

## **Caracterização e viabilidade da fração vascular estromal proveniente da bola adiposa de Bichat associada ao plasma pobre em plaquetas - uma opção para tratamentos estéticos**

**Characterization and viability of the stromal vascular fraction from the Bichat fat ball associated with platelets-poor plasma - an option for aesthetic treatments**

**Caracterización y viabilidad de la fracción vascular estromal de la bola de grasa de Bichat asociada a plasma pobre en plaquetas - una opción para tratamientos estéticos**

Recebido: 18/06/2021 | Revisado: 25/06/2021 | Aceito: 30/06/2021 | Publicado: 14/07/2021

### **Desyree Ghezzi Lisboa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0019-2359>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [desyreelisboa@gmail.com](mailto:desyreelisboa@gmail.com)

### **Sabrina Cunha da Fonseca**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5280-1238>

Universidade Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [sabrina.cfonseca@hotmail.com](mailto:sabrina.cfonseca@hotmail.com)

### **Jeferson Luis de Oliveira Stroparo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1094-530X>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [jef\\_stroparo@hotmail.com](mailto:jef_stroparo@hotmail.com)

### **Rafaela Araújo Mendes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3774-6354>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [rafaela.mendes@live.com](mailto:rafaela.mendes@live.com)

### **Eduardo Discher Vieira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4311-1486>

Curityba Biotech, Brasil

E-mail: [eduardo.discher@outlook.com](mailto:eduardo.discher@outlook.com)

### **Victoria Cruz Cavallari**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0232-7328>

Curityba Biotech, Brasil

E-mail: [vitoria\\_cavallari@hotmail.com](mailto:vitoria_cavallari@hotmail.com)

### **Roberto da Rocha Leão Neto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1379-7819>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [leaorep@gmail.com](mailto:leaorep@gmail.com)

### **Marilisa Carneiro Leão Gabardo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6832-8158>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [marilisagabardo@gmail.com](mailto:marilisagabardo@gmail.com)

### **Tatiana Miranda Deliberador**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4076-4905>

Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, Brasil

E-mail: [deliberador@gmail.com](mailto:deliberador@gmail.com)

### **Célia Regina Cavichiolo Franco**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2525-7788>

Universidade Federal do Paraná, Brasil

E-mail: [crcfranc@ufpr.br](mailto:crcfranc@ufpr.br)

### **Maira Pedrosa Leão**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3724-911X>

Curityba Biotech, Brasil

E-mail: [moirapedroso@gmail.com](mailto:moirapedroso@gmail.com)

### **João César Zielak**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3393-3491>

Universidade Positivo, Brasil

E-mail: [jzielak2@gmail.com](mailto:jzielak2@gmail.com)

## Resumo

A bichectomia é um procedimento que se constitui na remoção da porção anterior do corpo adiposo de Bichat (paCAB). O extrato celular obtido após o processamento por meio de digestão enzimática desse tecido é chamado de fração vascular estromal (FVE). A natureza das células que compõem a FVE qualifica esse produto para uma ampla gama de aplicações clínicas, especialmente em procedimentos de estímulo à renovação e à reparação tecidual, incluindo-se os fins estéticos de rejuvenescimento em face. Entretanto, o aproveitamento desse material biológico vivo está diretamente relacionado ao seu adequado manejo e transporte, desde sua coleta, processamento e envio para aplicação clínica. Este trabalho teve como objetivo caracterizar a FVE obtida a partir da paCAB, e também verificar se o plasma pobre em plaqueta (PPP) autólogo é eficiente na manutenção da viabilidade celular, podendo ser uma opção de meio para transporte até sua aplicação clínica mediata. Três pacientes com indicação da realização de bichectomia participaram da pesquisa. Antes da remoção da paCAB foi realizada a coleta sanguínea venosa para a obtenção do PPP. A paCAB bilateral coletada foi enviada para o Centro de Processamento Celular Curityba Biotech e submetida ao protocolo para desagregar as células da matriz extracelular. Ao final, a FVE foi fracionada em alíquotas que foram acondicionadas em seringas e em placas de cultivo, e impostas a ensaios para se avaliar a viabilidade celular nos tempos 0, 24 e 48 h. A viabilidade celular e a caracterização das células presentes na FVE foram avaliadas por microscopia de luz e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Uma amostra foi mantida em garrafa de cultivo até atingir  $7 \times 10^6$  células. Após, foram impostas a comprovação da presença de células-tronco mesenquimais (CTM) capazes de se manter em cultivo padrão. A amostra analisada por imunofenotipagem confirmou a existência das seguintes células: células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas, células endoteliais e células T.

**Palavras-chave:** Corpo adiposo; Bochecha; Células do tecido conjuntivo; Transplante autólogo; Adesão celular.

## Abstract

Bichectomy is a procedure that consists of removing the anterior portion of the Bichat adipose body (apBAB). The cell group obtained after processing through enzymatic digestion of this tissue is called the stromal vascular fraction (SVF). The nature of the cells that make up the SVF qualifies this product for a wide range of clinical applications, especially in procedures to stimulate renewal and repair, including the aesthetic purposes of rejuvenation in the face. However, the use of this living biological material is directly related to the proper handling and transport, from its collection, processing and return for clinical application. This study aimed to characterize the SVF obtained from apBAB, and also to verify whether autologous platelet-poor plasma (PPP) is efficient in maintaining cell viability, and can be a means of transport to its mediated clinical application. Three patients with indication for having a bichectomy participated in the study. Before removing the apBAB, venous blood collection was performed to obtain the PPP. The bilateral apBAB collected was sent to the Cell Processing Center Curityba Biotech and submitted to the protocol for separation of cells from its matrix. In the end, the SVF was divided into aliquots that were packed in syringes and in culture plates and evaluated for cell viability at times 0, 24 and 48 h. Cell viability and the characterization of cells present in SVF were evaluated by means of immunophenotyping by flow cytometry and by light microscopy. A sample was kept in a culture bottle until it reached  $7 \times 10^6$  cells to prove the presence of mesenchymal stem cells capable of remaining in standard culture. The viability presented in the PPP medium remained constant and with a viability of 70% in up to 48 h. In addition, the sample analyzed by immunophenotyping confirmed the existence of: mesenchymal and hematopoietic stem cells, endothelial cells and T cells.

**Keywords:** Fat body; Cheek; Connective tissue cells; Autologous transplant; Cell adhesion.

## Resumen

La bichectomía es un procedimiento que consiste en extirpar la porción anterior del cuerpo adiposo de Bichat (paCAB). El grupo celular obtenido tras el procesamiento mediante digestión enzimática de este tejido se denomina fracción vascular estromal (FVE). La naturaleza de las células que componen la FVE califica este producto para una amplia gama de aplicaciones clínicas, especialmente en procedimientos para estimular la renovación y reparación, incluidos los fines estéticos de rejuvenecimiento del rostro. Sin embargo, el uso de este material biológico vivo está directamente relacionado con el correcto manejo y transporte, desde su recolección, procesamiento y retorno para su aplicación clínica. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar el FVE obtenido de paCAB, y también verificar si el plasma autólogo pobre en plaquetas (PPP) es eficiente para mantener la viabilidad celular, y puede ser un medio de transporte para su aplicación clínica mediada. Participaron en el estudio tres pacientes con indicación de bichectomía. Antes de retirar el paCAB, se realizó una extracción de sangre venosa para obtener el PPP. El paCAB bilateral recolectado fue enviado al Centro de Procesamiento Celular Curityba Biotech y sometido al protocolo de separación de células de su matriz. Al final, la FEVI se dividió en alícuotas que se empaquetaron en jeringas y en placas de cultivo y se evaluó la viabilidad celular en los tiempos 0, 24 y 48 h. La viabilidad celular y la caracterización de las células presentes en la FEV se evaluaron mediante inmunofenotipificación por citometría de flujo y microscopía óptica. Se mantuvo una muestra en una botella de cultivo hasta que alcanzó  $7 \times 10^6$  células para demostrar la presencia de células madre mesenquimales capaces de permanecer en cultivo estándar. La viabilidad presentada en el medio PPP se mantuvo constante y con una viabilidad del 70% hasta en 48 h. Además, la muestra analizada por inmunofenotipificación confirmó la existencia de: células madre mesenquimales y hematopoyéticas, células endoteliales y células T.

**Palabras clave:** Cuerpo adiposo; Mejilla; Células del tejido conectivo; Autotrasplante; Adhesión celular.

## 1. Introdução

Alguns procedimentos cirúrgicos têm sido alvo de atenção nos últimos anos devido à rápida transformação que proporcionam e ao curto período de recuperação, como é o caso das bichectomias. A bichectomia é uma técnica cirúrgica que consiste na retirada da porção anterior do corpo adiposo de Bichat (paCAB), localizado nas bochechas em frente à margem anterior do músculo masseter, e superficialmente à fáscia do músculo bucinador. Este tecido é composto por uma massa de gordura envolta por uma fina camada de tecido conjuntivo e é normalmente descartado, logo após a cirurgia (Bernardino Júnior et al., 2008).

Sabe-se que o tecido adiposo, especialmente o visceral e o subcutâneo, possui células-tronco mesenquimais (CTM). Tais células têm sido bastante estudadas (Fruhbeck et al., 2001) devido ao seu potencial clonogênico e, portanto, à sua capacidade de proliferação (Carvalho e Goldenberg, 2012). No tecido adiposo essas células estão presentes na fração vascular estromal (FVE), que pode ser usada em várias aplicações clínicas, incluindo procedimentos estéticos, tais como a diminuição de cicatrizes e rugas (Massumoto et al., 2014; Thomas-Porch et al., 2018).

Uma técnica muito popular usada na minimização de linhas de expressão é a injeção de ácido hialurônico (AH), um produto consumido na aplicação clínica com a finalidade de preenchimento e rejuvenescimento facial (Almeida e Sampaio 2016; Thomas-Porch et al., 2018). No entanto, além de existir a possibilidade de reações indesejáveis (necrose superficial), esse biomaterial preenchedor pode não permanecer por muito tempo no local, uma vez que não possui atividade biológica celular de reparo (Crocco et al., 2012).

Por outro lado, além dos benefícios de preenchimento, a FVE tem como vantagens: 1) não provocar necrose e, 2) desencadear uma resposta biológica positiva - exatamente por apresentar em sua composição células capazes de promover a renovação de uma maneira autóloga, levando ao rejuvenescimento tecidual local (Cohen, 2015; Moseley et al., 2015; Zwingenberger et al., 2013).

Assim, a separação das células da FVE presentes no meio do tecido gorduroso da paCAB pode viabilizar sua aplicação clínica. O procedimento de separação pode ser realizado mediante a digestão enzimática pelo uso de colagenases, que possuem a capacidade de degradação da matriz extracelular composta de fibras reticulares, desaderindo as células da mesma (Massumoto et al., 2014).

A finalidade do isolamento da FVE é a sua utilização como enxerto autógeno, no intuito de recuperar uma função de preenchimento e induzir o reparo tecidual (Stroparo et al., 2021; Thomas-Porch et al., 2018). Entretanto, os meios (veículos) ideais para a entrega dessas células não devem conter produtos xenógenos e ao mesmo tempo devem garantir a viabilidade celular. Embora haja limitações de volume do material de origem autóloga, o uso da FVE pode ser importante no que se refere à segurança do processo de retorno celular ao paciente. Entre os veículos empregados como meios de sobrevivência das células, subprodutos obtidos do sangue autólogo têm demonstrado bastante eficiência (Villiers et al., 2011; Felthaus et al., 2017). A coleta sanguínea venosa é uma forma simples de se obter um meio de transporte autólogo seguro para as células. O plasma pobre em plaquetas (PPP), por exemplo, pode ser obtido a partir da centrifugação do sangue coletado, em tubo (vacutainer) adicionado de anticoagulante (citrato de sódio) (Ministério da Saúde, 2010).

A literatura suporta boas evidências de sobrevivência e crescimento das CTM quando em contato com o soro autólogo e/ou com o PPP. Já o plasma rico em plaquetas (PRP), outra preparação sanguínea bastante popular, obtida do sangue por centrifugação, não apresenta bons resultados como carreador celular. A alta concentração de plaquetas no meio de cultivo ou de transporte (acima de 20%) possui efeitos inibitórios, capazes de interferir negativamente na manutenção das células (Almeida et al., 2008; Felthaus et al., 2017).

Por outro lado, a Sociedade Internacional para Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy* – ISCT) padronizou os critérios mínimos para a confirmação da presença de CTM nas amostras o que inclui três etapas: 1) aderência ao plástico; 2) expressar antígeno de superfície específicos; e 3) diferenciação multipotente (Dominici et al., 2006).

Quando em condições de cultivo, as células podem ser classificadas em aderentes e não aderentes. As células aderentes possuem a característica de adesão a placas ou garrafas de cultivo celular padrão. Já as não aderentes não conseguem essa adesão e ficam em suspensão no meio de cultivo. Entre as células aderentes estão os fibroblastos e, na sua maioria, após algumas semanas de cultivo, as CTM. A adesão das células se dá pela carga negativa que a placa ou a garrafa de cultivo possui, sendo que esta carga estimula a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos, iniciadores da ancoragem celular (Peres e Curi, 2005).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a viabilidade das células que compõem a FVE obtida a partir da paCAB em um meio de manutenção visando sua aplicação clínica, o PPP, por até 48 h.

## 2. Metodologia

Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Positivo (protocolo 2.597.562), três pacientes com indicação de remoção da paCAB foram convidadas a participar da pesquisa. Após a apresentação da proposta do estudo, aceitaram participar de forma voluntária. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi lido e assinado e então as pacientes foram submetidas aos procedimentos cirúrgicos. O material biológico doado foi processado no Centro de Processamento Celular da Curityba Biotech, localizado em Curitiba, Paraná, Brasil.

O presente trabalho, de natureza qualitativa, foi realizado baseado em metodologias previamente descritas, como a obtenção do PPP (Marques et al., 2014), a obtenção da FVE (Zuk et al., 2001; Dongen et al., 2016), o acondicionamento em seringas (Almeida et al., 2008; Andia et al., 2019; Asri et al., 2005), as análises de citometria de fluxo e devidas imunomarcações (Meirelles et al., 2006; Dominici et al., 2006), proliferação de células aderentes (Yang et al., 2008), e o ensaio de avaliação da diferenciação celular ou potencial multipotente (Dominici et al., 2006; De Souza et al., 2018).

### 2.1 Obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)

A obtenção do PPP usado no experimento seguiu a metodologia descrita por Marques et al. (2014). Trinta e dois tubos tipo vacutainer contendo o anticoagulante citrato de sódio foram usados para a coleta de sangue por meio de venopunção periférica, os quais foram centrifugados a  $200 \times g$  por 5 minutos (Centrífuga EBA – 200; Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemanha).

Após essa primeira centrifugação, o conteúdo total do plasma sanguíneo (aproximadamente 44 mL) foi removido dos vacutainers com o auxílio da pipeta Pasteur (BD® Falcon; Corning, Nova York, EUA) e o volume de 11 mL foi alicotado em quatro tubos de centrifugação (Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Áustria). Após, esses quatro tubos foram levados à centrífuga e os conteúdos foram submetidos a uma segunda centrifugação a  $200 \times g$  por 10 minutos.

Após a segunda centrifugação, a metade superior (PPP) de todos os tubos foi coletada e transferida para um único tubo Falcon de 50 mL, deixando disponível para o experimento um total aproximado de 22 mL de PPP. Células residuais e plaquetas permaneceram na metade inferior do tubo Falcon, produzindo o PRP, sendo este descartado (Figura 1A).

### 2.2 Isolamento da Fração Vascular Estromal (FVE) e avaliação por citometria de fluxo

Após a remoção bilateral da paCAB dos pacientes, realizado no Centro Cirúrgico da Clínica de Odontologia do Curso de Odontologia da Universidade Positivo, o material biológico doado foi enviado ao Centro de Processamento Celular Curityba Biotech devidamente acondicionado em tubos Falcon de 50 mL, contendo como meio para transporte: meio para

cultivo (DMEM low glucose; Gibco, Waltham, EUA), antifúngico 250 µg/mL (anfotericina B), antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Waltham, EUA). A manipulação do material biológico em sistema aberto ocorreu em cabine de segurança biológica (Telstar Bio II Advance, FACScalibur, BD, Franklin Lakes, EUA) instalada em sala limpa ISO 7.

Conforme metodologia previamente descrita (Dongen et al., 2016), o tecido adiposo coletado de cada doadora foi lavado individualmente em uma solução salina tamponada com fosfato (PBS; Gibco, Waltham, EUA) e, em seguida foi realizada a digestão enzimática por 30 minutos com 0,075% de colagenase do tipo-1 (Gibco, Waltham, EUA) na proporção 1:1 em volume (colagenase/CAB) a 37 °C em banho-maria (BM-0112; Parsec, Curitiba, Brasil). Após a incubação, a atividade enzimática foi neutralizada com DMEM + 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Gibco, Waltham, EUA) na proporção 1:1 em volume. Subsequente à neutralização, a solução passou pela centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. Após esse processo, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 10 mL de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>CL) 160 mM em temperatura ambiente (25 ± 2 °C), por 10 minutos. Passado esse tempo, o conteúdo foi centrifugado novamente em 1500 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o novo *pellet* ressuspensão em 4 mL de PPP autólogo, e depois filtrado em membrana com poro de 70 µm (Easy Strainer; Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Áustria). Após a filtração, esses 4 mL foram divididos em 10 alíquotas de 400 µL (amostras de FVE total). Duas dessas alíquotas de 400 µL de FVE total foram para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo (800 µL, os quais foram testados em triplicata) (Muse® Count & Viability; Luminex, Austin, EUA) (T0 = Teste em Tempo 0) (Figura 1B).

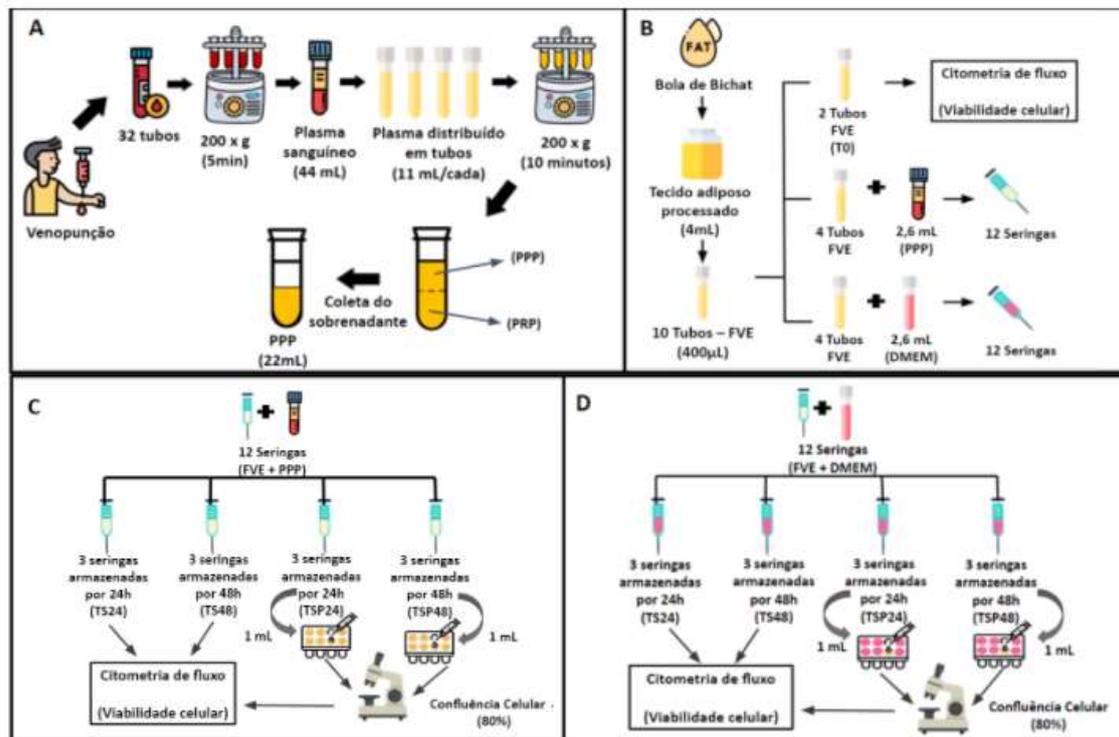
### 2.3 Desenho experimental por doador

A partir de trabalhos anteriormente descritos (Almeida et al., 2008; Andia et al., 2019; Asri et al., 2005) e visando uma possível aplicação clínica, seringas convencionais de 1 mL (polipropileno, BD, Curitiba, Brasil) foram utilizadas no acondicionamento das células presentes na FVE em PPP. Quatro alíquotas de FVE total (400 µL cada) foram diluídas em 2,6 mL de PPP cada e, subdivididos em 12 seringas de 1 mL, mantidas em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) nas seguintes condições: três seringas por 24 h (TS24) e três seringas por 48 horas (TS48) que após este período foram submetidas às análises sem prévio cultivo. As outras três seringas por 24 h (TSP24) e três seringas por 48 horas (TSP48) foram posteriormente cultivadas em três poços em placa de 24 poços e impostas às análises.

As células dos grupos TSP24 e TSP48 foram cultivadas em duas placas de cultivo de 24 poços: uma placa ocupando três poços de 1 mL por 24 h (TSP24) e outra ocupando três poços de 1 mL por 48 h (TSP48), mantidos em incubadora (37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic Corporation, Osaka, Japão) até atingirem a confluência celular - esse teste foi realizado para se conhecer o número de células aderentes os tempos de 24 e 48 h, e ao meio (PPP) (Figura 1C).

As outras quatro alíquotas restantes de FVE total foram diluídas da mesma forma que os grupos anteriores; no entanto, o PPP foi substituído por meio de cultivo convencional DMEM (DMEM; Gibco, Waltham, EUA) e os grupos foram denominados de CS24 e CS48 para DMEM sem cultivo e, CSP24 e CSP48 para DMEM com cultivo. O DMEM foi utilizado para um controle *in vitro*, uma vez que não pode ser utilizado para aplicação clínica (Figura 1D).

**Figura 1 - Desenho do estudo.**



A) Obtenção do Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). B) Isolamento da Fração Vascular Estromal (FVE) e avaliação por citometria de fluxo. C) Grupo experimental para análise de citometria formado pela Fração Vascular Estromal (FVE) e Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). D) Grupo controle para análise de citometria formado pela Fração Vascular Estromal (FVE) e meio de cultura DMEM. Ícones feitos por Freepik, Creativemarket/Eucalypt, photo3idea-studio e srip do [www.flaticon.com](http://www.flaticon.com).

Fonte: Autores.

Na Tabela 1 estão representados os procedimentos executados e devidos processos da pesquisa.

**Tabela 1 - Procedimento por doador, replicado aos três doadores.**

Grupos	FVE Total (volume)	Diluição (2,6 mL)	Local	Tempo (h)	Tipo de teste
T0	2 × 400 µL	-	Mistura para "n" de 3	Imediato	
TS24	400 µL	PPP	3 seringas (1 mL)	24	
TS48	400 µL	PPP	3 seringas (1 mL)	48	Viabilidade celular por citometria de fluxo
CS24	400 µL	DMEM	3 seringas (1 mL)	24	
CS48	400 µL	DMEM	3 seringas (1 mL)	48	
TSP24	400 µL	PPP	3 poços (placa de 24)	24 até confluência	
TSP48	400 µL	PPP	3 poços (placa de 24)	48 até confluência	Avaliação em microscópio invertido + citometria de fluxo
CSP24	400 µL	DMEM	3 poços (placa de 24)	24 até confluência	
CSP48	400 µL	DMEM	3 poços (placa de 24)	48 até confluência	

T0: tempo zero (teste imediato); TS: grupos teste seringa (células que estavam nas seringas com o meio plasma pobre em plaqueta (PPP) nos tempos propostos 24 e 48 h); CS: controle seringas (células que estavam nas seringas com o meio DMEM nos tempos propostos 24 e 48 h); TSP: teste seringa placa (são as células que estavam nas seringas com o PPP e foram para as placas de cultura celular); CSP: controle seringa placa (são as células que estavam nas seringas com o DMEM e foram para as placas de cultura celular até a confluência).

Fonte: Autores.

Para a avaliação da viabilidade celular das alíquotas não cultivadas (grupos: TS24, TS48, CS24 e CS48), o conteúdo de cada seringa foi transferido para um tubo de ensaio (um tubo para cada grupo) (Labor; Osasco, São Paulo). Retirou-se 50 µL tubos respectivos tubos, após foram transferidos para um tubo de mini-centrifuga de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), e posteriormente adicionados de 450 µL do reagente do kit (Muse<sup>®</sup> Count & Viability; Luminex, Austin, EUA), a fim de se obter 500 µL de volume para análise.

Antecedendo o ensaio de viabilidade celular, as amostras cultivadas em placas de 24 poços (TSP24, TSP48, CSP24 e CSP48) foram avaliadas em microscopia de luz para confirmar confluência celular. Para a avaliação da viabilidade celular o meio foi retirado das placas (PPP e DMEM-controle), em seguida adicionado 1 mL de tripsina (Trypsin, EDTA 0,025%, Gibco) e incubado por 5 minutos a 37 °C. Após incubação, a tripsina foi inativada com mesmo volume de meio DMEM acrescido de 10% de SFB. A seguir as células foram transferidas para tubos de centrifugação de 15 mL (cada tubo pertencente a um grupo) e centrifugadas a 200× g por 5 minutos. O *pellet* foi ressuspensão em 4mL de DMEM + 10% SFB mantido em garrafa de cultivo celular para isolamento de MSC e cumprimento de protocolo de validação para células-tronco (Dominici et al., 2006).

O restante do conteúdo foi acomodado em quatro tubos Falcon de 15 mL e foram centrifugados a 200× g por 10 minutos. O *pellet* formado foi ressuspensão em 450 µL de reagente (Muse<sup>®</sup> Count & Viability; Luminex, Austin, EUA), para análise no citômetro de fluxo.

Os dados gerados no citômetro de fluxo foram provenientes do Módulo de Software de Viabilidade e Conteúdo Muse<sup>®</sup> intuitivo, que fornece uma análise detalhada sobre a contagem de células viáveis, ou seja, células vivas com capacidade proliferativa e uma contagem total celular, além de fornecer a percentagem de viabilidade da amostra. Por fim, as informações obtidas nos tempos de 24 h e 48 h de todos os grupos foram comparadas com a porcentagem de viabilidade celular inicial do tempo 0 (citometria de fluxo imediatamente após o isolamento da FVE).

As células mantidas em cultivo (incubadora, 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>; Panasonic Corporation, Osaka, Japão) foram constantemente acompanhadas, diariamente, por microscopia de luz invertida (Motic AE31E Series, Vancouver, Canadá) durante sete dias para a confirmação da aderência celular, bem como da morfologia destas células e sua confluência, posteriormente foram tripsinizadas, e avaliadas por citometria de fluxo.

#### 2.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A análise da FVE por meio da imunofenotipagem foi realizada pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. Empregou-se citômetro de fluxo FACSCANTO II (Becton; Dickinson, EUA) e a análise foi realizada com auxílio do software Infinicyt versão 1.6.0 (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Espanha). Este ensaio teve como propósito identificar diversas populações celulares presentes na FVE, detectando diferentes fenótipos.

Esta análise foi realizada em um painel de seis fluoróforos (FITC/PE/PERCP/PECY-7/APC/APC-CY7). Cada amostra foi acondicionada em cinco tubos de 5 mL, sendo eles: 1) só células da FVE (sem marcação); 2) controle isotópico para delimitar as populações negativas (controle de ligações inespecíficas), tubo 3) marcadores de CTM e CTH; 4) marcadores de células endoteliais; e 5) marcadores de células T.

No tubo 1 foi delimitada a população celular de interesse e retirados os debris. O limite da marcação negativa foi estabelecido pelo controle isotópico (tubo 2). Nos demais tubos (3, 4 e 5) também foi necessário retirar os debris e as células mortas (marcação com 7-AAD) para em seguida ser realizada a análise das marcações celulares. No tubo 3 havia anticorpos anti-CD90 FITC/CD105 PE/7-AAD/CD34 PE-CY7/CD73 APC/CD45 APC-CY7; no tubo 4 havia anticorpos anti-CD146 FITC/CD31 PE/CD45 APC-CY7; e no tubo 5, CD3 FITC/CD4 PE/CD56 APC/CD45 APC-CY7.

## 2.5 Ensaio de diferenciação celular– avaliação do potencial multipotente

Antes do processamento do tecido adiposo para obtenção da FVE, uma parte da paCAB de cada paciente foi utilizada para o ensaio de diferenciação celular, de acordo com metodologias previamente descritas (Dominici et al., 2006; De Souza et al., 2018), aplicando-se as colorações correspondentes ao tipo celular diferenciado: na adipogênese foi utilizado o corante Oil Red, que evidencia gotículas lipídicas, as quais são acumuladas nas células adiposas. Na osteogênese foi utilizado o Alizarin Red, que vai corar a deposição de cálcio na matriz extracelular. Na condrogênese foi utilizado o Azul de Toluidina, que marca grupos ácidos de componentes celulares, como a região do núcleo celular e tem afinidade por mucopolissacarídeos encontrados na matriz extracelular cartilaginosa.

## 2.6 Análise estatística

Os dados de viabilidade celular de todos os grupos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ( $\alpha=0,05$ ), e em seguida aos testes t de Student ou Kruskal-Wallis, conforme distribuição normal ou não-normal. Os testes foram realizados no GraphPad Prism (versão 5.01, Windows, San Diego, USA).

## 3. Resultados

Esta pesquisa analisou a viabilidade celular da FVE nos tempos 0, 24 e 48 h em meio autólogo (PPP) e meio controle (DMEM), simulando uma situação de transporte, capaz de avaliar a durabilidade e o potencial de eficiência do material.

Uma alíquota dessas células foi colocada em cultivo e analisada por microscopia de luz invertida, confirmando a existência de células aderentes, com morfologia fibroblastóide e capazes de gerar confluência celular. Essas células também foram avaliadas com relação a sua capacidade de se diferenciar em, no mínimo, três linhagens celulares (adipócitos, osteócitos e condrócitos) comprovando, desta forma, sua característica de CTM.

Células da FVE também foram submetidas à análise por citometria de fluxo para a caracterização e quantificação de CTM e CTH, células endoteliais e células T, além da confirmação da presença de CTM ativas.

### 3.1 Citometria de fluxo para viabilidade celular

Ao final da leitura dos tempos 0 h, 24 h e 48 h dos grupos que utilizaram os meios 1) PPP e 2) DMEM, foram realizadas as médias dos resultados obtidos da triplicata (Tabela 2).

**Tabela 2** – Resultados da porcentagem média da viabilidade celular por citometria de fluxo.

Tempo	Doador 1	Doador 2	Doador 3	Média total
<b>T0</b>	58,90%	54,73%	65,87%	<b>59,83%</b>
<b>TS24</b>	74,07%	82%	75%	<b>77%</b>
<b>TS48</b>	72,52%	76%	70,77%	<b>73,10%</b>
<b>CS24</b>	90,76%	84%	78,92%	<b>84,56%</b>
<b>CS48</b>	83%	64%	60,54%	<b>69,18%</b>

Nota: T0: tempo zero (teste imediato); TS: grupos teste seringa; CS: grupos controle seringas.

Fonte: Autores.

Após análise estatística, a viabilidade celular em T0 foi significativamente menor quando comparada aos grupos TS24PPP, TS48PPP e CS24DMEM. Acredita-se que isso ocorreu devido ao fato das células do T0 não possuírem tempo de se adaptar ao meio imediatamente após seu processamento, além do estresse sofrido devido à recém digestão enzimática com a colagenase tipo 1 (Marques et al., 2014) (Tabela 3). O grupo CS24DMEM obteve o melhor resultado de viabilidade celular dentre todos os grupos (84,56%). Entretanto, seu percentual em 48 h (grupo CS48DMEM) foi similar ao grupo T0. O grupo CS48DMEM se igualou com o T0 pós-processamento (Tabela 3) mostrando diferença significativa entre os tempos, pois em 48h obteve uma diminuição da viabilidade celular. Ainda, o grupo CS24DMEM apresentou a melhor viabilidade e por isso estatisticamente diferiu dos grupos TS48PPP, CS48DMEM e T0 (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados da análise de viabilidade celular conforme os grupos.

Tratamento	Viabilidade
T0	0,598322222 <sup>a</sup>
CS48 (DMEM)	0,691066667 <sup>ab</sup>
TS48 (PPP)	0,729611111 <sup>b</sup>
TS24 (PPP)	0,770344444 <sup>bc</sup>
CS24 (DMEM)	0,845011111 <sup>c</sup>

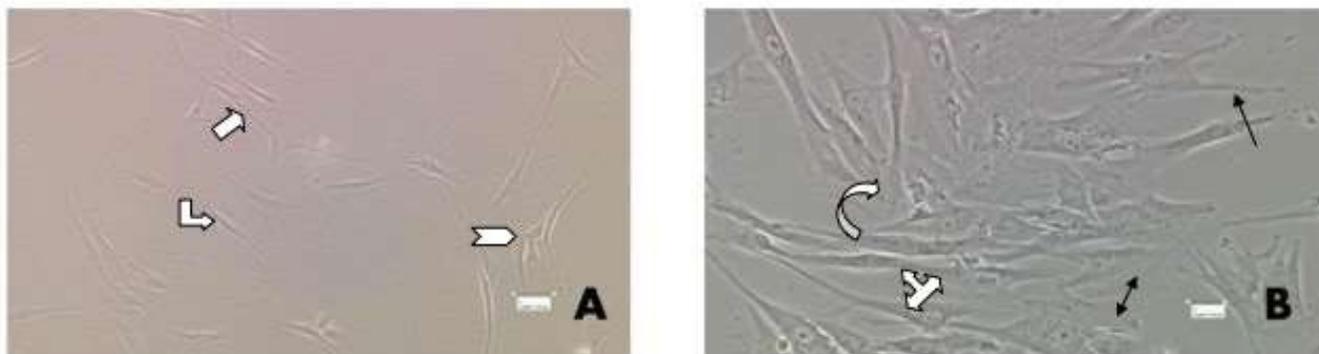
Letras minúsculas diferentes expressam diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Autores.

As células armazenadas em seringas por 24 h e 48 h, e posteriormente cultivadas até atingirem confluência celular de (80%) foram submetidas à citometria de fluxo, em que foi obtida uma média de viabilidade celular de 96,34%. Embora as células do grupo CS48DMEM tenham apresentado uma baixa viabilidade, quando colocadas em cultivo, estas células foram capazes de proliferar tanto quanto as células do grupo CS24DMEM. Este teste foi realizado para simular *in vitro* a proliferação e viabilidade, apenas das células aderentes (Yang et al., 2008).

### 3.2 Microscopia de luz invertida - Células provenientes de seringa e cultivadas

A Figura 2 mostra as células em condições ideais de cultivo ( $\text{CO}_2$  controlado e troca de meio DMEM regular), ainda em subconfluência. Observa-se células esparsas por sobre o cultivo celular, aderentes ao substrato, de morfologia alongadas, e pouco espaiadas (Figura 2A). Na Figura 2B vê-se um maior número de células, estando estas ainda subconfluentes, aderidas e espaiadas por sobre o substrato. Há maior expansão do corpo celular, emitindo características projeções membranares, de aspecto morfológico semelhantes e fibroblastóide.

**Figura 2** – Imagens em microscopia de luz invertida do cultivo celular em condições ideais. A) Células em cultivo celular de três dias (DMEM, condições ideais de cultivo) (barra = 11,99  $\mu$ m; B) Células em cultivo de sete dias (DMEM, condições ideais de cultivo)(barra = 16,34  $\mu$ m).



-  Células esparsas por sobre o cultivo celular
-  Células aderentes ao substrato
-  Morfologia de células alongadas, pouco espreiadas
-  Maior número de células, subconfluentes
-  Expansão do corpo celular
-  Projeções membranares
-  Morfologicamente semelhantes a fibroblastóides

Fonte: Autores.

### 3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo das células aderentes

Na análise da imunofenotipagem os resultados são apresentados na Tabela 4. A porcentagem das células foi baixa (maior população de células endoteliais foi 1,61%). As células endoteliais e as células T da FVE proveniente da bola de Bichat apresentaram porcentagem acima de 1%; já as células-tronco apresentaram uma porcentagem menor que 1%.

**Tabela 4** - Imunofenotipagem dos tipos celulares por citometria de fluxo da FVE em T0.

Tipo celular	Porcentagem
Células endoteliais	1,61%
CTM e CTH	0,08%
Células T	1,06%

CTM: células-tronco mesenquimais; CTH: células-tronco hematopoiéticas.  
Fonte: Autores.

Os marcadores CD3-FITC/CD4 PE/CD56-APC/CD45-APC – CY7 fornecem diversas informações, entre as quais a porcentagem de cada população, tamanho e granulosidade das células de linfócitos T (Ercole et al., 2003; Rothenberg 1992).

As CTH são caracterizadas pelo marcador CD34; já o marcador CD45+ é um marcador PAN-leucocitário, ou seja, marca todos os leucócitos. A combinação do anticorpo anti-CD90/CD105/CD73 e CD34+/CD34- marcam as células-tronco. Resultados realizados com o controle isotópico e células com população igual as CTM pelo marcador CD105-.

### 3.4 Citometria de fluxo – Caracterização celular

A análise foi realizada de acordo com os parâmetros da ISCT. Sendo assim, houve a confirmação da existência de CTM na amostra mantida em cultura celular proveniente da bola de Bichat (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resultados da caracterização imunofenotípica das células aderentes.

Fenótipo	
Positivo $\geq 70\%$	Negativo $\leq 10\%$
CD105 - 97,2%	CD45 - 0,42%
CD73 - 92%	CD34 - 9,97%
CD90 - 96,3%	CD14 - 0,49%
	CD19 - 0,52%
	HLA - 3,15%

Fonte: Autores.

### 3.5 Citometria de fluxo – Viabilidade celular II

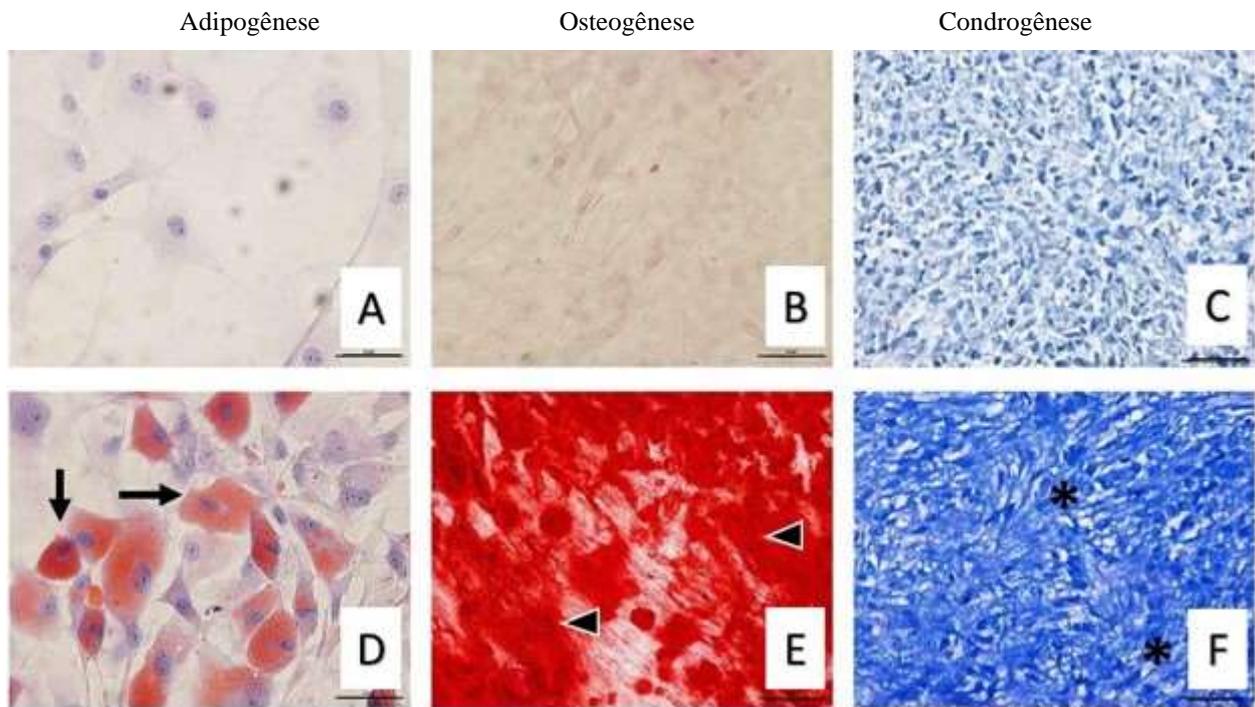
A citometria de fluxo para viabilidade celular das CTM em meio de cultivo padrão DMEM, apresentando como resultado células com viabilidade de 98,93%, ou seja, células vivas e com capacidade de se dividir.

Foram também utilizados dois marcadores para a confirmação da viabilidade: o 7-AAD (7 Amino Actinomycin D), marcador de necrose celular que apresentou 1,07% como resultado e Anexina V com 0,65%, que marca fosfatidilserina na superfície celular, que indica apoptose.

### 3.6 Ensaio de diferenciação celular – avaliação do potencial multipotente

Obteve-se a diferenciação das células, comprovando a origem das mesmas como células-tronco mesenquimais, conforme potencial multipotente capaz dar origem a células de tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso (Dominici et al., 2006; De Souza et al., 2018) (Figura 3).

**Figura 3** - Potencial de diferenciação adipogênica (Oil Red), osteogênica (Alizarin Red) e condrogênica (Azul de Toluidina) das células-tronco obtidas em 400×.



A, B e C) Células-tronco antes das diferenciações. D) Setas apontando para as células diferenciadas em adipócitos com grânulos de gordura em seu interior (coloração vermelha). E) Triângulos apontando para a matriz calcificada corada em vermelho (Alizarina). F) Asteriscos evidenciando os mucopolissacarídeos corados em azul na matriz extracelular cartilaginosa. **Barra** = 100  $\mu$ m.

Fonte: Autores.

#### 4. Discussão

Durante os últimos anos ocorreu um crescimento na busca da terapia baseada em células na prática clínica, com destaque para as CTM, em razão da sua alta capacidade proliferativa, potencial de diferenciação em outros tipos celulares e pelos baixos riscos de efeitos adversos, tais como rejeições, já que essas células podem ser obtidas de forma autóloga (Rigotti et al., 2016).

No corpo humano existem diferentes tecidos que podem servir de fonte de CTM adultas, dentre os mais populares e de uso prático tem-se a medula óssea e o tecido adiposo, com destaque para o último, pois a coleta de gordura é menos invasiva e dolorosa (Andia et al., 2019). As CTM adultas derivadas do tecido adiposo podem ser divididas em formas não expandidas de cultura - FVE e formas expandidas de cultura (Bongson e Lee, 2005; Pak, et al., 2017), sendo que a escolha do tipo celular está diretamente relacionada à sua aplicação clínica de interesse, tendo hoje uma maior busca para o uso em procedimentos dermatológicos (Otero-Viñas et al., 2016). Conforme relatado por Yun et al. (2012), uma melhoria da cor e maleabilidade da pele, além da redução da cicatriz pelo uso de células tronco derivadas do tecido adiposo foram obtidas, assim como Cohen et al. (2017) investigaram o potencial da FVE em enxerto facial para fins de rejuvenescimento. Diante do sucesso empregado pelas diferentes formas de CTM oriundas do tecido adiposo, e dos diferentes sítios em que podem ser encontradas, o presente estudo verificou a existência de CTM na bola de Bichat, mais especificamente na porção FVE. Demonstrou-se que a técnica utilizada foi capaz de isolar, multiplicar e promover a diferenciação dessas células em três tipos celulares especializados com êxito.

Antes da aplicação propriamente dita, é necessário fazer um procedimento de expansão *ex vivo*, pois na clínica é

necessário um número maior de células do que aquele obtido a partir do isolado do tecido (Mushahary et al., 2018) e, para esse procedimento, é fundamental o uso de insumos ideais, como um meio basal e uma suplementação que contenha componentes essenciais para sobrevivência e proliferação celular. Dentre os reagentes disponíveis, o SFB tem sido usado como padrão-ouro (Asri et al., 2019) de suplementação, e o meio DMEM como veículo. Entretanto, os meios comerciais e suas suplementações não são recomendados para prática clínica, pois se tratam de materiais xenogênicos, com riscos de efeitos adversos e sujeitos à contaminação por patógenos e endotoxinas (Saeed et al. 2017). Para contornar esse problema, pesquisadores têm buscado por meios alternativos, como os meios autólogos - soro humano, lisado de plaquetas (hPL) e até soro sanguíneo do cordão umbilical (Mushahary et al., 2018). Dentre os meios autólogos de destaque provenientes do soro humano, há o PRP e o PPP, sendo que a escolha entre eles está intimamente relacionada à aplicação clínica de interesse.

Rigotti et al. (2016) demonstraram que o uso do meio autólogo PRP gera infiltrados inflamatórios e maior permeabilidade vascular, além de promover uma reatividade do componente nervoso, características essas desejáveis em situações patológicas em que se requer uma maior angiogênese ou reparo nervoso, sendo desfavorável para aplicação estética. Dados semelhantes apresentados por Felthaus et al. (2017) justificaram o não uso do PRP para fins estéticos, no qual eles demonstraram que o PRP acaba inibindo a proliferação e diferenciação celular, diferentemente do PPP que, por apresentar baixas concentrações de plaquetas, acaba permitindo o crescimento e diferenciação celular. Esses resultados são condizentes com o aqui achado, no qual mediante a citometria de fluxo, observou-se que até 70% das células da FVE se mantiveram vivas em um período de até 48 h quando cultivadas em PPP.

No presente estudo ficou evidente que o PPP é ideal para ser utilizado como veículo para armazenar as células durante transporte, pois as amostras cultivadas em meio PPP tiveram uma viabilidade satisfatória semelhante ao grupo cultivado em DMEM (24 h) que é o meio ideal de cultivo. Notoriamente, o meio PPP conservou a viabilidade celular até 48 h, diferentemente do meio DMEM, que revelou viabilidade celular insatisfatória após 48 h. Isso é explicado pelo fato desse meio precisar de trocas para manter as condições ideais para célula (composição gasosa e temperatura adequada). Como foi simulado um transporte por 48 h, fora das condições (com exposição à temperatura ambiente e ausência de CO<sub>2</sub>) ocorreu alteração do pH com conseqüente morte celular. Segundo Amirkhani et al. (2016), o tecido gorduroso humano é formado por adipócitos, macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, células endoteliais e CTM, e este conjunto celular é chamado de FVE. Desta forma, após o isolamento é necessária uma caracterização do perfil celular obtido da amostra para se certificar que a população celular de interesse foi adquirida. Para tanto, organizações como a Federação Internacional de Terapia e Ciência Adiposa (IFATS) e a ISCT visam à caracterização celular via antígenos de superfície, tendo o antígeno CD34 como um importante marcador de células regenerativas juntamente a marcadores clássicos de MSC como CD73 e CD90 (Bora et al., 2017). Neste estudo foi constatada a presença de todo o nicho celular que compõe o FVE – células endoteliais, CTH e células T, bem como a caracterização celular de CTM se deu de acordo com a classificação das organizações. Curiosamente, nesta amostra houve elevada presença de células T, fato explicado pela hipótese de Silva (2017), em que o ASC derivado de diferentes sítios anatômicos na região abdominal pode ter características morfo-fenotípicas distintas, portanto o conteúdo celular do tecido gorduroso varia tanto com base na região de isolamento quanto pelo protocolo de processamento (Andia et al., 2019; Condé-Green et al., 2016; Dongen et al., 2016; Oberbauer et al., 2015). Sendo assim, o conhecimento do perfil celular de cada sítio anatômico favorece um melhor direcionamento de uso clínico.

## 5. Conclusão

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que a FVE é um produto biológico que pode ser obtido de tecido gorduroso destinado ao descarte, mostrando-se ser um produto viável para aplicação clínica quando utilizado o PPP como meio para transporte, por um período até 48 h. Ainda, este estudo comprovou que a FVE contém inúmeros tipos

celulares de interesse para situações onde um reparo seja desejável, entre eles as células T, células endoteliais, CTM e CTH, células tão desejadas inclusive para procedimentos de rejuvenescimento autólogo. Diferentes métodos de obtenção das células com processamento mínimo precisam ser testados de modo a otimizar o tecido coletado visando aumentar a disponibilidade das células.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Pelé Pequeno Príncipe pela realização das citometrias deste estudo.

## Referências

- Almeida, A. R. H., Menezes, J. A., Araújo, G. K. M., & Mafra, A. V. C. (2008). Utilização de plasma rico em plaquetas, plasma pobre em plaquetas e enxerto de gordura em ritidoplastias: análise de casos clínicos. *Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 23(2), 82-88.
- Almeida, A. R. T., & Sampaio, G. A. A. (2016). Ácido hialurônico no rejuvenescimento do terço superior da face: revisão e atualização - Parte 1. *Surgery & Cosmetic Dermatology*, 8(2): 148-153.
- Amirkhani, M. A., Shoaehassani, A., Soleimani, M., Hejazi, S., Ghalichi, L., & Nilforoushzhadeh, M. A. (2016). Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study. *Bioimpacts*, 6(3), 149-154.
- Andia, I., Maffulli, N., & Burgos-Alonso, N. (2019). Stromal vascular fraction technologies and clinical applications. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19(12), 1289-1305. 10.1080/14712598.2019.1671970.
- Asri, S. R., Setiati, H. D., Asrianti, D., Margono, A., Usman, M., & Yulianto, I. (2005). Optimum concentration of platelet-rich fibrin lysate for human dental pulp stem cells culture medium. *Journal of International Dental and Medical Research*, 12(6), 105-110.
- Bongson, A., & Lee, E. H. (2005). *Stem Cells: From Benchtop to Bedside Illustrated Edition*. (Ed.: Ariff Bongso, National University of Singapore, Singapore)
- Bora, P., & Majumdar, A. S. (2017). Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 145. 10.1186/s13287-017-0598-y.
- Carvalho, A. C. C., & Goldenberg, R. C. S. (2012). *Células-tronco mesenquimais: conceitos, métodos de obtenção e aplicações*, (Ed. Atheneu, São Paulo).
- Cohen, S. R. (2015). Commentary on: expanded stem cells, stromal-vascular fraction, and platelet-rich plasma enriched fat: comparing results of different facial rejuvenation approaches in a clinical trial. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(3), 271-274.
- Cohen, S. R., Hewett, S., Ross, L., Delaunay, F., Goodacre, A., Ramos, C., Leong, T., & Saad, A. (2017). Regenerative cells for facial surgery: biofilling and biocontouring. *Aesthetic Surgery Journal*, 37(suppl\_3), S16-S32.
- Condé-Green, A., Marano, A. A., Lee, E. S., Reisler, T., Price, L. A., Milner, S. M., & Granick, M. S. (2016). Fat grafting and adipose-derived regenerative cells in burn wound healing and scarring: a systematic review of the literature. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 137(1), 302-312. 10.1097/PRS.0000000000001918.
- Crocco, E. I., Alves, R. O., & Alessi, C. (2012). Eventos adversos do ácido hialurônico injetável. *Surgical and Cosmetic Dermatology*, 4(3), 259-263.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *The International Society for Cellular Therapy position statement*, 8(4), 315-317.
- Dongen, J. A. V., Stevens, H. P., Parvizi, M., Lei, B. V. D., & Harmsen, M. C. (2016). The fractionation of adipose tissue procedure to obtain stromal vascular fractions for regenerative purposes. *Wound Repair and Regeneration*, 24(6), 994-1003. 10.1111/wrr.12482.
- Ercole, L. P., Malvezzi, M., Boaretti, A. C., Utiyama, S. R. R., Rachid, A., & Radominski, S. C. (2003). Análise imunofenotípica de subpopulações linfocitárias do sangue periférico na esclerose sistêmica. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 43(3), 141-148.
- Felthaus, O., Prantl, L., Skaff-Schwarze, M., Klein, S., Anker, A., Ranieri, M., & Kuehlmann B. (2017). Effects of different concentrations of Platelet-rich Plasma and Platelet-Poor Plasma on vitality and differentiation of autologous Adipose tissue-derived stem cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 66(1), 47-55. 10.3233/CH-160203.
- Fruhbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J., & Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280(6), E827-847.
- Bernardino Júnior, R., da Cunha Sousa, G., Balbino Lizardo, F., Batista Bontempo, D., Prado e Guimarães, P., & Humberto Macedo, J. (2008). Corpo adiposo da bochecha: um caso de variação anatômica. *Bioscience Journal*, 24(4).
- Marques, A. P. L., Botteon, R. C. C. M., Cordeiro, M. D., Machado, C. H., Botteon, P. T. L., Barros, J. P. N., & Spíndola, P. F. (2014). Padronização de técnica manual para obtenção de plasma rico em plaquetas de bovino. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(Sup 1), 1-6.
- Massumoto, C., Massumoto, S. M., Ayoub, C. A., & Lizier, N. F. (2014). *Células-tronco da coleta aos protocolos terapêuticos*. (Ed. Atheneu São Paulo).

- Meirelles, L. S., Chagastelles, P., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(11), 2204-2213.
- Ministério Da Saúde. (2010). Coleta de sangue, diagnóstico e monitoramento das DST, Aids e herpes virais.
- Moseley, T. A., Zhu, M., & Hedrick, M. H. (2006). Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plastic and Reconstr Surgery*, 118(3), 121-128.
- Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19-31. 10.1002/cyto.a.23242.
- Oberbauer, E., Steffenhagen, C., Wurzer, C., Gabriel, C., Redl, H., & Wolbank, S. (2015). Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regeneration*, 4, 7. 10.1186/s13619-015-0020-0.
- Otero-Viñas, M., & Falanga, V. (2016). Mesenchymal stem cells in chronic wounds: the spectrum from basic to advanced therapy. *Advances in wound care (New Rochelle)*, 15(4), 149-163. 10.1089/wound.2015.0627.
- Pak, J., Lee, J. H., Park, K. S., Park, M., Kang, L. W., & Lee, S. H. (2017). Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *Journal of biomedical science*, 24(1), 9.
- Peres, C. M., & Curi, R. (2005). *Como cultivar células*. (Guanabara Koogan Rio de Janeiro).
- Rigotti, G., Sá, L. C., Amorim, N. F. G., Takiya, C. M., Amable, P. R., Borojevic, R., & Sbarbati, A. (2016). Expanded stem cells, stromal-vascular fraction, and platelet-rich plasma enriched fat: comparing results of different facial rejuvenation approaches in a clinical trial. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(3), 261-270. 10.1093/asj/sjv231.
- Rothenberg, E. V. (1992). The development of functionally responsive T cells. *Advances in immuno-oncology*, 51, 85-214.
- Saeed, M. A., El-Rahman, M. A., Helal, M. E., Zaher, A. R., & Grawish, M. E. (2017). Efficacy of human platelet rich fibrin exudate vs fetal bovine serum on proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 10(1), 38-47. 15283/ijsc16067.
- Silva, M. M. (2017). Efeito do secretoma de células tronco mesenquimais da derme no crescimento do pelo de camundongos (*Mus musculus*) C57BL/6. TCC (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas. Curso de Ciências Biológicas.
- Stroparo, J. L. de O., Weiss, S. G., Fonseca, S. C. da, Spisila, L. J., Gonzaga, C. C., Oliveira, G. C., & Zielak, L. C. (2021). Biomateriais de enxerto ósseo xenogênico não interferem na viabilidade e proliferação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos - um estudo piloto in vitro. *Research, Society and Development*, 10(4), e34410414249. 10.33448/rsd-v10i4.14249.
- Thomas-Porch, C., Li, J., Zanata, F., Martin, E. C., Pashos, N., Genemaras, K., & Gimble, J. M. (2018). Comparative proteomic analyses of human adipose extracellular matrices decellularized using alternative procedures. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(9), 2481-2493.
- Villiers, J.A., Houreld, N.N., & Abrahamse, H. (2011). Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(4), 869-882.
- Yang, Q., Peng, J., Guo, Q., Huang, J., Zhang, L., Yao, J., & Lu S. (2008). A cartilage ECM-derived 3-D porous acellular matrix scaffold for in vivo cartilage tissue engineering with PKH26-labeled chondrogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 29(15), 2378-2387.
- Yun, S. I., Jeon, Y. R., Lee, W. J., Lee, J. W., Rah, D. K., Tark, K. C., & Lew, D. H. (2012). Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatologic Surgery*, 38(10), 1678-1688. 10.1111/j.1524-4725.2012.02495.x.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, P., & Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7(2), 211-228.
- Zwigenberger, S., Yao, Z., Jacobi, A., Vater, C., Valladares, R. D., & Stiehler, M. (2013). Stem cell attraction via SDF-1 $\alpha$  expressing fat tissue grafts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(7): 2067-2074.