedades regenerativas e modulatórias das células-tronco mesenquimais, estudos prospectivos vêm sendo realizados com uso autólogo da fração de células mononucleares da medula óssea para o tratamento da osteonecrose na doença falciforme (HERNIGOU *et al.* 2002; GANJI *et al.*, 2004; HERNIGOU *et al.*, 2008; DALTRO *et al.*, 2008).

Apesar da eficácia comprovada nos diferentes estudos, os mecanismos moleculares desta terapia permanecem pouco elucidados. Diante disso, nosso trabalho se propõe avaliar o comportamento das células-tronco mesenquimais contidas na fração de mononucleares da medula óssea de pacientes portadores de doenças falciformes, em termos de frequência e caracterização funcional desta população.

METODOLOGIA:

Obtenção da amostra:

Os experimentos e ensaios foram realizados com 28 amostras biológicas obtidas em procedimentos cirúrgicos de punção de medula óssea (MO) da crista ilíaca, conduzidos no Complexo-Hospital Universitário Professor Edgar Santos, na cidade de Salvador-BA.

Os pacientes foram agrupados em grupo controle (8 pacientes não falciformes portadores de osteonecrose da cabeça do fêmur) e grupo de estudo (pacientes falciformes portadores de osteonecrose da cabeça femoral) com 8 pacientes pertencente ao genótipo SC e 12 pertencentes ao genótipo SS.

Todo material coletado foi obtido após autorização dos pacientes, através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, pertencente à Universidade Federal da Bahia (registro CEP nº 126/09).

Obtenção das células mononucleares:

A medula óssea coletada em tubo falcon contendo heparina sódica (5000 U.I./ml) foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, para separação do plasma. Em seguida, a amostra foi reconstituída com o mesmo volume de solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio (CMF 1x). A suspensão celular foi adicionada lentamente ao polímero de separação Ficoll- Paque™ 1,077g/L (GE Healthcare Bio-sciences AB) e submetida a centrifugação a 2500 rpm durante 15 minutos. O anel de células mononucleares existente na interface após centrifugação foi separado e lavado uma vez com solução salina.

Ensaio de CFU-F e CFU-O:

A contagem do número de unidades formadoras de colônias-fibroblástóides foi realizada conforme protocolo padrão (PROCKOP e GREGORY, 2007). Cerca de 1×10^6 de células mononucleares de cada amostra foram cultivadas em triplicata em frasco de cultivo de 25 cm² com meio DMEM high glucose (4500mg/l Glucose) (Sigma Aldrich®, USA) + 10% Soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil) (meio de cultura basal proliferativo). Após 10 dias de cultivo, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (BSS 1x) (KH₂PO₄ 1,1 mM, 6,1 mM glicose, pH 7.4), fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com cristal de violeta (1 mg/ml) para evidenciação e contagem das colônias. Consideraram-se colônias de progenitores mesenquimais- fibroblastóides, aquelas que possuíam acima de 50 células. O número de colônias obtidas foi contado macroscopicamente e correlacionado ao número de CFU-F presentes nas amostras de CMMO.

Após esse período de 14 dias, o ensaio de CFU-O foi realizado. O meio de cultura basal proliferativo foi substituído pelo meio indutor osteogênico conforme protocolo adotado (PROCKOP e GREGORY, 2007) e mantidas por mais 10 dias. Finalizado o período da indução osteogênica (10 dias), as colônias foram lavadas com solução de BSS 1x, seguidas de fixação com paraformaldeído a 4% durante 10 minutos e coradas em 1% Alizarina Red S, pH 4,1, para evidenciação dos depósitos de cálcio da matriz óssea. Para melhor visualização das colônias, as culturas foram contra-coradas com o corante histológico cristal de violeta.

Isolamento, cultivo e expansão das CTMs:

As células-tronco mesenquimais foram isoladas e cultivadas usando protocolo padrão (PROCKOP; GREGORY, 2007). A fração de CMMO foi incubada sobre superfície plástica na densidade inicial de plaqueamento entre $1-3 \times 10^7$ células após contagem de células viáveis usando o corante de exclusão Azul de Trypan (Gibco®, Invitrogen, EUA) em Câmara de Neubauer (**Laboroptik®, Germany**). As células viáveis foram distribuídas em poços de 9 cm² com meio Minimum Essential Medium Eagle-

Alpha Modifications 1x (α -MEM) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB e antibióticos, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A troca do meio de cultura foi realizada a cada 4 dias até atingirem 70-80% da confluência. O sub-cultivo foi realizado após lavagem 3x com solução salina CMF 1x e descoladas da superfície plástica com solução de 1,25mg/ml tripsina-EDTA (Gibco®, Invitrogen, EUA). Em seguida, a suspensão celular foi distribuída em novas placas/garrafas ou diretamente utilizada em ensaios experimentais.

As culturas foram rotineiramente observadas em microscópio invertido de contraste de fase (Leica Microsystems Inc., USA) para verificação morfológica das células.

Caracterização imunofenotípica e viabilidade celular

A identificação dos marcadores de superfície das CTMs e a viabilidade em cultura foram avaliadas através de ensaios de citometria de fluxo. Para caracterização das CTMs, cerca de $1-3 \times 10^5$ células foram marcadas com diferentes anticorpos conjugados aos fluorocromos PE e FITC. Os anticorpos analisados foram anti-CD105-PE (eBioscience, CA, USA), anti-CD90-FITC (eBioscience, CA, USA), anti-CD146-PE (BD Pharmingen®) e anti-CD29-FITC (eBioscience, CA, USA).

Para análise da viabilidade celular foi utilizado o corante 7-AAD (7-amino-actinomicina D) (BD Pharmingen™), um marcador ácidos nucléicos que pode ser usado em substituição ao iodeto de propídio, para exclusão de células não viáveis por citometria de fluxo.

Ensaio de diferenciação celular *in vitro*

A multipotencialidade característica das CTMs foi avaliada em ensaios de diferenciação osteogênico e adipogênico, *in vitro*, seguindo os protocolos específicos já estabelecidos na literatura (PROCKOP; GREGORY, 2007).

No final do período da diferenciação osteogênica, a cultura foi lavada e fixada com paraformaldeído 4%, em seguida coradas com 1% Alizarina Red S (Sigma Aldrich®, USA) (pH 4,1) que evidencia a deposição da matriz calcificada. Para evidenciar a conversão adipogênica, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, e coradas com solução alcoólica saturada de Oil red.

O procedimento rotineiramente foi realizado em triplicata e os resultados registrados em imagens fotográficas.

Detecção de osteocalcina intracelular

Para análise molecular da diferenciação osteogênica, cerca de $2-3 \times 10^5$ CTMs foram cultivadas em meio osteoindutor, durante 7 dias ou mantidas em condições controle. Esta população de CTMs ósteo-induzidas e controle foram submetidas à marcação com o anticorpo murino anti-Osteocalcina humana conjugado a PE (R&D systems®), conforme protocolo recomendado pelo fabricante, e finalmente analisadas em citômetro de fluxo. A aquisição dos eventos foi feita após detecção de sinal em FL2 em citômetro (FACScalibur BD Biosciences, CA, EUA) correspondente à emissão de fluorescência da phycoerythrin (PE). Os resultados obtidos foram expostos na forma de histograma.

Incubação em câmara de hipóxia

Quando pertinente, alguns ensaios e experimentos foram realizados após pré-condicionamento em condições de normóxia e hipóxia durante 48h. O condicionamento em atmosfera hipóxica foi desenvolvido em jarra de anaerobiose contendo um gerador de atmosfera (Anaerobac®-Probac do Brasil). Este gerador produz uma atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico, em um sistema hermeticamente fechado, onde as culturas foram mantidas durante 48 horas. A hipóxia foi verificada através de fita interna indicadora que detecta a presença e redução de oxigênio através da mudança de coloração de azul para branca. A incubação ocorreu em estufa a 37°C, conforme recomendações do fabricante. Após esse intervalo de tempo, as culturas foram usadas nos ensaios experimentais.

Isolamento de RNA

Para obtenção do RNA, a monocamada celular aderida ao frasco de cultura foi lavada com solução salina BSS 1x para retirada do meio de cultura. Em seguida adicionou-se o tampão de extração (Lysis Buffer RLT, Qiagen®) contendo o agente redutor beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich®). O conteúdo retirado foi transferido para um criotubo estéril e congelado a -70°C, até o momento de uso.

A etapa de extração do RNA foi realizada com uso de minicolunas (RNeasy Mini Kit, Qiagen®) com membrana de sílica que tem a função de reter apenas o conteúdo de RNA enquanto o material contaminante é eliminado nas lavagens seqüenciais. A concentração e pureza do RNA obtido foram avaliadas por leitura espectrofotométrica a 260nm em espectrofotômetro de nanovolume (Nanodrop). O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação Abs_{260nm}/Abs_{280nm} , considerando-se como pureza satisfatória uma relação próxima de 2,0. A integridade do RNA estava conservada na maioria das amostras. Diferenças nas concentrações das amostras foram normalizadas pela redução de seus volumes por centrifugação a vácuo.

Síntese de cDNA:

Todos os RNAs isolados serviram como molde na síntese dos respectivos DNAs complementares (cDNA), através de uma reação realizada pela enzima transcriptase reversa. A síntese dos cDNAs foi realizada conforme as seguintes etapas: 1µg do RNA molde foi submetido a tratamento com 2 µL DNase I (1U/ µL) em tampão específico, a 37°C por 10min e posteriormente a 75°C por mais 5 minutos. Para cada amostra de RNA tratado foram adicionados 3 µL da mistura (mix) contendo: 1 µL de dNTPs (10mM), 0,5 µL de OligodT (0,5 µg/ µL) e 0,5 µL de Random primer (100ng/µL). A mistura foi incubada a 65°C por 10 min e logo depois colocada no gelo. Os nucleotídeos utilizados na reação continham as 4 bases (púricas e pirimídicas) fosfatadas: desoxiadenosina trifosfatada- dATPs, dexitimidina trifosfatada-dTTPs, desoxicitidina trifosfatada-dCTPs e desoxiguanosina trifosfatada-dGTPs. Após a imersão em gelo, adicionou-se à reação 6 µL do mix da enzima transcriptase reversa Super Script III (ImProm-II, Promega, USA), composto por: tampão de síntese a uma concentração final de 5x, DTT (0,1M), RNase OUT (40U/ µL) e a enzima Super Script III (200UI/ µL). A reação foi incubada a 25°C por 10 min, 50°C por 2h e 75°C por 15min. Após este período, a enzima foi inativada com RNase H (5U/ µL) em incubação a 37°C por 30 minutos e a 72°C por 10 min. Finalmente, as amostras de cDNA foram diluídas de 1:3 com água Milli-Q e armazenadas a -20°C para posterior utilização em ensaio de qRT-PCR.

qRT-PCR:

Com o intuito de determinar a melhor concentração para cada primer, realizou-se o teste de eficiência com o uso de uma mistura de cDNAs diluída em série. As concentrações finais variaram entre a máxima de 800nM e a mínima de 100nM, sendo escolhidas as concentrações de 200nM para os primers MCAM e BGLAP e 400nM para os demais genes. As reações foram realizadas em triplicata, usando 3 µl do cDNA de interesse diluído de 1:30, adicionando-se 3µl do primer de interesse e 6µl do Syber® Green Dye (Applied Biosystems®). As reações ocorreram em placas de 96 poços colocadas em Termociclador (7300 SDS, Applied Biosystems®). As amplificações foram realizadas nas seguintes condições: 50°C por 2 min (etapa de ativação da enzima Uracil N-Glicosilase), 95°C por 10 minutos (ativação da DNA Polimerase), 40 ciclos de 95°C de 15 seg (etapa de desnaturação) e 60°C por 1 minuto (etapa de anelamento dos oligonucleotídeos e extensão do amplicon). A análise inicial dos dados foi feita através do programa 7300 System SDS Software, Applied Biosystems®, por meio do qual um *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene foi estabelecido. Assim, a partir da intersecção do *threshold* com a curva de amplificação, obtém-se o Ct (*Threshold cycle*) da amostra.

Para análise final da expressão gênica, adotou-se o cálculo de expressão relativa pelo método de Pfaffl, considerando a variação dos Cts (Cycle Threshold) para cada amostra e a eficiência dos primers (diferente de 100%). A expressão do transcrito na amostra alvo foi analisada em relação a uma

amostra referência (controle ou não tratada). A diferença entre os valores do Cts da amostra referência e a amostra tratada, gerou o coeficiente Δ CT. O mesmo cálculo da variação dos Cts foi aplicado para os transcritos endógenos (ou constitutivos) nas mesmas amostras, usados como normalizadores. A normalização foi feita utilizando 2 genes endógenos (GAPDH e β -ACTINA), que juntos forneceram dados computados na geração de um valor correspondente à estabilidade de pelo menos 1 deles.

As sequências dos iniciadores (primers) para análise da expressão gênica foram obtidas no banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide). As similaridades dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente diante da sua similaridade aos dados de RNAm humanos através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)/ Human genome. A tabela 2 apresenta a relação dos primers escolhidos para análise.

Tabela 1- Oligonucleotídeos (iniciadores) utilizados para amplificação por qRT-PCR

As sequencias estão representadas na direção 5' → 3'. Fwd: *Forward*, Rev: *Reverse*.

Genes		Seqüências
SDF1	Fwd	CATTGACCCGAAGCTAAAGTG
	Rev	TTTCTGGGCAGCCTTTCTC
Collagen I	Fwd	CACACGTCTCGGTCATGGTA
	Rev	AAGAGGAAGGCCAAGTCGAG
ALPL	Fwd	AGCCAGAGATGCAATCG
	Rev	CTATCCTGGCTCCGTGCTC
BGLAP	Fwd	CCTCCTGCTTGACACAAAG
	Rev	TGAGAGCCCTCACACTCCTC
Runx2	Fwd	CCATAACCGTCTTCACAAATCC
	Rev	AATGCGCCCTAAATCACTG
MCAM	Fwd	ACTTCCACCTCCACCAGCTC
	Rev	GTCTGCGCCTTCTTGCTC

ENG	Fwd	CTGAGGACCAGAAGCACCTC
	Rev	TCCATGTCCTCTTCCTGGAG
HIF1A	Fwd	GAAGTGGCAACTGATGAGCA
	Rev	GCGCGAACGACAAGAAA
Genes constitutivos (normalizadores)		
GAPDH	Fwd	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
	Rev	TGTTGCTGTAGCCAAATTCG
β-ACTIN	Fwd	GGCACCCAGCACAAATGAAG
	Rev	CCGATCCACACGGAGTACTTG

Resultados

Frequência de CTMs na fração de CMMO em condições normais e após hipóxia:

A frequência de colônias de células mononucleares foi verificada em ensaio de CFU-F (Fig. 1A), conforme protocolo adotado. Apesar do pequeno número amostral, notou-se o aumento, estatisticamente significativo, na quantidade de colônias das amostras dos pacientes falciformes (HbSS) em comparação àquelas oriundas do grupo controle (HbA) ($p < 0,05$) (Fig. 1B). Não houve diferença significativa entre a frequência de CFU-F na medula óssea de pacientes HbSC e grupo controle.

Após o pré-condicionamento em hipóxia temporária, houve redução no número de CFU-F quando comparado à condição controle (normóxia) ($p = 0,0078$) (Fig 1C).

Análise morfológica das CTMs expandidas em condições normais e após hipóxia :

As culturas foram rotineiramente observadas ao microscópio invertido. As células-tronco mesenquimais mostravam-se tipicamente fibroblastóides quando cultivadas em condições normais. Diversidade quanto ao tamanho das células foi notada ao longo das passagens, caracterizando uma população de células-tronco mesenquimais heterogênea.

Não houve diferença morfológica entre as CTMs HbA (Figs. 2A/2C) e CTMs HbSS (Fig. 2B).

Alterações morfológicas foram notadas após pré-condicionamento das culturas de CTMs em hipóxia por 48 horas. As células se tornaram hipertróficas, achatadas, com núcleos irregulares e citoplasma contendo vacúolos inespecíficos (Fig.3).

Características imunofenotípicas das CTMs:

As culturas foram analisadas por citometria de fluxo para os antígenos de superfície CD105, CD29, CD146 e CD90, conhecidos como marcadores positivos de CTMs . Devido a ausência de um marcador específico para as células-tronco mesenquimais, utilizou-se a associação destes quatro antígenos para identificação, seguindo os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores (2006).

A população de CTMs foi marcada com maior intensidade para os antígenos CD105 (endoglina), CD90 (Thy-1) e CD29, e fracamente positiva para CD146 (MCAM), marcador de células subendoteliais dos sinusóides da medula óssea (pericitos).

As CTMs HbA (Fig. 4A) e CTMs HbSS (Fig. 4B) apresentaram mesmo perfil para os marcadores de superfície, em concordância com o padrão já estabelecido na literatura.

Análise da viabilidade e taxa de proliferação celular em normóxia e após hipóxia:

A avaliação da viabilidade das células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes foi realizada após tratamento com o corante 7-Amino-Actinomicina D (7-AAD).

Pode-se observar que as CTMs permanecem viáveis mesmo após o pré-condicionamento temporário em hipóxia. Para este ensaio, o n amostral pequeno impossibilitou a análise estatística (Fig 5A/5B)

A taxa de proliferação celular foi avaliada em função do tempo e efeito da incubação (normóxia e hipóxia). No geral, observou-se a redução na taxa de proliferação das CTMs (falciformes e normais) após o pré-condicionamento em hipóxia (Figs. 6A/6B/ 7A/7B).

Avaliação da multipotencialidade:

A multipotencialidade das CTMs dos pacientes falciformes foi verificada em ensaios de diferenciação osteogênica e adipogênica in vitro, de acordo com os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores (2006). As CTMs dos pacientes falciformes foram capazes de se diferenciar em adipócitos (Fig.8) e osteoblastos (Fig. 9) após incubação em meios indutores.

Capacidade de diferenciação óssea em condições normais e após hipóxia:

Resultados do ensaio de CFU-O, quando realizado em condições normais de indução, mostraram que as células-tronco contidas na fração de células mononucleares da medula óssea foram capazes de se

converter na linhagem osteogênica. Observou-se a deposição de matriz mineralizada (coradas em Alizarina Red S) ao final de 10 dias em meio indutor (Fig. 10A).

Situação inversa foi verificada após o pré-condicionamento em hipóxia por 48 horas. As células-tronco mesenquimais perderam sua capacidade de diferenciação osteogênica, notada pela ausência de matriz calcificada ao final da indução (Fig. 10B).

Marcação para osteocalcina intracelular:

A conversão osteogênica das CTMs também foi avaliada através da identificação da proteína intracelular Osteocalcina, marcador ósseo tardio produzido por células ósteo-comprometidas ou osteoblastos.

Não foi possível notar diferenças entre as curvas (deslocamento) das amostras de CTMs falciformes induzidas e não induzidas (controle), demonstrado pelos valores do KS (D) para as amostras analisadas (n=4) (Fig. 11). O que sugere tempo insuficiente de indução (7 dias) para a síntese desta proteína.

Nenhuma diferença foi vista quanto à expressão de osteocalcina nas amostras em normóxia e após hipóxia (representado pela curva verde) (n=4)(p= 0,3460), como mostrado na figura 12.

Expressão gênica de marcadores ósseos:

Com o intuito de avaliar a expressão dos transcritos gênicos envolvidos na diferenciação óssea nas CTMs em condições normais de cultivo e após hipóxia, realizamos a análise quantitativa dos genes *COLLAGEN I*, *ALPL*, *BGLAP*, *RUNX2*, *MCAM*, *ENG*, *SDF1* e *HIF1A* através da técnica de qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real).

Após 7 dias em meio indutor osteogênico, foi possível verificar aumento na expressão de transcritos nas CTM de pacientes falciformes, nas condições normais de cultivo (Fig. 13).

Para o fator transcricional *RUNX2*, verificou-se aumento na ordem de 8 vezes em relação à cultura controle (células não induzidas em meio osteogênico). O mesmo perfil de aumento foi notado para os outros marcadores da osteogênese: *ALPL* (aproximadamente 4 vezes maior expressão) e *COLLAGEN I* (5 vezes mais expresso). Diferente dos outros marcadores ósseos, o gene *BGLAP* (Osteocalcina) teve sua expressão reduzida após efeito ósteo-indutor por 7 dias. Verificou-se aumento dos níveis de expressão para os genes *MCAM*, *HIF-1A*, e *SDF-1 α* após indução osteogênica. Nenhum efeito foi notado para o gene *ENG*, responsável pela síntese do antígeno de superfície

Endoglina (CD105), usado na identificação da população de células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

Os resultados demonstraram que o pré-condicionamento por 48 horas em hipóxia levou à redução na expressão dos transcritos envolvidos na diferenciação osteogênica em fase inicial: *RUNX2*, *ALPL* e *COLLAGEN I*. Não houve alteração na expressão dos genes *BGLAP* e *MCAM* quando comparados a expressão na amostra controle.

Mesmo perfil de redução na expressão foi visto para os genes *HIF-1A*, e *SDF-1 α* após hipóxia.

DISCUSSÃO

A osteonecrose é uma das complicações ósseas mais comuns nos pacientes falciformes, com incidência variando entre 10-50% e geralmente apresenta acometimento bilateral (KUTLAR, 2007). A doença é mais prevalente entre os genótipos SS e SC, podendo também ocorrer em pacientes com co-herança de genes para talassemias alfa ou beta (ASSOULINE-DAYAN *et al.*, 2002).

A osteonecrose na doença falciforme é decorrente de eventos vaso-oclusivos freqüentes que resultam no infarto das superfícies articulares e cabeça de ossos longos como fêmur e úmero (ALMEIDA; ROBERTS, 2005).

Esses eventos vaso-oclusivos levam à interrupção circulatória e conseqüente hipóxia às estruturas ósseas. O processo de reparo é limitado e insidioso, atribuído à neovascularização prejudicada e possivelmente às alterações na freqüência e funcionalidade das células-tronco mesenquimais (CTMs) e ósseas no local.

Com base nas potenciais anormalidades das CTMs, Hernigou e colaboradores (1999) investigaram o comportamento celular na região vizinha à área acometida pela necrose na cabeça femoral. A medula foi obtida através da punção das áreas proximal e intertrocânter do fêmur. O número de CFU-Fs estava reduzido nos pacientes portadores de osteonecrose após corticoterapia ($1,88 \pm 4,02$) em comparação aos pacientes pertencentes ao grupo controle (voluntários saudáveis) ($32,7 \pm 15,9$) e falciformes portadores de osteonecrose ($30,9 \pm 30,1$). Resultados sugerem que a ausência de células-tronco mesenquimais no local prejudica a regeneração óssea e leva ao mau prognóstico com conseqüente colapso da cabeça femoral.

Em estudo anterior realizado pelo mesmo grupo, foi detectada a freqüência diminuída de CFU-F, que potencialmente originariam osteoblastos maduros, na medula óssea isolada da crista ilíaca dos pacientes portadores de osteonecrose por álcool ou corticóide induzida (HERNIGOU *et al.*, 1997).

As CTMs constituem uma população celular rara na medula óssea, cuja freqüência varia entre 0,01% a 0,0001% do total de células nucleadas. Apesar da rara presença, estas células podem proliferar

efetivamente, mantendo seu caráter de células-tronco *in vivo*. A perda progressiva do potencial de diferenciação devido à senescência ocorre após cerca de 40 duplicações (KRAMPERA *et al.*, 2007).

No presente estudo foi avaliada a frequência de CFU-F na fração de células mononucleares da medula óssea de pacientes portadores de osteonecrose em decorrência da doença falciforme.

Nos resultados apresentados, foi verificada maior frequência de CFU-F na medula óssea dos pacientes falciformes ($22,72 \pm 23,85$) (HbSS) com osteonecrose da cabeça femoral quando comparada com a frequência na medula óssea de pacientes do grupo controle ($7,6 \pm 10,41$) (HbA) (portadores de osteonecrose por outros fatores de risco).

Não se notou diferenças significativas entre a frequência de CFU-F na medula óssea de pacientes falciformes do genótipo SC quando comparada a frequência destas colônias na medula óssea dos pacientes do grupo controle (HbA) (Figura 1).

Os resultados obtidos possivelmente estão relacionados com o estresse hematopoiético, característico da anemia falciforme, decorrente da hemólise aumentada associada ao desequilíbrio entre fatores de crescimento (SCF, IL-6, GMC-SF) e reguladores (TGF- β) de células progenitoras no nicho medular (CROIZAT; NAGEL, 1999; KUZNETSOV *et al.*, 2009). Considerando que as CFU-F compartilham a mesma origem na medula óssea e seu papel *in vivo* está na sustentação direta da hematopoiese neste microambiente, é possível que a alta frequência encontrada seja reflexo da maior necessidade de suporte estromal às células hematopoéticas nos pacientes com anemia falciforme. A maior frequência de CFU-F estaria relacionado à maior proliferação, sobrevivência e diferenciação das células-tronco hematopoéticas, no intuito de suprir a depleção contínua das hemácias no sangue periférico.

No caso dos pacientes pertencentes ao genótipo SC, a presença da heterozigose implica em menor taxa de polimerização de hemoglobina S intracelular, conseqüentemente menor falcização e hemólise intravascular, resultando em uma anemia hemolítica menos grave (KATO *et al.*, 2009). Em decorrência dessa anemia mais branda, a hematopoiese na medula óssea destes pacientes ocorre com menor intensidade quando comparado com a anemia falciforme, o que reflete na menor proliferação de progenitores estromais e hematopoiéticos *in vivo*. A menor frequência de CFU-F nos pacientes HbSC estaria em acordo com os nossos achados.

A baixa frequência de CFU-F na medula óssea dos pacientes do grupo controle (HbA), pode ser atribuída aos fatores de risco iniciadores (abuso de álcool, uso de corticosteróides em altas concentrações, idiopática) da osteonecrose e decisivos no prognóstico da doença, em concordância com os trabalhos anteriormente publicados (HERNIGOU *et al.*, 1997; HERNIGOU *et al.*, 1999).

A necrose avascular óssea na doença falciforme atinge pacientes jovens nas fases ativas de desenvolvimento (adolescência e adultos jovens), diferente da osteonecrose secundária a outros fatores de risco, que geralmente acomete indivíduos adultos ao redor dos 40 anos de idade. A

população em nosso grupo controle tem idade média variando entre $51 \pm 11,2$ anos enquanto média de idade da população falciformes em estudo varia entre $29,1 \pm 10,52$ anos.

Já é conhecido na literatura, que a frequência das CFU-F na medula é inversamente proporcional ao aumento na idade do doador (STOLZING *et al.*, 2008; VERFAILLIE *et al.*, 2008). Logo, é possível que a idade dos pacientes em nosso estudo seja uma variável determinante quanto à diferença entre as frequências de CFU-F comparadas nos dois grupos (HbA e HbSS).

Verificamos uma tendência a redução no número de CFU-F após pré-condicionamento em hipóxia, quando comparado a incubação em normóxia, porém sem diferenças estatisticamente significativas. A tensão de oxigênio em nosso modelo de estudo variou entre 1-2% após 6-8 horas de incubação em jarra hermeticamente fechada, conforme descrição do fabricante. Essa atmosfera gerada *in vitro* supera as baixas tensões de oxigênio no nicho medular (~7%) e provavelmente tenha sido impeditivo ao desenvolvimento normal das CFU-F (MA *et al.*, 2010).

Morfologicamente, as células-tronco mesenquimais dos pacientes falciformes (HbSS e HbSC) cultivadas em condição controle (normóxia) apresentaram formato típico fibroblastóide, semelhante à cultura de células-tronco do grupo controle (HbA), e descrito previamente na literatura. Devido à escassez de trabalhos nesta área, não existem relatos na literatura sobre as características morfológicas das CTMs isoladas da medula óssea de pacientes falciformes.

Dados conflitantes estão presentes na literatura sobre a ação da hipóxia na proliferação, auto-renovação, metabolismo e diferenciação das CTMs. A resposta à hipóxia varia conforme a técnica empregada, tempo em incubação, tensão de oxigênio escolhida e tipo celular.

O papel do oxigênio como agente sinalizador intracelular é alvo de muitas pesquisas atuais. A tensão de oxigênio fisiológica no corpo humano está abaixo dos níveis atmosféricos, variando conforme os nichos entre 1% nas cartilagens (tecido avascular), 5-7% na medula óssea até 10-13 % nas artérias, pulmões e fígado (MA *et al.*, 2010). Baseado nessas informações, estudos investigam se as CTMs cultivadas sob baixas tensões de oxigênio apresentam melhor sobrevivência e taxa proliferativa quando comparadas às culturas em condições controle (normóxia).

Em trabalho publicado por Hung e colaboradores (2011), notou-se aumento da proliferação celular e capacidade de diferenciação óssea nas CTMs cultivadas sob baixa tensão de oxigênio durante 7 dias. Porém a diferenciação adipogênica e condrogênica foi reduzida após o efeito da hipóxia. Os autores ainda identificaram aumento na expressão de genes da pluripotência (Oct-4, Nanog, Klf4, Sall4 e TERC) e maior síntese de fatores de crescimento como VEGF no meio de cultura. A manutenção da capacidade de auto-renovação sem perder a multipotencialidade das CTMs, transforma a hipóxia em estratégia interessante para engenharia tecidual óssea.

Resultados concordantes foram obtidos anteriormente por Grayson *et al.* (2007) que notou aumento na proliferação celular sob reduzidas concentrações de oxigênio ao longo de sete passagens (30

vezes maior número de células que no cultivo em normóxia). Alta expressão do fator Oct-4 também foi vista nas CTMs cultivadas em hipóxia, confirmando o efeito mantenedor da auto-renovação e multiplicação celular.

Em nosso modelo de estudo, houve diminuição na taxa de proliferação das CTMs pertencentes ao grupo controle e CTMs dos pacientes falciformes após o pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas. Foi notada a redução na velocidade de proliferação quando comparada às CTMs cultivadas em condições normais (normóxia). Os gráficos da Figura 7 apresentam o efeito imediato no perfil proliferativo da hipóxia (logo após a retirada da jarra de anaerobiose) e após 7 dias respectivamente. Após o pré-condicionamento em hipóxia durante 48 horas, as células-tronco mesenquimais falciformes e do grupo controle apresentaram alterações morfológicas (células hipertróficas, presença de vacúolos no citoplasma e núcleo irregular) reversíveis, ao longo do cultivo em condições normais (normóxia). Nossos dados se assemelham aos achados por Holzwarth et al (2010) com cultura de células-tronco mesenquimais humanas após pré-condicionamento em hipóxia (1-3%) por 7 dias. Os autores encontraram mudanças morfológicas nas culturas de CTMs quando comparadas àquelas cultivadas paralelamente em normóxia (21%), e essas alterações somadas à redução da capacidade proliferativa e acúmulo na fase G1 do ciclo celular foram considerados sinais sugestivos de quiescência celular.

As baixas tensões de oxigênio podem afetar características fundamentais de vários tipos celulares. Em estudo realizado com células-tronco mesenquimais isoladas do cordão umbilical após efeito de agentes mimetizadores de hipóxia, verificou-se alterações morfológicas como perda do formato fibroblastóide e ganho do aspecto achatado e citoplasma vacuolizados, além da redução na taxa de proliferação destas CTMs em cultura, e aumento do número de células na fase G0/G1 (ZENG *et al.*, 2011).

Em ambos os estudos, é notório o efeito da hipóxia nas alterações morfológicas e redução na taxa de proliferação, condizentes com nossos resultados. Ainda não há relatos descritos sobre o perfil proliferativo das CTMs da fração de CMMO de pacientes falciformes.

Apesar da redução na taxa de proliferação, a viabilidade celular após o pré-condicionamento das CTMs dos pacientes falciformes em hipóxia é mantida, como verificado na Figura 5. Diferentes de outros tipos celulares as células-tronco mesenquimais podem sobreviver em ambientes hipóxicos por vários dias, suportadas pela up-regulação de algumas vias de sobrevivência e aumento do metabolismo glicolítico (DAS *et al.*, 2009). Essa característica é crítica na aplicação clínica destas células em ambientes isquêmicos como na região da osteonecrose. Logo, pode-se sugerir que as CTMs isoladas da fração de CMMO dos pacientes falciformes a serem injetada de forma autóloga na região da necrose femoral permanecerão viáveis.

As CTMs constituem uma população heterogênea de células quanto à morfologia, fisiologia e expressão de antígenos de superfície. Até o momento, nenhum marcador específico e único foi identificado (BOBIS *et al.*, 2006 e KRAMPERA *et al.*, 2007).

Conforme os critérios mínimos estabelecidos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular, as células-tronco mesenquimais são identificadas pela presença positiva dos marcadores CD105, CD73 e CD90 e ausência dos antígenos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICCI *et al.*, 2006 e NARDI; MEIRELLES; CAPLAN, 2008).

No presente trabalho, as CTMs isoladas da fração de CMMO de pacientes falciformes foram caracterizadas quanto à presença de marcadores de superfície, através da técnica de citometria de fluxo. Apesar da heterogeneidade típica destas células em cultura, a população de CTMs isoladas da fração de mononucleares da medula óssea falciforme (HbSS e HbSC) expressaram positivamente os antígenos CD105, CD146, CD90 e CD29 compondo o fenótipo característico das células-tronco mesenquimais.

As CTMs são capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Além da identificação morfológica e fenotípica, a habilidade de células clonais em formar esses três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar CTMs e distingui-las dos precursores comprometidos nas linhagens: óssea, adipocítica e condrogênica (BYDLOWSKY *et al.*, 2009).

Quando cultivadas em meio indutor, as CTMs isoladas da fração de células mononucleares da medula óssea de pacientes falciformes (HbSS e HbSC) apresentaram-se multipotentes, com capacidade de diferenciação nas linhagens mesodermis osteogênicas e adipogênicas semelhante ao grupo controle (HbA). Nossos resultados demonstraram a deposição da matriz calcificada corada com Alizarina Red S pelas CTMs falciformes após 21 dias sob o estímulo do meio ósteo-indutor. A conversão em adipócitos foi notada através das mudanças morfológicas na população de CTMs e síntese de lipídios intracelulares evidenciados com solução saturada de Oil Red. Os achados sugerem que a CTMs isoladas da CMMO de pacientes com osteonecrose são multipotentes *in vitro*, após indução em condições normais de cultivo (normóxia).

Resposta variável quanto à diferenciação osteogênica após hipóxia foi notada em nossos ensaios com CTMs em cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída à heterogeneidade celular da população de CTM e possivelmente à variabilidade entre diferentes indivíduos (ZIPORI *et al.*, 2011).

É possível que dentro de uma mesma cultura de CTMs existam células com diferentes potenciais de diferenciação, caracterizadas em tri-potentes (osteogênese, condrogênese e adipogênese), bi-potentes (osteogênese-adipogênese ou osteogênese-condrogênese) e mono-potentes em menor frequência (BIANCO *et al.*, 2008). Logo, pode-se sugerir que a resposta variável das CTMs ao meio osteogênico após hipóxia possa estar relacionada à heterogeneidade clonal das CTMs.

Em nosso trabalho, verificamos também o potencial de diferenciação óssea das CFU-F isoladas da fração de CMMO de pacientes falciformes em condições normais e após hipóxia temporária, através do ensaio de CFU-O. As unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (CFU-F) foram responsivas ao meio indutor osteogênico apenas quando cultivadas em normóxia. A capacidade de diferenciação osteogênica destas células progenitoras estromais foi perdida após pré-condicionamento em hipóxia (1-2%) temporária (48 horas). O mesmo efeito foi verificado a nível molecular, através da técnica de qRT-PCR. Nossos resultados demonstraram redução na expressão de transcritos envolvidos na osteo-diferenciação de estágio inicial como *ALP*, *COLLAGEN I* e *RUNX2*.

O mesmo efeito foi notado por Potier e colaboradores (2007) que verificaram a down-regulação de genes nas CTM humanas, envolvidos na osteogênese após serem submetidas a 1% de oxigênio em jarra de anaerobiose durante 48 horas. A redução dos transcritos *cbfa/Runx2*, osteocalcina e colágeno tipo I após o pré-condicionamento da cultura em hipóxia temporária sugeriu fortemente a inibição da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais. Outro efeito importante visto nesse estudo foi o aumento da produção de fatores angiogênicos (VEGF, β -FGF, TGF- β 3), a nível transcricional e protéico, responsáveis pela modulação da hipóxia e conseqüente reversão indireta da isquemia.

A supressão de marcadores osteogênicos como ALP (fosfatase alcalina) e osteocalcina após hipóxia transiente também foi vista em modelo in vitro estudado por Gruber e colaboradores (2008). As células ósseas humanas cultivadas durante 72 horas em baixa tensão de oxigênio (1%) apresentaram redução no potencial osteogênico frente ao estímulo com BMP-6, além disso, tiveram resposta metabólica diminuída e alterações morfológicas. Porém, as mudanças no perfil celular após a hipóxia temporária foram gradualmente substituídas pela resposta normal das células quando cultivadas em normóxia durante 7 dias. Os resultados sugeriram que a reoxigenação, portanto a formação de vasos sanguíneos no tecido pode ser um fator essencial para o processo de osteointegração das células e consolidação da terapia.

No presente estudo, não foi verificada alteração na expressão do gene *BGLAP* após efeito da hipóxia. Este gene é responsável pela síntese da proteína Osteocalcina, secretada na matriz extracelular a partir do 16º dia (NAKAMURA *et al.*, 2009). Como esse marcador está presente apenas na fase tardia da mineralização, acima de 2 semanas, é provável que nosso período de indução osteogênica (7 dias) tenha sido insuficiente na ativação deste gene, como mostrado na figura 12, na barra “normóxia 7 dias de indução”.

As análises de expressão relativa demonstraram redução nos níveis dos genes *HIF1A*, *ENG* e *SDF-1* após o efeito da hipóxia. Esperava-se o aumento da transcrição do gene *HIF1A*, após o estímulo da hipóxia, conforme já relatado na literatura (WAN *et al.*, 2010 e CLEMENS *et al.*, 2009;). Porém, sabe-se que a ativação deste gene pode advir de outros estímulos como alcalinização intracelular,

presença de espécies reativas de oxigênio, fatores de crescimento (b-FGB, IGF e insulina) adicionados ao meio de cultura e outros (LAZARO *et al.*, 2006), o que provavelmente explica a maior expressão do *HIF1A* em condições de normóxia.

A ausência de oxigênio local exerce efeito na ativação do fator transcricional induzido pela hipóxia (HIF1), presente em diversas células. O HIF1 é uma molécula heterodimérica, composta por duas subunidades HIF-1 α e HIF-1 β , sendo a primeira altamente responsiva e estabilizada pela hipóxia. Sob baixas tensões de oxigênio, o HIF-1 α se acumula no citoplasma e posteriormente é translocado para o núcleo celular, onde sofre dimerização com a subunidade HIF-1 β . Esse dímero é responsável pela ativação dos diversos genes responsivos à hipóxia, tais como produtores das proteínas envolvidas na maturação celular (eritropoietina e transferrina), metabolismo energético (transportador de glicose 1 e 3), proliferação, viabilidade celular (IGF e p21) e angiogênese (VEGF e endotelina-1) (WAN *et al.*, 2010).

Surpreendentemente, em nossos resultados foi demonstrada a redução da expressão deste fator transcricional nas amostras de CTMs após efeito da hipóxia. Então, pode-se especular que as CTMs na região da osteonecrose (isquêmica) não expressam HIF1A e por conseqüência os níveis de proteínas ósteo-angiogênicas como VEGF e endotelina-1 estariam reduzidos. Logo, o comprometimento da neovascularização na necrose femoral pode estar relacionado aos reduzidos fatores de crescimento e angiogênicos no microambiente afetado. São necessários modelos animais para que esta hipótese seja avaliada.

Além disso, o fator transcricional HIF1A regula a transcrição do SDF-1A e CXCR4 e conseqüentemente controla a síntese da quimiocina SDF-1 α , potente fator de mobilização de progenitores da medula óssea para local de injúria tecidual (DAS *et al.*, 2009). A baixa expressão do transcrito da quimiocina SDF-1 α , encontrada em nossos resultados, pode ser reflexo da reduzida ativação do HIF1A nas CTMs falciformes após hipóxia.

O SDF-1 α está presente em altas concentrações nos locais de injúria tecidual e serve como potente quimioatraente no recrutamento de células circulantes (endoteliais e hematopoiéticas) e CTMs residentes nas proximidades da lesão que apresentem o receptor CXCR4 expresso na superfície, as quais são necessárias para o reparo ou regeneração órgão-específico (KITAORI *et al.*, 2009).

Expressão reduzida deste gene nas CTMs falciformes após efeito da hipóxia *in vitro*, pode estar correlacionada com a síntese diminuída desta quimiocina no local da necrose avascular *in vivo*, verificado no reparo ósseo comprometido.

Apesar das discrepâncias entre os modelos *in vitro* e os fenômenos biológicos *in vivo*, podemos inferir que a presença de um gradiente de fatores quimioatratores na região isquêmica seria o determinante do direcionamento destas células para o tecido lesado.

É a primeira vez que se caracterizam as células-tronco mesenquimais de pacientes falciformes em cultura. Nosso trabalho tem caráter inovador e traz informações imprescindíveis sobre o perfil destas células envolvidas na regeneração óssea a nível experimental.

Conclusões

Nossos dados mostram que pacientes falciformes portadores de osteonecrose apresentam frequência elevada de células-tronco mesenquimais na medula óssea, quando comparado ao grupo controle (HbA) portador de osteonecrose por outros fatores de risco.

As CTMs falciformes são morfológica e imunofenotipicamente semelhantes às células-tronco mesenquimais dos pacientes do grupo controle. São viáveis, proliferativas e multipotentes nas condições normais de cultivo. Porém reduziram sua capacidade de deposição de matriz mineralizada após hipóxia temporária. Os mesmos resultados foram notados na análise da expressão gênica para marcadores ósseos de fase inicial (*RUNX2*, *ALPL* e *COLLAGEN I*).

REFERÊNCIAS:

ALMEIDA, A.; ROBERTS, I. Bone involvement in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, n.129, p. 482-495, 2005.

ASSOULINE-DAYAN, Y.; CHANG, C.; GREENSPAN, A. Pathogenesis and Natural History of Osteonecrosis. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**. v. 32, p. 94-124, 2002.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. J.; Mesenchymal Stem Cells: Revisiting history, concept, and assays. **Cell Stem Cell**. v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BOBIS S.; JAROCHA D. MAJKA M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical Applications. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**. v. 44, p. 215-230, 2006.

BOSS, J. H.; BEJAR, J. ; PELED, E. Vasculature deprivation – induced osteonecrosis of the rat femoral head as a model for therapeutic trials. **Theoretical Biology and Medical Modelling**. p. 2-24, 2005.

BYDLOWSKI, P. S.; DEBES, A. A.; MASELLI, M. F. L.; JANZ, L. F. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. v. 31 p. 25-35, 2009.

CLEMENS, T.; RIDDLE, R.C.; KHATRI, R.; SCHIPANI, E. Role of hypoxia-inducible factor 1- α in angiogenic- osteogenic coupling. **J Mol Med**. v. 87, p, 583-590, 2009.

CROIZAT , H.; NAGEL, L. R. Circulating Cytokines Response and the Level of Erythropoiesis in Sickle Cell Anemia. **American Journal of Hematology**. v. 60, 105–115, 1999.

DALTRO, G. C; FORTUNA, V. A.; ARAÚJO, M. A. S.; LESSA, P. I. F.; ASSIS-SOBRINHO, U.; BOROJEVIC, R. Femoral Head necrosis treatment with autologous stem cell in sickle cell disease. **Acta Ortop. Bras.**, n. 16, v.1, p. 23-27, 2008.

DAS, R.; JAHR, H.; OSCH, J.V.M, G.; FARREL, E. The Role of Hypoxia in Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells: Considerations for Regenerative Medicine Approaches. **Tissue Engineering**. p. 1-10, 2009.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S. ; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 8, p. 315-317, 2006.

GANGJI, V.; HAUZEUR, P. J.; MATOS, C.; MAERTELAER, V.; TOUNGOUZ, M.; LAMBERMONT, M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. **J. Bone Joint Surgery Am.**, n. 86, p.1153-1160, 2004.

GRAYSON, W.L.; ZHAO, F.; BUNNELL, B.; MA, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue information of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 358, p. 948-953, 2007.

GRUBER, R.; KANDLER, B.; HERMANN, A; FISCHER, M.B.; WATZEK, G. Bone Cell Responsiveness to Growth and differentiation factors Under Hypoxia in vitro. The international Journal of Oral & Maxillofacial implants. v .23, p. 417-426, 2008.

HERNIGOU P.; BEAUJEAN, F.; LAMBOTTE, C., J. Decrease in the mesenchymal stem-cell pool in the proximal femur in corticosteroid-induced osteonecrosis. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 81, p. 349-355, 1999.

HERNIGOU, P.; BACHIR, D.; GALACTEROS, F. The Natural History of Symptomatic Osteonecrosis of the Femoral Head in Adults with Sickle Cell Disease. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, n.3, v. 85-A, 2003.

HERNIGOU, P.; BEAUJEAN, F. Abnormalities in the Bone Marrow of the Iliac Crest in Patients Who Have Osteonecrosis Secondary to Corticosteroid Therapy or Alcohol Abuse. **J Bone Joint Surg Am**. v.79, p. 1047-1053, 1997.

HERNIGOU, P.; DALTRO, G. C.; FILLIPINI, P.; MUKASA, M. M.; MANICOM, O. Percutaneous Implantation of Autologous Bone Marrow Osteoprogenitor Cells as Treatment of Bone Avascular Necrosis Related to Sickle Cell Disease. **The Open Orthopaedics Journal**. v. 2, p. 62-65, 2008.

HOLZWARTH, C.; VAEGLER, M.; GIESEKE, F.; PFISTER, S.M.; HANDGRETINGER, R.; KERST, G.; MULLER, I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells.**BMC Cell Biology**. p. 1-11, 2010.

HUNG, S. P.; HO, J.H.; SHIH, Y. V.R.; LO, T.; LEE, O. K. Hypoxia Promotes Proliferation and Osteogenic Differentiation Potentials of Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopaedic Research**. v.30, p. 260-266, 2011.

KATO, G. J.; HEBBEL, P. R.; STEINBERG, H. M.; GLADWIN, T. M. Vasculopathy in sickle cell disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine, and new research directions. **British Journal of Haematology**. v. 129, p. 465-481, 2009.

KITAORI, T.; ITO, H.; SCHWARZ, E. M.; TSUTSUMI, R.; YOSHITOMI, H.; OISHI, S.; NAKANO, M.; FUJI, N.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, T. Stromal Cell-Derived Factor 1/CXCR4 Signaling Is Critical for the Recruitment of Mesenchymal Stem Cells to the Fracture Site During Skeletal Repair in a Mouse Model. **ARTHRITIS & RHEUMATISM**. v. 60, n.3, p. 813-823, 2009.

KRAMPERA, M.; FRANCHINI M.; PIZZOLO, G.; APRILI, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. **Blood Transfus**. v. 5, p. 120-129, 2007.

KUTLAR, A. Sickle cell disease: a multigenic perspective of a single gene disorder. **Hemoglobin**. v. 31, n. 2, p. 209-224, 2007.

KUZNETSOV, S. A.; MANKANI, M.H.; BIANCO, P.; ROBEY, P. Enumeration of colony-forming units-fibroblast from mouse and human bone marrow in normal and pathological conditions. **Stem Cell Res.** v.1, p. 83-94, 2009.

LAFFORGUE, P. Pathophysiology and natural history of avascular necrosis of bone. **Joint Bone Spine.** v. 73, p. 500-507, 2006.

LAZARO, L. M. HIF1- α : hypoxia-inducible factor or dysoxia-inducible factor? **FASEB Journal.** v. 20, p. 828-832, 2006.

LEE, S., L.; LEE, S., J.; ROH L., H.; KIM, H., C.; JUNG, S., J.; SUH, T., K. Alterations in the Differentiation Ability of Mesenchymal Stem Cells in Patients with Nontraumatic Osteonecrosis of the Femoral Head: Comparative Analysis According to the Risk Factor. **Journal of Orthopaedic Research.** p. 604-609, 2006.

LOPEZ, A.P.; MARAIS, E.; GALLAY, N.; LANGONNÉ, A.; DELORME, B.; HERAULT, O.; CHARBORD, P.; DOMENECH, J.; The In Vitro Migration Capacity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Comparison of Chemokine and Growth Factor Chemotactic Activities. **TISSUE- SPECIFIC STEM CELLS.** v. 25, p. 1737-1745, 2007.

MA, T.; GRAYSON, W.L.; FROHLICH, M.; NOVAKOVIK, G. V.; Hypoxia and Stem Cells- based engineering of mesenchymal tissues. **Biotechnol Prog.** 2009. v. 25, n.1, p. 32-42, 2009.

MEIRELLES, S. L.; CAPLAN, I. A.; NARDI, B. N. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells.** v. 26, p. 2287–2299, 2008.

NAKAMURA, A.; DOHI, Y.; AKAHANE, M.; OHGUSHI, H.; NAKAJIMA, H.; FUNAOKA, H.; TAKAKURA, Y. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering.** v. 15, n. 2, p. 169-180, 2009.

POTIER, E.; FERREIRA, E. ; ANDRIAMANALIJAONA, R. ; PUJOL, J. P.; OUDINA, K.; AVRAMOGLU, L. D.; PETITE, H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and factor expression. **Bone.** v. 40, p. 1078-1087, 2007.

STOLZING, A.; JONES, E.; MCGONAGLE, D.; SCUTT, A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cell: Consequences for cell therapies. **Mechanisms of Aging and development.** v.129, p. 163-173, 2008.

VERFAILLIE, C. M.; ROOBROUCK, V.D.; MONTOYA, F.U. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. **Experimental Cell Research.** v. 314, p. 1937-1944, 2008.

WAN, C.; SHAO, J. GILBERT, S. R.; RIDDLE, R. C.; LONG, F.; JOHNSON, R.S.; SCHIPANI, E.; CLEMENS, T. Role of HIF-1 α in skeletal development. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1192, p. 322-326, 2010.

ZENG, H.L.; ZHONG, QI.; QIN, Y.L.; BU, Q. Q.; HAN, X.A.; JIA, H. T.; LIU, H. W. Hypoxia-mimetic agents inhibit proliferation and alter the morphology of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. **BMC Cell Biology.** p. 12-32, 2011.

ZIPORI, D.; FISCHER, M. P.; LEVIN, S. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. **Stem Cell Rev and Rep.** v. 7, p.560-568, 2011.

LEGENDAS DAS FIGURAS:

Figura 1- Ensaio de CFU-F. (A) Representação macroscópica das Unidades Formadoras de Colônia-Fibroblastóides após 14 dias de cultivo. (B) Valores correspondentes às médias das replicatas de cada amostra agrupadas conforme os genótipos. Dados obtidos após análise das replicatas (Média \pm DP) de vinte e oito experimentos independentes. (Test T-student e pós-teste Mann Whitney com nível de significância de 5%). (C) Gráfico comparativo entre o número de unidades formadoras de colônias-fibroblastóides (Média \pm DP) em condições de normóxia e hipóxia temporária. **Dados obtidos a partir de onze experimentos independentes. (t-Teste e pós-teste de Wilcoxon $**p=0,0078$).**

Figura 2 – (A) Fotomicrografia representativa da cultura de CTMs HbA em pré-confluência. (B) Fotomicrografia da cultura de células-tronco mesenquimais, em alta confluência, proveniente de amostra de medula óssea de paciente falciforme (HbSS). (C) Análise ao microscópio ótico de cultura de CTMs HbA evidenciadas com May-Grünwald/ Cristal violeta para facilitar visualização morfológica (aumento de 20X).

Figura 3- Fotomicrografia representativa das culturas celulares após pré-condicionamento em hipóxia durante 48horas. (A) CTMs HbA. (B) CTMs HbSS. (C) CTMs HbSC (aumento de 20X).

Figura 4- Análise imunofenotípica para marcadores moleculares por citometria de fluxo. Os histogramas mostram a expressão das moléculas CD146, CD105, CD90 e CD29 (em roxo), comparado com as células não marcadas (auto-fluorescência) (em verde). (A) CTMS HbA #4 (B) CTMs HbSS #4. Experimento representativo de n=8.

Figura 5- Cultura de CTMs HbSS #2 tratadas com 7-AAD nas condições de normóxia (A) e após hipóxia temporária (B). M1: frequência percentual das células não marcadas (viáveis); M2: frequência percentual de células positivas para 7-AAD.

Figura 6- Curva de proliferação das CTMs isoladas da medula óssea de (A) paciente controle e (B) falciforme (HbSC) nas duas condições de incubação ao longo de 7 dias totais. Experimentos representativos (n=8). Dados apresentados como média \pm DP.

Figura 7- Perfil proliferativo das CTMs de pacientes controle e falciformes sob duas condições de incubação (normóxia e após hipóxia temporária). (A) Contagem (triplicata) após 3 dias do plaqueamento inicial ($**p=0,0074$). (B) Contagem (triplicata) após 7 dias do plaqueamento inicial ($**p=0,0012$). Dados apresentados como média \pm desvio padrão, $p < 0,05$ (teste T-student pareado).

Figura 8- Fotomicrografia representativa do ensaio de diferenciação adipogênica das culturas de CTMs. (A) CTMs HbA e (D) CTMs HbSS cultivadas em meio basal. (B) e (C) CTMs HbA cultivadas em meio adipogênico e coradas em Oil Red, evidenciando gotículas lipídicas refringentes (em laranja), objetiva de 10 e 20x respectivamente. (E) e (F) Indução em meio adipogênico das CTMs HbSS, aumento de 20x.

Figura 9- Registro fotográfico representativo do ensaio de diferenciação osteogênica das culturas de CTMs HbA (A/B) e HbSS (C/D). Coloração em Alizarina Red S, evidenciando os depósitos de cálcio na matriz óssea. Aumento de 20x.

Figura 10- Registro fotográfico representativo do ensaio de CFU-O. Colônias em normóxia (A) e após pré-condicionamento em hipóxia (B) coradas em Alizarina Red S e contra-coradas com corante histológico cristal violeta (C e D).

Figura 11- Marcação para Osteocalcina humana intracelular. (A) Cultura de **CTMs HbSS #2** ósteo-induzidas durante 7 dias em **normóxia** (em roxo) e condição controle (verde). (B) Cultura de **CTMs HbSS #2** ósteo-induzidas durante 7 dias pré-condicionadas em **hipóxia** (em roxo) e condição controle (verde). Resultados não demonstram deslocamento considerável após 7 dias de indução. Experimento representativo (n=5).

Figura 4:

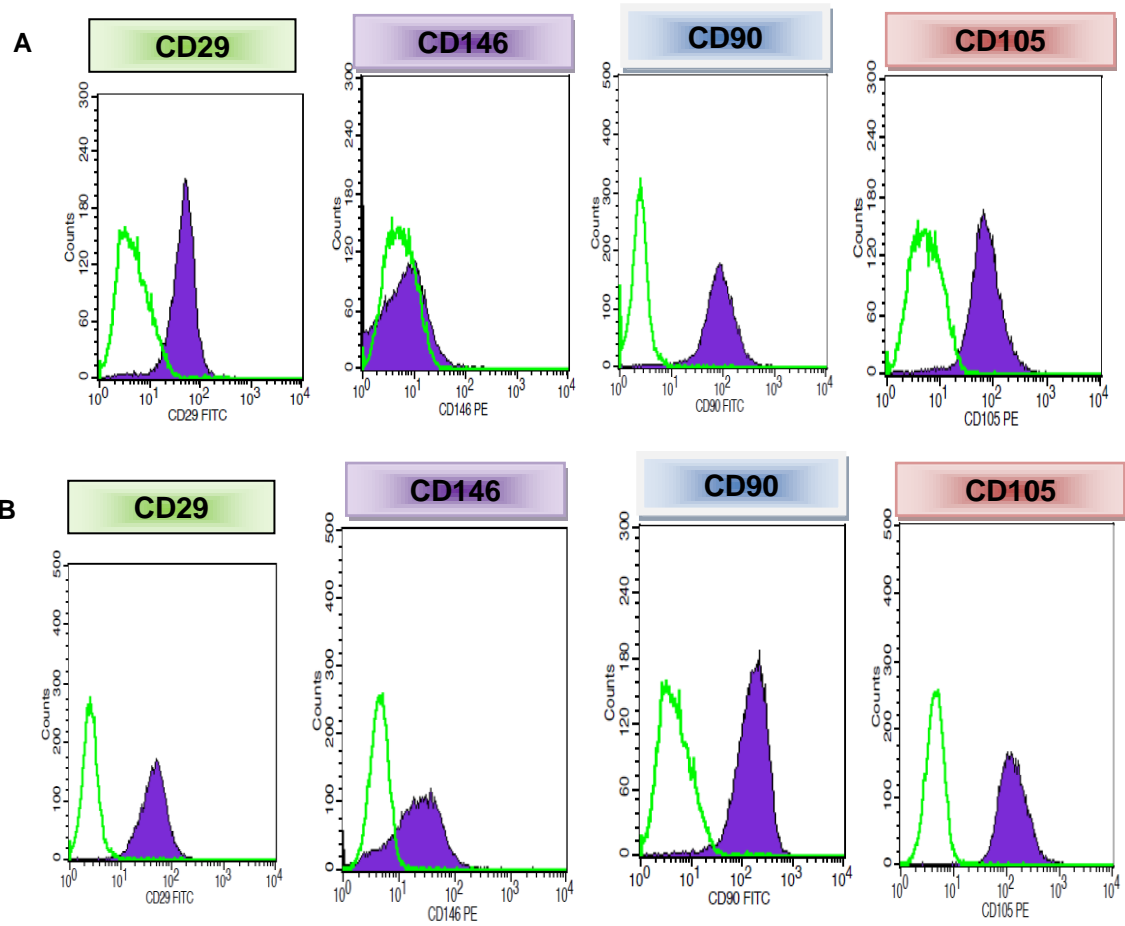
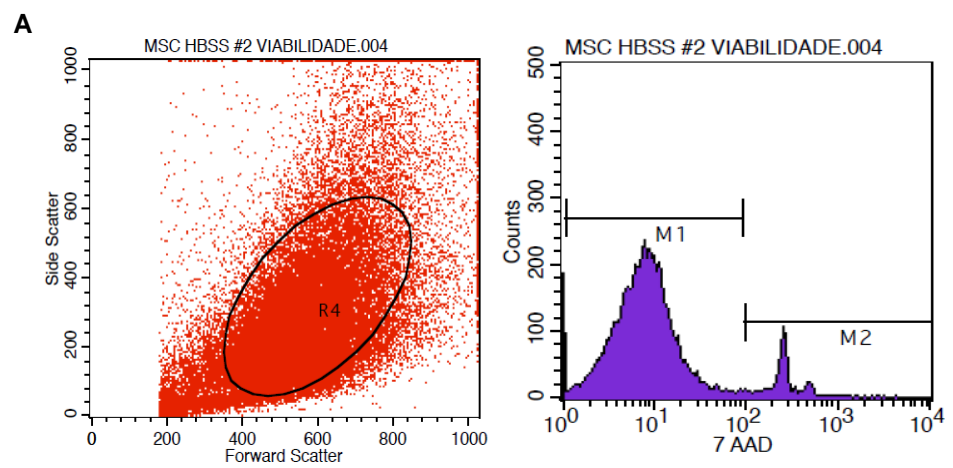


Figura 5



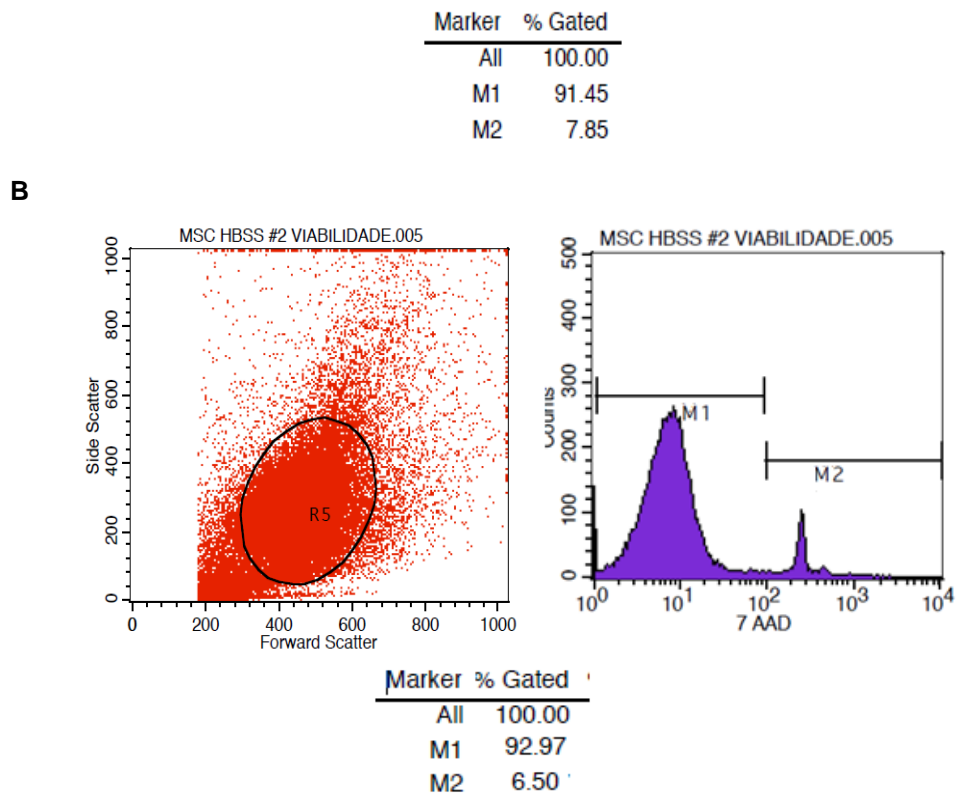
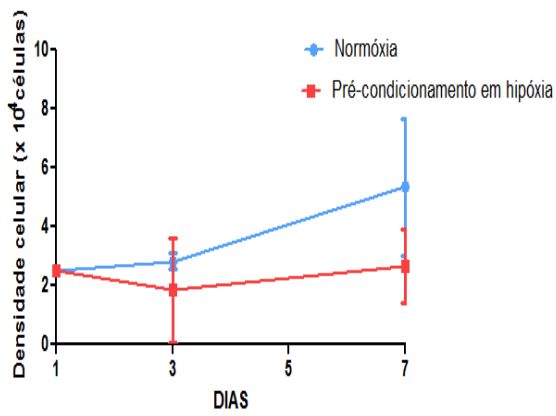


Figura 6:

A Curva de Proliferação- MSC HbA



B Curva de Proliferação- MSC HbSC

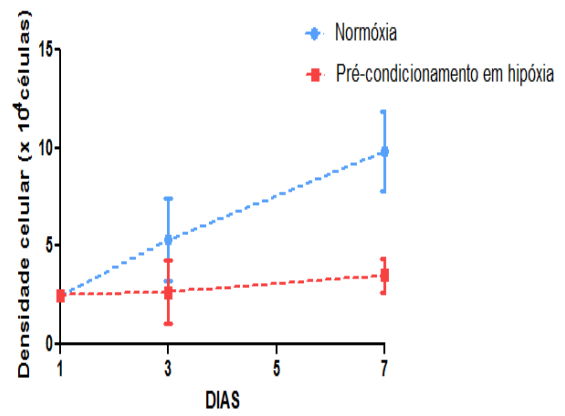


Figura 7:

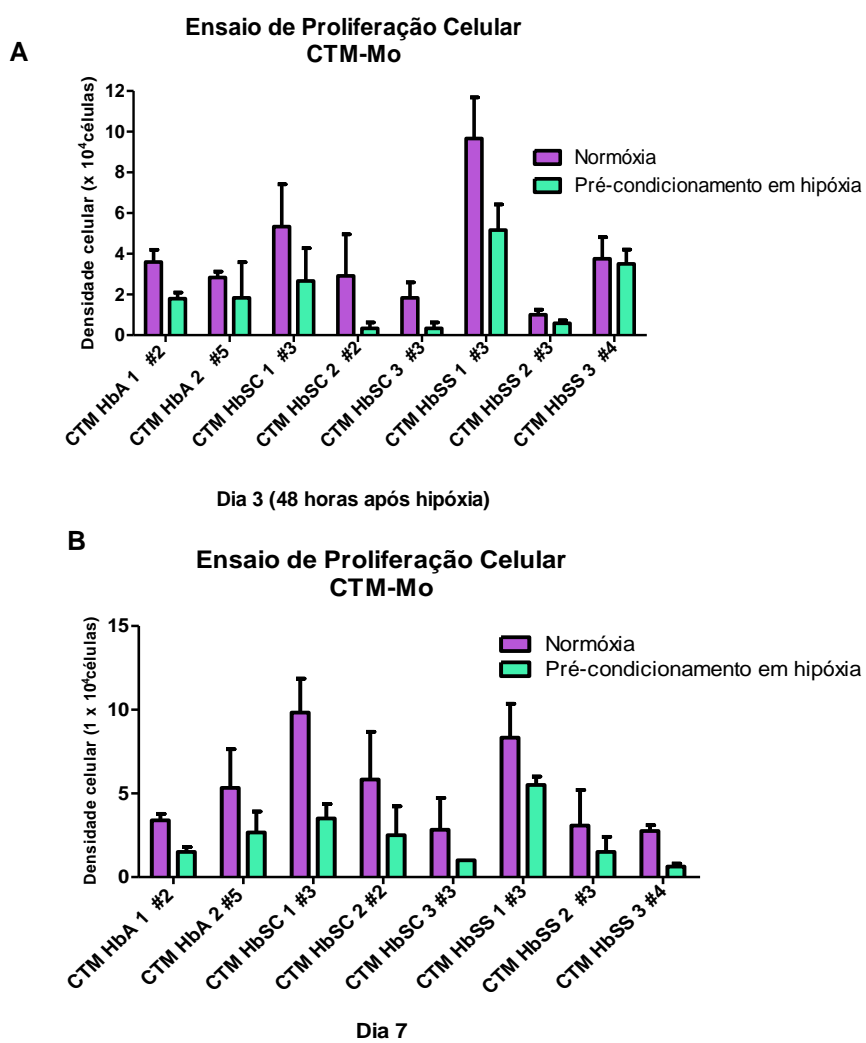


Figura 8:

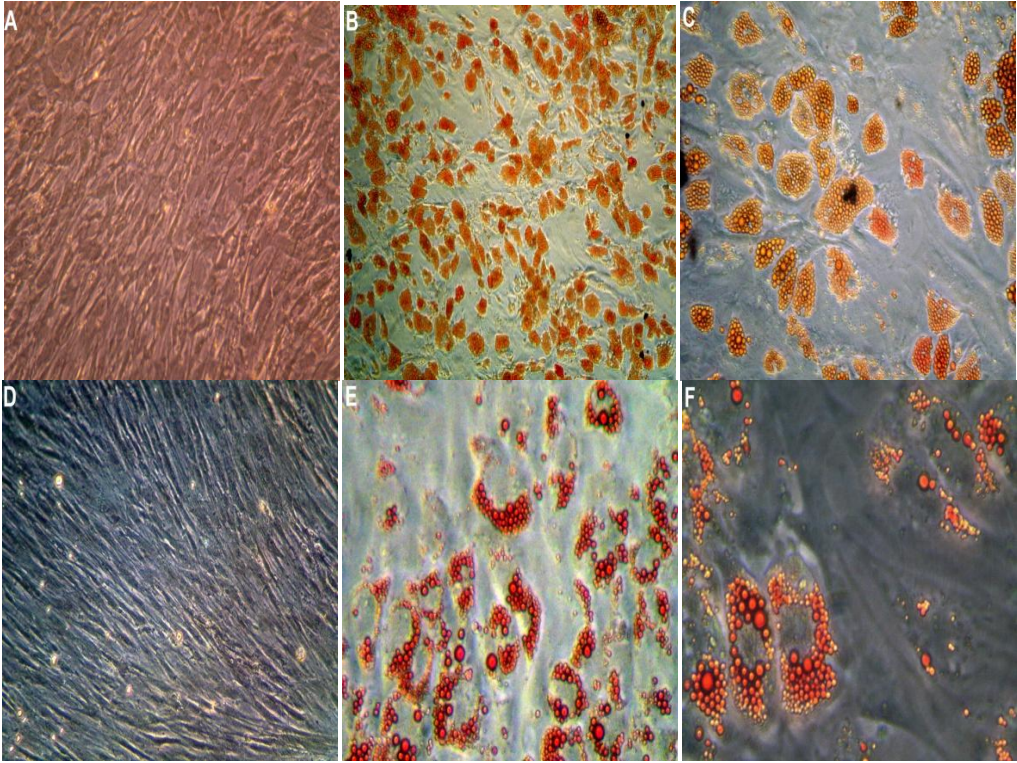


Figura 9:

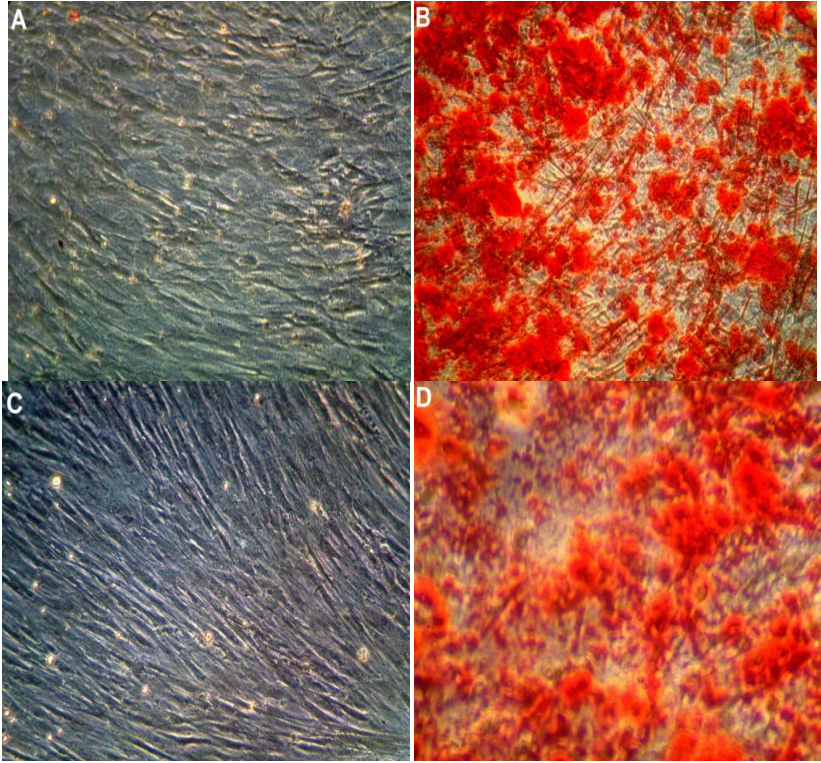


Figura 10:

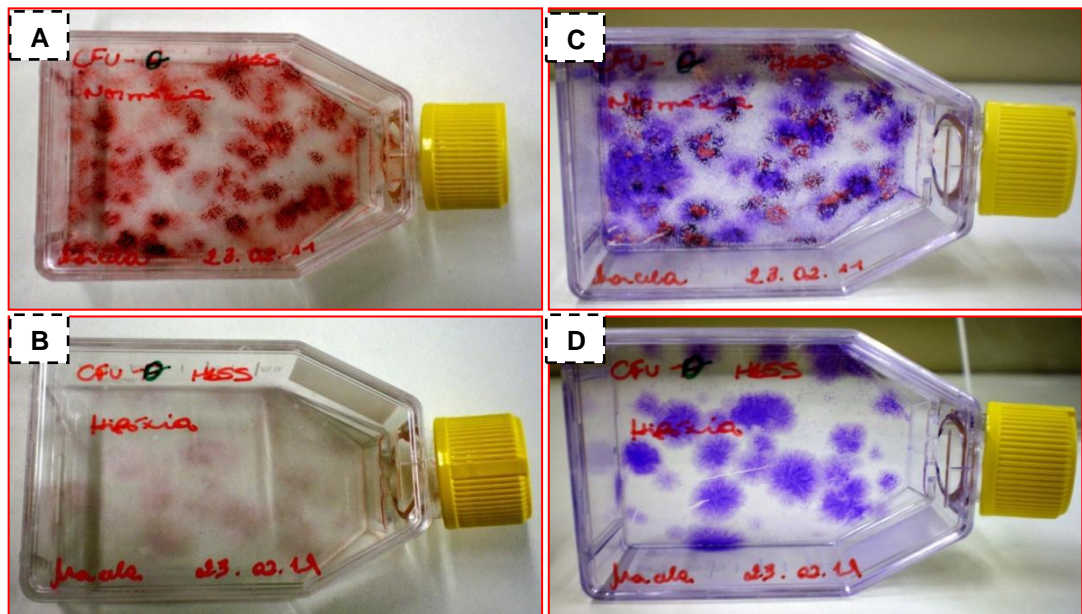


Figura 11:

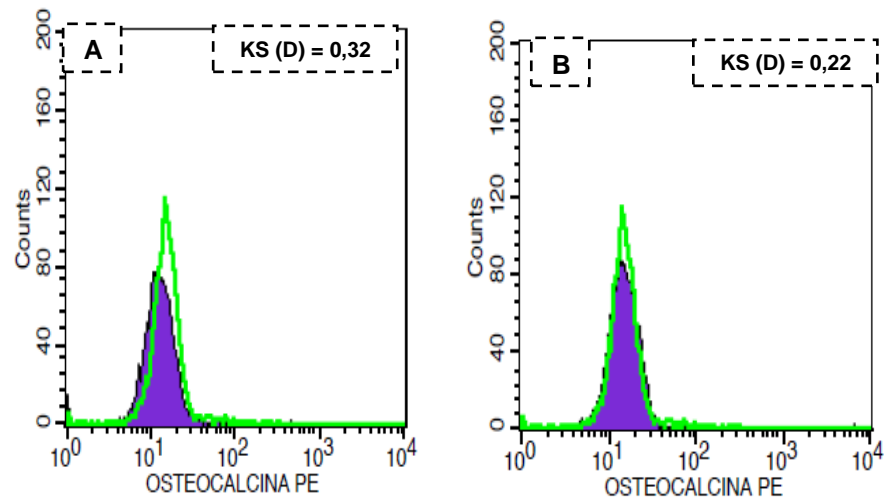


Figura 11:

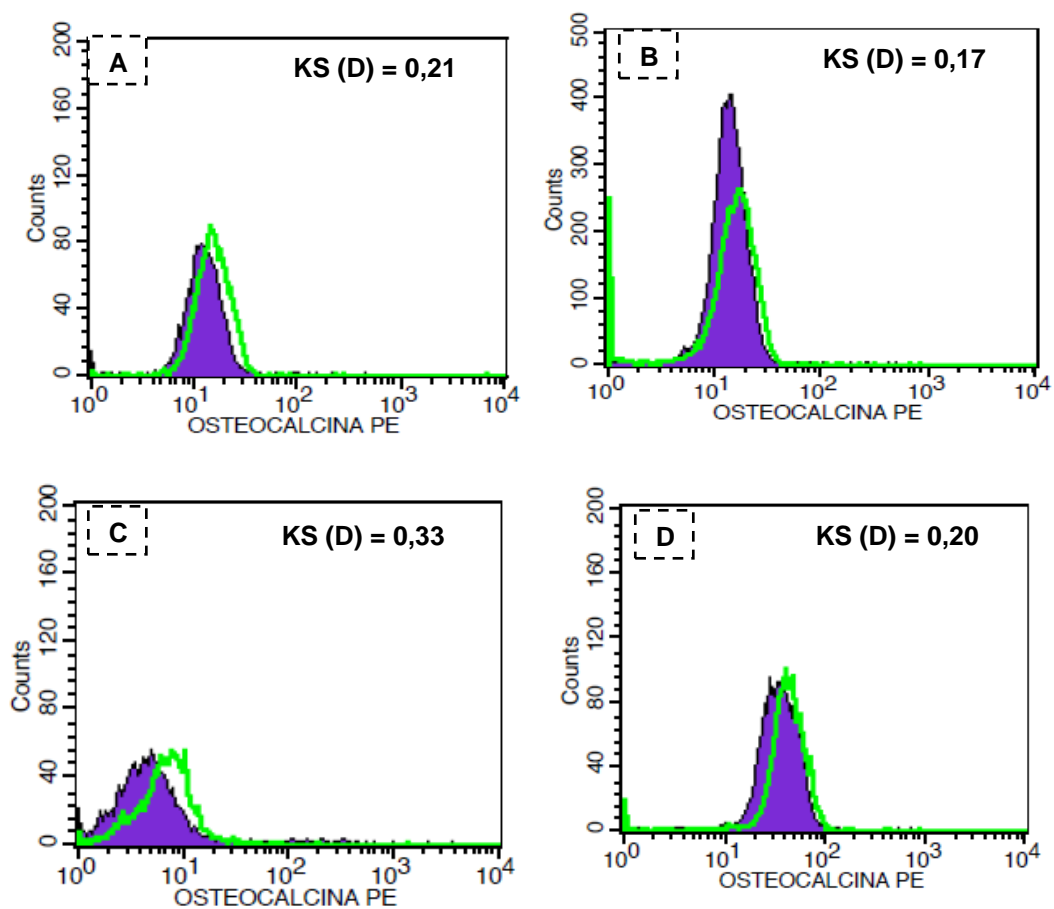
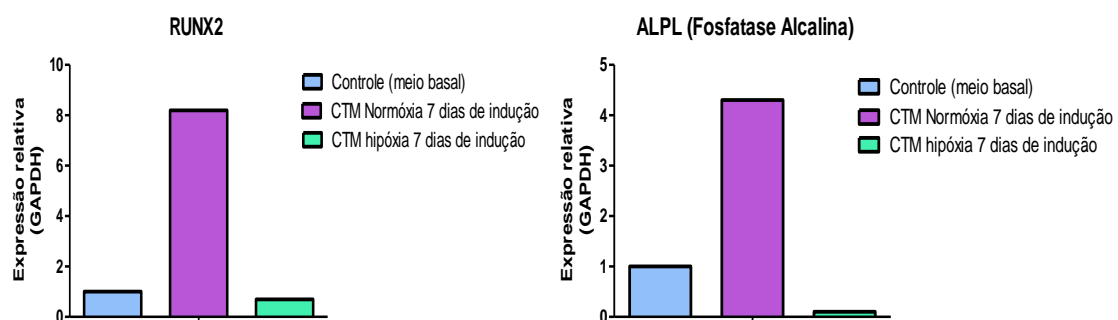
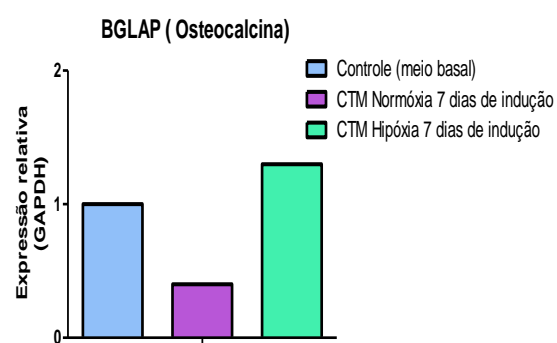
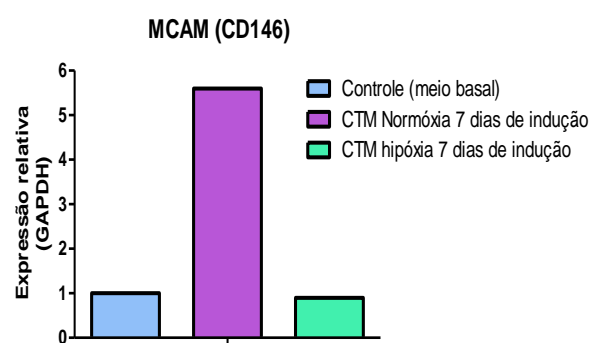
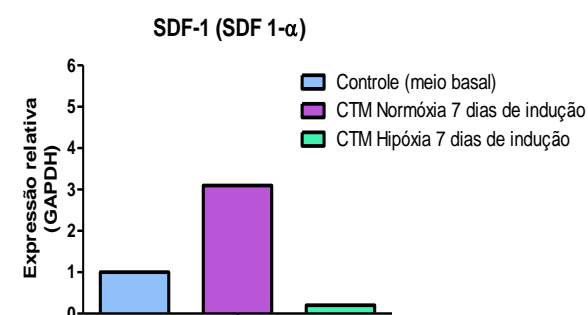
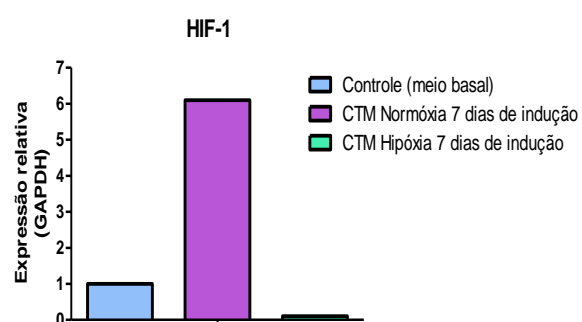
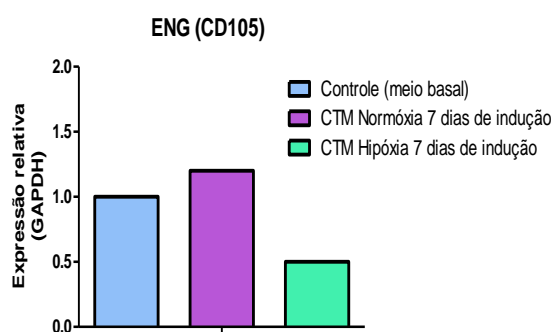
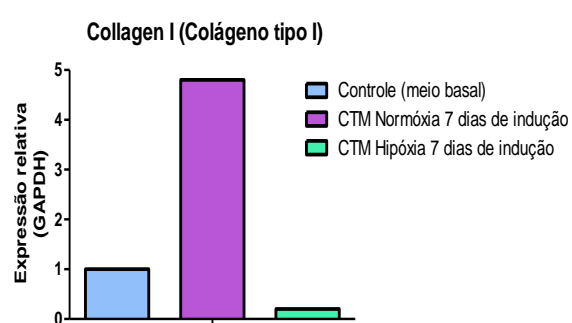


Figura 12:





8. ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação e caracterização de células-tronco mesenquimais (CTMs) na fração de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) de pacientes falciformes.

Procedimento: Coleta de aspirado/biópsia de medula óssea

DADOS DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Paciente: _____

2. Nº Identidade: _____ **3. Sexo:** () M () F

4. Data de Nascimento: _____

5. Endereço: _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **Estado:** _____

CEP: _____ **Telefone:** _____

6. Responsável Legal: _____

7. Natureza (Grau De Parentesco, tutor, curador): _____

8. Nº Identidade: _____ **9. Sexo:** () M () F

10. Data de Nascimento: _____

11. Endereço: _____

Bairro: _____ **Cidade:** _____ **Estado:** _____ **CEP:** _____

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Nós estamos lhe convidando para participar de um estudo de pesquisa. O propósito deste formulário de consentimento é dar-lhe as informações que você ira precisar para ajudá-lo a decidir se vai participar do estudo ou não. Por favor, leia o formulário cuidadosamente. Você pode fazer perguntas sobre o propósito da pesquisa, os possíveis riscos e benefícios, seus direitos como um voluntário, e qualquer outra dúvida sobre a pesquisa caso este formulário não esteja claro. Quando nós tivermos respondido todas as suas perguntas, você pode decidir se irá participar do estudo ou não. Nós lhe damos uma cópia deste formulário para seus registros.

PROPÓSITO E BENEFÍCIOS

Você está sendo convidado como voluntário a participar desta pesquisa realizada pela Universidade Federal da Bahia porque você passará por um procedimento cirúrgico ortopédico. Este é um dos estudos para avaliar nova terapia que poderá ser empregada no tratamento da osteonecrose. O estudo poderá ser benéfico a você se nós descobirmos novas formas de acelerar a cicatrização e reparo do tecido ósseo .

OBJETIVO: O objetivo deste estudo será avaliar o potencial das células-tronco para aplicação na regeneração óssea nos pacientes portadores de osteonecrose, no estado da Bahia

PROCEDIMENTO: Se você concordar em participar, nós pediremos sua permissão para coletar 3mL do aspirado medular (volume de uma colher de chá), que já será retirado durante o procedimento de diagnóstico que você será submetido. Você pode ajudar a pesquisa de células-tronco doando este material. A doação é um ato simples e livre, sem prejuízo para seu atendimento médico, e para isso basta que você expresse sua vontade através da assinatura desse termo de consentimento. Esse procedimento não implicará em nenhuma despesa adicional para você ou sua família e nem o material colhido será utilizado para fins lucrativos. De acordo com nossa legislação, é proibida qualquer forma de remuneração ou recompensa pela doação de material biológico. Os pesquisadores poderão entrar em contato com você ou seu médico de acompanhamento para atualizar as informações da história médica.

INTERRUPÇÃO DO ESTUDO: Você é livre para se recusar a participar ou retirar seu termo de doação a qualquer momento ou por decisão da equipe médico-científica. Você também poderá anular este consentimento, mesmo após tê-lo assinado, até o momento de sua cirurgia.

CUSTO DO PROCEDIMENTO: Nem você ou sua companhia de seguros serão onerados pelos procedimentos necessários para a coleta, análise, procedimentos e armazenamento do material biológico.

SIGILO: Seu médico irá tratar da sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu prontuário vai permanecer confidencial. Apenas a equipe do Estudo e a equipe assistencial terão acesso a ele. Possível publicação científica resultante desse estudo não te identificará, em nenhuma circunstância, como participante. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no seu prontuário médico e uma será fornecida a você.

INDENIZAÇÃO: Ao assinar este termo, você não abre mão de nenhum direito legal que você eventualmente teria em caso de conduta errônea ou negligente de qualquer membro da equipe multiprofissional de saúde que lhe dará assistência durante o estudo.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

Você não será pago por sua participação, nem será cobrado nenhuma taxa extra como resultado da participação neste estudo. Sua participação é completamente voluntária, você pode recusar a participar ou pode sair do estudo a qualquer hora e pedir que todas as amostras sejam destruídas. Para fazer isso você irá entrar em contato com um dos investigadores. A recusa ou retirada não levará a nenhuma penalização ou perda de seus benefícios. Sua identidade como doador de medula óssea irá permanecer confidencial. As amostras serão codificadas e não identificadas pelo nome do sujeito.

DECLARAÇÃO DO PACIENTE:

Eu, _____ tive tempo para ler e pensar sobre as informações contidas neste formulário antes de conceder a doação para o estudo.

Participarei doando espontaneamente o aspirado de medula óssea após o procedimento de diagnóstico hematológico. Fui devidamente informado dos objetivos da doação e estou ciente que esta coleta busca oferecer um material para o estudo de células tronco presentes na medula óssea. Recebi esclarecimento sobre o anonimato desta doação e estou ciente que, mesmo tendo concordado em doar, o aspirado medular só será coletado se o procedimento de diagnóstico transcorrer sem intercorrências.

Declaro que estou ciente de que uma vez feita a doação, o material colhido não poderá ser reivindicado futuramente para meu próprio uso ou de algum membro da minha família. Entendo também que posso anular este consentimento a qualquer momento antes da minha cirurgia. Em caso de dúvidas poderei chamar a pesquisadora Marcela Salles nos telefones: (71) 3283-8943/ 8854-1854 ou ainda poderei procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, situado à Rua Augusto Viana, s/nº, – Canela Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar, Salvador- BA.

Dr: _____ **Telefone:** _____

Assinatura do Paciente: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Assinatura do Médico: _____

PRONTUÁRIO DE PESQUISA

Avaliação e caracterização de células-tronco mesenquimais (CTMs) na fração de células mononucleares de medula óssea (CMMOs) de pacientes falciformes.

1. Nome do Paciente: _____
 2. Documento de Identidade: _____
 3. Sexo: (M) (F) Data Nascimento: _____
 4. Profissão: _____
 5. Endereço: _____ Cidade: _____
Estado: ___ CEP: _____ Telefone: _____
-
01. Data do diagnóstico de anemia falciforme _____
 02. Já esteve internado? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes? _____
 03. Já teve pneumonia? () SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes? _____
 04. Já teve crise de seqüestro esplênico? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes? _____
 05. Já teve AVC? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes? _____
 06. Eplenectomizado? ()SIM () NÃO
 07. Você tem asma? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas crises nos últimos 6 meses? _____
 08. Tem crise de dor? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes? _____ Quando foi a última? _____
 09. Faz uso de alguma medicação? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, qual/ freqüência? _____
 10. Fez uso de profilaxia antibiótica? ()SIM () NÃO
 11. Completou o calendário vacinal? ()SIM () NÃO
 12. Faz uso de terapia transfusional? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, quantas vezes ao ano? _____
 13. Possui outra patologia? ()SIM () NÃO
Em caso de SIM, qual? _____
 14. Tem outros familiares com anemia falciforme?()SIM () NÃO Quem?
(grau de parentesco)
 15. Você trabalha? ()SIM () NÃO

Em caso de SIM, trabalha com algum tipo de substância química? Qual?

16. Você manipula diretamente esta substância? ()SIM () NÃO

Com que freqüência?

17. Faz uso de bebida alcoólica? ()SIM () NÃO

Em caso de SIM, com que freqüência?

18. Você fuma? ()SIM () NÃO

Em caso de SIM, com que freqüência?

19. Faz uso de outro tipo de droga?

Em caso de SIM, com que freqüência?

20. Data da próxima consulta no HUPES?

21. Exames recentes:

Data:

Hb	BT
LDH	Reticulócitos
Eletroforese de Hb	Glicose
Ht	BD
Leuco	BI
Plaq	VCM
Ferritina	RDW

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Médico: _____

Local e Data: _____