

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL

Jessica Michelle de Novais

**ESFERÓIDES DE FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL DERIVADA DO
TECIDO ADIPOSE HUMANO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS:
PROVA DE CONCEITO**

ARARAQUARA

2023

Jessica Michelle de Novais

**ESFERÓIDES DE FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL DERIVADA DO TECIDO
ADIPOSO HUMANO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS: PROVA
DE CONCEITO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Prof. Dr. André Capaldo Amaral

Orientador

Araraquara - SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

N821e Novais, Jéssica Michelle

Esferóides de fração vascular estromal derivada do tecido adiposo humano no tratamento de feridas cutâneas: prova de conceito/Jéssica Michelle Novais. - Universidade de Araraquara, 2023.
96f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientador: Prof. Dr. André Capaldo Amaral

1. Fração vascular estromal. 2. Lesões cutâneas. 3. Reparo epitelial. 4. Esferóide multicelular. 5. Cultivo 3D. 6. Medicina regenerativa.
I. Título.

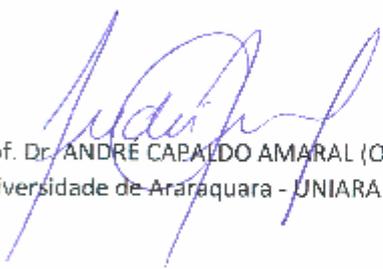
CDU 577.4

JESSICA MICHELLE DE NOVAIS

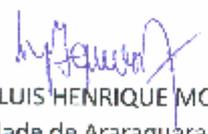
Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 27 de fevereiro de 2023

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. ANDRÉ CAPALDO AMARAL (Orientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE MONTREZOR
Universidade de Araraquara - UNIARA



Dr^a. JULIANA KELMY MACÁRIO BARBOZA DAGUANO
Pesquisadora junto ao Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer/CTI/Campinas

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a DEUS, que me deu luz, força e sabedoria para escrever essa pesquisa.

À minha mãe Sandra Mariê Tahara de Novais, que me apoia e inspira diariamente pela coragem, simplicidade e amor incondicional, que com muito carinho me incentiva a ser uma pessoa melhor e fazer sempre o meu possível melhor constantemente. E aos meus avós Fuquico Matuhashi Tahara e Ernesto Tetuzi Tahara *in memoriam* que por toda a minha vida me ensinaram a ter integridade e um bom coração.

Ao meu pai Paulo Sergio de Novais, por todo apoio e suporte, que sempre me indica um caminho de justiça, me proporciona o sentimento de segurança e me ensina sempre a visualizar todas as possibilidades de uma situação em minha vida. E aos meus avós Maria da Silva Novais e Antônio Canterúcio de Novais, que não estão mais presentes encarnados nesta vida, mas que sempre estarão cuidando de mim aonde eu for, me apoiando em todos os meus sonhos e sucesso.

Ao meu irmão por ser sempre o meu protetor e a sua família linda. Aos meus sobrinhos Caique de Novais e Luiza de Novais que são a alegria da minha vida.

Amo muito todos vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. André Capaldo Amaral, minha imensa gratidão pela oportunidade em aprender com sua dedicação não apenas no cargo de coordenador e acadêmico, mas também pelas lições de vida, pela confiança, motivação e inspiração. Para sempre minha amizade, gratidão e admiração.

AGRADECIMENTOS

À minha amiga Carolina Santos, muito obrigada por ter aberto os horizontes da área acadêmica, por todo apoio científico e pela oportunidade de aprender muito sobre a terapia celular que agora faz parte da minha vida!

À Coordenação Prof. Dr. André Capaldo Amaral - Coordenador e ao Prof. Dr. Wilton Rogério Lustri - Vice coordenador e as Secretárias Sandra Pavanelli e Rosana Pazini da Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal. E também aos funcionários da Universidade de Araraquara – UNIARA, obrigada pela atenção, paciência e dedicação.

A todos os professores e professoras pela convivência e ensinamentos. Em especial a Prof^a. Eliane Trovatti, pelo suporte laboratorial e apoio no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao grupo de pesquisa QUIMMERA. Aos Laboratórios de Biomateriais e Biotecnologia, BioPoIMat, NITE, labCBQuim e em especial ao LECER, gratidão pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa nos laboratórios desta instituição e por todo o aprendizado científico.

Ao Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer (CTI – Renato Archer), representado pela Prof^a. Dr^a. Juliana Daguano e ao Dr. Gustavo Henrique de Magalhães, sou imensamente grata a vocês e por todo apoio e contribuição nesta pesquisa.

A Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), representada pela Prof^a. Dr^a. Fernanda Anibal e as doutoras Fernanda Duarte, Bruna Fragelli e Krissia Godoy, muito obrigada pela oportunidade e contribuição nesta pesquisa.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Araraquara – UNESP, pela disponibilidade de alguns materiais.

Às queridas Renata Aquino de Carvalho, Vitória Medalha, Marina Lima Fontes e a Rafaela Baldassari que muito me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho, em etapas diferentes, e que também se tornaram minhas amigas!

À minha amiga Bruna Somílio da Fonseca que é e sempre será a minha dupla do mestrado pra vida. Aos meus amigos Mackson Ferraresi, Luiz

Henrique Maurício, Jonas Elias Frei e César Garcia que compartilharam grandes emoções dentro e fora do mestrado, da amizade para irmandade. Ao Raphael Rattes que muitas vezes me socorreu e acolheu aqui em Araraquara.

E a todos os meus colegas de Turma: Roberta Godoy, Wesley Ribeiro, Matheus Celestino, muito obrigada pela amizade, pelo convívio, pela comunhão, risadas, aprendizado e por tudo.

Aos meus colegas de pós-graduação: Bruna Dorm, José Alberto Paris, Benedito Domingos Neto, Rauany Lopes, Lucas Silva, Fernando Macedo, Jessica Fodra e Tatiana Araujo.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo para realização deste trabalho.

À minha Banca Examinadora (Prof^a. Dr^a. Juliana Daguano, Prof. Dr. Luis Henrique Montrezor e Prof. Dr. Andre Capaldo Amaral), por toda a contribuição em meu desenvolvimento acadêmico.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão dessa pesquisa.

Gratidão, de todo o meu coração!!

*Eu não sou o que me aconteceu.
Eu sou o que eu escolho me tornar.*
(Carl Jung)

*Você não pode provar uma definição.
O que você pode fazer é mostrar que ela faz sentido.*
(Albert Einstein)

*Elogie em público e corrija em particular.
Um sábio orienta sem ofender e ensina sem humilhar.*
(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

A ferida profunda da pele representa uma condição clínica que determina a incapacidade de regeneração espontânea, determinando graves consequências físicas aos seus portadores. Atualmente, resultados promissores relacionados ao uso da fração vascular estromal (FVE) derivada do tecido adiposo sobre o reparo de feridas vêm sendo evidenciados. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar os mecanismos modulatórios envolvidos no processo. Esta pesquisa teve como objetivo estabelecer uma prova de conceito a respeito da influência modulatória da FVE derivada do tecido adiposo humano, cultivada como esferóides multicelulares (EM), sobre o modelo *in vitro* para cicatrização de feridas. Para tal, uma amostra de tecido adiposo de uma voluntária foi extraída por lipoaspiração e processada para obtenção da FVE. O contingente celular foi semeado em contramoldes contendo micropoços para a constituição dos esferóides celulares. Posteriormente, foi realizada a avaliação dos efeitos modulatório e imuno-modulação da FVE, através da dosagem de fatores de crescimento e do ensaio de migração celular. A análise estatística dos resultados utilizou os procedimentos de estatística qualitativa descritiva e o teste de análise ANOVA, com significância estatística adotada de 5% ($p \leq 0,05$). Os resultados apresentaram a formação dos EM pela FVE com o método de cultura em superfície não aderente, evidenciaram positivamente o conceito inicial deste estudo e a capacidade de povoamento e desagregação celular dos EM em modelo *in vitro*, identificando o perfil indicativo de viabilidade celular. Concluiu-se, a capacidade da FVE derivada do tecido subcutâneo humano em constituir os EM influenciaram positivamente nos efeitos modulatórios do microambiente, através das citocinas e fatores de crescimento presentes no meio condicionado secretados durante a cultura 3D.

Palavras-chave: Fração Vascular Estromal; Lesões cutâneas; Reparo epitelial; Esferóide Multicelular; Cultivo 3D; Medicina Regenerativa.

Área de conhecimento do CNPq: 3.13.00.00-6 Engenharia Biomédica

ABSTRACT

Extensive tissue or organ injuries represent conditions capable of exceeding the intrinsic repair potential and determining undesirable physical, social, and economic consequences. To improve this potential, regenerative medicine advances as an applied science. One recent and promising strategy foresees using the stromal vascular fraction (SVF). On the other hand, few studies characterize application parameters, mechanisms of action, and therapeutic efficacy. This research aimed to establish a proof of concept regarding the constitution of multicellular spheroids (MS) from SVF derived from adipose tissue (AT) and to establish its regenerative and modulatory potential *in vitro*. For this purpose, a 50 mL sample of fat from a volunteer was extracted by liposuction and processed to obtain the SVF. The cell contingent was used for the constitution of MS by the non-adherent surface method. After five days of cultivation, the MS was transferred, cultured in plates, and submitted to morphological characterization by light, fluorescence, and scanning electron microscopy. The modulatory and regenerative potentials were established through the measurement (ELISA) of Interleukin (IL-6) and Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) in the MS culture medium, the morphological characterization of its integration after the transfer (settlement potential) and the wound healing assay. The results of this analysis were submitted to statistical procedures (ANOVA). The morphological results validated the concept of obtaining MS and demonstrated its adhesion, disaggregation, and settlement potential. The presence of IL-6 and TGF- β 1, as well as the higher rate of groove closure compared to controls in the wound healing assays ($p \leq 0.05$), demonstrate the modulatory and reinforce the regenerative potential. The validation of the proof of concept and the demonstration of the biological potential allows for including this technique in the arsenal of procedures used by regenerative medicine.

Keywords: Stromal Vascular Fraction, Skin lesions, Epithelial repair, Multicellular Spheroid, 3D Cultivation, Regenerative Medicine

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura tridimensional da pele, evidenciando as três camadas do tecido epitelial: epiderme (camada superficial), derme (segunda camada), hipoderme (terceira camada) e seus anexos.

Figura 2: Esquema de retalho de tecido epitelial autólogo transplantado na área lesionada – Uma das técnicas denominadas como enxerto, é utilizada para tratamento de lesões cutâneas profundas.

Figura 3: Tripé da Medicina Regenerativa. – Apresentam-se os princípios da Medicina Regenerativa que são baseados no seguinte tripé: células, biomoléculas e suporte, estão interligados para promover a qualidade de vida aos indivíduos.

Figura 4: Categorização de Células-tronco. – CT embrionárias (blastocisto ou embrião) e CT Somáticas que são provenientes de tecidos maduros e tendem a diminuir com o efeito do processo de envelhecimento sobre o organismo.

Figura 5: Imagem ilustrativa de um esquema de esferóide e o seu processo de formação. a) Células semeadas em ambiente não aderente; b) Formação dos esferóides baseada no aglomerado celular por agrupamento; c) Padrão do processo de consolidação do esferóide (auto-organização); d) Esferóide multicelular com a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas.

Figura 6: Esquema representativo do preparo dos moldes de agarose. a) Contramolde de agarose 3D. b) Inserção da agarose líquida foi no interior do contramolde. c) Molde de agarose solidificado.

Figura 7: Fotografia do contramolde desacoplado (*); contramolde acoplado (**) e do molde de agarose pronto (***) contendo os micropoços de cultivo celular para formação dos EM.

Figura 8: Processo de digestão enzimática. a) Quantidade de gordura antes da divisão. b) Fracionamento da gordura, contendo 40 mL total da amostra com 20 mL de gordura após ser homogeneizado com 20 mL de colagenase tipo II. c) Amostras durante o período de digestão enzimática. d) Amostras após os 45 minutos de digestão enzimática. e) Um dos Tubos Falcons após a inativação enzimática com adição do meio de cultura após o processo de centrifugação.

Figura 9: Obtenção do pellet da FVE. a) Tubo Falcon após a inativação da digestão enzimática contendo a amostra com meio de cultura. b) Amostra com a Solução de Tampão de Cloreto de Amônio para lise de hemácias. c) Após o processo de centrifugação, evidenciando o pellet da FVE.

Figura 10: Esquema representativo das etapas de formação dos EM. As células foram semeadas nos moldes e acondicionadas em triplicata na placa de 12 poços para cultivo tridimensional. a) Suspensão da FVE (semeadura da suspensão celular). b) Células dentro dos micropoços do molde (interação célula-matriz extracelular). c) Esferóides formados dentro dos micropoços.

Figura 11: Ilustração do Método Wound Healing – Ensaio de ranhura, simulando in vitro uma ferida cutânea e analisa a migração celular promovendo o reparo da lesão no período de 24 horas. a) Imagem ilustrativa da monocamada de células em confluência do poço antes da ranhura. b) Imagem ilustrativa do poço logo após a realização da ranhura no tempo de 0 hora. c) Imagem ilustrativa do poço após a ranhura no tempo de 24 horas, as setas apontam o fechamento da simulação do leito da ferida.

Figura 12: Micrografias da caracterização do perfil mesenquimal das CT da FVE. a) As setas indicam as gotículas de gordura, característica da diferenciação adipogênica e b) Os nódulos de mineralização da matriz são apresentados pelas setas, característica da diferenciação osteogênica. Objetivas de 40x.

Figura 13: Micrografias da sequência temporal do processo de constituição e compactação dos EM. Objetiva de 4x. a) Dia 0 – Células suspensas no micropoço do molde de agarose. b) Dia 1 – Aglomeração celular. c) Dia 2 – Início do processo de compactação do EM. d) Dia 3 – Progressão do processo de compactação. e) Dia 4 – Perceptível um leve aumento do diâmetro. f) Dia 5 – Maturação e finalização da estrutura da agregação celular.

Figura 14: Sequência micrográfica dos EM em microscópio invertido pré-confocal em campo claro. a) As setas indicam a adesão do EM no substrato e o início do processo de desagregação nas primeiras 36 horas. b) Desalinhamento da margem dos EM indicado pela seta superior e as outras setas indicam mais migração das células no substrato após 48 horas. c) Depois de 72 horas, as setas indicam o povoamento das células, que se encontra mais amplificado – Objetiva 10x.

Figura 15: Micrografia em fluorescência com marcador DAPI na amostra de 72 horas após transferência. As setas indicam os núcleos das células, referente ao potencial de povoamento.

Figura 16: Micrografias obtidas no MEV na amostra de 36 horas após a transferência dos EM que apresentou a sua estrutura morfológica. a) Visão de perfil do EM. b) Visão súpero-inferior do EM.

Figura 17: Micrografias obtidas pelo MEV. a) Evidência da junção célula-célula (* = superfície do EM). b) Micrografia que apresenta a interação célula-matriz-extracelular. c) Micrografia que apresenta os prolongamentos celulares dos EM (** = camada superficial da placa de cultura).

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura – 36 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.

Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura – 48 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.

Figura 20: Micrografia obtida do MEV na amostra de 72 horas após transferência na placa de cultura apresentou a sua estrutura morfológica na visão súpero-inferior do EM.

Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura – 72 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.

Figura 22: Comparação do ensaio de migração celular após a criação da ranhura de 0 hora e 24 horas. a) e b) Grupo controle negativo. c) e d) Grupo controle positivo. e) e f) Grupo experimental.

Figura 23: Gráfico do ensaio de migração celular. (* = Diferença entre o GC- e o GC+ e ** = Diferença entre o GE e o GC+ e diferença entre o GE e o GC-, evidenciando que os resultados não são iguais entre os grupos).

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das feridas agudas segundo o agente causal.

Tabela 2: Classificação e exemplificação dos tipos de células e tecidos.

Tabela 3: Tipo e Função Celular.

Tabela 4: Apresentação dos dados comparativos dos períodos distintos obtidos pela reconstrução topográfica 3D.

Tabela 5: Dados dos resultados da dosagem de citocinas.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
CO ₂	Gás Carbônico
CPA	Células Progenitoras de Adipócitos
CT	Células-tronco
CTM	Células-tronco Mesenquimais
CTMA	Células-tronco Mesenquimais Adultas
CTMDTA	Células-tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EM	Esferóides Multicelulares
FVE	Fração Vascular Estromal
G	Giros
g	Gramma
IL	Interleucina
L	Litro
LECER	Laboratório de ensaios celulares e engenharia regenerativa
M	Mol
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MR	Medicina Regenerativa
nm	Nanômetro
KCL	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio Monobásico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio Dibásico Anidro
NaCl	Cloreto de Sódio
nm	nanômetro
PBS	Solução de Tampão de Fosfato Salino
pg	Picograma
pH	Potencial Hidrogeniônico
Rpm	Rotação por minuto
<i>Scaffolds</i>	Arcabouço
SFB	Soro Fetal Bovino
SVF	<i>Stromal Vascular Fraction</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i> (fator de crescimento transformante-β)
U/ml	Unidade por mililitros
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. Estrutura e Função da Pele	18
2.2. Reparo epitelial e as limitações do processo de reparo	20
2.3. Tratamentos e Consequências ao paciente e ao leito da ferida	22
2.4. Medicina Regenerativa	23
2.5. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos	25
2.6. O tecido adiposo como fonte da Fração Vascular Estromal	27
2.7. Fração Vascular Estromal (FVE)	28
2.8. Terapia Celular por CT	30
2.9. CTM extraídas da FVE	32
2.10. Esferóides Multicelulares (3D)	33
3. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. SUJEITO	38
4.2. ESFERÓIDES MULTICELULARES	38
4.2.1. Preparo dos contramoldes de agarose	38
4.2.2. Extração da FVE	40
4.2.3. Potencial de diferenciação em multi-linhagens das CTMDTA	42
4.2.4. Constituição dos EM	43
4.2.5. Caracterização dos potenciais regenerativos dos EM da FVE	44
4.2.5.1. Transferência dos EM	44
4.2.5.2. Caracterização Morfológica dos EM	44
4.2.6. Avaliação dos efeitos modulatório e imuno-modulação dos EM	46
4.2.6.1. Dosagem de citocinas IL-6 e TGF β 1	46
4.2.6.2. Ensaio de migração celular - Método <i>Wound Healing</i>	47
4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
5. RESULTADOS	50
5.1. Potencial de diferenciação em multi-linhagens das CTMDTA	50

5.2. Esferóides Multicelulares	50
5.2.1. Constituição dos EM	50
5.2.2. Caracterização dos potenciais regenerativos dos EM da FVE	51
5.2.3. Avaliação dos efeitos modulatórios e imuno-modulação dos EM	58
5.2.3.1. Dosagem das citocinas IL-6 e TGF- β 1	58
5.2.2.2. Ensaio de migração celular - Método <i>Wound Healing</i>	59
5.3. Análise Estatística	60
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. APÊNDICE	77
10. ANEXOS	89
10.1. Anexo I	89
10.2. Anexo II	92

1. INTRODUÇÃO

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e a sua principal função é defesa e proteção de todos os órgãos e tecidos internos (CHURCH *et al.*, 2006). A pele é constituída por três camadas, sendo a camada superficial denominada de epiderme, a intermediária denominada de derme e a profunda denominada de hipoderme/tecido subcutâneo (SHPICHKA *et al.*, 2019).

Um dano tecidual pode ser causado por agentes de natureza física, térmica ou química, gerando a exposição dos tecidos subjacentes, resultando em uma ferida (CHURCH *et al.*, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2016). A gravidade da lesão depende do comprometimento gerado no revestimento epitelial que pode ser classificado quanto à profundidade, local e extensão (COLTRO *et al.*, 2011). Nas lesões profundas ocorre a destruição de todas as camadas da pele com acometimento do tecido subcutâneo e de outros tecidos mais profundos como fáscias, músculos, tendões e osso (SINGER E CLARK, 1999).

Em contrapartida, o potencial de reparo intrínseco da pele nas feridas profundas é quase inexistente, incapaz de promover a regeneração total e espontânea dos tecidos (TREICHEL *et al.*, 2011; GONZALEZ *et al.*, 2016). E o tratamento para haver a restauração do tecido e minimizar as consequências limitantes de reparo é o enxerto (COLTRO *et al.*, 2011). O reparo por meio da cicatrização após o enxerto, geralmente não devolve a função normal do tecido. Há riscos de não integração do enxerto, desde a não cicatrização, rejeição do enxerto, sepse, presença de isquemia e necrose (DUARTE *et al.*, 2005; TREICHEL *et al.*, 2011).

Embora a medicina convencional, mesmo contendo diversas complicações, seja eficaz, a medicina regenerativa é uma alternativa para os distúrbios incuráveis, apresentando procedimentos terapêuticos inovadores no campo da terapia celular (MAO; MOONEY, 2015). A medicina regenerativa é uma ciência promissora, com ampla integração de conhecimentos por meio do tripé: célula, suporte e biomoléculas (HSU *et al.*, 2018). É uma área emergente que associa tecnologias avançadas e influencia positivamente no tratamento de doenças com o intuito de restaurar vários órgãos e tecidos, tais como: osso,

tendão e pele através da terapia celular (COLOMBO *et al.*, 2017; HSU *et al.*, 2020).

A terapia celular trouxe perspectivas positivas com o uso de células-tronco (CT), apresentando o isolamento de células, promovendo a sinalização autócrina e parácrina, no intuito de repovoar a região lesada (PITTENGER *et al.*, 1987). As células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTMDTA) ganham destaque sendo extraídas de um material de descarte biológico através de procedimentos minimamente invasivos (HYNDS; BONFANTI; JANES, 2018; SANANTA *et al.*, 2020b; MAQSOOD *et al.*, 2020). As CT se localizam em um microambiente dinâmico, denominado nicho de células e uma das estratégias atuais não é somente o uso de células isoladas e sim o uso das células que constituem o nicho delas (RASOULI *et al.*, 2021).

A fração vascular estromal (FVE) é um *pool* de células que inclui as CT, as células precursoras endoteliais, as células T reguladoras, os histiócitos, pericitos e os pré-adipócitos. A FVE tem efeito anti-apoptótico e imunomodulatório (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014; LAIDDING *et al.*, 2021). Esses efeitos modulatórios ocorrem devido à proliferação celular, a síntese de colágeno pela atividade dos fibroblastos e das interleucinas, à regulação positiva da expressão gênica e fatores de crescimento (NGUYEN *et al.*, 2016). A FVE tem demonstrado um grande potencial terapêutico com aplicações clínicas em disfunções relacionadas à diabetes, em regeneração nervosa e na regeneração de feridas de queimaduras (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014; GUO *et al.*, 2016; LAIDDING *et al.*, 2021).

Embora os recentes estudos sobre o uso da FVE demonstrem resultados clínicos promissores em lesões cutâneas, ainda não foi investigada a influência modulatória apresentada pela IL-6 e o TGF- β 1 resultantes da administração de FVE na cultura tridimensional na forma de esferóides multicelulares (EM).

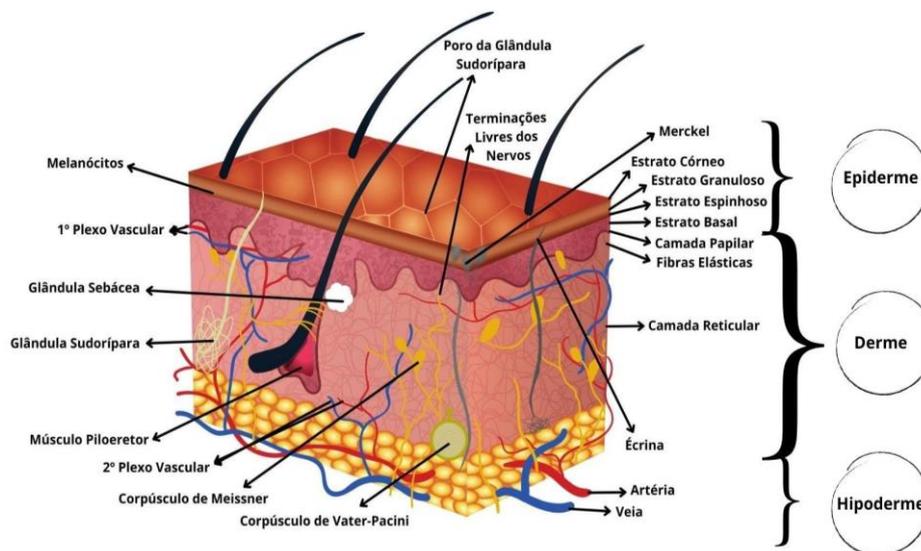
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estrutura e Função da Pele

A pele é uma estrutura primordial para o ser humano, sendo o maior órgão de todo o organismo e é o alvo precípua de fenômenos patológicos. A hidratação, início da síntese de vitamina D, excreção, regulação térmica e proteção contra fatores externos: físicos, químicos e biológicos são as principais funções do tecido epitelial (VATER *et al.*, 2022; TOTTOLI *et al.*, 2020).

O tegumento é uma estrutura anatômica complexa, é composto por três camadas, sendo elas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo ou hipoderme. É fundamental considerar os aspectos miméticos estruturais da pele, pois, a recapitulação de um modelo *in vitro* continua sendo desafiador nas tentativas de simular o sistema tegumentar com toda a sua característica anatômica (ROGER *et al.*, 2019) (Figura 1).

Figura 1: Estrutura tridimensional da pele, evidenciando as três camadas do tecido epitelial: epiderme (camada superficial), derme (segunda camada), hipoderme (terceira camada) e seus anexos.



Fonte: Própria autora.

Entretanto, a epiderme contém um epitélio estratificado queratinizado, é subdividida em quatro camadas, sendo elas: basal, espinhosa, granular e cornificada (TAVAKOLI; KLAR, 2020).

Roger e colaboradores (2019) relatam que a camada basal é composta pela membrana basal, encontrada na junção dermo-epidérmica (separa a derme da epiderme, facilitando a troca de substâncias e a polaridade dos queratinócitos basais). Na camada espinhosa, as células colunares ativas se proliferam e migram para a superfície até atingir a conexão intercelular e constituir a epiderme estratificada. Já na camada granular, os grânulos intracelulares de querato-hialina e corpos lamelares proporcionam a perda dos núcleos e organelas principais e forma o estrato córneo, sendo a camada mais externa da pele. O estrato córneo tem como função de barreira da pele contra danos externos (ROGER *et al.*, 2019; TAVAKOLI; KLAR, 2020).

A derme fornece o suporte crucial para a epiderme, é composta por vasos sanguíneos e linfáticos, apêndices como os folículos capilares, terminações nervosas e glândulas secretoras. As células encontradas nesta camada são: as células do sistema imune, os melanócitos e os fibroblastos, responsáveis pela produção de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno, a fibronectina e a elastina, que promovem a densidade e elasticidade, assim como, a força de tração cutânea permite que o tecido volte no seu aspecto original. Ademais, coordenam todo o processo de cicatrização de feridas em três estágios: inflamação, proliferação e remodelação. O colágeno tipo I, III, IV e as integrinas são componentes fundamentais da membrana basal, que também contribui para a integridade mecânica da pele (SHPICHKA *et al.*, 2019; TAVAKOLI; KLAR, 2020).

Abaixo da derme está conectada a hipoderme ou denominado também como tecido subcutâneo. É um tecido conjuntivo que contém fibroblastos, tecido adiposo (adipócitos), nervos, vasos linfáticos que formam uma rede micro vascularizada, e as artérias e veias que garante a oxigenação e nutrição. Além de ser um reservatório de energia, o tecido subcutâneo protege os tecidos internos e órgãos do frio e do trauma, servindo como um amortecedor contra choques e/ou impactos físicos. A hipoderme é formada por células adiposas estruturadas em lóbulos que constituem todo o tecido adiposo e essa estrutura fornece energia e participa na síntese hormonal, por exemplo: atua no estroma desde a fase inicial do desenvolvimento do ser vivo e na secreção de leptina (SHPICHKA *et al.*, 2019; PLEGUEZUELOS-BELTRÁN *et al.*, 2022).

2.2. Reparo epitelial e as limitações do processo de reparo

O reparo tecidual e os processos de regeneração ocorrem através de eventos sequenciais com liberação de mediadores moleculares e celulares logo após um dano tecidual e tem como intuito promover a restauração do tecido lesado (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Após uma lesão, se iniciam os processos para restaurar a integridade da área lesionada que contêm quatro distintas fases, sendo elas: a fase de hemostasia (coagulação), fase inflamatória (infiltração de células mononucleares), a fase de proliferação ou fibroproliferativa que consiste na epitelização, fibroplasia e angiogênese (síntese de uma nova rede vascular), e a fase de maturação (depósito de colágeno) que promove a remodelação e formação do tecido cicatricial (VATER *et al.*, 2022; SHPICHKA *et al.*, 2019).

Na fase de hemostasia, os componentes do sangue, tais como os macrófagos, neutrófilos e as plaquetas, começam a migrar para o local da ferida. As plaquetas sinalizam e estimulam o colágeno, resultando em sua ativação e agregação. Contudo, a trombina produz e catalisa o começo da cascata de coagulação, que sintetiza e ativa a fibrina, formando uma malha que estanca o sangramento. Ademais, as plaquetas também promovem o recrutamento de leucócitos, iniciando o progresso da inflamação (VATER *et al.*, 2022).

Na fase inflamatória, as células imunes (leucócitos, neutrófilos e macrófagos) estão presentes para fagocitar as bactérias, patógenos ou detritos celulares. As células inflamatórias, como as plaquetas, liberam diversos fatores de crescimento para combater os microrganismos no sítio da lesão, auxiliam na migração dos fibroblastos para o local da ferida e ativa a angiogênese que dá continuidade ao processo (TAVAKOLI; KLAR, 2020).

Na fase de proliferação, os fibroblastos reconstituem o tecido de granulação, amplifica a angiogênese (suporte de oxigênio e nutrientes para as células), deposita proteínas da matriz extracelular e modula o processo de epitelização, onde as células epiteliais se deslocam para as bordas da lesão para cobrir o dano (SHPICHKA *et al.*, 2019; TAVAKOLI; KLAR, 2020).

Em seguida, inicia a fase de maturação da ferida onde ocorre a remodelação com a degradação do excesso das fibras colágenas na derme, atingindo o pico de contração mecânica máxima formando as linhas de Langer. O resultado é de uma cicatriz com até 80% de resistência comparada à pele original (HSU *et al.*, 2018; VATER *et al.*, 2022).

A ferida é considerada complexa e de difícil resolução nas seguintes situações: lesões cutâneas extensas, sepse, comprometimento dos tecidos com inviabilidade (presença de isquemia e/ou necrose, tais como diabetes e patologias vasculares), impedindo os processos normais de cicatrização (TOTTOLI *et al.*, 2020).

Tavakoli & Klar (2020), propuseram alguns critérios para categorizar as feridas, baseados no processo de reparo e divididos em duas partes: a primeira parte em feridas agudas e a segunda parte em feridas crônicas.

A primeira parte é classificada como feridas agudas consegue cicatrizar completamente o leito da lesão, são classificadas como mecânica, química, elétrica, radioativa e por altas temperaturas, pode haver mínimas cicatrizes no período de 8 a 12 semanas, exemplificado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação das feridas agudas segundo o agente causal.

Classificação das Feridas Agudas	Exemplo
Mecânica	É causado pelo atrito da pele, através do contato friccional em superfícies rígidas e materiais perfuro-cortantes (facas, penetração de projéteis de arma de fogo e incisões cirúrgicas).
Química	Quando o indivíduo fica exposto a substâncias químicas corrosivas.
Elétrica	Ocorre com o contato direto com a corrente elétrica, logo após a lesão pode se manifestar em qualquer parte do corpo.
Radiação	Ocorre a lesão quando o indivíduo fica exposto a radiação de alta potência ou por longo período.
Altas Temperaturas	É causada quando o indivíduo se expõe a altas temperaturas.

Fonte: Dados coletados em TAVAKOLI & KLAR (2020)

A segunda parte é classificada como feridas crônicas são lesões com a cicatrização retardada de 12 semanas, após o início da lesão. Essas feridas são causadas principalmente por repetidos insultos teciduais ou condições fisiológicas subjacentes, tais como: infecções, tratamento primário inadequado e outros fatores de malignidades relacionados ao paciente que prejudica a inervação e a migração celular (TAVAKOLI; KLAR, 2020; TOTTOLI *et al.*, 2020).

2.3. Tratamentos e consequências ao paciente e ao leito da ferida

Ao longo dos tempos, as feridas, pela sua grande prevalência nos hospitais e nos ambulatorios em geral, são consideradas um grave problema de saúde pública, apresentando dificuldades em relação ao tratamento de seus danos (COLTRO *et al.*, 2011).

A excisão precoce tangencial ou total de feridas extensas e profundas com fechamento imediato por transplante de pele autólogo é o padrão principal, sendo utilizadas para diminuir a mortalidade, morbidade, complicações e reduzir o tempo de todo o tratamento e internação (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

Consequentemente, a necessidade de intervenções com tratamentos inovadores para as doenças cutâneas, requer uma urgência para promover o reparo, por exemplo, cirurgias com o uso de tecidos autólogos ou mesmo a substituição por alo-enxertos, precisa de mais aprimoramento para as lesões por queimaduras profundas e extensas, epidermólise bolhosa, câncer e entre outras doenças (NII; KATAYAMA, 2021; YAMADA; BEHFAR; TERZIC, 2021) (Figura 2).

Figura 2: Esquema de retalho de tecido epitelial autólogo transplantado na área lesionada. – Uma das técnicas denominadas como enxerto, é utilizada para tratamento de lesões cutâneas profundas.



Fonte: Própria autora.

Para tratar doenças epiteliais e melhorar a condição do tecido, existem muitos tratamentos, desde os cuidados com o uso de curativos biológicos, fotobiomodulação, medicamentos, cirurgia e terapia celular (XIONG et al., 2021). Entretanto, ainda não há tratamento eficiente e de baixo custo para acelerar a cicatrização da ferida, reduzir o tamanho da área de lesão e evitar a necrose tecidual (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

De acordo com Atalay e colaboradores (2014), ainda há poucos estudos e tratamentos definitivos comprovados para diminuir o tamanho e acelerar o processo de cicatrização de feridas extensas e profundas na prática clínica moderna. Há inúmeros métodos de tratamento que carecem da falta de evidência científica. Muitas condutas estão baseadas em empirismo ou em pequenas séries clínicas. Faltam parâmetros para avaliações mais apropriadas dos resultados obtidos e de possíveis comparações entre terapias (TÊTÊ EDEM *et al.*, 2021).

Nas últimas décadas, estudos com o uso da FVE vêm sendo abordados, por ser um conjunto de células autólogas, possui benefícios com os seus efeitos múltiplos comprovados em diferentes tipos de feridas (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

2.4. Medicina Regenerativa

Desde 1970, a busca pelo progresso no tratamento das feridas crônicas, permaneceu vivaz até a atualidade, ainda como alvo de estudos. Entretanto, as intervenções clínicas evidenciadas naquela época, eram somente capazes de tratar os sinais e sintomas (JACQUES; SUURONEN, 2020).

O índice de morbidades relacionado aos processos degenerativos e incuráveis do tecido cutâneo gera uma urgência dos cuidados na fase crônica, pois predispõe a mortalidade. Neste contexto, há barreiras que desafiam o meio científico, visto que, ainda não há resultados que apresentam competências suficientes para sanar esta problemática (YAMADA; BEHFAR; TERZIC, 2021).

A ciência buscou aprimorar o sistema de saúde com propostas enriquecedoras através de pesquisas inovadoras que introduz a medicina

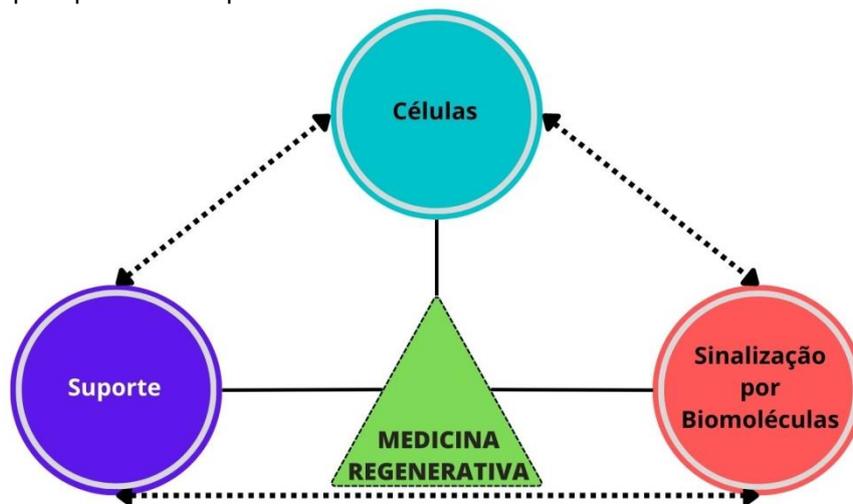
regenerativa como uma alternativa de terapia escalável e acessível, para restabelecer a integridade física e funcional nos distúrbios incuráveis. A medicina regenerativa (MR) é uma área multidisciplinar que promete a restauração de órgãos e tecidos, solucionando de forma permanente as disfunções por deformidades, traumas, doenças e degenerações no indivíduo humano (JACQUES; SUURONEN, 2020; PETIT-ZEMAN, 2001).

A medicina regenerativa é uma alternativa auspiciosa para o futuro. Apoiada pelo rigor da ciência e pesquisa, sendo executada por uma força de trabalho objetiva, que propõe tratamentos inovadores para atender as necessidades dos pacientes e da população. Os seus princípios são baseados no seguinte tripé: células, biomoléculas e suporte (Figura 3). Por conseguinte, a terapia celular e a engenharia de tecidos *in vitro*, promovem o uso de células e podem controlar a indução de biomoléculas ativas com o intuito de regenerar células, tecidos e órgãos, restaurando as suas funções de forma *in vivo*, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015; JACQUES; SUURONEN, 2020; YAMADA; BEHFAR; TERZIC, 2021).

No decorrer dos últimos tempos, a medicina obteve sucesso nas áreas de terapia com o uso de antibióticos, anestésicos e esterilização, mas ainda continua na tentativa de preservar os órgãos acometidos. Todavia, ainda existem muitas patologias que não conseguem ser tratadas. Contudo, a área danificada tem baixo potencial de regeneração, devido à incapacidade da migração celular, proliferação e liberação de citocinas a área lesionada fica exposta, proporcionando risco de desenvolver uma infecção generalizada (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015).

Neste aspecto, a medicina convencional enfrenta problemas prementes que exigem uma evolução dos tratamentos médicos e a MR traz conquistas relevantes, gerando uma esperança para os quadros que necessitam de regeneração dos tecidos danificados, oferecendo o caminho para a cura, em vez de apenas tratar os sintomas (SAMPOGNA; GURAYA; FORGIONE, 2015; NII; KATAYAMA, 2021).

Figura 3: Tripé da Medicina Regenerativa. – Apresentam-se os princípios da Medicina Regenerativa que são baseados no seguinte tripé: células, biomoléculas e suporte, estão interligados para promover a qualidade de vida aos indivíduos.



Fonte: Própria autora.

2.5. Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos

Quando um órgão tem a função severamente prejudicada, geralmente, depende de transplante para atingir a sua restauração (MASSARO *et al.*, 2021). Devido à escassez de doadores humanos, gera-se uma necessidade de encontrar outra maneira para obtenção de órgãos, necessitando assim, o desenvolvimento de outros materiais ou métodos na engenharia de tecidos, por exemplo, o uso de suportes poliméricos, bioimpressão de órgãos e tecidos, transplante de células, e também, a utilização de doadores animais, que são considerados como possibilidades favoráveis para o tratamento de diversas doenças que eram consideradas irreversíveis (MANSOURABADI *et al.*, 2021).

As práticas preventivas e as estratégias terapêuticas variam de acordo com a necessidade apresentada, seguindo uma abordagem pragmática para a sobrevivência do transplante, sendo o principal desafio: a tolerância dos auto-antígenos e controle das respostas imunológicas (MANSOURABADI *et al.*, 2021; MUSHTAQ *et al.*, 2021).

O uso de órgãos de doadores proporciona um alto risco de rejeição do indivíduo receptor, devido à resposta imunológica a algo conflitante no organismo, provocando uma incompatibilidade gerada após o transplante e as

drogas utilizadas, por exemplo, os imunossupressores pode sobrecarregar o metabolismo, causando uma deficiência para outras terapias. Todavia, isso promove o aumento da morbidade e da mortalidade. Entretanto, o adiamento do transplante ou da terapia celular afeta negativamente o cenário clínico, causando um mau prognóstico no indivíduo (MASSARO *et al.*, 2021; MUSHTAQ *et al.*, 2021).

Na terapia celular, os tipos de células e tecidos utilizados são caracterizados em homotópicas (quando têm a mesma finalidade histológica) e heterotópicas (quando são de tecidos diferentes com potencial de diferenciação), identificadas e exemplificadas na Tabela 2 (CHU *et al.*, 2018).

Tabela 2: Classificação e exemplificação dos tipos de células e tecidos.

Classificação dos tipos de células e tecidos	Origem
Autólogos	Proveniente do próprio indivíduo.
Alógenos	Quando são da mesma espécie de indivíduos.
Xenogênicos	Provenientes de indivíduos diferentes.
Por indução	São células geneticamente modificadas.

Fonte: Dados coletados em (MASSARO *et al.*, 2021).

Sorice e colaboradores (2016) relatam que há quase uma década, a terapia baseada em transplante de células vem exibindo resultados clínicos positivos na reparação dos danos teciduais em diversos fenótipos patológicos de lesões cutâneas.

Ademais, a terapia celular recombinante é de grande relevância para as pesquisas, a principal barreira é a identificação das células para a utilização, que são dependentes de várias etapas com a capacidade de combinar o seu uso, permitindo empregar 1 (um) ou 2 (dois) tipos de células recombinantes para a construção de uma única camada ou bicamada. Logo, o desenvolvimento dos veículos eficientes como suporte, para a entrega de células ou tecidos nos órgãos lesionados, está cada vez mais promissor para

conseguir propor a sua capacidade de regeneração (SORICE *et al.*, 2016; CHU *et al.*, 2018).

2.6. O tecido adiposo como fonte da Fração Vascular Estromal

O tecido adiposo (TA) é dividido em dois tipos de tecidos principais, tais como: tecido adiposo branco e tecido adiposo marrom. Ambos com suas características distintas, mas cooperam reciprocamente para atingir o seu propósito de armazenamento de energia, regulação da temperatura corporal, proteção contra choques e impactos de órgãos e estruturas musculoesqueléticas (DRAGOO *et al.*, 2021).

O tecido adiposo branco promove a nutrição corporal e é o mais abundante, sendo distribuída no corpo todo, sua função é controlar o armazenamento e a liberação de ácidos graxos, tem um papel endócrino destinado a fornecer homeostase para nossas necessidades bioenergética e mais abundante no corpo todo. O tecido adiposo marrom é um sistema de termogênese e garante a sobrevivência das espécies, liberando calor na oxidação de ácidos graxos sobre estimulação adrenérgica e é encontrado principalmente na região visceral do abdômen (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014; DRAGOO *et al.*, 2021).

O tecido adiposo marrom também apresenta complicações metabólicas secundárias, devido à concentração da gordura mais acentuada na região visceral, evidenciando diferentes expressões genéticas, maior taxa lipolítica e diminuição da sensibilidade à insulina (MEISSBURGER *et al.*, 2016).

O TA também possui as funções metabólicas, mecânicas, imunológicas com efeitos parácrinos, autócrinos e endócrinos, contém uma variedade de moléculas bioativas, tornando-se uma fonte abundante para aquisição de células e fatores de crescimento, possibilita a regeneração no campo da biologia e auxilia na renovação tecidual (DRAGOO *et al.*, 2021; RAAJENDIRAN *et al.*, 2019).

O TA é um órgão endócrino capaz de influenciar na massa e distribuição dos componentes celulares, função hormonal, estado inflamatório de

homeostase e fibrótico. Além de interagir com outros órgãos, tecidos e tipos celulares, afeta nas condições relacionadas à idade e a outras patologias provenientes do envelhecimento (DURAN-ORTIZ; BERRYMAN; KOPCHICK, 2019; FRIAS *et al.*, 2023).

Antonyshyn e colaboradores (2022); Kuhlmann e colaboradores (2020) relatam que o gênero do indivíduo, por exemplo, nas mulheres devido ao nível e os hormônios femininos serem mais abundantes, há uma afinidade mais abrangente em comparação ao sexo masculino. Assim como, a obesidade e tabagismo do doador são parâmetros críticos que afetam a morfologia, vitalidade, a capacidade de proliferação e o potencial das CT.

Devido às mudanças sofridas pela progressão da idade, o indivíduo diminui a capacidade do potencial das células de autorregeneração, sendo diretamente ligado com o sistema endócrino, através das influências hormonais, por exemplo, o hormônio de crescimento e melatonina, que são secretados pelas glândulas hipófise e pineal, pois, gera o envelhecimento. A progressão das comorbidades relacionadas à idade acomete toda a distribuição de gordura, a deposição de lipídios, a sensibilidade à insulina, a desregulação do processo inflamatório e a predisposição ao desenvolvimento de tecido fibrótico (DURAN-ORTIZ; BERRYMAN; KOPCHICK, 2019).

2.7. Fração Vascular Estromal

Para a obtenção da fração vascular estromal (FVE), o tecido adiposo passa por procedimentos, ou seja, após a extração o conteúdo de gordura aspirado é levado ao processo de centrifugação e isolamento, onde são utilizadas enzimas, por exemplo, a colagenase, para a separação das células adiposas do tecido conjuntivo e das células sanguíneas. Logo, gera um *pellet* de células denominadas de FVE (CHU *et al.*, 2018; HEARNDEN *et al.*, 2021).

A FVE corresponde a uma população heterogênea de células variadas, por exemplo: fibroblastos, células-tronco hematopoiéticas, células endoteliais progenitoras, células-tronco mesenquimais (CTM), células progenitoras,

pericitos, histiócitos, Células T, células B, e mastócitos (PUISSANT *et al.*, 2005; HAN *et al.*, 2015; BUNELL *et al.*, 2021).

Esse *pool* de células produz e liberam fatores de crescimento que irão auxiliar no reparo do tecido acometido. Além disso, expressam características parácrinas, autócrinas e endócrinas, mediando, desta forma, o reparo dos tecidos (TSUJI *et al.*, 2014). Estes fatores de crescimento têm grande influência angiogênica, sendo de grande importância seu uso na MR e na Engenharia de Tecidos (HSIAO *et al.*, 2012; LIUBAVICIUTE; IVASKIENE; BIZIULEVICIENE, 2020).

A hiperplasia e a hipertrofia do tecido adiposo ocorrem através da expansão das células de gordura (adipócitos). Os adipócitos são pós-mitóticos, derivados da proliferação e diferenciação de pré-adipócitos ou de células progenitoras de adipócitos (CPA), localizados na FVE do tecido adiposo, é um evento importante para a cultura tridimensional, pois auxilia na constituição dos esferóides multicelulares. Nas CPA contém proteínas de superfície celulares variadas que são comumente relatadas e expressas em células da FVE que podem sofrer adipogênese, tais como: CD34, CD29, CD13, CD44, CD73, CD90, CD142 e CD9, evidenciando altas taxas de renovação utilizadas em estudos na medicina regenerativa (RAAJENDIRAN *et al.*, 2019).

A FVE é angiogênica referente aos estímulos hipóxicos, pois, ao regular a expressão gênica dos fatores de crescimento, também promove a estimulação da síntese de colágeno de fibroblastos dérmicos humanos e pode ser uma alternativa de obtenção comparada ao uso das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

Li e colaboradores (2017) relatam que, durante muito tempo, o tecido de gordura obtido através dos procedimentos de lipoaspiração foi descartado como resíduo cirúrgico. A FVE do tecido adiposo que atua como fonte de CTMDTA, tem propriedades anti-apoptose, antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora via capacidade de indução de tolerância ou por supressão imunológica direta. Porém, a angiogênese é um segmento crítico da cicatrização de feridas.

A FVE é uma fonte rica de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo que se diferenciam em linhagens de adipócitos, osteoblastos, condrócitos, miócitos e células semelhantes a neurônios (ATALAY; CORUH; DENIZ, 2014).

As CTMDTA, devido a sua multipotência, capacidade de diferenciação e auto renovação, são amplamente utilizadas para a cicatrização na MR (SANANTA *et al.*, 2020a).

É fundamental monitorar o processo da capacidade das CTM de se diferenciarem em linhagens celulares e determinar o estágio de diferenciação, além de enriquecer o conhecimento através de várias técnicas disponíveis que promove a detecção de genes e/ou marcadores expressos (DRAGOO; CHANG, 2017).

2.8. Terapia Celular por Células-tronco

Nos últimos tempos, o uso de CT na terapia celular se tornou um foco, pois apresenta benefícios como a habilidade de auto renovação e proliferação, possui um potencial de diferenciação em linhagens que modulam o ambiente de reparo por meio de citocinas e contém fatores de crescimento, trazendo perspectivas positivas em diversos estudos (SORICE *et al.*, 2016; SANANTA *et al.*, 2020b). Além disso, a sua matriz extracelular integra uma multipotência que regula o microambiente, sinalizando através de uma comunicação local via liberação de mensageiros químicos (MAQSOOD *et al.*, 2020).

Entre as principais CT utilizadas na terapia celular estão as totipotentes, as embrionárias, as somáticas ou multipotentes (são consideradas CTM adultas) e as pluripotentes induzidas (são células totalmente diferenciadas, que foram reprogramadas por metodologias específicas para obterem as características semelhantes às células-tronco pluripotentes embrionárias), que se diferenciam em hematopoiéticas e mesenquimais (SORICE *et al.*, 2016; HEARNDEN *et al.*, 2021) (Tabela 3).

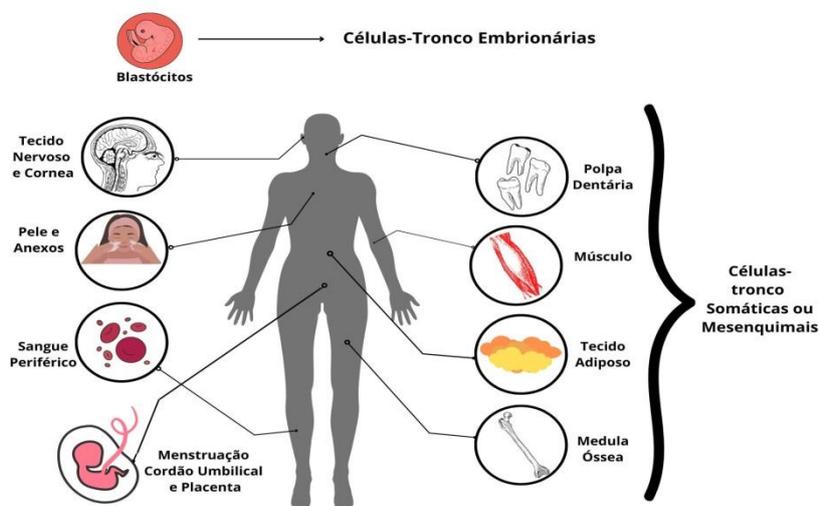
Tabela 3. Tipo e Função Celular.

Tipo Celular	Função
Totipotentes	A capacidade de uma única célula produzir todas as células.
Pluripotentes	A capacidade de diferenciação em uma célula dentre as três camadas germinativas (Por exemplo: ectoderme, endoderme e mesoderme – células-tronco embrionárias)
Oligopotentes	A capacidade de se diferenciar em células limitadas de um único tipo.
Multipotentes	A capacidade de diferenciação em apenas alguns tipos celulares é responsável pela renovação de certos órgãos (Por exemplo: medula óssea).
Onipotentes	Um único tipo de tecido (Por exemplo: células progenitoras).

Fonte: Tabela desenvolvida de própria autoria com base de dados em HSU *et al.*, 2019; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019.

As preocupações na segurança e das diretrizes éticas do uso das CT embrionárias direcionaram ao aperfeiçoamento das terapias regenerativas para o uso das CT multipotentes, especialmente as células-tronco mesenquimais adultas, pois conseguiram ser obtidas e isoladas de quase todos os tecidos do corpo e são mais comumente encontradas na medula óssea, na polpa do dente e no tecido adiposo, proporcionando maior facilidade na sua utilização (SORICE *et al.*, 2016; SANANTA *et al.*, 2020b) (Figura 4).

Figura 4: Categorização de Células-tronco. – CT embrionárias (blastocisto ou embrião) e CT Somáticas que são provenientes de tecidos maduros e tendem a diminuir com o efeito do processo de envelhecimento sobre o organismo.



Fonte: Própria autora.

Para que as células sejam consideradas CT, são propostos no mínimo 3 (três) critérios: as células devem ser aderentes ao plástico; as mesmas devem expressar positivamente para CD105, CD73 e CD90 e negativamente para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR e devem ter a capacidade de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos em padrões de cultura *in vitro* (HYNDS; BONFANTI; JANES, 2018; SANANTA *et al.*, 2020a; MAQSOOD *et al.*, 2020).

As CTMDTA se mostram promissoras, apresentam vantagens em relação a outros métodos, principalmente na reparação de tecidos, evidenciando baixo risco de rejeição. Resultando assim, em 35% a 56% da regeneração de alta qualidade e uma diminuição significativa na formação de cicatrizes (PITTENGER *et al.*, 1987; SORICE *et al.*, 2016; TANI *et al.*, 2022).

2.9. CTM extraídas da FVE

Atualmente, estudos relatam que as CTMDTA não apresentam diferenças na morfologia e fenótipo imune quando comparadas com as células-tronco da medula óssea e do cordão umbilical, além de sua frequência ser maior em CTMDTA do que nas outras regiões, aproximadamente 500 vezes maior que o número de células obtidas da medula óssea, pode variar, dependendo do método de isolamento (ALONSO-GOULART *et al.*, 2018a).

Existem muitos processos para digestão e isolamento da FVE, mas o método enzimático convencional para isolamento é amplamente utilizado com as seguintes enzimas: colagenase, tripsina, dispase ou outras enzimas relacionadas. Mantidas à temperatura de 37°C, com a duração da digestão cerca de 30 a 60 minutos, uso de PBS (solução tampão de fosfato salino), processos de centrifugações, meio de cultura modificado de Dulbecco (DMEM) com de 10% a 20% de soro fetal bovino e as relações com peso/volume de tecido são fracionados, e assim, conseguir o isolamento e cultivo das células (LIUBAVICIUTE; IVASKIENE; BIZIULEVICIENE, 2020).

Entretanto, algumas metodologias com custos menores e mais eficazes estão sendo propostas por diferentes grupos de pesquisa. Alguns são baseados no uso de enzimas, outros em processos não enzimáticos, mas em

sua maioria, resolveram questões como padronização do sistema operacional, esterilidade e ausência de toxinas e xenobióticos, normalmente exigidas pelas autoridades reguladoras desse tipo de terapia. Embora, ainda não seja acessível em todos os hospitais, pois, é de alto custo e de difícil manuseio, geralmente esses sistemas foram otimizados e são promissores para terapia (ALONSO-GOULART *et al.*, 2018b).

Um dos tratamentos inovadores sugeridas para feridas cutâneas crônicas é a terapia celular com o transplante de CT, sendo uma opção promissora para pacientes em situação grave com transplantes ou enxertos de pele, por ser uma abordagem menos invasiva (SANANTA *et al.*, 2020a).

Entretanto, com os avanços tecnológicos novos métodos para expansão e cultivo celular foram desenvolvidos. Eles são usados para formação de esferóides tridimensionais, para atuar na regeneração e no reparo de lesões cutâneas, obtendo maior eficácia celular nos tratamentos propostos. (HYNDS; BONFANTI; JANES, 2018; CHERNOFF; BRYAN; PARK, 2018; SUH *et al.*, 2019).

2.10. Esferóides Multicelulares

O método de entrega das células é o próximo passo e é o maior desafio para a terapia celular. Foram efetivadas muitas tentativas para esta finalidade, realizando a aplicação das células no local, pulverização, injeção direta na área da ferida, associações com o uso de arcabouços (*scaffolds*). A administração e a sobrevivência das células no ambiente sistêmico, assim como o enxerto, precisam estar preparadas para o microambiente biológico, pois, o organismo humano funciona de forma tridimensional (EL-SERAFI *et al.*, 2017).

Em relação à cultura bidimensional convencional (2D), é a precursora para a efetivação e transformação do cultivo estático. Entretanto, o cultivo 2D *in vitro* é realizado em placas ou garrafas de cultura com material de plástico tratado (poliestireno com tratamento especial que proporciona uma superfície hidrófila com cargas negativas, facilitando a aderência e espraiamento celular), as células se aderem no fundo da garrafa formando uma monocamada (popularmente exemplificado como um tapete de células). Contudo, quando

reproduzidas *in vivo* não é muito bem efetivada, já que as células respondem em 3D (WOAPPI *et al.*, 2020).

A cultura dinâmica em suspensão tridimensional (3D) permite que as células se adaptem à sua forma nativa, imitando o microambiente biológico *in vivo*, em relação à arquitetura celular do epitélio das células com mais precisão do que a cultura 2D. A cultura 3D se destaca com o cultivo das células em contramoldes de agarose com porosidade, que contém micropoços e proporciona um ambiente que regula positivamente o contato célula-célula, através da interação célula-matriz extracelular que gera um aumento da troca de líquidos, e assim, constitui os esferóides multicelulares (EM) (LASCHKE; MENGER, 2017; YANAGI *et al.*, 2021).

Os EM são esferas 3D, formadas através da agregação celular, têm a função aprimorada de anti-apoptose para suportar o ambiente hostil *in vivo*, promove a melhora da hipóxia, induzindo com eficácia a angiogênese por meio da regulação positiva de secreções parácrinas, autócrinas e endógenas. Assim, a aplicação dos esferóides na lesão, mostrou maior vascularização e fechamento da ferida em comparação com as CT dispersas, pois, os EM imitam o complexo ambiente tridimensional dos tecidos naturais (ZHENG *et al.*, 2021; LASCHKE; MENGER, 2017).

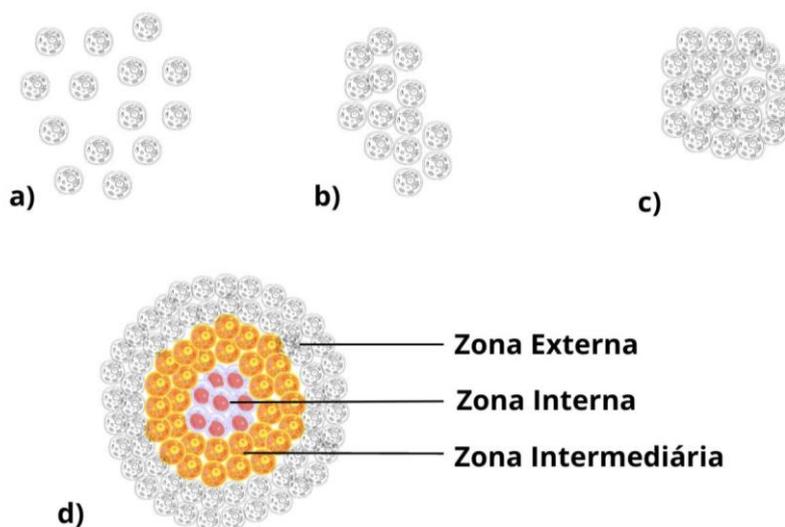
A formação dos EM e os processos de agregação celular envolvem três fases: a primeira fase é a sementeação em ambiente não aderente, onde as células se encontram soltas, a segunda fase é quando as células fazem o agrupamento dando início ao aglomerado celular e a terceira fase ocorre quando as células se auto-organizam para consolidar os EM (HAZRATI; DAVARAN; OMIDI, 2022).

O EM contém três camadas em sua estrutura, denominadas de: zona de proliferação, zona de repouso e o núcleo necrótico. A camada externa, denominada de zona externa, consiste em células com núcleos normais e intactos que apresentam proliferação e metabolismo ativo. A camada intermediária, denominada de zona intermediária, é composta por células com núcleos encolhidos e a proliferação e atividade metabólicas inalteradas. Na camada interna mais centralizada do EM, é denominado de zona interna,

corresponde às células com núcleos desintegrados, células envelhecidas e apoptóticas no ponto central do esferóide. As principais causas dessa necrose, ocorrem devido ao acesso limitado dessas células aos nutrientes do meio de cultura, apresentam também limitações de acesso ao oxigênio, falta de troca de CO₂, alterações no pH e acúmulo de resíduos metabólicos próximo ao núcleo celular (HAZRATI *et al.*, 2022; VADILELU *et al.*, 2017).

Portanto, os gradientes de concentração de nutrientes, oxigênio e resíduos dentro dos esferóides devem sempre ser considerados ao selecionar a técnica ideal para gerar esferóides *in vitro*, para assim, alcançar maior funcionalidade nas condições *in vivo* (Figura 5) (HAZRATI *et al.*, 2022; LASCHKE; MENGER, 2017).

Figura 5: Imagem ilustrativa de um esquema de esferóide e o seu processo de formação. a) Células semeadas em ambiente não aderente; b) Formação dos esferóides baseada no aglomerado celular por agrupamento; c) Padrão do processo de consolidação do esferóide (auto-organização); d) Esferóide multicelular com a organização concêntrica de células proliferativas e necróticas.



Fonte: Adaptado VADIVELU *et al.*, 2017.

Existem diversas estratégias para a obtenção dos esferóides, tais como: força centrífuga, campo eletromagnético, ultra-som ou ondas acústicas e gota suspensa que utilizam estímulos físicos para promover a aglomeração celular (DECARLI *et al.*, 2021). Entre as atuais técnicas utilizadas para a constituição

dos esferóides, o método de cultivo tridimensional em superfície não aderente também é utilizado para a constituição de esferoides, caracterizado pela formação de agregados de células nucleadas não aderidas em um ambiente sem aderência por ligação integrina-matriz extracelular, formando esferóides compactos por meio de interações hemofílicas caderina-caderina (KIM *et al.*, 2023; LASCHKE; MENGER, 2017).

Os EM apresentam variabilidade no diâmetro e na morfologia, que influenciam no processo de formação, podem apresentar menor compactação e superfície irregular (DECARLI *et al.*, 2021; LASCHKE & MENGER, 2017). Contudo, a formação dos esferóides 3D é o método mais provável para proteger as células, prevenir as células individuais de tensões físicas e pode gerar um enxerto capaz de cobrir uma ferida ampla (EL-SERAFI *et al.*, 2017).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

O objetivo desta pesquisa é estabelecer uma prova de conceito a respeito da ação da FVE derivada do tecido adiposo subcutâneo humano e cultivada como esferóides multicelulares sobre o reparo da pele, utilizando um modelo *in vitro* para a cicatrização de feridas.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Verificar a possibilidade de constituição dos EM da FVE derivada do tecido adiposo.
- ✓ Avaliar o potencial de diferenciação das CT isoladas do *pool* de células da FVE.
- ✓ Analisar o potencial biológico da FVE em esferoide no processo de adesão, desagregação e migração celular em modelo *in vitro* para a modulação do nicho.
- ✓ Analisar os efeitos modulatórios dos subprodutos dos EM de FVE na cicatrização e reparo de lesão em modelo *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. SUJEITO

Uma voluntária, do sexo feminino, com idade de 34 anos, clinicamente saudável foi submetida ao procedimento estético de lipoaspiração. Previamente ao procedimento cirúrgico, a candidata a voluntária foi devidamente informada sobre os benefícios e riscos relacionados ao estudo, bem como os procedimentos realizados para a coleta e manutenção do material para a extração das células.

A participação como voluntária foi confirmada após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO I - item 10.1), seguindo as normas previstas pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Araraquara (CEP-UNIARA), sob o número do parecer 5.241.963 (ANEXO II - item 10.2).

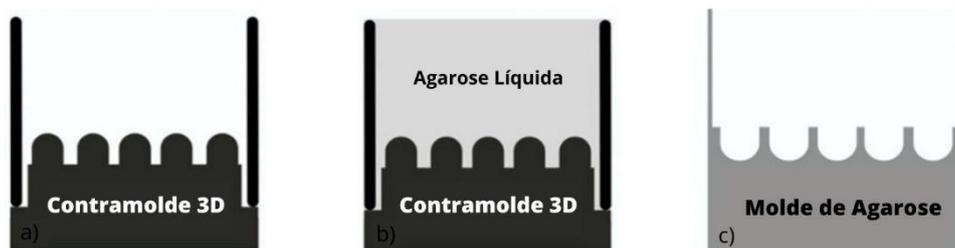
4.2. ESFERÓIDES MULTICELULARES

4.2.1. Preparo dos moldes de agarose

Foi utilizado o protocolo modificado de Napolitano e colaboradores (2007), para a constituição dos Esferóides Multicelulares (EM), baseado no princípio de cultivo 3D em superfície não aderente.

Para o preparo dos moldes, foi usado 2% de agarose (KASVI – K9-9100) diluídos em solução tampão de fosfato salino (PBS-1X – constituído por NaCl 140 mM; KCl 2,5 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM; pH 7,4 – SIGMA-Aldrich) e fundida em micro-ondas até ficar homogênea e transparente. A agarose líquida foi inserida no interior do contramolde (2 mL) para solidificação (Figura 6).

Figura 6: Esquema representativo do preparo dos moldes de agarose. a) Contramolde de agarose 3D. b) Inserção da agarose líquida no interior do contramolde. c) Molde de agarose solidificado.



Fonte: Própria autora.

O contramolde utilizado, foi produzido por impressão 3D e fornecido pelo Centro de Tecnologia e Informação Renato Archer (MORAES *et al.*, 2022), que gerou moldes contendo 164 micropoços com diâmetro individual de 500 μm (Figura 7).

Figura 7: Fotografia do contramolde desacoplado (*); contramolde acoplado (**) e do molde de agarose pronto (***) contendo os micropoços de cultivo celular para formação dos EM.



Fonte: Própria autora.

Para a esterilização dos moldes, os mesmos foram imersos em álcool (70%) por 30 minutos, lavados com PBS (1X) e mantidos em irradiação UV em cabine biológica por 20 minutos. Em seguida, foi realizado o processo de

maturação. Os moldes foram colocados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM - Sigma-Aldrich), cinco trocas do meio foram realizadas a cada 15 minutos e as amostras do meio foram armazenados em um tubo *falcon* com meio DMEM e mantidos na geladeira.

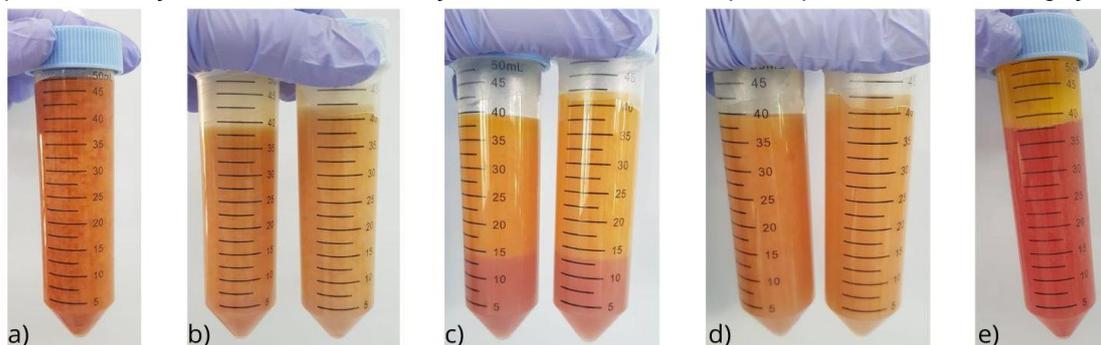
4.2.2. Extração da FVE

Durante a cirurgia, com a paciente sob anestesia geral, o médico responsável realizou o procedimento de lipoaspiração do tecido adiposo subcutâneo da região abdominal. A gordura extraída (50 mL) foi inserida e armazenada em um tubo de ensaio estéril e encaminhado até o Laboratório de Ensaio Celulares e Engenharia Regenerativa da Universidade de Araraquara (LECER/UNIARA), prosseguindo com os próximos passos da pesquisa.

A amostra de gordura foi fracionada em duas partes e inserida em dois tubos de ensaio estéreis (22,5 mL). Em seguida, foi adicionado 20 mL de solução de colagenase tipo II (2 mg/mL – SIGMA-Aldrich) em cada tubo para a realização da digestão enzimática a 37°C, sendo homogeneizada manualmente a cada 10 minutos durante 45 minutos (LAIDDING *et al.*, 2021). Posteriormente, foi realizada uma breve homogeneização manual, os tubos foram esterilizados externamente com álcool (70%) e introduzidos na cabine biológica para que o contingente fosse dividido em três partes.

Em seguida, a digestão enzimática foi inativada com a adição de 24 mL de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell) e 1% dos antibióticos (Penicilina [100 U/mL – Vitrocell] e Estreptomicina [100 µg/mL – Vitrocell]). Após, foi realizada uma breve homogeneização manual e os tubos foram submetidos à centrifugação (CELM – COMBATE) de 1500 rpm por 4 minutos a temperatura ambiente de 21°C. Os componentes celulares foram fracionados e o conteúdo de sobrenadante de cada tubo foi desprezado (Figura 8) (CARVALHO *et al.*, 2021; LAIDDING *et al.*, 2021).

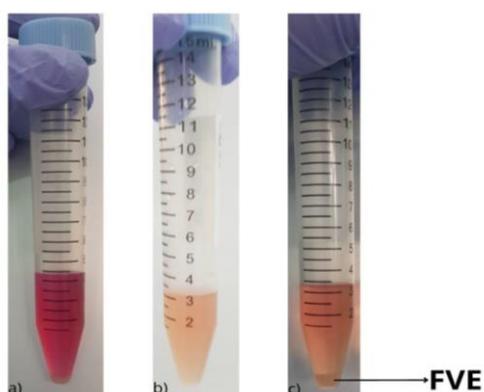
Figura 8: Processo de digestão enzimática. a) Quantidade de gordura antes da divisão. b) Fracionamento da gordura, contendo 40 mL total da amostra com 20 mL de gordura após ser homogeneizado com 20 mL de colagenase tipo II. c) Amostras durante o período de digestão enzimática. d) Amostras após os 45 minutos de digestão enzimática. e) Um dos Tubos *Falcons* após a inativação enzimática com adição do meio de cultura após o processo de centrifugação.



Fonte: Própria autora.

Os *pellets* de células foram ressuspensos em 1 mL de meio de cultura em cada tubo, homogeneizados e transferidos para um único tubo *Falcon* de 15 mL. O tubo foi centrifugado a 1500 rpm por 2 minutos a temperatura de 21°C, sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* de células ressuspensos em 3 mL de solução tampão de Cloreto de Amônio para lise de hemácias por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada uma breve homogeneização com o auxílio de um micropipetador e submetido à outra centrifugação a 1500 rpm por 2 minutos a 21°C para a obtenção do *pellet* da FVE com eritrócitos reduzidos (Figura 9).

Figura 9: Obtenção do *pellet* da FVE. a) Tubo *Falcon* após a inativação da digestão enzimática contendo a amostra com meio de cultura. b) Amostra com a Solução de Tampão de Cloreto de Amônio para lise de hemácias. c) Após o processo de centrifugação, evidenciando o *pellet* da FVE.



Fonte: Própria autora.

Em seguida, o *pellet* da FVE foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura, uma alíquota de 10 μ L do conteúdo foi transferida para um microtubo e foi adicionado a 10 μ L de *Trypan Blue* para a quantificação celular na câmara de *Neubauer* e visualizado pelo microscópio invertido (Nikon Eclipse – TS100) na objetiva de 10x.

4.2.3. Potencial de diferenciação em multi-linhagens das CTMDTA

A suspensão celular de 200 μ L do *pellet* da FVE contendo 4×10^5 células/mL foi acondicionada em uma garrafa de 25 cm² (KASVI) com 3 mL de meio de cultura, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell), Penicilina (100 U/mL - Vitrocell) e Estreptomicina (100 μ g/mL - Vitrocell), e incubadas em estufa de cultivo celular (Panasonic – COM-19) a temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, para cultura das células.

Os subcultivos foram realizados quando a garrafa alcançou 80% de confluência. A remoção das células foi realizada pela adição de solução de tripsina/EDTA (0,25% - GIBCO), seguida pelo fracionamento do *pellet* e ressuspensão em 1 mL de meio de cultura para o procedimento de identificação e diferenciação das CTMDTA.

Após a 3ª passagem, foi realizada a semeadura de 2×10^5 células/mL em duas placas de Petri (KASVI – 6.0 cm), cultivadas até atingir 90% de confluência. Em seguida, foi realizada uma lavagem com PBS 1X e foram inseridos os meios específicos de indução para cada linhagem estabelecida (osteogênico e adipogênico), sendo trocados a cada 72 horas, durante 15 dias de cultura.

Para diferenciação do potencial adipogênico, as células foram incubadas na placa de cultura com o meio indutor composto por DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), 0,5 mM de isobutilmetilxantina (IBMX), 1 μ M dexametasona, insulina 10 μ M e 200 μ M indometacina. Para a adesão da pigmentação do *Oil Red* (ORO-Sigma) foi injetado 3 mL da solução de isopropanol 60% (1,8 mL de isopropanol em 1,2 mL de água destilada) por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, o

isopropanol foi removido da placa de cultura e 3 mL da solução de ORO foi adicionado na amostra, mantida por 45 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após, a solução foi descartada e realizada três lavagens com 2 mL de água destilada na amostra para identificar a cor das gotículas de gordura intracelular na diferenciação adipogênica (KHAN *et al.*, 2012).

A diferenciação do potencial osteogênico foi induzida com meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino (10%), ácido ascórbico de 50 μ M, 10 mM β - glicerofosfato, e 0,1 μ M de dexametasona. Na placa de cultura, foi utilizado 3 mL da solução de *Alizarin Red* (AR) por 60 minutos, ao abrigo da luz e mantida em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução foi removida e realizadas três lavagens com 2 mL de água destilada para identificar a mineralização óssea da matriz extracelular. Os resultados seguem as análises qualitativas com base na intensidade da coloração avermelhada e na extensão das áreas positivas da coloração da AR (KHAN *et al.*, 2012).

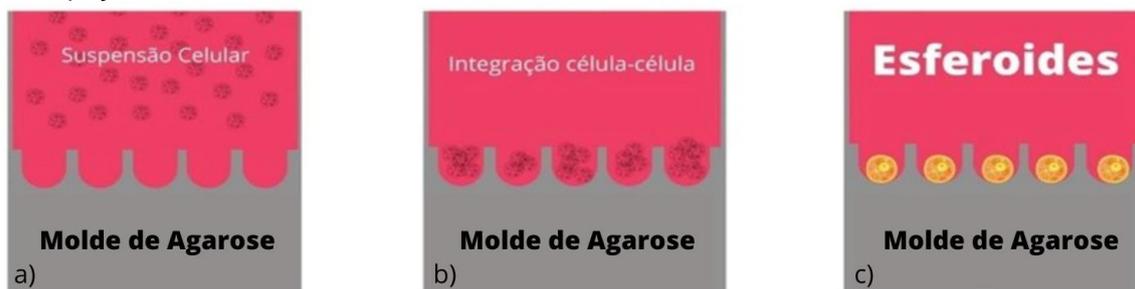
4.2.4. Constituição dos EM

Para a constituição dos EM foi utilizado o método de superfície não aderente. Resumidamente, a densidade total de 4×10^5 células obtidas da FVE foi semeada em três moldes de uma placa de cultura de 12 poços (KASVI) para o cultivo.

Os moldes permaneceram submersos em 1 mL de meio de cultura suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell) e mais os antibióticos em 1% Penicilina (100 U/mL - Vitrocell) e Estreptomicina (100 μ g/mL - Vitrocell). E mantidos em condições ideais, que são em estufa de cultivo celular (Panasonic – COM-19) a temperatura de 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico para de cultivo para a interação célula-matriz extracelular.

Durante o acompanhamento do período de cultura, foi completado cerca de 200 μ L a 600 μ L de meio de cultivo para manter a agarose hidratada e a suplementação necessária para a constituição dos EM até o 5^o dia de cultura, o esquema representativo das etapas de formação dos EM está ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Esquema representativo das etapas de formação dos EM. As células foram semeadas nos moldes e acondicionadas em triplicata na placa de 12 poços para cultivo tridimensional. a) Suspensão da FVE (semeadura da suspensão celular). b) Células dentro dos micropoços do molde (interação célula-matriz extracelular). c) Esferóides formados dentro dos micropoços.



Fonte: Própria autora.

4.2.5. Caracterização dos potenciais regenerativos dos EM da FVE

4.2.5.1. Transferência dos EM

A transferência dos EM ocorreu após a coleta e reserva do meio condicionado obtido pela constituição dos EM. Logo após o armazenamento do meio condicionado, com o auxílio de uma micropipeta, foi introduzido 1 mL de meio de cultura no interior do molde de agarose, homogeneizados cuidadosamente para remoção dos EM dos micropoços. Em sequência, os EM foram transferidos para três placas de Petri (3,5 cm - KASVI) contendo 2 mL de meio de cultura completo a 20% de soro fetal bovino (SFB - Vitrocell) e mais os antibióticos em 1% Penicilina (100 U/mL - Vitrocell) e Estreptomicina (100 µg/mL - Vitrocell).

Os EM foram acompanhados diariamente para analisar a capacidade de interação com o substrato pós-carreamento nos períodos de 36 horas, 48 horas e 72 horas.

4.2.5.2. Caracterização morfológica dos EM

Após a transferência dos EM para as placas de Petri, os EM foram fixados de acordo com os períodos pré-determinados de 36 horas, 48 horas e 72 horas. A fim de analisar a estrutura de superfície e os núcleos do EM, todos os períodos foram fixados com 2 mL de solução de formaldeído (Synth) 4%,

por 30 minutos, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e descartado a solução *a posteriori*. Logo em seguida, a amostra foi lavada com 2 mL de água destilada em ambiente não estéril (SANTOS *et al.*, 2021).

Em sequência, a marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (THERMO FISHER - 1 mg/mL) foi realizada somente nos EM do período de 72 horas, seguindo o protocolo do fabricante, foi adicionado 300 µL da solução de DAPI e a amostra foi mantida por 30 minutos, em temperatura de 21°C e ao abrigo de luz. Em seguida, a solução foi descartada, realizado duas lavagens com 2 mL de água destilada e mantida em 3 mL de água destilada para visualização dos núcleos celulares no microscópio pré-confocal invertido de fluorescência (Leica – DMi8 Harpia).

Pós-fixados em seus respectivos períodos, os EM foram desidratados por lavagens seriadas de 10 minutos em soluções de etanol, nas concentrações de etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Todas as etapas foram realizadas em temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 2021). Após a desidratação, as amostras permaneceram em temperatura ambiente 21°C e ao abrigo da luz para a secagem, e, posteriormente, armazenadas em 10°C até o dia de análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

Para o preparo das amostras para o MEV, foi realizada a avaliação estrutural da superfície dos EM, através do Microscópio eletrônico de varredura com litografia por feixe de elétrons (TESCAN, Mira3 XMU – Field Emission Gun (FEG-SEM)), foi necessário utilizar o equipamento *sputtering* de Ouro (SPUTTER COATER – BAL-TEC, BALZERS – SCD 050), foi aplicado o revestimento de alvo de ouro (parâmetros: corrente 50 mA, *sputtering* em 30 segundos de tempo em gás argônio, 0.05 mbar de pressão de trabalho e espessura do filme de ouro aproximadamente 10 nm de ouro) para que ocorra a visualização das amostras sem destruir os componentes biológicos via elétrons do MEV *a posteriori*.

A análise complementar de reconstrução topográfica 3D foi aplicada nas amostras de 36, 48 e 72 horas, utilizando o software de análise MountainsMap (SEM Topo – versão 7.4 – distribuído pela Digital Surf). O método utilizado consiste na obtenção de uma imagem de MEV da região de

interesse (ROI), utilizando o detector de elétrons secundários (SE), seguida da obtenção de outra imagem da mesma região com uma inclinação (*tilt*) da porta amostras em 5° do software, mantendo constante distância de trabalho, magnificação, foco e campo de visão da amostra, para evitar artifícios matemáticos durante a reconstrução (FONSECA; MODENESI; ARIAS; 2018).

A técnica de formação topográfica é feita por reconstrução estereoscópica das imagens, onde regiões mais altas da imagem terão maior deslocamento quando é realizado o *tilt* na porta amostras, em relação às regiões menos elevadas. O software utilizado forneceu imagens de mapa topográfico, reconstrução 3D topográfica, e parâmetros de interesse calculados utilizando a ISO 25178. As medidas de comprimento dos EM foi realizada utilizando o software gratuito Gatan DigitalMicrograph versão 2.3.2 (parâmetros: Rugosidade RMS (Rg - μm) e Altura máxima (sz - μm).

4.2.6. Avaliação dos efeitos modulatório e imuno-modulação dos EM da FVE

4.2.6.1. Dosagem de citocinas IL-6 e TGF- β 1

Para a realização de dosagem das citocinas IL-6 e TGF- β 1, foi coletado 500 μL do meio condicionado obtido através do cultivo 3D da constituição dos esferóides, reservado em um microtubo de 1,5 mL em temperatura -15 °C e realizados no laboratório de inflamação e doenças infecciosas (LIDI) do Departamento de morfologia e patologia (DMP) na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para o ensaio imunoenzimático qualitativo ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), foi utilizado o protocolo descrito na bula do fabricante com placas de microtitulação de alta afinidade com 96 poços para ELISA (Kit OptEIATM, BDBiosciences) em quintuplicada para cada alvo biomolecular.

Entre cada etapa, as placas foram lavadas com 300 μL /poço de solução de lavagem (PBS 1X [Tampão fosfato salino: 8 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,15 g de Na_2HPO_4 ; 0,2 g de KH_2PO_4 e 1 L de água destilada] + tween 20 a 0,05%,

pH 7,4). Após a sensibilização das placas com 100 µL/poço de anticorpo de captura específico em tampão carbonato (7,13 g de NaHCO₃ e 1,59 g de Na₂CO₃ para 1 L de água milli-q) na proporção 1:250 e incubadas por 16 horas a 4 °C.

Em seguida, foi efetuada a etapa de bloqueio com 200 µL/poço com albumina 1%, seguido de incubação por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, foram introduzidos 50 µL das amostras e da curva de titulação dos padrões de citocinas nos poços da placa com incubação de 2 horas em temperatura de 22 °C.

Posteriormente, 100 µL/poço do anticorpo de captura conjugado com a enzima peroxidase foi adicionado, incubado ao abrigo de luz por 1 hora e 30 minutos, temperatura de 22°C, a enzima foi inativada com albumina 1X, na proporção 1:250 de enzima e anticorpo. A próxima etapa foi realizada ao abrigo de luz, no qual, foram aplicados 100 µL/poço do substrato da enzima TMB (3,3'; 5,5' – Tetrametilbenzidina) e as placas foram incubadas por 30 minutos em 22°C.

Em sequência, a reação enzimática foi interrompida com a adição de 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2M e a leitura das placas foram realizadas no comprimento de onda de 450nm, pelo espectrofotômetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), sendo as concentrações calculadas a partir da curva de titulação dos padrões de citocinas e as concentrações finais expressas em µL/mL. Similarmente, os controles brancos com os anticorpos de detecção e captura, foram diluídos em albumina 1X.

4.2.6.2. Ensaio de migração celular - Método *Wound Healing*

Para o ensaio de migração celular, foi realizado o ensaio de migração celular, conhecido como método *Wound Healing*, também denominado de ensaio de ranhura, que consiste na realização de uma ranhura em um modelo *in vitro*, simulando o leito de lesão (ALMEIDA *et al.*, 2019).

As células MG-63 (fibroblastos de osteosarcoma humano) foram removidas das garrafas de cultivo, quantificadas e transferidas para uma placa de 24 poços, e foram semeadas 2×10^5 células/poço em 9 poços da placa. Após 12 horas de cultivo com a confluência total da superfície de crescimento, formou-se uma monocamada de células no substrato do poço.

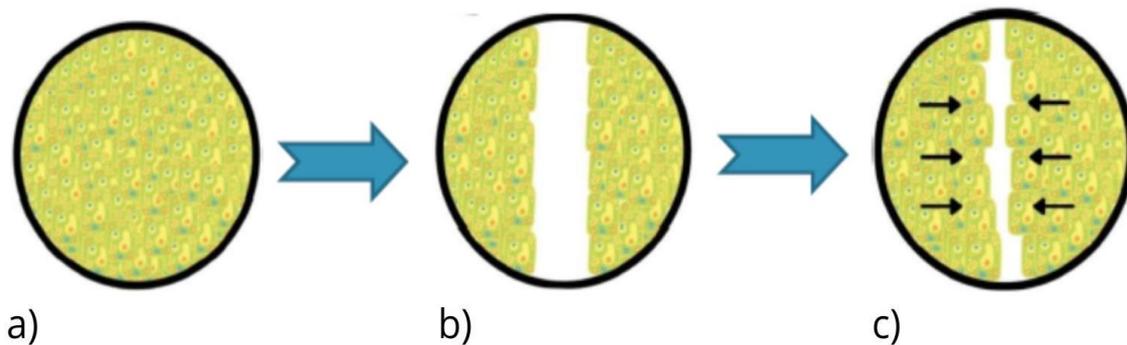
Em sequência, foi realizada uma escarificação linear (em forma de risco) em cada poço com o auxílio de uma ponteira estéril de 100 μ L (KASVI) e uma régua para apoio e padronização da ranhura. Posteriormente, foi realizada uma lavagem delicada com 200 μ L de PBS em cada poço para a retirada das células em suspensão.

Logo após a ranhura e a lavagem, foram determinados os grupos: grupo controle positivo (GC+), o grupo controle negativo (GC-) e o grupo experimental (GE), foram avaliados em triplicata no período de 0 hora (dia da ranhura) e 24 horas (após a ranhura). Para o GC+, foram inseridos 300 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de SFB (Vitrocell), Penicilina (100 U/mL - Vitrocell) e Estreptomicina (100 μ g/ml - Vitrocell) em cada poço. No GC-, foi colocado 300 μ L de meio DMEM (Vitrocell) sem SFB nos poços. E o GE, foi introduzido 300 μ L/poço de meio de cultivo condicionado obtido do cultivo tridimensional da constituição dos EM.

O registro desta análise foi obtido por micrografias identificadas dos campos da ranhura, sendo avaliada a área de ranhura, referente à distância das duas margens dos riscos no tempo de 0 hora e após 24 horas.

A quantificação da migração celular foi realizada pela percentagem da área recoberta no tempo de 24 horas em relação ao tempo 0 hora. Os dados foram expressos pela diferença entre a superfície recoberta em resposta às condições experimentais estabelecidas (Figura 11). Para identificar a migração das células e o fechamento da área de ranhura, foi utilizado o software o “*Image J*”, que proporciona resultados quantitativos mais precisos.

Figura 11: Ilustração do Método *Wound Healing* – Ensaio de ranhura, simulando *in vitro* uma ferida cutânea e analisa a migração celular promovendo o reparo da lesão no período de 24 horas. a) Imagem ilustrativa da monocamada de células em confluência do poço antes da ranhura. b) Imagem ilustrativa do poço logo após a realização da ranhura no tempo de 0 hora. c) Imagem ilustrativa do poço após a ranhura no tempo de 24 horas, as setas apontam o fechamento da simulação do leito da ferida.



Fonte: Própria autora.

4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado os procedimentos de estatística qualitativa descritiva básica, foi aplicado o modelo de análise de variância (ANOVA) e complementada pelo método de Fisher para comparação das médias entre grupos (GC+, GC- e GE) com nível de significância estatística adotada de 5% ($p \leq 0,05$) (APÊNDICE A).

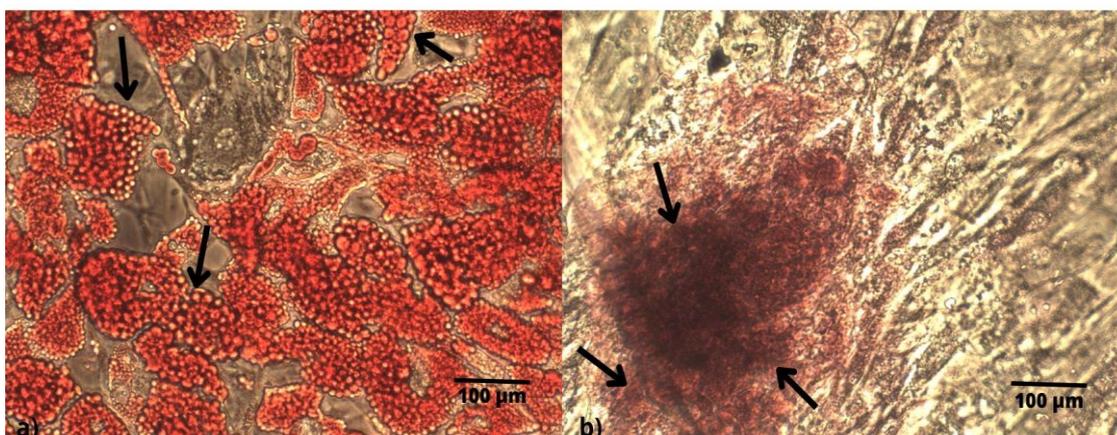
5. RESULTADOS

A primeira etapa da pesquisa consistiu em reproduzir o protocolo de extração da FVE, que foi obtido com êxito. O protocolo resultou em uma quantidade de $2,1 \times 10^6$ células. No conteúdo do lipoaspirado de gordura, correspondeu a $4,2 \times 10^4$ cél/mL (50 mL).

5.1. Potencial de diferenciação em multi-linhagens das CTMDTA

Os resultados referentes aos ensaios de caracterização do potencial de diferenciação em multi-linhagens demonstraram que as células extraídas e isoladas da FVE exibiram a diferenciação adipogênica, caracterizada pela mudança morfológica intracelular com presença de gotículas de gordura (Figura 12-A), e a diferenciação osteogênica, caracterizada pela presença de nódulos de mineralização da matriz (Figura 12-B).

Figura 12: Micrografias da caracterização do perfil mesenquimal das CT da FVE. a) As setas indicam as gotículas de gordura, característica da diferenciação adipogênica e b) Os nódulos de mineralização da matriz são apresentados pelas setas, característica da diferenciação osteogênica. Objetivas de 40x.



Fonte: Própria autora.

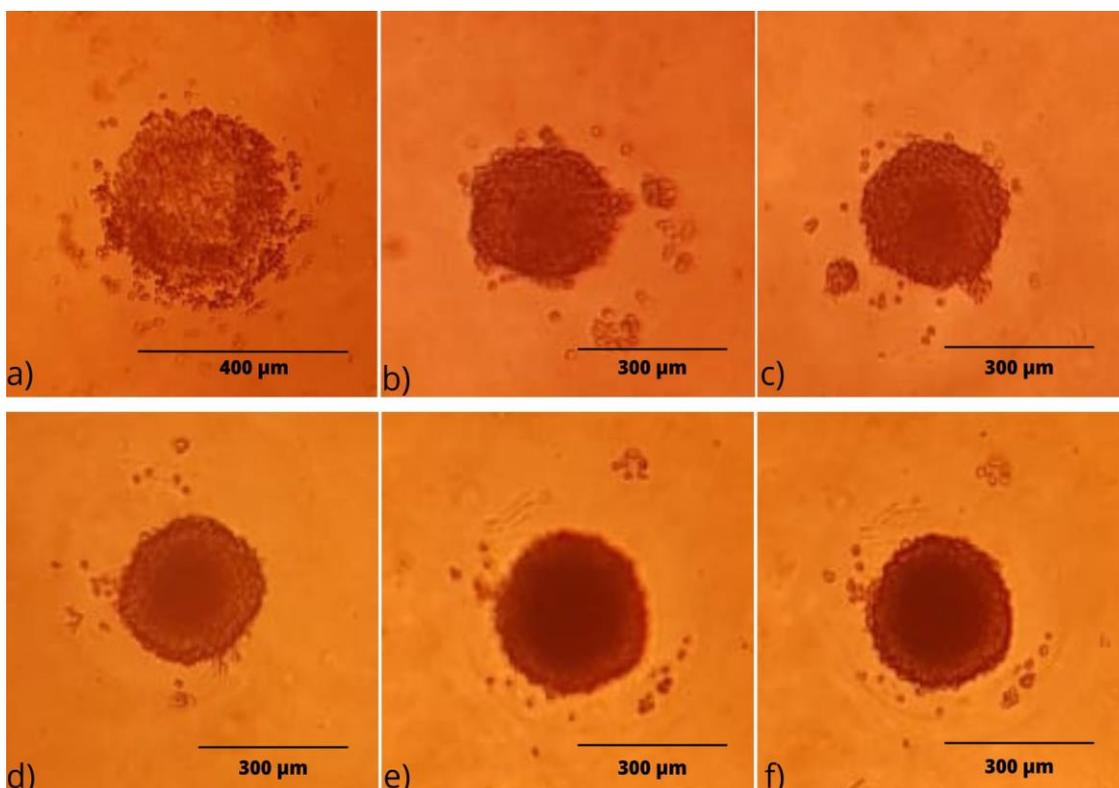
5.2. Esferóides Multicelulares

5.2.1. Constituição dos EM

A constituição dos EM da FVE foi bem-sucedida, como pode ser evidenciada na Figura 13. O início do processo de constituição dos EM corresponde ao dia da semeadura (hora 0), com as células dispersas nos

micropoços (Figura 13-A). Após 24 horas, ocorreu a aglomeração celular e a constituição dos EM (Figura 13-B). Depois de 48 horas, na Figura 13-C, foi possível observar o início do processo de compactação dos EM que progrediu até o último dia da cultura. Na Figura 13-F, apresentou o formato de esfera com a região central espessa, a morfologia em forma de esfera celular ficou mais definida, evidenciou a maturação com o EM constituído com a diferença da quantidade de células compactadas.

Figura 13: Micrografias da sequência temporal do processo de constituição e compactação dos EM. Objetiva de 4x. a) Dia 0 – Células suspensas no micropoço do molde de agarose. b) Dia 1 – Aglomeração celular. c) Dia 2 – Início do processo de compactação do EM. d) Dia 3 – Progressão do processo de compactação. e) Dia 4 – Perceptível um leve aumento do diâmetro. f) Dia 5 – Maturação e finalização da estrutura da agregação celular.



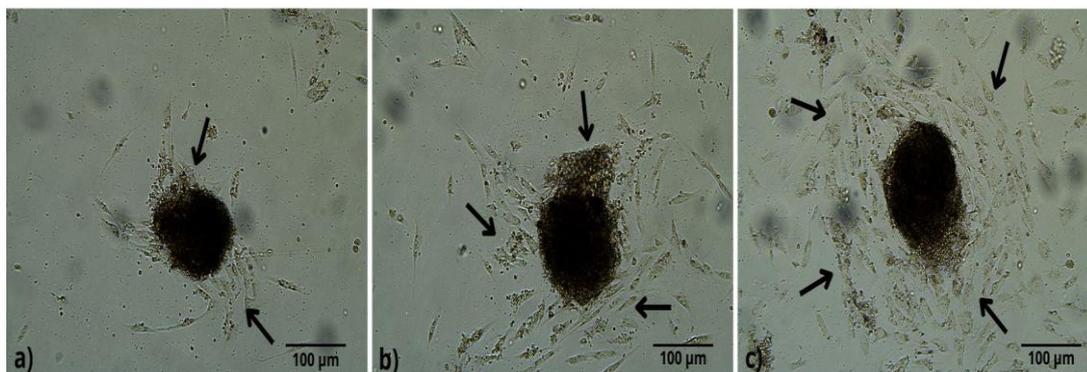
Fonte: Própria autora.

5.2.2. Caracterização dos potenciais regenerativos dos EM da FVE

A transferência dos EM foi realizada e, a partir de 36 horas de cultivo, resultou na adesão e desagregação dos EM, associada à migração e proliferação das células da FVE no substrato. O monitoramento do cultivo nos períodos de 48 e 72 horas evidenciou a progressão desses eventos,

culminando no aumento da ocupação da superfície de cultivo ao redor dos EM (Figura 14). Por intermédio dessa ocorrência, fica evidente o êxito do potencial de povoamento *in vitro* dos EM.

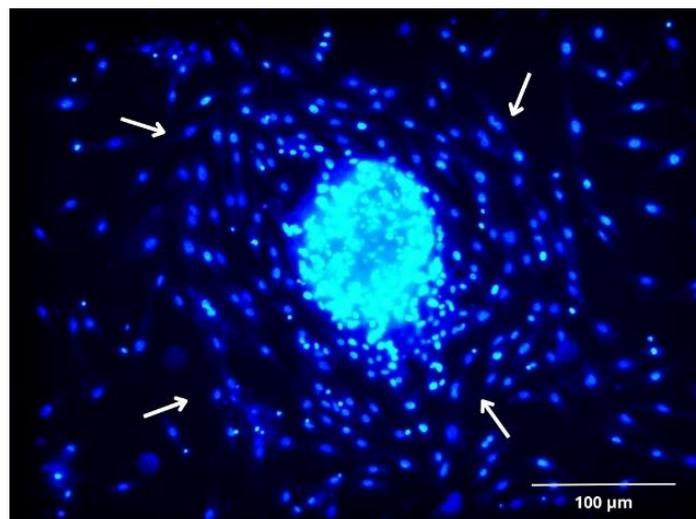
Figura 14: Sequência micrográfica dos EM em microscópio invertido pré-confocal em campo claro. a) As setas indicam a adesão do EM no substrato e o início do processo de desagregação nas primeiras 36 horas. b) Desalinhamento da margem dos EM indicado pela seta superior e as outras setas indicam mais migração das células no substrato após 48 horas. c) Depois de 72 horas, as setas indicam o povoamento das células, que se encontra mais amplificado – Objetiva 10x.



Fonte: Própria autora.

O resultado da marcação com DAPI identificou a coloração do núcleo celular em destaque na cor azul. Esta análise de fluorescência foi realizada no mesmo EM do período de 72 horas mencionado anteriormente e evidenciou os núcleos intactos das células. Ademais, demonstrou a viabilidade das células no processo de desagregação, porque o marcador fluorescente se destacou e também, apresentou o potencial de povoamento indicados pelas setas na Figura 15.

Figura 15: Micrografia em fluorescência com marcador DAPI na amostra de 72 horas após transferência. As setas indicam os núcleos das células, referente ao potencial de povoamento.

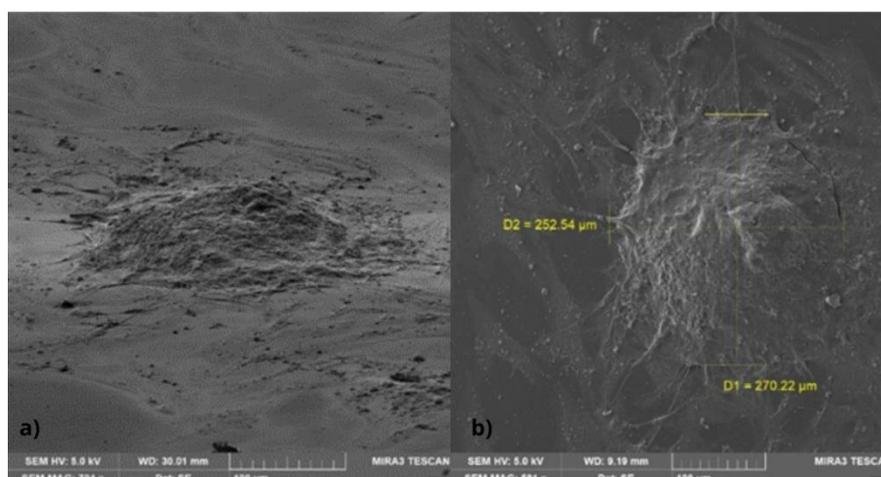


Fonte: Própria autora.

A caracterização do processo de povoamento foi complementada com as análises por MEV.

No período de 36 horas após a transferência os EM encontravam-se aderidos e espalhados na superfície de cultivo, com diâmetro látero-lateral variando entre 250 e 300 µm, circundados por células individualizadas, resultantes dos processos de desagregação, migração e proliferação. Foi possível evidenciar ainda o recobrimento dos EM com matriz extracelular, que se encontrava ancorada na superfície da placa de cultivo (Figura 16).

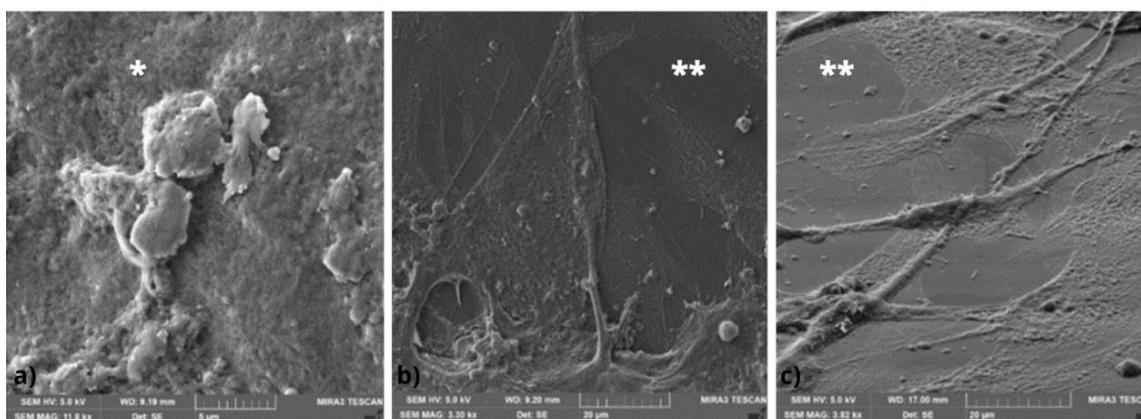
Figura 16: Micrografias obtidas no MEV na amostra de 36 horas após a transferência dos EM que apresentou a sua estrutura morfológica. a) Visão de perfil do EM. b) Visão súpero-inferior do EM.



Fonte: Própria autora.

Outros resultados foram observados com a microscopia de varredura sobre a superfície dos EM. O primeiro resultado apresentou esporádicas interações célula-célula presente na superfície da matriz extracelular do EM (Figura 17-A) e a célula interagindo com os filamentos da ancoragem de adesão dos EM na placa (Figura 17-B). Na Figura 17-C, foi possível visualizar os prolongamentos celulares pela presença de filamentos na superfície do substrato conectando células próximas e distantes referentes ao EM.

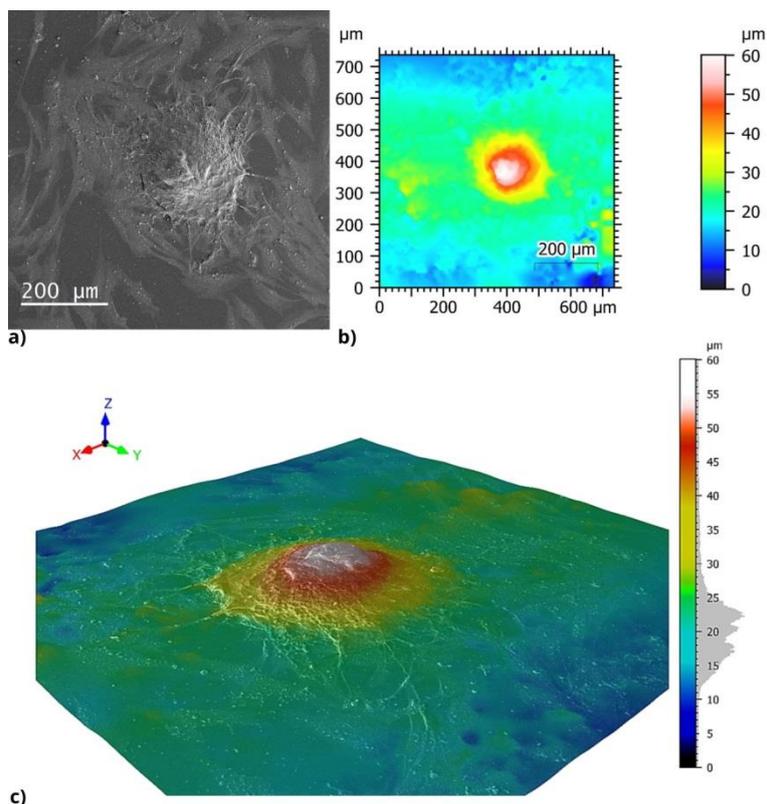
Figura 17: Micrografias obtidas pelo MEV. a) Evidência da junção célula-célula (* = superfície do EM). b) Micrografia que apresenta a interação célula-matriz-extracelular. c) Micrografia que apresenta os prolongamentos celulares dos EM (** = camada superficial da placa de cultura).



Fonte: Própria autora.

Os resultados das reconstruções estereoscópicas tridimensionais (3D) possibilitaram a melhor compreensão das modificações sofridas pelos EM em relação ao grau de achatamento resultante do espraiamento e desagregação. Como evidenciado na Figura 18, representativa do período de 36 horas após a transferência, houve uma significativa redução da altura dos EM.

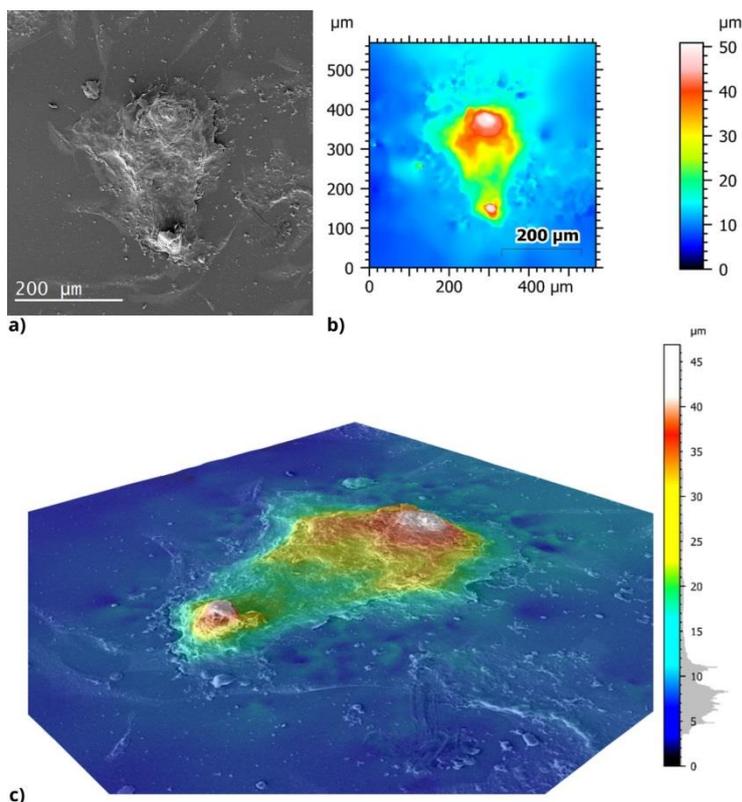
Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura – 36 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.



Fonte: Própria autora.

O resultado referente as reconstruções estereoscópicas 3D do período de 48 horas, apresentaram a altura com o pico de 46,8 μm do EM (Figura 19-C). Este resultado em comparação com o período de 36 horas do EM, mostrou uma redução da altura do EM de 13,2 μm, relativamente ao tempo exposto em cultura com possível afirmação do aumento da desagregação celular dos EM.

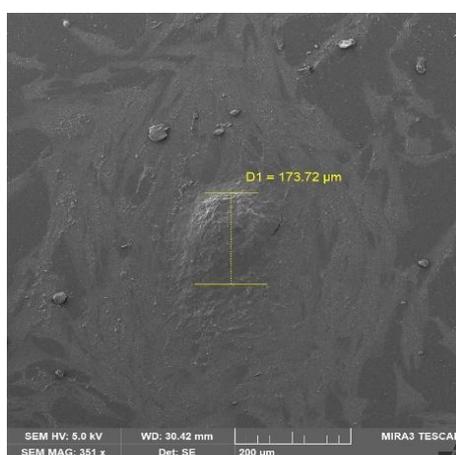
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura – 48 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.



Fonte: Própria Autora.

No período de 72 horas, os EM apresentaram o diâmetro de 173,72 µm, evidenciando a redução dimensional contínua da desagregação celular variando entre 50 a 100 µm, comparado aos períodos anteriores, também, foi identificado mais células ao seu redor, ilustrado na Figura 20.

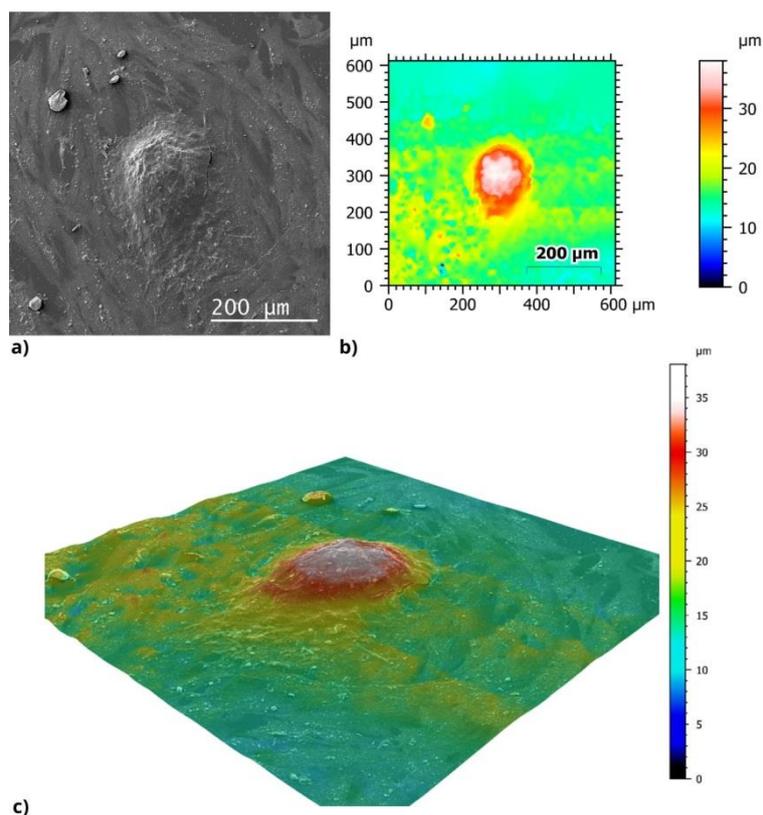
Figura 20: Micrografia obtida do MEV na amostra de 72 horas após transferência na placa de cultura apresentou a sua estrutura morfológica na visão súpero-inferior do EM.



Fonte: Própria autora.

A Figura 21 demonstra o resultado da reconstrução topográfica 3D aplicado no EM do período de 72 horas, a altura atingiu o pico de 38 μm do EM. Novamente, ao comparar com os períodos anteriores, foi perceptível o grau de achatamento resultante do espriamento e desagregação variando entre 8.8 a 22 μm , que correspondente ao período de 48 horas comparado ao período de 36 horas após transferência para a placa.

Figura 21: Microscopia eletrônica de varredura – 72 horas. a) Imagem do EM pelo MEV. b) Camada Topográfica 2D do EM. c) Reconstrução estereoscópica 3D.



Fonte: Própria Autoria.

A Tabela 4 apresenta os dados comparativos dos respectivos períodos, referentes a reconstrução estereoscópica das imagens nos parâmetros à rugosidade (RMS) e a altura do ponto máximo do EM.

Tabela 4: Apresentação dos dados obtidos pela reconstrução topográfica 3D dos períodos de 36, 48 e 72 horas após transferência na placa de cultura referentes a comparação da rugosidade e altura dos EM.

Amostra	Rugosidade RMS / μm	Altura do ponto máximo EM (μm)
36h	7,01	50,1
48h	6,67	39,9
72h	4,43	22,5

Fonte: Própria autora.

Existe uma tendência de diminuição da rugosidade RMS e da altura máxima dos EM. A diminuição da rugosidade está diretamente implícita na perda de textura pelo EM, devido à desagregação dos EM e a formação de matriz extracelular que proporcionou a redução das imperfeições superficiais, em relação à comparação das reconstruções topográficas 3D de 36 e 72 horas. Contudo, a amostra de 72 horas apresentou menor intensidade referente a presença de *pixels* brancos (de maior intensidade) em relação à amostra de 36 horas.

5.2.3. Avaliação dos efeitos modulatório e imuno-modulação dos EM da FVE

5.2.3.1. Dosagem das citocinas IL-6 e TGF- β 1

Os resultados obtidos das análises de dosagem das citocinas IL-6 e TGF- β 1, mostraram que os dados dos alvos moleculares evidenciaram a presença de ambas citocinas liberadas no meio condicionado da constituição dos EM, foi identificado a densidade de fluorescência para análise do potencial de modulação na IL-6 na concentração $\pm 809,2$ pg/mL ($\pm 66,03$ pg/mL). Entretanto, diante de um imprevisto de execução para a obtenção de o teste realizar com exatidão a curva, não foi possível obter a concentração exata do TGF- β 1. Portanto, este dado foi representado em absorbância na densidade de óptica $\pm 0,469$ pg/mL ($\pm 0,082$ pg/mL). De acordo com os dados obtidos, foi identificado que houve citocinas secretadas e que há influência do potencial de modulação pelos EM (Tabela 5).

Tabela 5: Dados dos resultados da dosagem de citocinas.

CITOCINAS	DOSAGEM	DESVIO-PADRÃO
IL-6	809,2 pg/mL	±66,03 pg/mL
TGF-β1	0,469 (DO)	±0,082 pg/mL (DO)

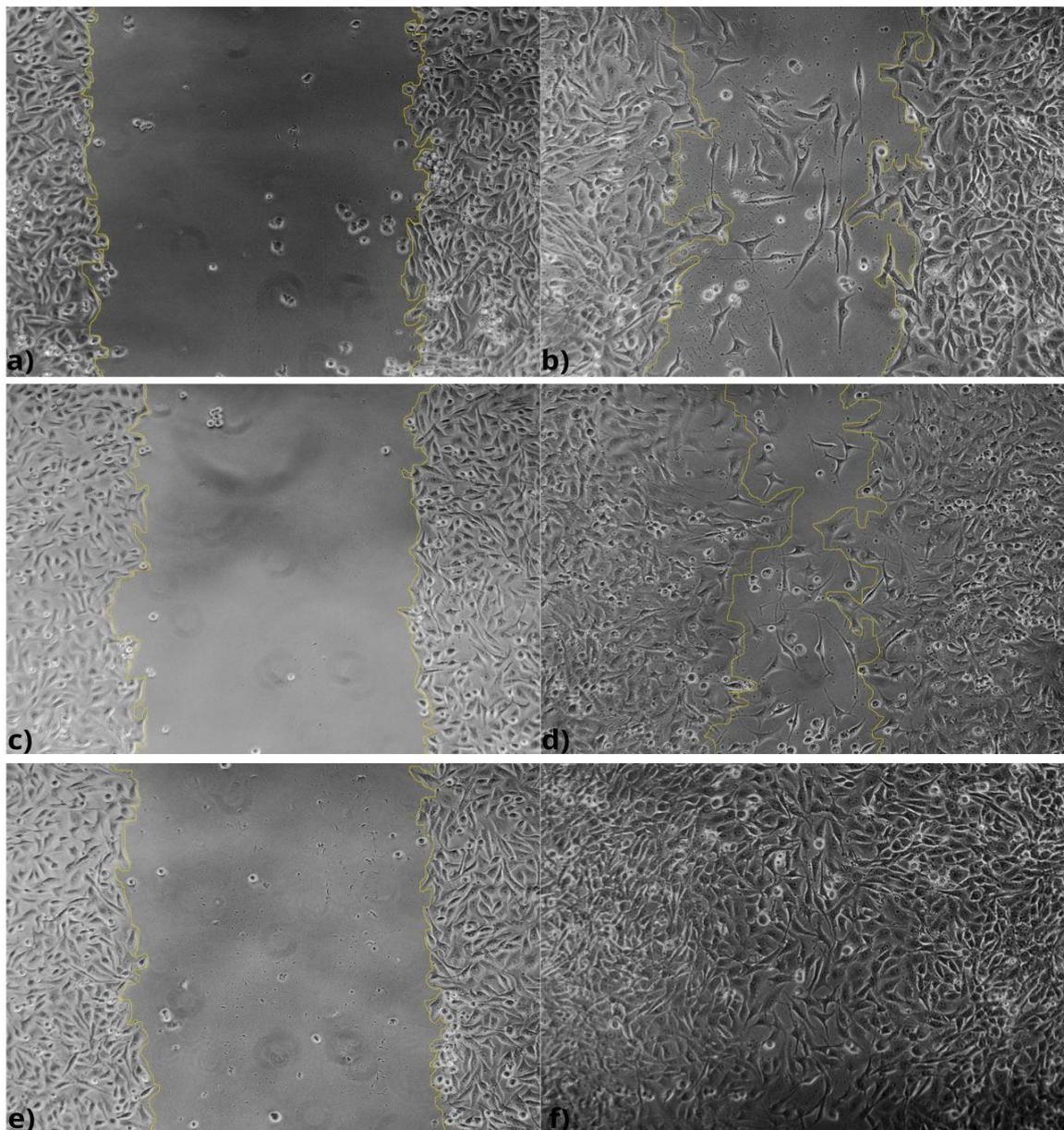
Fonte: Própria autora.

5.2.3.2. Ensaio de migração celular – Método *Wound Healing*

O resultado do ensaio de migração celular apresentou o fechamento da ranhura e identificou a influência do potencial de regeneração através da análise da migração e proliferação celular.

A comparação da ranhura nos períodos de 0 e 24 horas, foram evidenciados em micrografias obtidas em seu respectivo tempo, foi realizado a marcação da área, onde foi delimitada em amarelo para realçar a visualização de todo o fechamento da ranhura. No GC- (DMEM sem SFB), não houve o fechamento da ranhura (Figura 22-A e B). No CG+ (DMEM com 10% SFB), houve redução da área da ranhura, mas a migração das células não foi suficiente para fechar por completo toda a área (Figura 22-C e D). No GE (meio condicionado), resultou no fechamento completo da ranhura, identificando a migração e proliferação das células em toda a área (Figura 22-E e F).

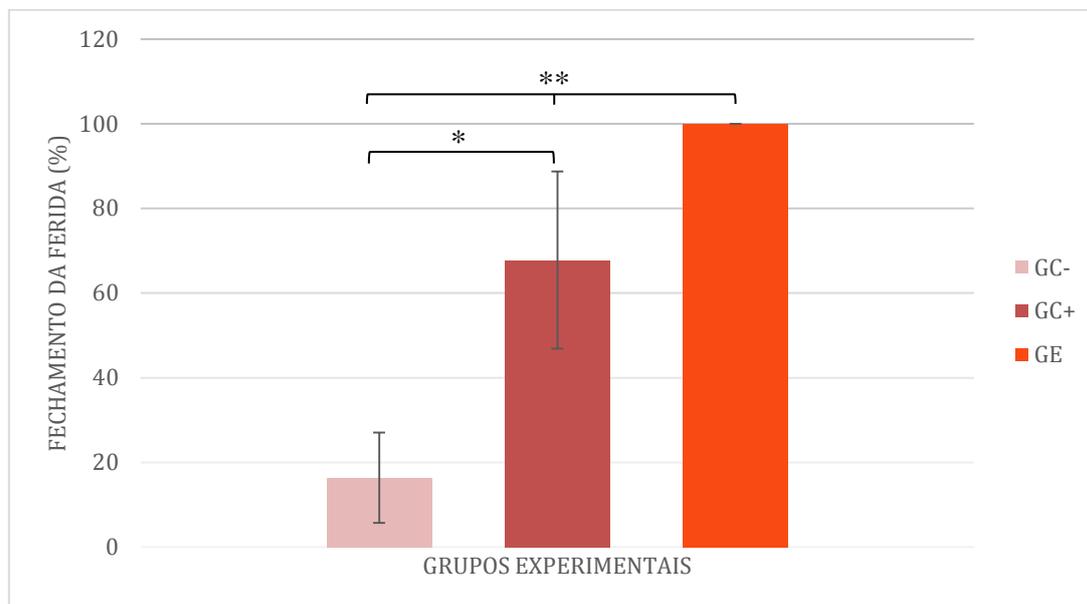
Figura 22: Comparação do ensaio de migração celular após a criação da ranhura de 0 hora e 24 horas. a) e b) Grupo controle negativo. c) e d) Grupo controle positivo. e) e f) Grupo experimental.



Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos nos respectivos períodos (0 - 24 horas) demonstraram uma redução na área correspondente à ranhura de 16%, 68% e 100% respectivamente para os grupos GC-, GC+ e GE (Figura 23).

Figura 23: Gráfico do ensaio de migração celular. (* = Diferença entre o GC- e o GC+ e ** = Diferença entre o GE e o GC+ e diferença entre o GE e o GC-, evidenciando que os resultados não são iguais entre os grupos).



Fonte: Própria autora.

5.3. Análise Estatística

A análise estatística foi aplicada no ensaio de migração celular e todo o resultado se encontra detalhado no Apêndice A.

A comparação das médias identificou que as médias das diferenças dos três grupos são diferentes com o valor ($p \leq 0,05$). Entretanto, vale ressaltar que o tamanho amostral é pequeno e o deve-se ter o cuidado nas interpretações.

Nas médias de comparação para a área de 0 hora nos três grupos independentes, concluiu que as médias das diferenças dos 3 grupos não são estatisticamente diferentes, apresentou o valor ($p > 0,05$).

Na área de 24 horas, as médias de comparação evidenciaram diferenças entre os três grupos com o valor ($p < 0,05$), porém nas comparações complementares de Fisher, apresentaram que as médias entre o GC- e GC+ são estatisticamente iguais, pois não houve o fechamento total da área, enquanto que, nas médias comparadas do GC- e GE e do GC+ e GE

identificaram que são estatisticamente diferentes no intervalo de confiança 95% para diferença de médias, devido ao fechamento total da área no GE.

6. DISCUSSÃO.

Os resultados do presente estudo mostram que foi obtida a prova de conceito estabelecida. Este é o primeiro registro de constituição de EM da FVE derivada do tecido adiposo subcutâneo humano.

A metodologia utilizada nesta pesquisa foi reproduzida por Laiding e colaboradores (2021), que consiste no uso da técnica de lipoaspiração convencional da gordura subcutânea da região abdominal em um método seguro para a obtenção da FVE via digestão enzimática. Dessa forma, o uso de enzimas facilitou a seleção de células nucleadas, resultante em um *pellet* celular de FVE. De acordo com o FDA (*Federal Drug Administration*) não permite o uso de processos que utilizam a digestão enzimática, devido às limitações apresentadas durante o manuseio excessivo das amostras no processo de digestão, aumentando o risco de contaminação (GHORBANI; JALALI; VAREDI, 2014; MANZANO *et al.*, 2022). Existem técnicas que alegam obter a FVE sem a necessidade da etapa de digestão enzimática (CENTURION; CABALLERO; WEISS, 2019). Ademais, por mais promissora que essa técnica possa ser ainda necessita de mais estudos.

A FVE se destaca por ser mais econômica e conveniente de obtenção comparada ao uso de outras técnicas para obtenção e isolamento das células tronco, por exemplo, células-tronco da medula óssea. Na literatura são encontrados diversos protocolos de extração da FVE e essa diferença não reduz a sua eficácia (ALETTO; FRANCESCO; MAFFULLI, 2022; ÖNER *et al.*, 2022). Uma variedade de células é encontrada na FVE, por exemplo, os pericitos são precursores de CTM e intimamente associados às células endoteliais, apresentam a similaridade *in natura*, que hipoteticamente, auxiliam no controle do microambiente do seu nicho, facilitando a resposta regenerativa (SÁ DA BANDEIRA; CASAMITJANA; CRISAN, 2017).

A simulação do nicho é um grande desafio, assim como, a permanência da viabilidade das CT em aplicações clínicas (KIM *et al.*, 2021; ÖNER *et al.*, 2022). As CT são destaque na terapia celular, o seu potencial de regeneração apresenta resultados promissores na medicina, porém, seu uso está em

constantes inovações, devido às limitações na aplicação de seu uso clínico (HAZRATI; DAVARAN; OMIDI, 2022; YASTI; AKGÜN; AKIN, 2022).

Em relação ao potencial terapêutico das CT, é necessário do cultivo bidimensional em larga escala com expansão excessiva de células em monocamada (ÖNER *et al.*, 2022). A utilização das CT isoladas em monocamadas 2D progrediu para a cultura 3D, apresentando vantagens com o uso de modelos *in vitro* baseados em células que imitam a função dos tecidos e órgãos *in vivo* com o potencial de reduzir o uso dos experimentos em animais nas pesquisas com desenvolvimento de novas terapêuticas com tratamentos medicamentosos, reparo e substituição de tecidos e órgãos (HAZRATI; DAVARAN; OMIDI, 2022; YLOSTALO, 2020). Oportunamente, isso favoreceu o embasamento desta pesquisa na constituição dos EM com o uso da FVE, que permitiu incluir um método eficiente e de curto prazo e não requer passagem e proliferação de CT em cultivo 2D, sendo um procedimento autólogo com baixo risco de rejeição (LABARRE; ZIMMERMANN, 2022; LEE *et al.*, 2020).

Para constatar a presença de CT nos EM derivados da FVE, com base nos critérios determinados na literatura à evidência do isolamento, adesão, proliferação e a caracterização de diferenciação do perfil mesenquimal em adipogênica e osteogênica foram identificadas. Porém, por ser uma pesquisa inédita ainda necessita de mais estudos, por exemplo, a análise futura com o uso de citometria de fluxo com marcadores específicos de moléculas de sinalização celular permitirão mais embasamento com análise mais fidedigna (ANTONYSHYN *et al.*, 2022; GHORBANI; JALALI; VAREDI, 2014; LISBOA *et al.*, 2021).

As células que constituem o aglomerado celular no cultivo 3D apresentam maior biocompatibilidade e interagem entre si via sinalização parácrina, a comunicação facilitada ocorre pela atividade de citocinas e fatores de crescimento que influenciam moléculas que alteram a forma, expressão gênica, citoesqueleto e a função das células que respondem ativamente aos comandos gerados à medida que as células se agregam no cultivo 3D (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2012; HAZRATI; DAVARAN; OMIDI, 2022; KIM *et al.*, 2023).

Jiang e colaboradores (2023) e Laschke & Menger (2017) relatam que a terapia celular com EM possui vantagens, pois, há um futuro brilhante para distúrbios incuráveis, doenças genéticas e degenerativas, entrega de drogas, redução do uso de modelos animais e produção biológica com a constituição de um órgão realista *in vitro*. O aglomerado celular *in vitro* fornece um ambiente semelhante ao *in vivo* propiciando um complexo funcional.

Os EM da FVE evidenciaram que o tamanho obtido nos resultados se encontrava com diâmetro dentro dos padrões retratados na literatura variando entre 100 a 400 μm , relacionado diretamente à densidade de semeadura e às características do modelo de constituição, assim como o tempo de cultivo, são considerados diâmetros favoráveis para a sobrevivência das células (LEE *et al.*, 2020; ONG *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2021). Ressalta-se que, quanto maior o seu tamanho, maior a dificuldade de difusão de nutrientes e oxigênio ao centro dos esferóides e maior o grau de necrose em sua região central (KIM *et al.*, 2023a; VADIVELU *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2021).

Os resultados apresentados referentes ao potencial de regeneração identificaram que a desagregação dos EM e o povoamento celular, conforme a migração das células houve o achatamento com diminuição da altura, reduzindo-se ao longo do tempo com a presença de matriz celular ao redor das células. Contudo, esses dados apresentados são importantes, pois, há poucos estudos que demonstram detalhadamente a caracterização de migração celular e a morfologia dos EM derivados da FVE, proporcionando oportunidades de análises futuras, como a histomorfometria para contribuir com o avanço na área com o cultivo 3D.

Di Stefano e colaboradores (2021) e Jiang e colaboradores (2023) relatam que os EM secretam proteínas e citocinas, tais como, interleucinas e fatores de crescimento capazes de modular o microambiente. Os resultados da avaliação dos efeitos modulatórios através da dosagem de citocinas realizados por ELISA, constataram a presença da IL-6 e TGF- β 1 na amostra deste estudo.

A interleucina IL-6 tem ação pró-inflamatória, enquanto, o fator de crescimento TGF- β 1 apresenta efeitos anti-apoptóticos e anti-fibróticos, quando a sua expressão é irregular apresenta distúrbios fibróticos, inflamação crônica e câncer. Por isso, a sua regulação é necessária e importante para o reparo tecidual, que ocorre por meio do processo de homeostase (iniciando a resposta imune, assim, as células participantes do processo de reparo iniciam a secreção de citocinas, promovendo a modulação com potencial regenerativo ideal do microambiente). Ambas citocinas dosadas, levam a restauração da homeostase do local da lesão que facilita a sinalização parácrina e autócrina no microambiente que contribui para o crescimento endotelial e remodelação tecidual (HASHIMOTO *et al.*, 2022; HAZRATI; DAVARAN; OMIDI, 2022; TZAVLAKI; MOUSTAKAS, 2020).

Vale ressaltar que, embora esses sejam os alvos selecionados para avaliar as biomoléculas secretadas, um número muito maior de outras moléculas devem ter sido liberadas e participado dos resultados encontrados. A literatura aponta que as mais evidenciadas foram o VEGF, IL-1, TNF- α , IL-31, EGF, HGF, INF- γ que participam ativamente na restauração tecidual (ONG, *et al.*, 2018; HASHIMOTO *et al.*, 2022).

O resultado do ensaio de migração celular evidenciou o fechamento completo do ensaio de ranhura, sugere-se que seja por mediadores liberados pelos EM da FVE que proporcionou o efeito modulório, influenciando fortemente no microambiente e apresentou eficácia do potencial regenerativo com o fechamento completo da ranhura, sugerindo-se o reparo da lesão da pele em modelo *in vitro*. Mediante a essa peculiaridade apresentada dos resultados, que seja possível sugerir a influência dessas citocinas secretadas na concentração das amostras do meio de cultura dos EM.

Com base nos resultados inéditos obtidos nesta pesquisa, o propósito *in vitro* é relevante e com potencial para a aplicação clínica com evidências da possibilidade de utilização do cultivo 3D da FVE, que sugere ser capaz de proporcionar, dentro do que se denomina terapia do nicho celular. Além de demonstrar positivamente a influência modulatória do microambiente, com

potencial regenerativo para diversas condições patológicas. Essa é a maior motivação desta pesquisa e ainda inspira para mais estudos futuros com perspectivas promissoras.

Os estudos futuros podem repetir esses experimentos e medir a expressão gênica e fenotípica da FVE com análises da variedade de substâncias e moléculas disponíveis no nicho, por exemplo, a análise de PCR e a proteômica.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Concluiu-se a validação da prova de conceito na constituição dos EM da FVE derivada do tecido subcutâneo humano.
- ✓ O potencial biológico da FVE em forma de EM permitiu caracterizar o processo de adesão, desagregação e migração celular em modelo *in vitro*.
- ✓ O potencial regenerativo apresentou respostas positivas da influência modulatória no microambiente em modelo *in vitro* com presença de citocinas secretados pelos EM da FVE, sugerindo-se o reparo da lesão cutânea.
- ✓ Esta pesquisa mostrou um resultado inédito, que espera contribuir com a ciência e inspirar no desenvolvimento de novas pesquisas a conduzirem mais caracterizações dos EM da FVE.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHILLI, T. M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. **Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids.** *Expert Opinion on Biological Therapy*, out. 2012.

ALETTO, C.; FRANCESCO, O.; MAFFULLI, N. **Knee intra-articular administration of stromal vascular fraction obtained from adipose tissue: A systematic review.** *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma.* Elsevier B.V., 1 fev. 2022.

ALMEIDA, V. M., BEZERRA, M. A., NASCIMENTO, J. C., & AMORIM, L. M. F. (2019). **Anticancer drug screening: Standardization of in vitro wound healing assay.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 55(6), 606–619. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190054>.

ALONSO-GOULART, V. et al. Mesenchymal stem cells from human adipose tissue and bone repair: a literature review. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 2, n. 1, p. 74–80, jan. 2018a.

ANTONYSHYN, J. A. et al. Vascular tissue engineering from human adipose tissue: fundamental phenotype of its resident microvascular endothelial cells and stromal/stem cells. **Biomaterials and Biosystems**, v. 6, p. 100049, jun. 2022.

ATALAY, S.; CORUH, A.; DENIZ, K. Stromal vascular fraction improves deep partial thickness burn wound healing. **Burns**, v. 40, n. 7, p. 1375–1383, 1 nov. 2014.

CARVALHO, R. A. DE et al. Poly-(lactic acid) and fibrin bioactive cellularized scaffold for use in bone regenerative medicine: Proof of concept. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 36, n. 3, p. 171–184, 1 maio 2021.

CENTURION, P.; CABALLERO, G.; WEISS, M. **Comment to: “Laser-Assisted Liposuction (LAL) Versus Traditional Liposuction: Systematic Review”.** *Aesthetic Plastic Surgery.* Springer New York LLC, 15 ago. 2019.

CENTURION, P.; NORIEGA, A. Fat preserving by laser 1210-nm. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 15, n. 1, p. 2–12, fev. 2013.

CHERNOFF, G.; BRYAN, N.; PARK, A. M. **Mesothelial Stem Cells and Stromal Vascular Fraction: Use in Functional Disorders, Wound Healing, Fat Transfer, and Other Conditions.** *Facial Plastic Surgery Clinics of North America.* W.B. Saunders, 1 nov. 2018.

CHU, G. Y. et al. **Stem cell therapy on skin: Mechanisms, recent advances and drug reviewing issues.** *Journal of Food and Drug Analysis.* Elsevier Taiwan LLC, 1 jan. 2018.

CHURCH, D. et al. **Burn wound infections. Clinical Microbiology Reviews**, abr. 2006.

COLOMBO, F. et al. Regenerative medicine: Clinical applications and future perspectives. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 5, n. 1, p. 1, 2017.

COLTRO, P. S. et al. Atuação da cirurgia plástica no tratamento de feridas complexas. p. 381–386, 2011.

DA BANDEIRA, D. Sá; CASAMITJANA, J.; CRISAN, M. **Pericytes, integral components of adult hematopoietic stem cell niches. Pharmacology & therapeutics**, v. 171, p. 104-113, 2017.

DECARLI, M. C. et al. **Cell spheroids as a versatile research platform: Formation mechanisms, high throughput production, characterization and applications. Biofabrication. IOP Publishing Ltd**, 1 jul. 2021.

DI STEFANO, A. B. et al. Cell quality evaluation with gene expression analysis of spheroids (3D) and adherent (2D) adipose stem cells. **Gene**, v. 768, 5 fev. 2021.

DRAGOO, J. L. et al. The essential roles of human adipose tissue: Metabolic, thermoregulatory, cellular, and paracrine effects. **Journal of Cartilage & Joint Preservation**, v. 1, n. 3, p. 100023, set. 2021.

DRAGOO, J. L.; CHANG, W. Arthroscopic Harvest of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells From the Infrapatellar Fat Pad. **American Journal of Sports Medicine**, v. 45, n. 13, p. 3119–3127, 1 nov. 2017.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 28 fev. 2005.

DURAN-ORTIZ, S.; BERRYMAN, D. E.; KOPCHICK, J. J. **Growth hormone impact on adipose tissue and aging. Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research. Elsevier Ltd**, 1 mar. 2019.

EL-SERAFI, A. T. et al. **Skin regeneration in three dimensions, current status, challenges and opportunities. Differentiation. Elsevier Ltd**, 1 jul. 2017.

FONSECA, N. M.; RODRÍGUEZ, A. A.; MODENESI, J. P.. **Caracterização da Superfície de Fratura Gerada por Fadiga em Soldas Subaquáticas Molhadas**. Dissertação de mestrado. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**, p. 1-96, 2018.

FRIAS, F. et al. Stromal Vascular Fraction Obtained From Subcutaneous Adipose Tissue: Ex-Obese and Older Population as Main Clinical Targets. **Journal of Surgical Research**, v. 283, p. 632–639, 1 mar. 2023.

GHORBANI, A.; JALALI, S. A.; VAREDI, M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: A non-enzymatic method. **Tissue and Cell**, v. 46, n. 1, p. 54–58, 2014.

GONZALEZ, A. C. D. O. et al. **Wound healing - A literature review. Anais Brasileiros de Dermatologia**. Sociedade Brasileira de Dermatologia, 1 set. 2016.

GUO, J. et al. **Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**. Churchill Livingstone, 1 fev. 2016.

HASHIMOTO, T. et al. IL-31-generating network in atopic dermatitis comprising macrophages, basophils, thymic stromal lymphopoietin, and periostin. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 2022.

HAZRATI, R.; DAVARAN, S.; OMIDI, Y. **Bioactive functional scaffolds for stem cells delivery in wound healing and skin regeneration. Reactive and Functional Polymers**. Elsevier B.V., 1 maio 2022.

HEARNDEN, R. et al. Isolation of stromal vascular fraction cell suspensions from mouse and human adipose tissues for downstream applications. **STAR Protocols**, v. 2, n. 2, 18 jun. 2021.

HSU, C. K. et al. **Mechanical forces in skin disorders. Journal of Dermatological Science**. Elsevier Ireland Ltd, 1 jun. 2018.

HSU, F. M. et al. Antibacterial polypeptide/heparin composite hydrogels carrying growth factor for wound healing. **Materials Science and Engineering C**, v. 112, 1 jul. 2020.

HSU, M. N. et al. **CRISPR technologies for stem cell engineering and regenerative medicine. Biotechnology Advances**. Elsevier Inc., 1 dez. 2019.

HYNDS, R. E.; BONFANTI, P.; JANES, S. M. Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 2, p. 139–150, fev. 2018.

JACQUES, E.; SUURONEN, E. J. **The Progression of Regenerative Medicine and its Impact on Therapy Translation. Clinical and Translational Science**. Blackwell Publishing Ltd, 1 maio 2020.

JIANG, Z. et al. **Genetically modified cell spheroids for tissue engineering and regenerative medicine. Journal of Controlled Release**. Elsevier B.V., 1 fev. 2023.

KHAN, W. S., ADESIDA, A. B., TEW, S. R., LONGO, U. G., & HARDINGHAM, T. E. (2012). **Fat pad-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cell-based adipose tissue repair strategies. Cell Proliferation**,

45(2), 111. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2184.2011.00804>.

KIM, S. W. et al. Delivery of a spheroids-incorporated human dermal fibroblast sheet increases angiogenesis and M2 polarization for wound healing. **Biomaterials**, v. 275, 1 ago. 2021.

KIM, W. et al. **Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration**. Bioactive Materials. KeAi Communications Co., 1 jan. 2023.

KUHLMANN, C. et al. **Current review of factors in the stem cell donor that influence the regenerative potential of adipose tissue-derived stem cells**. **Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie**. Georg Thieme Verlag, 1 dez. 2020.

LABARRE, K. W.; ZIMMERMANN, G. Infiltration of the Hoffa's fat pad with stromal vascular fraction in patients with osteoarthritis of the knee -Results after one year of follow-up-. **Bone Reports**, v. 16, 1 jun. 2022.

LAIDDING, S. R. et al. Combination of platelet rich plasma and stromal vascular fraction on the level of vascular endothelial growth factor in rat subjects experiencing deep dermal burn injury. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 64, 1 abr. 2021.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. **Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications**. **Biotechnology Advances**. Elsevier Inc., 1 nov. 2017.

LEE, J. S. JEE et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell spheroid sheet accelerates regeneration of ulcerated oral mucosa by enhancing inherent therapeutic properties. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 91, p. 296–310, 25 nov. 2020.

LISBOA, D. G. et al. Caracterização e viabilidade da fração vascular estromal proveniente da bola adiposa de Bichat associada ao plasma pobre em plaquetas - uma opção para tratamentos estéticos. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e37010817341, 14 jul. 2021.

LIUBAVICIUTE, A.; IVASKIENE, T.; BIZIULEVICIENE, G. **Modulated mesenchymal stromal cells improve skin wound healing**. **Biologicals**. Academic Press, 1 set. 2020.

MANSOURABADI, A. H. et al. **Cell therapy in transplantation: A comprehensive review of the current applications of cell therapy in transplant patients with the focus on Tregs, CAR Tregs, and Mesenchymal stem cells**. **International Immunopharmacology**. Elsevier B.V., 1 ago. 2021.

MANZANO, G. S. et al. Disease modifying therapy management of multiple sclerosis after stem cell therapies: A retrospective case series. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 63, 1 jul. 2022.

MAO, A. S.; MOONEY, D. J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 47, p. 14452–14459, 24 nov. 2015.

MAQSOOD, M. et al. **Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: Sources, characteristics, and application in regenerative medicine.** *Life Sciences*. Elsevier Inc., 1 set. 2020.

MASSARO, M. S. et al. **Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering: Immunogenicity versus positive cell stimulation.** *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd, 1 ago. 2021.

MORAES, Angela Maria; DECARLI, Monize Caiado; SILVA, Jorge Vicente Lopes da; NOGUEIRA, Julia Adami; DERNOWSEK, Janaina de Andréa; NETO, Paulo Inforçatti; REZENDE, Rodrigo Alvarenga; PEREIRA, Frederico David Alencar de Sena; MIRONOV, Vladimir. **Micromolde, obtido a partir de impressão 3D, para produção de esferoides celulares.** Titular: Universidade Estadual de Campinas. BRn.1421_ESFEROIDES. Depósito: 04 mar. 2022.

MUSHTAQ, M. U. et al. Impact of SARS-CoV-2 in Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Recipients. **Transplantation and Cellular Therapy**, v. 27, n. 9, p. 796.e1-796.e7, 1 set. 2021.

NAPOLITANO, A. P. et al. Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. **BioTechniques**, v. 43, n. 4, p. 494–500, out. 2007.

NGUYEN, A. et al. **Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 1: Current concepts and review of the literature.** *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. Churchill Livingstone, 1 fev. 2016.

NII, T.; KATAYAMA, Y. **Biomaterial-assisted regenerative medicine.** *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG, 2 ago. 2021.

ÖNER, Ç. et al. The effect of stromal vascular fraction in an experimental frostbite injury model. **Burns**, 2022.

ONG, Chin Siang et al. **Bioimpressão 3D usando células-tronco.** *Pesquisa pediátrica*, v. 83, n. 1, pág. 223-231, 2018.

PETIT-ZEMAN, S. **Regenerative medicine.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://biotech.nature.com>>.

PITTINGER, M. F. et al. **10. C. ZenerJ. Electrochem. Soc.** [s.l.] Academic Press, 1987. Disponível em: <www.sciencemag.org/feature/>.

PLEGUEZUELOS-BELTRÁN, P. et al. **Advances in spray products for skin regeneration. Bioactive Materials.** KeAi Communications Co., 1 out. 2022.

RAAJENDIRAN, A. et al. Identification of Metabolically Distinct Adipocyte Progenitor Cells in Human Adipose Tissues. **Cell Reports**, v. 27, n. 5, p. 1528-1540.e7, 30 abr. 2019.

RASOULI, M. et al. **The interplay between extracellular matrix and progenitor/stem cells during wound healing: Opportunities and future directions. Acta Histochemica.** Elsevier GmbH, 1 out. 2021.

ROGER, M. et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. **Journal of Anatomy**, v. 234, n. 4, p. 438–455, 1 abr. 2019.

SAMPOGNA, G.; GURAYA, S. Y.; FORGIONE, A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, n. 3, p. 101–107, set. 2015.

SANANTA, P. et al. Collagen scaffold for mesenchymal stem cell from stromal vascular fraction (biocompatibility and attachment study): Experimental paper. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 59, p. 31–34, 1 nov. 2020a.

SANANTA, P. et al. Adipose-derived stromal vascular fraction prevent bone bridge formation on growth plate injury in rat (in vivo studies) an experimental research. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 60, p. 211–217, 1 dez. 2020b.

SANTOS, Katharine Raquel Pereira dos; AGUIAR JUNIOR, Francisco Carlos Amanajás de; ANTONIO, Erivaldo Alves; SILVA, Fabricya Roberta da; SILVA, Keyla Tamires da; MARINHO, Ketsia Sabrina do Nascimento; LIMA JUNIOR, N. B. de. **Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA.** Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 1-36, 2021.

SHPICHKA, A. et al. **Skin tissue regeneration for burn injury. Stem Cell Research and Therapy.** BioMed Central Ltd., 15 mar. 2019.

SINGER E CLARK, 1999 - Cutaneous Wound Healing. [s.d.].

SORICE, S. et al. The role of stem cell therapeutics in wound healing: Current understanding and future directions. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 138, n. 3, p. 31S-41S, 2016.

SUH, A. et al. **Adipose-derived cellular and cell-derived regenerative therapies in dermatology and aesthetic rejuvenation. Ageing Research Reviews.** Elsevier Ireland Ltd, 1 set. 2019.

TANI, H. et al. Production of functional cardiomyocytes and cardiac tissue from human induced pluripotent stem cells for regenerative therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 164, p. 83–91, 1 mar. 2022.

TAVAKOLI, S.; KLAR, A. S. **Advanced hydrogels as wound dressings. Biomolecules.** MDPI AG, 1 ago. 2020.

TÊTÊ EDEM, K.-K. et al. Skin substitutes for extensive burn coverage in Togo: A retrospective study. **Burns Open**, v. 5, n. 1, p. 25–33, jan. 2021.

TOTTOLI, E. M. et al. **Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. Pharmaceutics.** MDPI AG, 1 ago. 2020.

TREICHEL, T. L. E. et al. Total fraction of mononuclear cell or stromal vascular fraction transplant associated with cellulosic membrane in experimental cutaneous wounds in rabbits. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 62–72, 2011.

TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. **TGF-B signaling. Biomolecules.** MDPI AG, 1 mar. 2020.

VADIVELU, R. K. et al. Liquid marbles as bioreactors for the study of three-dimensional cell interactions. **Biomedical Microdevices**, v. 19, n. 2, 1 jun. 2017.

VATER, C. et al. Lecithin-based nanoemulsions of traditional herbal wound healing agents and their effect on human skin cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 170, p. 1–9, 1 jan. 2022.

WOAPPI, Y. et al. Self-assembling 3D spheroid cultures of human neonatal keratinocytes have enhanced regenerative properties. **Stem Cell Research**, v. 49, 1 dez. 2020.

XIONG, M. et al. **The novel mechanisms and applications of exosomes in dermatology and cutaneous medical aesthetics. Pharmacological Research.** Academic Press, 1 abr. 2021.

YAMADA, S.; BEHFAR, A.; TERZIC, A. **Regenerative medicine clinical readiness. Regenerative Medicine.** Future Medicine Ltd., 1 mar. 2021.

YANAGI, T. et al. Three-dimensional spheroids of dedifferentiated fat cells enhance bone regeneration. **Regenerative Therapy**, v. 18, p. 472–479, 1 dez. 2021.

YASTI, A. Ç.; AKGÜN, A. E.; AKIN, M. Use of stromal vascular fraction stem cell therapy for functional and cosmetic outcomes in a young female patient with deep dermal flame burns on the face. **Burns Open**, v. 6, n. 3, p. 116–119, jul. 2022.

YLOSTALO, J. H. **3D Stem Cell Culture. CellsNLM (Medline)**, 27 set. 2020.

ZAKRZEWSKI, W. et al. **Stem cells: Past, present, and future. Stem Cell Research and Therapy.** BioMed Central Ltd., 26 fev. 2019.

ZHENG, Z. et al. Polydopamine-modified collagen sponge scaffold as a novel dermal regeneration template with sustained release of platelet-rich plasma to accelerate skin repair: A one-step strategy. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 8, p. 2613–2628, 1 ago. 2021.

9. APÊNDICE – Análise estatística dos dados

Grupo controle positivo

	Área 0	Área 24
Poço 1	3.041.193	252.003
Poço 2	4.491.501	1.848.606
Poço 3	4.393.434	2.068.311

Grupo controle negativo

	Área 0	Área 24
Poço 1	2.582.259	2.457.507
Poço 2	3.059.286	2.491.209
Poço 3	3.229.221	2.394.303

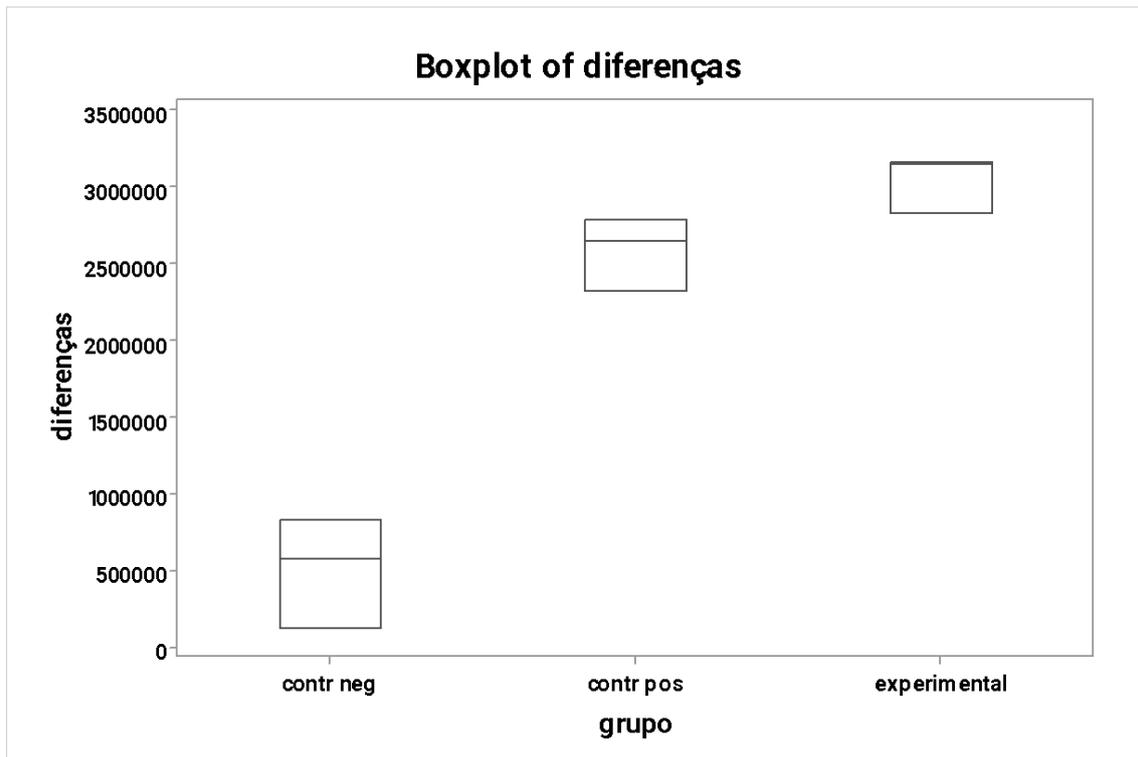
Grupo experimental

Poço 1	2.822.778	0
Poço 2	3.155.427	0
Poço 3	3.146.313	0

	area 0	area 24	area 0	area 24	area 0	area 24
Row	positivo	positivo	negativo	negativo	experimental	experimental
1	3041193	252003	2582259	2457507	2822778	0
2	4491501	1848606	3059286	2491209	3155427	0
3	4393434	2068311	3229221	2394303	3146313	0

Diferenças (área 0 – área 24) para os 3 grupos

	dif contr	dif contr	dif
Row	pos	neg	experimental
1	2789190	124752	2822778
2	2642895	568077	3155427
3	2325123	834918	3146313





Uso de ANOVA (análise de variância) para comparação de médias

(1) Comparação das médias das diferenças para os 3 grupos independentes (uso de um modelo de ANOVA (análise de variância) para os dados).

One-way ANOVA: diferenças versus grupo

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor Levels Values
 grupo 3 contr neg; contr pos; experimental

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
grupo	2	1,09319E+13	5,46593E+12	74,24	0,000

Error 6 4,41743E+11 73623871799
 Total 8 1,13736E+13

Conclusão: As médias das diferenças dos 3 grupos são estatisticamente diferentes (valor-p < 0,05).

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
271337	96,12%	94,82%	91,26%

Means

grupo	N	Mean	StDev	95% CI
contr neg	3	509249	358719	(125924; 892574)
contr pos	3	2585736	237255	(2202411; 2969061)
experimental	3	3041506	189479	(2658181; 3424831)

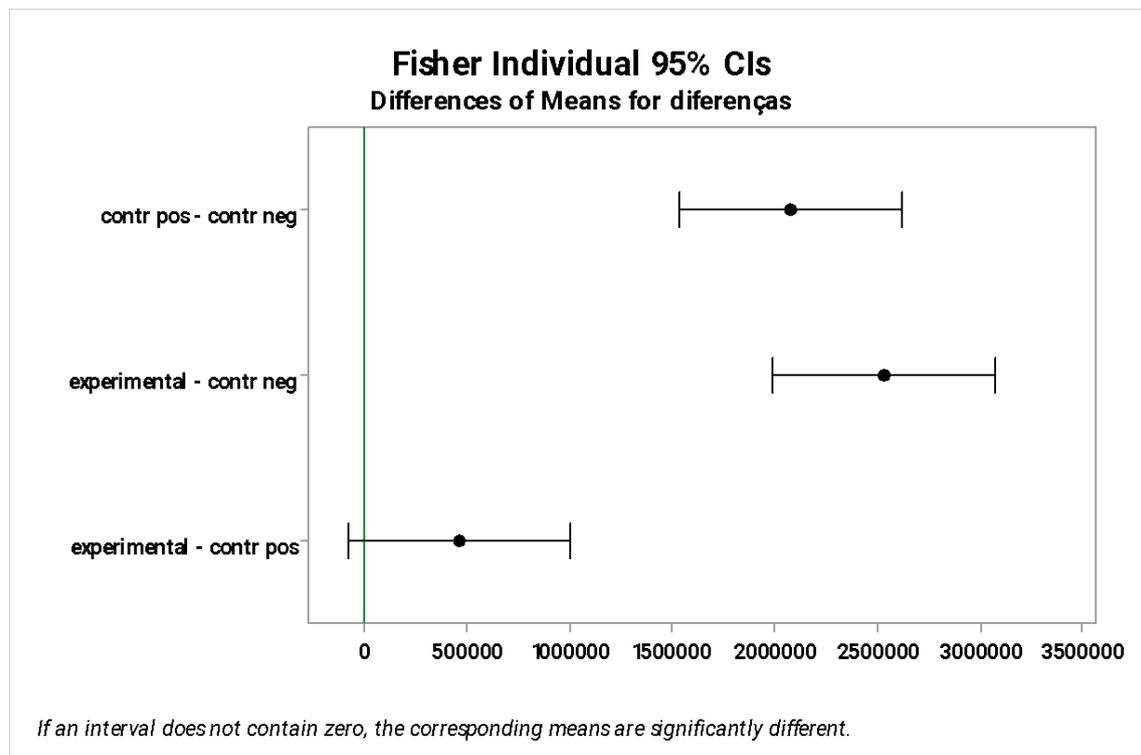
Pooled StDev = 271337

Fisher Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Fisher LSD Method and 95% Confidence

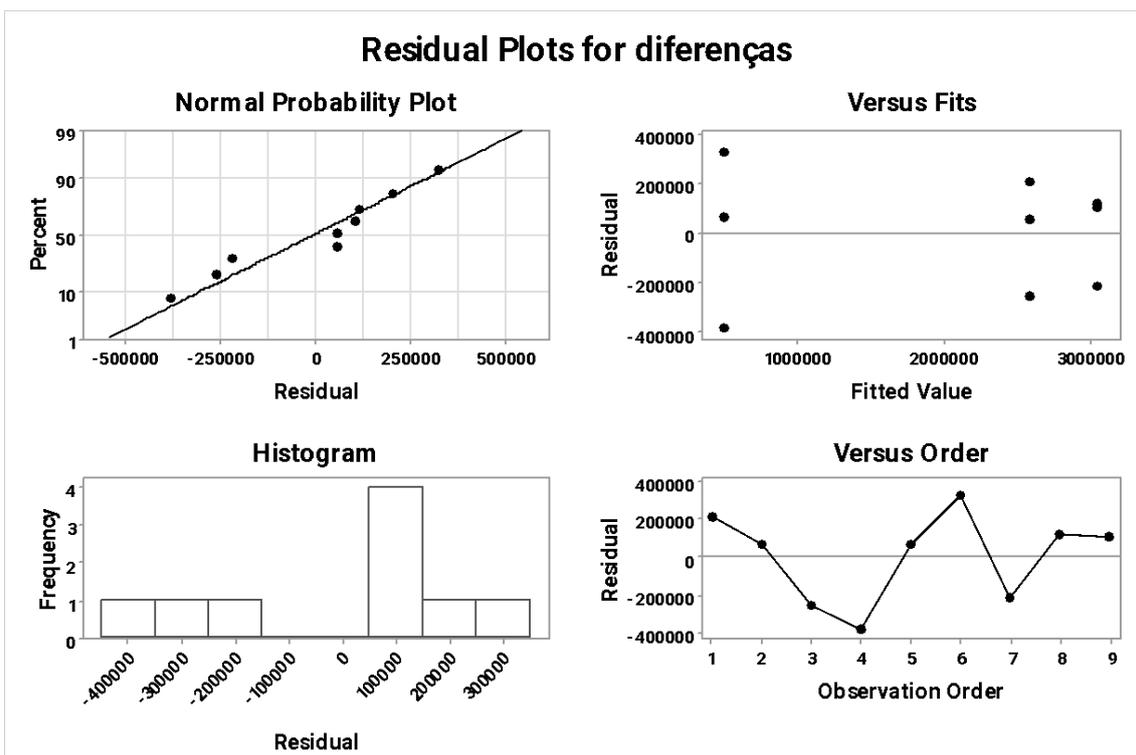
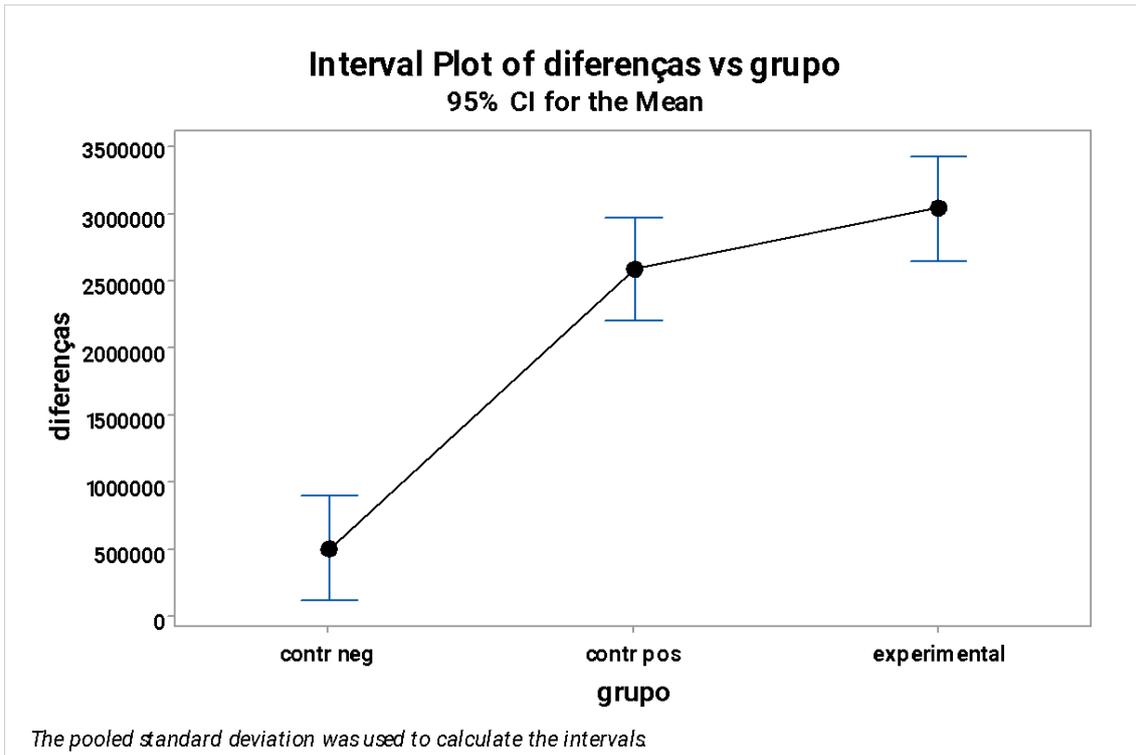
grupo	N	Mean	Grouping
experimental	3	3041506	A
contr pos	3	2585736	A
contr neg	3	509249	B

Means that do not share a letter are significantly different.



Conclusões das comparações de Fisher dois a dois (intervalos de confiança 95% para as diferenças de médias):

- A média das diferenças entre controle negativo e controle positivo são diferentes (valor zero não está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias das diferenças). Assim a média das diferenças controle negativo e a média das diferenças controle positivo são estatisticamente diferentes.
- A média das diferenças entre experimental e controle negativo são diferentes (valor zero não está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias). Assim, a média das diferenças experimentais e a média das diferenças de controle negativo são estatisticamente diferentes.
- Médias das diferenças entre experimental e controle positivo são iguais (valor zero está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias). Assim a média das diferenças experimentais e a média das diferenças de controle positivo são estatisticamente iguais.
- Isso também é confirmado pela figura abaixo (intervalos de confiança 95% para as médias das diferenças em cada grupo).



Conclusão: Suposições são necessárias para o modelo de ANOVA (normalidade e variância constante para os resíduos) foram verificadas.

Nota: Como o tamanho amostral é muito pequeno, deve-se ter cuidado nas interpretações.

(2) Comparação das médias para área 0 para os 3 grupos independentes (uso de um modelo de ANOVA (análise de variância) para os dados.

One-way ANOVA: area 0 versus grupo

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
grupo	3	contr neg; contr pos; experimental

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
grupo	2	1,91652E+12	9,58258E+11	3,57	0,095
Error	6	1,61066E+12	2,68443E+11		
Total	8	3,52717E+12			

Conclusão: As médias das diferenças dos 3 grupos não são estatisticamente diferentes (valor-p = 0,095 > 0,05).

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
518115	54,34%	39,11%	0,00%

Means

grupo	N	Mean	StDev	95% CI
contr neg	3	2956922	335408	(2224968; 3688876)
contr pos	3	3975376	810511	(3243422; 4707330)
experimental	3	3041506	189479	(2309552; 3773460)

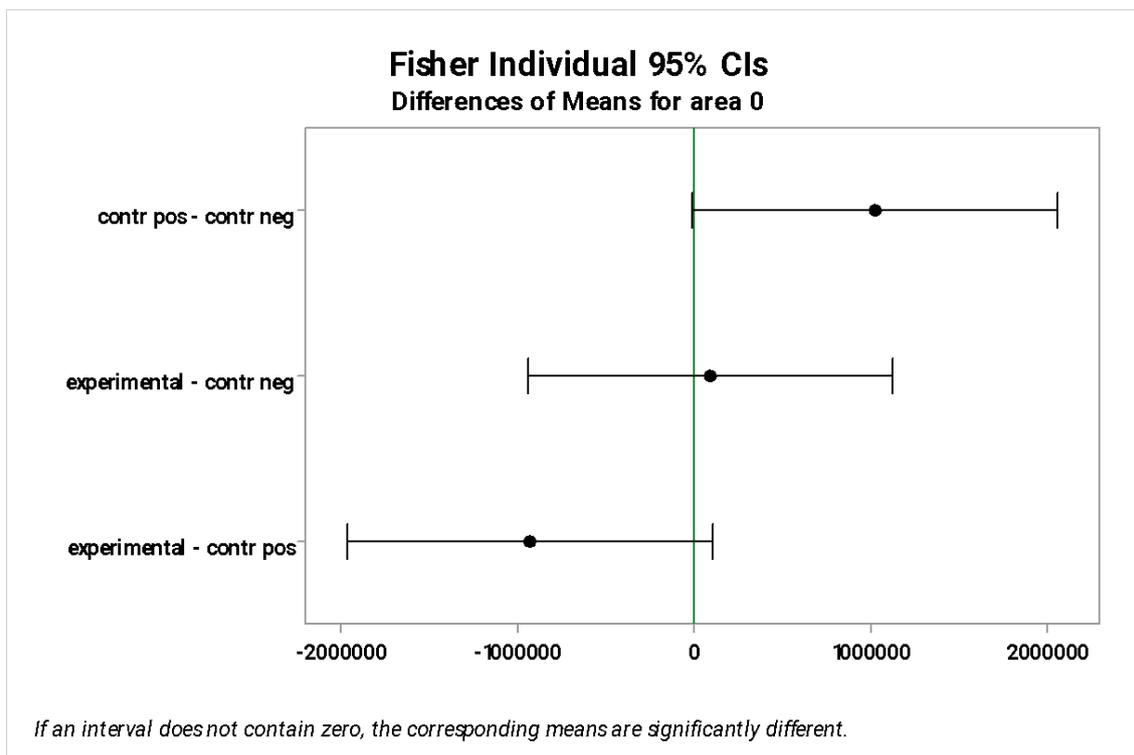
Pooled StDev = 518115

Fisher Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Fisher LSD Method and 95% Confidence

grupo	N	Mean	Grouping
contr pos	3	3975376	A
experimental	3	3041506	A
contr neg	3	2956922	A

Means that do not share a letter are significantly different.

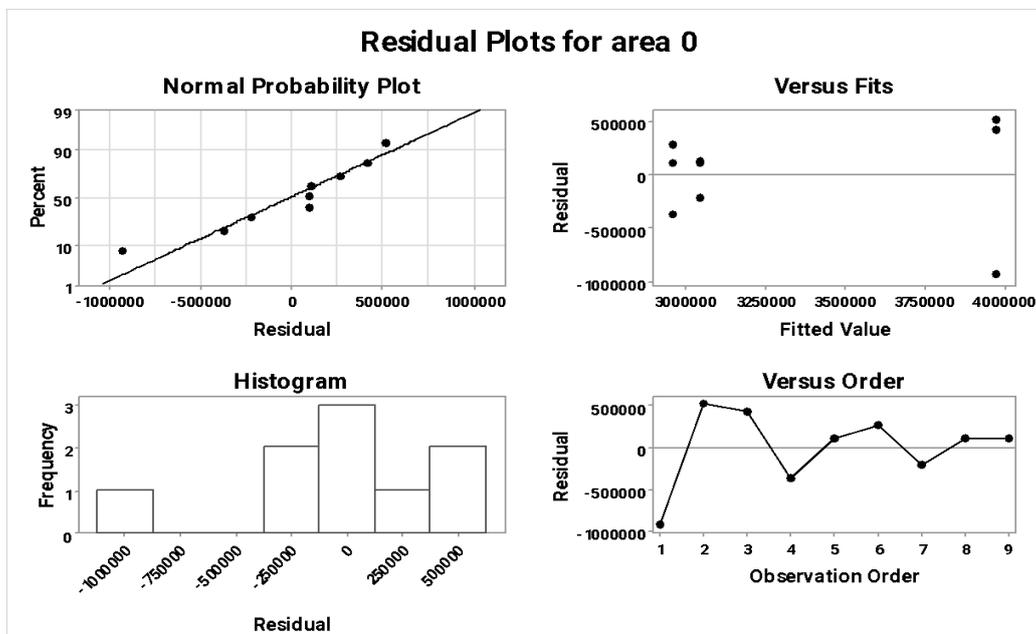
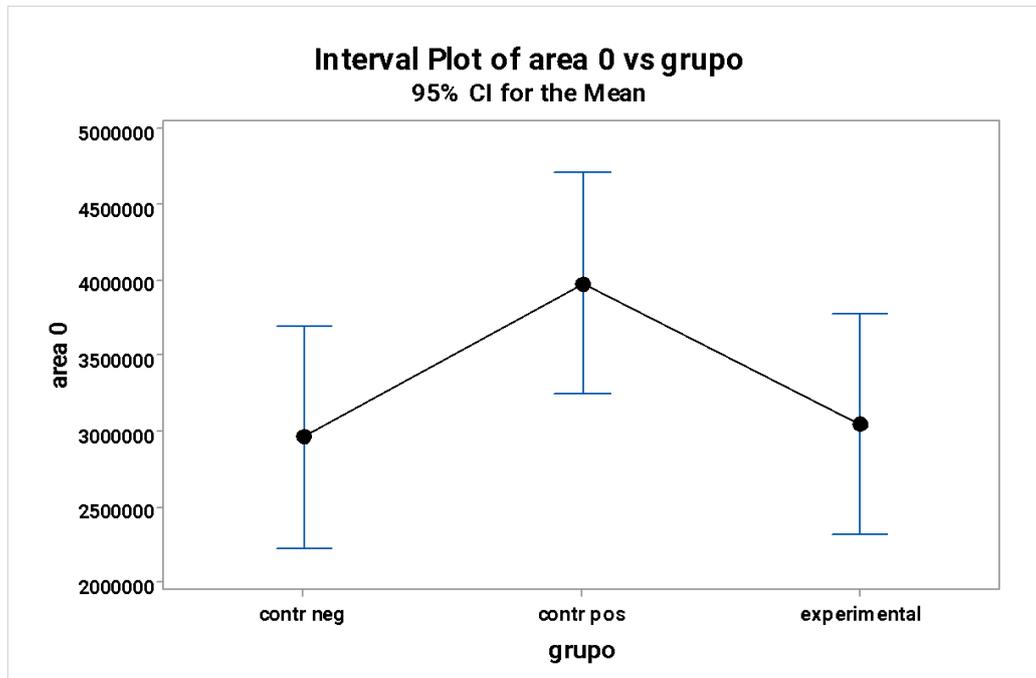


Conclusões das comparações de Fisher dois a dois (intervalos de confiança 95% para as diferenças de médias):

- Média das áreas de 0 horas entre controle negativo e controle positivo não são diferentes (valor zero está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias das áreas 0 horas, apesar do valor zero mostrar que estava quase no limite inferior). Assim, a média da área 0 horas (controle negativo) e a média da área 0 horas (controle positivo) são estatisticamente iguais.
- Média das áreas 0 horas entre experimental e controle negativo não são diferentes (valor zero está incluído no intervalo de confiança 95% para diferença de médias de área 0 horas). Assim, a média da área 0 horas (experimental) e a média da área 0 horas (controle negativo) são estatisticamente iguais.
- Médias das áreas 0 horas entre experimental e controle positivo não são diferentes (valor zero está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias das áreas 0 horas). Assim, a média da área 0 horas

(experimental) e a média da área 0 horas (controle positivo) são estatisticamente iguais.

- Isso também é confirmado pela figura abaixo (intervalos de confiança 95% para as médias das áreas 0 horas em cada grupo), pois os intervalos de confiança 95% para as médias são superpostos.



Conclusão: Suposições foram necessárias para o modelo de ANOVA (normalidade e variância constante para os resíduos) serem verificadas.

(3) Comparação das médias para área 24 para os 3 grupos independentes (uso de um modelo de ANOVA (análise de variância) para os dados.

One-way ANOVA: área 24 versus grupo

Method

Null hypothesis All means are equal
 Alternative hypothesis At least one mean is different
 Significance level $\alpha = 0,05$

Equal variances were assumed for the analysis.

Factor Information

Factor	Levels	Values
grupo	3	contr neg; contr pos; experimental

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
grupo	2	9,04164E+12	4,52082E+12	13,77	0,006
Error	6	1,97030E+12	3,28384E+11		
Total	8	1,10119E+13			

Conclusão: As médias das diferenças dos 3 grupos são estatisticamente diferentes (valor- $p = 0,006 < 0,05$).

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
573048	82,11%	76,14%	59,74%

Means

grupo	N	Mean	StDev	95% CI
contr neg	3	2447673	49196	(1638114; 3257232)
contr pos	3	1389640	991328	(580081; 2199199)
experimental	3	0,000000	0,000000	(-8,09559E+05; 8,09559E+05)

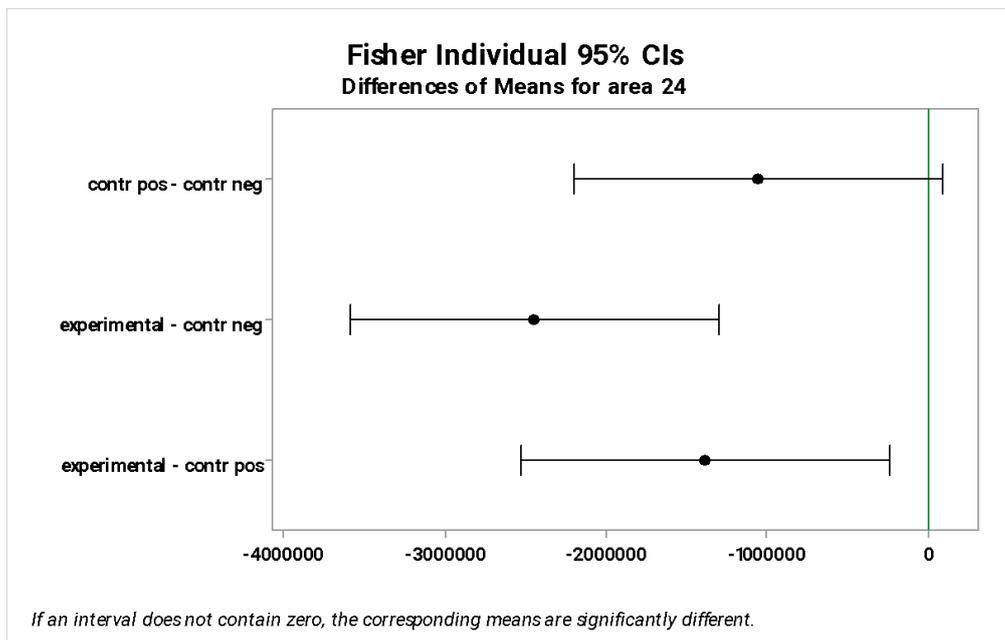
Pooled StDev = 573048

Fisher Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Fisher LSD Method and 95% Confidence

grupo	N	Mean	Grouping
contr neg	3	2447673	A
contr pos	3	1389640	A
experimental	3	0,000000	B

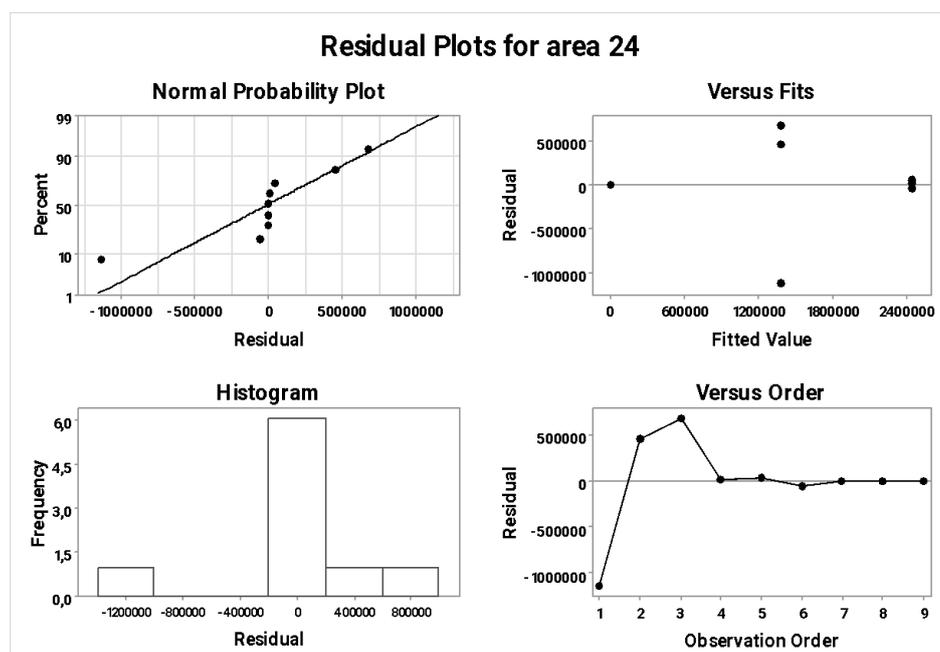
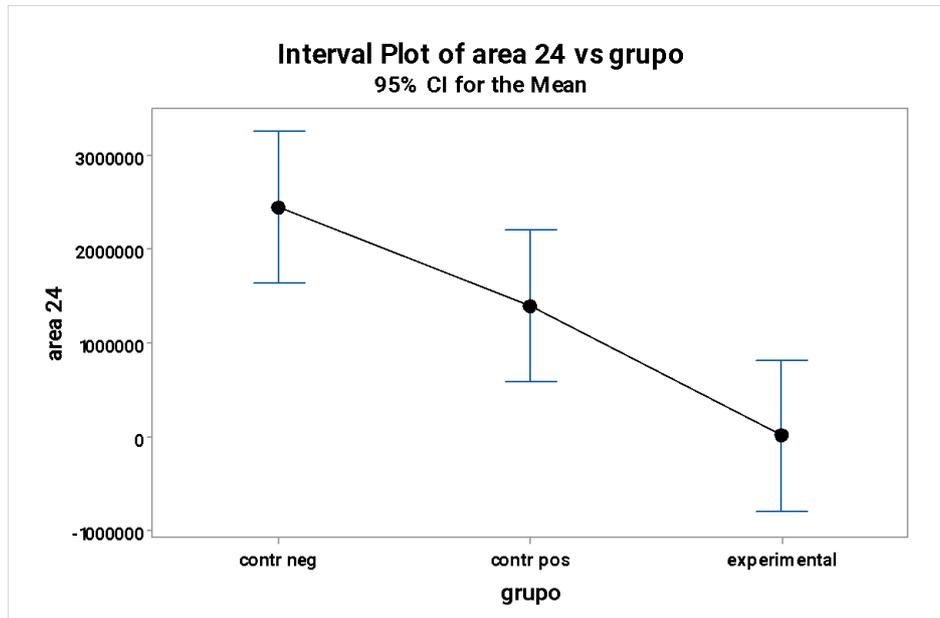
Means that do not share a letter are significantly different.



Conclusões das comparações de Fisher dois a dois (intervalos de confiança 95% para as diferenças de médias):

- Média das áreas 24 horas após, entre controle negativo e controle positivo não são diferentes (valor zero está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias das áreas 24, apesar do valor zero identificar que estava quase no limite inferior). Assim, a média da área 24 horas (controle negativo) e a média da área 24 horas (controle positivo) são estatisticamente iguais.
- Média das áreas 24 horas entre experimental e controle negativo são diferentes (valor zero não está incluído no intervalo de confiança 95% para diferença de médias de área 24). Assim, a média da área 24 horas (experimental) e a média da área 24 horas (controle negativo) são estatisticamente diferentes.
- Médias das áreas 24 horas entre experimental e controle positivo são diferentes (valor zero não está incluído no intervalo de confiança 95% para a diferença de médias das áreas 24 horas). Assim, a média da área 24 horas (experimental) e a média da área 24 horas (controle positivo) são estatisticamente diferentes

- Isso também é confirmado pela figura abaixo (intervalos de confiança 95% para as médias das áreas 24 horas em cada grupo).



Conclusão: Suposições foram necessárias para o modelo de ANOVA (normalidade e variância constante para os resíduos) foram razoavelmente verificadas.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Bloco C, Centro Araraquara SP CEP: 14801-320 Telefone: (16) 3301.7263
www.uniara.com.br/comite-de-etica

regenerativa, com a descoberta de ferramentas terapêuticas que possam ajudar na cura de doenças e no futuro, poder ser beneficiada dos recursos proporcionado por essa nova técnica de maneira direta e indireta. E a participação neste projeto deverá ter a duração de no máximo 30 minutos em um único encontro, tempo estimado para leitura, esclarecimentos e assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE);

4. As participantes não terão nenhuma despesa ao participar da pesquisa e poderão retirar sua concordância na continuidade da pesquisa a qualquer momento.

5. Não há nenhum valor econômico a receber ou a pagar às voluntárias pela participação, no entanto, caso haja qualquer despesa decorrente desta participação haverá o seu ressarcimento pelos pesquisadores.

6. Caso ocorra algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, as voluntárias poderão pleitear indenização, segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde.

7. Meu nome como doadora voluntária será preservado, assegurando assim a minha privacidade e o sigilo permanecerá. E quando eu desejar terei livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas repercussões.

8. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para fins desta pesquisa, e os resultados poderão ser publicados.

9. A Fração Vascular Estromal e as células da Gordura doadas serão utilizadas, única e exclusivamente, para fins dessa pesquisa. Os constituintes não utilizados serão descartados em recipientes específicos de descarte para amostras biológicas para posterior incineração;

10. Os resultados desta pesquisa contribuirão com a determinação da eficácia desses recursos, que poderão ser utilizados futuramente no tratamento de lesões da pele.

Qualquer dúvida, pedimos a gentileza de entrar em contato com Jessica Michelle de Novais, mestranda e pesquisador responsável pela pesquisa, telefone: (16) 99168-3072, e-mail: jessica.novais@uniara.edu.br, com o pesquisador e orientador da pesquisa André Capaldo Amaral, telefone: (16) 99769-0095, e-mail: acamaral@uniara.edu.br e/ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Uniara, localizado na Rua Voluntários da Pátria nº 1309 - bloco C, no Centro da cidade de Araraquara-SP, telefone: (16) 3301.7263, e-mail: comitedeetica@uniara.com.br, atendimento de segunda a sexta-feira das 08h00min. – 13h00min. - 14h00min – 17h00min, e/ou com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, telefone (61) 3315.5877, e-mail: conep@saude.gov.br.

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____

Página 2 de 3

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA**

Rua Voluntários da Pátria, 1309 Bloco C, Centro – Araraquara SP – CEP: 14801-320 – Telefone: (16) 3301.7263
www.uniara.com.br/comite-de-etica

Eu, _____, RG nº _____ declaro ter sido informada e concordo em ser participante do Projeto de pesquisa acima descrito, cedendo à gordura de descarte da Cirurgia Plástica de lipoaspiração.

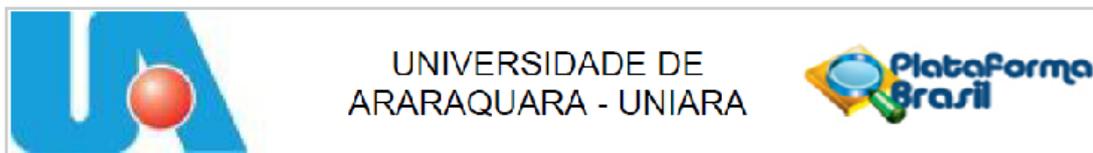
_____, ____ de _____ de 2022.

Assinatura da participante

Jessica Michelle de Novais
Assinatura da Responsável por obter o consentimento

Rubrica do pesquisador: _____ Rubrica do participante: _____.

10.2. ANEXO II – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FRAÇÃO VASCULAR ESTROMAL DERIVADA DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO NO TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS: PROVA DE CONCEITO

Pesquisador: Jessica Michelle de Novais

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 52807721.0.0000.5383

Instituição Proponente: ASSOCIACAO SAO BENTO DE ENSINO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.241.963

Apresentação do Projeto:

A ferida profunda da pele representa uma condição clínica que determina a incapacidade de regeneração espontânea, determinando graves consequências físicas aos seus portadores. Atualmente, resultados promissores relacionados ao uso da fração vascular estromal (FVE) derivada do tecido adiposo sobre o reparo de feridas decorrentes de queimaduras vêm sendo evidenciados. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar os mecanismos modulatórios envolvidos no processo. Este projeto tem como objetivo estabelecer uma prova de conceito a respeito da influência modulatória de FVE derivada do tecido adiposo humano, e cultivada como esferoides multicelulares, sobre o modelo in vitro para cicatrização de feridas. Para tal, será extraída uma amostra de tecido adiposo de cinco voluntárias por meio do procedimento cirúrgico de lipoaspiração. Em seguida, será realizado o processo de centrifugação para obtenção da FVE. A FVE passará pelo procedimento de isolamento e caracterização do perfil mesenquimal das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. Logo após será realizado o cultivo e a semente celular nos poços de agarose para constituição dos esferoides celulares, posteriormente será realizado a avaliação do efeito modulatório da FVE através do ensaio de migração celular. A análise estatística dos resultados utilizará procedimentos de estatística qualitativa descritiva básica e o teste de análise t-Student, com significância estatística adotada de 5% (p 0,05).

Hipótese:

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309

Bairro: Centro

CEP: 14.801-320

UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-7263

Fax: (16)3301-7144

E-mail: comitedeetica@uniara.com.br



UNIVERSIDADE DE
ARARAQUARA - UNIARA



Continuação do Parecer: 5.241.963

Embora os estudos sobre o uso da FVE demonstrem resultados promissores em lesões cutâneas, ainda não estão completamente estabelecidos a sua eficácia terapêutica e os mecanismos modulatórios relacionados ao seu papel bioestimulante.

Critério de Inclusão:

Os critérios Ideais para Inclusão das doadoras do tecido adiposo são: Sexo feminino; Idade entre 25 a 55 anos; Não tabagista; Ausência de doenças crônicas e/ou auto-imune; Hígidos (ausentes de qualquer processo patológico ativo e com bom estado nutricional); Não ter feito uso de qualquer drogas ou fármacos que afete a hemodinâmica no geral.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste projeto de pesquisa é estabelecer uma prova de conceito a respeito da influência modulatória da FVE, derivada do tecido adiposo subcutâneo humano e cultivada como esferóides multicelulares, sobre o reparo da pele utilizando um modelo in vitro para cicatrização de feridas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O risco identificado nesta pesquisa é o constrangimento, caso não seja preservado o anonimato das voluntárias por parte dos Pesquisadores. Tal risco será minimizado pelo rigor dos pesquisadores, o nome das participantes será preservado, assegurando assim a sua privacidade e se desejar terá livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo. OBSERVAÇÃO: Os riscos cirúrgicos não são de responsabilidade desta pesquisa, pois todo o procedimento cirúrgico e a retirada da amostra doada serão efetivados pelo médico selecionado pela doadora. Entretanto, por se tratar de um material de descarte biológico da cirurgia, o sigilo permanecerá, em vista que, a voluntária, tenha o desejo de realizar o procedimento estético cirúrgico em si e o projeto é uma consequência da amostra doada.

Benefícios:

Embora não existam benefícios direto imediatos, as voluntárias poderão ser beneficiadas indiretamente com os benefícios futuros com a utilização da técnica e contribuir na sociedade. As voluntárias contribuirão também com a ciência para melhorar os métodos utilizados na área de pesquisa em medicina regenerativa, que possam ajudar no desenvolvimento de tratamentos inovadores futuros.

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309

Bairro: Centro

CEP: 14.801-320

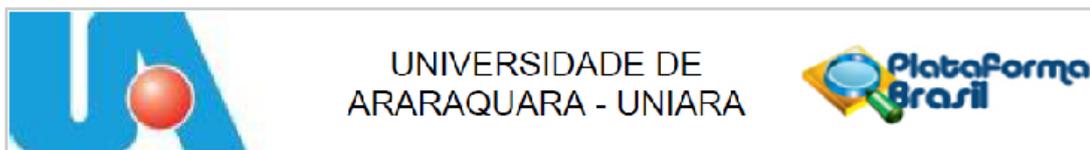
UF: SP

Município: ARARAQUARA

Telefone: (16)3301-7283

Fax: (16)3301-7144

E-mail: comitedeetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer: 5.241.963

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os "Comentários e Considerações sobre a Pesquisa" estão apontados no campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações" deste parecer.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os "Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória" estão apontados no campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações" deste parecer.

Recomendações:

Recomenda-se que sigam os objetivos e a metodologia proposta neste projeto.

Qualquer dúvida no decorrer do projeto este colegiado se coloca disposição e recomendamos que consulte a Resolução 466/12 CNS, (disponível no site do CEP) que seguimos para as análises éticas dos trabalhos endereçados a este CEP.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A solicitação feita por este colegiado, sendo a correção no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, foi atendida pela pesquisadora responsável, e deste modo o Protocolo de pesquisa está APROVADO, para ser realizado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Projeto de pesquisa encontra-se adequado e aprovado, de acordo com colegiado e com as normativas vigentes. Qualquer alteração que venha ocorrer, em especial Eventos Adversos, pedimos a gentileza de informar este CEP por meio de Emenda e/ou Notificação, junto a Plataforma Brasil e, no decorrer do desenvolvimento da pesquisa solicitamos o encaminhamento do Relatório Parcial, e após a conclusão do mesmo o envio do Relatório Final, procedimentos esses de cunho obrigatório.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1830107.pdf	07/02/2022 17:41:16		Aceito
Parecer Anterior	CARTA_RESPOSTA_PARECER_ANTERIOR.pdf	07/02/2022 17:40:39	Jessica Michelle de Novais	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_TCLE_EDITADO_AD_REFERENDUM.pdf	07/02/2022 17:31:17	Jessica Michelle de Novais	Aceito

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309

Bairro: Centro

CEP: 14.801-320

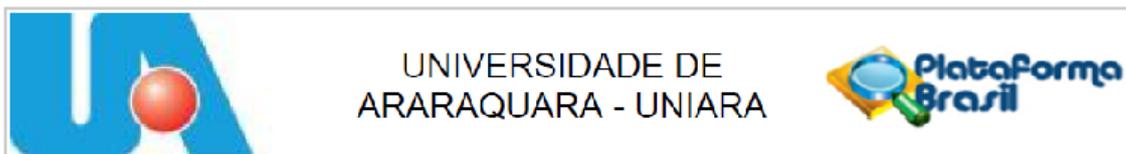
UF: SP

Município: ARAQUARA

Telefone: (16)3301-7263

Fax: (16)3301-7144

E-mail: comitodetica@uniara.com.br



Continuação do Parecer. 5.241.963

Ausência	TERMO_DE_CONSENTIMENTO_TCLE_EDITADO_AD_REFERENDUM.pdf	07/02/2022 17:31:17	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_EDITADO.pdf	29/11/2021 12:05:42	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DE_PESQUISA_MESTRADO_Reparado.pdf	29/11/2021 12:05:13	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_DE_INSERTAO_POSTERIOR_DE_CONSENTIMENTO_INSTITUCIONAL.pdf	25/10/2021 09:55:32	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_LABORATORIO.pdf	25/10/2021 08:57:30	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL_JESSICA	25/10/2021 08:54:16	Jessica Michelle de Novais	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO.PDF	23/10/2021 12:31:21	Jessica Michelle de Novais	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ARARAQUARA, 14 de Fevereiro de 2022

Assinado por:
Andréa Corrêa Carrascosa
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Voluntários da Pátria nº1309
Bairro: Centro **CEP:** 14.001-320
UF: SP **Município:** ARARAQUARA
Telefone: (16)3301 7263 **Fax:** (16)3301-7144 **E-mail:** comitedeetica@uniara.com.br