

VITOR PENTEADO FIGUEIREDO PAGOTTO

**Aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo para
tratamento de fístula enterocutânea em modelo experimental murino**

São Paulo

2023

VITOR PENTEADO FIGUEIREDO PAGOTTO

**Aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo para
tratamento de fístula enterocutânea em modelo experimental murino**

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

Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e
Medicina Perioperatória

Área de concentração: Cirurgia Translacional

Orientador: Prof. Dr. Rolf Gemperli

Coorientadora: Profa. Dra. Cristina Pires Camargo

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pagotto, Vitor Penteado Figueiredo
Aplicação de células-tronco derivadas de tecido
adiposo para tratamento de fístula enterocutânea em
modelo experimental murino / Vitor Penteado
Figueiredo Pagotto. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas
e Medicina Perioperatória. Área de Concentração:
Cirurgia Translacional.
Orientador: Rolf Gemperli.
Coorientadora: Cristina Pires Camargo.

Descritores: 1.Medicina regenerativa 2.Células-
tronco mesenquimais 3.Transplante de células-tronco
mesenquimais 4.Fístula cutânea 5.Fístula do sistema
digestório 6.Cirurgia plástica

USP/FM/DBD-344/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Pagotto VPF. Aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo para tratamento de fístula enterocutânea em modelo experimental murino [doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Regina Célia Penteado Figueiredo e Mauro Pagotto, minha profunda gratidão e afeto por cada momento que tive com vocês em minha vida. Isso me fez chegar até aqui.

À minha esposa, Giovanna Rios Bazo Pagotto, pelo apoio incondicional às minhas ideias e sonhos, estimulando meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Rolf Gemperli, que me ensinou, guiou e orientou durante todos esses anos, desde a residência até a pós-graduação, sendo eterno incentivador e mentor do meu crescimento pessoal e profissional.

À Professora Doutora Cristina Pires Camargo, pelo incentivo e apoio incondicional para minha vida acadêmica.

Aos membros do LIM/04 - Laboratório de Microcirurgia - Cirurgia Plástica da FMUSP, na pessoa da Professora Doutora Cristina Pires Camargo, que contribuíram para a minha formação profissional e para o andamento desta tese.

Aos professores e assistentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em nome do Professor Doutor Fábio de Freitas Busnardo, Supervisor do Serviço, e do Professor Doutor Dimas Milcheski, Diretor do Serviço.

Aos residentes do Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em nome do Professor Doutor Dov Charles Goldenberg, responsável pelo Programa de Residência Médica.

Aos participantes do Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e Medicina Perioperatória - ACCEPT FMUSP -, cuja orientação e suporte foram fundamentais para a conclusão desta tese.

A toda minha família, que sempre me apoiou e me incentivou.

Aos meus amigos, que me estimularam e apoiaram na conclusão desta tese.

Aos animais de investigação, cujas contribuições salvaram milhões de vidas humanas e animais, além de reduzir o sofrimento em todo o mundo.

*Logic will get you from A to B. Imagination will
take you everywhere.*

Albert Einstein

RESUMO

Pagotto VPF. Aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo para tratamento de fístula enterocutânea em modelo experimental murino [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: fístula enterocutânea (FEC) corresponde a uma comunicação anômala entre a luz intestinal e a pele. De acordo com a localização da FEC e da magnitude do seu débito de conteúdo intestinal, pode estar associada a elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Embora existam várias alternativas terapêuticas, consideráveis taxas de insucesso e recidiva ainda permanecem como desafio clínico. A recente incorporação de tratamento com o uso de células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA) para o fechamento de FEC sugere resultados benéficos, tanto em termos de segurança quanto de eficácia. Entretanto, o mecanismo de ação do uso de CTA apresenta lacunas de conhecimento. **Objetivos:** avaliar a redução do diâmetro da FEC após aplicação perifistular de células-tronco derivadas de tecido adiposo em um modelo experimental de fístula enterocutânea. **Método:** foram utilizados 26 ratos Wistar machos com peso variando de 300 g a 450 g. Todos os animais, sob anestesia geral, foram submetidos a procedimento para confecção de FEC. Após 4 semanas deste procedimento, os animais foram divididos em três grupos: controle (C) (n = 8), em que nenhuma intervenção foi realizada, duas aplicações perifistulares de meio de cultura (MC) (n = 9) e duas aplicações perifistulares de 1×10^6 CTA alógenas (CTA) (n = 9). O intervalo entre cada aplicação foi de uma semana. Quatro semanas após a primeira aplicação, os animais foram submetidos a eutanásia e amostras de tecido submetidos a avaliação histopatológica por hematoxilina-eosina para contagem de vasos sanguíneos e células inflamatórias, avaliação de inflamação e fibrose tecidual, e de expressão gênica por qRT-PCR. **Resultados:** os animais submetidos à aplicação de CTA ($3,3 \pm 0,6$ mm) apresentaram redução do diâmetro da FEC de 68,3% em comparação ao grupo C ($10,4 \pm 2,3$ mm; $p = 0,002$) e de 65,3% em relação ao grupo MC ($9,5 \pm 4,1$ mm; $p = 0,011$). Não houve diferença na contagem de células inflamatórias entre os grupos ($p = 0,29$), porém a quantidade de vasos sanguíneos em relação ao grupo C ($12,43 \pm 4,3$ células / campo) foi 134,7% maior no grupo CTA ($29,1 \pm 8,3$ células/campo) ($p = 0,003$). A expressão gênica de CD68 apresentou redução de 51,3% no grupo CTA ($0,58 \pm 0,65$) em relação ao grupo C ($1,19 \pm 0,78$) ($p = 0,012$), enquanto a expressão de MMP9 foi 88,6% inferior no grupo CTA ($0,19 \pm 0,18$) em relação ao grupo C ($1,66 \pm 1,50$) ($p = 0,009$). Não houve diferença na expressão entre os outros genes avaliados (IL-10, IL-1, MMP3 e TNF) ($p > 0,05$). **Conclusão:** o estudo reforça a ação da CTA como opção terapêutica na FEC. O aumento da densidade vascular verificado neste estudo pode revelar um dos mecanismos envolvidos. Mais estudos são necessários para compreender os mecanismos moleculares e genéticos envolvidos.

Palavras-chave: Medicina regenerativa. Células-tronco mesenquimais. Transplante de células-tronco mesenquimais. Fístula cutânea. Fístula do sistema digestório. Cirurgia plástica.

ABSTRACT

Pagotto VPF. Application of adipose tissue-derived stem cells for the treatment of enterocutaneous fistula in an experimental murine model [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2023.

Introduction: enterocutaneous fistula (ECF) corresponds to an anomalous communication between the intestinal lumen and the skin. According to the location of the ECF and the magnitude of its intestinal content output, it may be associated with high rates of morbidity and mortality. Although there are several therapeutic alternatives, considerable failure and recurrence rates still remain a clinical challenge. The recent incorporation of treatment using adipose tissue-derived stem cells (ASC) suggests beneficial results, both in terms of safety and efficacy. However, the mechanism of action of the use of ASC has knowledge gaps. **Objectives:** to evaluate the effect of peristular application of stem cells derived from adipose tissue in an experimental model of enterocutaneous fistula. **Methods:** 26 male Wistar rats weighing between 300 g and 450 g were analyzed. All animals, under general anesthesia, underwent a procedure for the preparation of ECF. After 4 weeks of these procedures, the animals were divided into three groups: control (C) (n = 8), two peristular applications of culture medium (CM) (n = 9) and two peristular applications of 1×10^6 allogeneic ASC each (ASC) (n = 9). The interval between each application was one week. Four weeks after the first application, the animals were euthanized and tissue samples submitted to histopathology evaluation by hematoxylin eosin for blood vessel and inflammatory cell count, evaluation of inflammation and tissue atrophy, and gene expression by qRT-PCR. **Results:** the animals submitted to the application of ASC (3.3 ± 0.6 mm) showed a reduction in the diameter of the ECF of 68.3% compared to group C (10.4 ± 2.3 mm; $p = 0.002$) and of 65.3% in relation to the CM group (9.5 ± 4.1 mm; $p = 0.011$). There was no difference in the inflammatory cell count between the groups ($p = 0.29$), but the number of blood vessels in relation to group C (12.43 ± 4.3 cells/field) was 134.7% higher in the ASC group (29.1 ± 8.3 cells/field) ($p = 0.003$). The CD68 gene expression showed a reduction of 51.3% in the ASC group (0.58 ± 0.65) in relation to the C group (1.19 ± 0.78) ($p = 0.012$), while the expression of MMP9 was 88.6% lower in the C group (1.66 ± 1.50) compared to the ASC group (0.19 ± 0.18) ($p = 0.009$). There was no difference in expression between the other genes evaluated (IL-10, IL-1, MMP3 and TNF) ($p > 0.05$) **Conclusion:** the study reinforces the action of ASC as a therapeutic option in ECF. The increase in vascular density observed in this study may reveal one of the mechanisms involved. More studies are needed to understand the molecular and genetic mechanisms involved.

Keywords: Regenerative medicine. Mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells transplantation. Cutaneous fistula. Digestive system fistula. Surgery, plastic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da ativação das células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA) pelas células e substâncias presentes no meio	26
Figura 2 - Fluxograma do modelo experimental	30
Figura 3 - Citometria de fluxo: os marcadores CD31 e CD45 apresentaram resultado negativo, enquanto os marcadores CD29, CD73, CD90 e CD105 apresentaram resultado positivo	34
Figura 4 - Citometria de fluxo: marcador PI apresentou resultado negativo	34
Figura 5 - Indução da fístula enterocutânea	35
Figura 6 - Aplicação perifistular subdérmica de 0,5 mL de solução de meio de cultura ou de células-tronco derivadas de tecido adiposo contendo 1×10^6 células	37
Figura 7 - Aferição do diâmetro da FEC por régua milimetrada posicionada no mesmo plano	39
Figura 8 - Análise histopatológica	50
Figura 9 - Gel de agarose 1% realizado com as amostras de RNA total, mostrando boa integridade do rRNA. A banda superior representa a banda 28S e a banda inferior representa 18S (rRNA)	51

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Comparação do diâmetro da fístula enterocutânea entre os grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA).....47
- Gráfico 2 - Comparação da quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA).....48
- Gráfico 3 - Comparação dos níveis de expressão dos genes *CD68*, *IL-10*, *IL-1*, *MMP3*, *MMP9* e *TNF* entre os grupos controle, meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA).....53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Comparação entre a presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos nos grupos controle, meio de cultura e células-tronco derivadas de tecido adiposo.....49
- Tabela 2 - Comparação entre os escores de inflamação e fibrose nos grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco (CTA) derivadas de tecido adiposo49
- Tabela 3 - Comparação da expressão dos genes de interesse entre os grupos controle, meio de cultura e células-tronco derivadas de tecido adiposo, tendo o grupo controle como referência52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bFGF	- <i>Basic fibroblast growth factor</i>
CCL	- Citocinas
cDNA	- DNA complementar
CT	- Células-tronco
CTA	- Células-tronco derivadas de tecido adiposo
CTM	- Células-tronco mesenquimais
CXCL	- Ligantes de citocinas
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	- <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ou ácido etilendiamino tetra-acético
EUA	- Estados Unidos da América
FEC	- Fístula enterocutânea
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM-CSF	- <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	- Hematoxilina-eosina
HGF	- <i>Hepatocyte growth factor</i>
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HLA-G5	- <i>Human leukocyte antigen G5</i>
IDO	- Indolamina 2-3 dioxigenase
IFN	- Interferon
IGF-1	- <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	- Interleucina
iNOS	- <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
LIF	- <i>Leukemia-inhibitory factor</i>
MC	- Meio de cultura
MCP-1	- <i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	- <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MMP3	- Metalometaproteinase 3
MMP9	- Metalometaproteinase 9
MR	- Medicina regenerativa
NO	- Óxido nitroso
PBS	- <i>Phosphate buffer saline</i>
PGE-2	- Prostaglandina E2
PIGF	- <i>Phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein</i>
qRT-PCR	- Reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa quantitativa
RNA	- Ácido ribonucleico
SCF	- <i>Stem cell factor</i>

- SDF-1 - *Stromal cell-derived factor 1*
- TGF- β - *Transforming growth factor β*
- TNF - Fator de necrose tumoral
- VEGF α - *Vascular endothelial growth factor*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	20
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	21
4	MÉTODOS	28
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	29
4.2	PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO	31
4.3	CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
4.4	INDUÇÃO DA FÍSTULA ENTEROCUTÂNEA	35
4.5	APLICAÇÃO PERIFISTULAR DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO.....	37
4.6	EUTANÁSIA	38
4.7	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	38
4.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	39
4.9	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	40
4.9.1	Extração de RNA total	40
4.9.2	Análise da expressão gênica por qRT-PCR	42
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.10.1	Cálculo do tamanho da amostra	44
4.10.2	Análise descritiva e inferencial	44
4.10.3	Expressão gênica	44
5	RESULTADOS	46
5.1	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	47
5.2	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	48
5.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	51
5.3.1	Análise de quantidade e qualidade das amostras de RNA total obtidas.....	51
5.3.2	Descrição da casuística do estudo	52
5.3.3	Resultado da análise de expressão gênica	52
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE	80

1 INTRODUÇÃO

Fístula enterocutânea (FEC) é definida como uma comunicação anormal entre o trato intestinal e a pele, associada a consideráveis taxas de morbidade quando comparada com outras condições cirúrgicas, atingindo até 30% de mortalidade (Farooqi; Tuma, 2018; Heimroth; Chen; Sutton, 2018; Cowan; Cassaro, 2018).

FEC são decorrentes em 75% dos casos por complicações cirúrgicas, como deiscência de anastomoses intestinais, lesões tróficas da parede intestinal e enterotomias inadvertidas, especialmente durante a lise de aderências em neoplasias e doenças inflamatórias (Edmunds Jr.; Williams; Welch, 1960; Meguid et al., 1988; Lloyd; Gabe; Windsor, 2006).

Outras causas de formação de FEC correspondem a doenças inflamatórias do intestino, como doença de Crohn e retocolite ulcerativa, neoplasia, doença diverticular, infecção, sepse e radiodermite (Edmunds Jr.; Williams; Welch, 1960; Galland; Spencer, 1986; Tong; Lim; Brody, 2012; Kasperek et al., 2012; Manos; Wolfgang, 2014). Nos países em desenvolvimento, as doenças infecciosas apresentam uma maior relevância na formação espontânea de FEC, destacando-se tuberculose, amebíase e tifo (Roy, 1986). Enquanto isso, nos países desenvolvidos, a doença de Crohn aparece como uma das principais causas de formação espontânea (Rolandelli; Roslyn, 1996; Berry; Fischer, 1996).

Apesar de não existir uma classificação padronizada para FEC, a mesma pode ser avaliada quanto à localização de origem, à complexidade de seu trajeto e também ao débito diário. As fístulas são classificadas como altas quando possuem origem no estômago, no duodeno ou na porção superior do intestino delgado. Já as fístulas baixas são originadas da porção distal do intestino delgado ou no cólon-sigmoide. Ainda mais, o órgão de onde o trajeto se inicia - estômago, duodeno, intestino delgado ou cólon - é utilizado na definição do nome, como por exemplo fístula gastrocutânea ou enterocutânea. Os trajetos podem ser simples ou complexos, dependendo da extensão e da quantidade de alças acometidas. Já o seu orifício pode ser lateral ou terminal em relação à alça, o que impacta na quantidade de conteúdo intestinal eliminado (Rolandelli; Roslyn, 1996). Por fim, as fístulas podem ser caracterizadas de acordo com o seu débito, em que volumes mais elevados estão associados à origem alta (Osborn; Fischer, 2009; Gribovskaja-Rupp; Melton, 2016):

- débito baixo: inferior a 200 mL/dia;
- débito moderado: 200 mL/dia a 500 mL/dia;
- débito alto: superior a 500 mL/dia.

Fístula enteroatmosférica é um subtipo específico de fístula intestinal em que a parede abdominal se encontra aberta e a luz do trato gastrointestinal encontra-se em comunicação direta com a atmosfera, sem a interposição da pele ou de partes moles (Yin et al., 2014). Essa condição apresenta maiores riscos de complicação e exige cuidados especializados.

A combinação de exame clínico e exames de imagens são indicados para a avaliação de qualquer tipo de FEC, que possuem importante relevância clínica. Fístulas causadas por complicações cirúrgicas, sem obstrução distal, com tecido intestinal adjacente saudável, de trajeto simples, com extensão superior a 2 cm, defeito na parede intestinal inferior a 1 cm, sem epitelização do trajeto e com débito baixo apresentam melhor prognóstico (Campos et al., 1999; Gonzalez, 2001; Haffejee, 2004; González-Pinto; Polk; Schwab, 2012).

As FEC em geral podem causar desnutrição proteico-calórica, alterações hidroeletrólíticas - magnésio, potássio, cloreto e bicarbonato -, insuficiência intestinal, infecção e morte (Dárdai; Pirityl; Nagy, 1991; González-Pinto; Gonzalez, 2001; Nightingale, 2003; Lal et al., 2006; Polk; Schwab, 2012; Tong; Lim; Brody, 2012). Insuficiência intestinal grave, definida pela incapacidade do trato gastrointestinal absorver a quantidade de nutrientes necessárias para a manutenção da vida, é uma complicação que acomete cerca de 3 a 6 milhões de pessoas por ano nos Estados Unidos da América (EUA) no final do século 20, devido majoritariamente à evolução desfavorável da FEC (David et al., 2011; Pécora et al., 2013). Apesar disso, a taxa de mortalidade é relacionada normalmente à sepse (Hollington et al., 2004; Murphy et al., 2013).

FECs representam um importante impacto tanto para os pacientes quanto para os sistemas de saúde, já que prolongam as internações em unidades de internação de $16,2 \pm 17,3$ dias para $82,1 \pm 100,8$ dias e também em unidades de terapia intensiva de $7,6 \pm 9,3$ dias para $28,5 \pm 30,5$ dias, além de provocar um aumento médio nos custos hospitalares de US\$ 130.000,00 para US\$ 540.000,00, de acordo com levantamento realizado nos Estados Unidos da América em 2006 (Teixeira et al., 2009). Além disso, a jornada do paciente durante o tratamento é caracterizada por sofrimento, altos impactos psicossociais e na qualidade de vida (Nightingale, 2003; Nightingale; Woodward, 2006; Marzo et al, 2015).

Poucos estudos clínicos estão disponíveis para a adoção de recomendações definitivas no tratamento de FECs. Assim, as principais orientações são baseadas em opiniões de especialistas e estudos com baixo nível de evidência. Entretanto, é

consenso que o tratamento dessa condição deve ser conduzido em centros de referência, com abordagem multidisciplinar e individualizada de acordo com as características do paciente (Rolandelli; Roslyn, 1996; Lynch et al., 2004; Schechter, 2011; Tong; Lim; Brody, 2012; Visschers et al., 2012; NHS, 2013; Davis; Johnson, 2013; Weledji, 2017; Heimroth, Chen e Sutton, 2018).

A prioridade na abordagem inicial de um paciente com FEC deve ser a estabilização clínica, como a correção de distúrbios hidroeletrólíticos e também o tratamento de potencial infecção, tanto com a utilização de antibióticos quanto com a drenagem percutânea de abscessos, se presentes (Campos et al., 1999; González-Pinto; Gonzalez, 2001; Hollington et al., 2004; Haffejee, 2004; Manos; Wolfgang, 2014). A avaliação e tratamento de possíveis alterações do estado nutricional pode ser feita tanto por nutrição enteral quanto por nutrição parenteral total, a depender das características da fístula e das condições clínicas do paciente (Meguid; Campos, 1996; Tong; Lim; Brody, 2012; Polk; Schwab, 2012). A nutrição enteral está associada aos benefícios imunológicos e hormonais de se preservar a mucosa intestinal e também não apresenta os altos custos e riscos de complicações relacionados à nutrição parenteral (Braga et al., 2001; Alpers et al., 2002; Collier et al., 2007). Esta última, por sua vez, pode reduzir a quantidade de secreção intestinal, reduzindo assim o débito fistular (González-Pinto; Gonzalez, 2001; Lloyd; Gabe; Windsor, 2006).

Além do cuidado nutricional, atenção especial deve ser direcionada para os cuidados com a pele. O líquido exteriorizado através da fístula causa irritação e maceração da pele, promovendo dor e desconforto (Lundy; Fischer, 2010; Lee, 2012). Assim, produtos de barreira devem ser aplicados para sua proteção, evitando infecções locais e favorecendo o fechamento espontâneo (Nightingale; Woodward, 2006). Em casos graves, o transplante musculocutâneo de parede abdominal é a única alternativa para o restabelecimento da integridade não apenas da pele, mas também de toda a parede abdominal (Galvão et al., 2003; Lee et al., 2014).

O tratamento medicamentoso da FEC consiste na prescrição de substâncias capazes de reduzir o fluxo intestinal. Assim, podem-se utilizar antagonistas do receptor H₂ e inibidores da bomba de prótons para fístulas altas e agentes antimotilidade, somatostatina e seus análogos, como octreotide e lanreotide, para fístulas baixas (Alvarez; McFadden; Reber, 2000; Hesse; Ysebaert; Hemptinne, 2001; Alvizatos; Felekis; Zorbalas, 2002; Nightingale, 2003; Gayral et al., 2009; Rahbour et

al., 2012). Outra estratégia medicamentosa deve-se ao uso de medicamentos imunossupressores como azatioprina e ciclosporina, quando a etiologia das fístulas for doença inflamatória intestinal, ou seja, doença de Crohn (Sands et al., 2004). Quando todas essas medidas são empregadas de forma conjunta, os pacientes apresentam chances inferiores a 50% de apresentar resolução espontânea da FEC, exceto na presença de tecido intestinal acometido por patologia nas proximidades - doença de Crohn, neoplasia ou radioenterite -, deiscência de anastomose superior a metade de seu calibre, curta extensão do trajeto da fístula e obstrução distal (Berry; Fischer, 1996; Rolandelli; Roslyn, 1996; Weledji; Lloyd; Gabe; Windsor, 2006; Chichom, 2012; Manos; Wolfgang, 2014; Quinn; Falconer; McKee, 2017). Para esses casos, o tratamento cirúrgico costuma ser indicado.

Cirurgia para a reconstrução da FEC somente deve ser indicada quando o paciente apresentar condições nutricionais satisfatórias, como albumina superior a 3,0 g/dL e índice de massa corpórea (IMC) superior a 20 kg/m², e resolução de eventuais processos infecciosos. Essa condição favorável costuma ser atingida após cerca de 4 a 6 semanas de tratamento multidisciplinar (Berry; Fischer, 1996; Meguid; Campos, 1996, Rolandelli; Roslyn, 1996; González-Pinto; Gonzalez, 2001; Lloyd; Gabe; Windsor, 2006; Martinez et al., 2012; Manos; Wolfgang, 2014; Quinn; Falconer; McKee, 2017). O objetivo do tratamento cirúrgico é a ressecção conservadora do segmento de intestino acometido, o estabelecimento da continuidade do trânsito intestinal e a reconstrução da parede abdominal, que pode necessitar de telas ou matrizes dérmicas (Alexandrides et al., 2000; Whiteford et al., 2005; Wise; Schwartz, 2006; Carlsen et al., 2007; Singh; George; Mortensen, 2007; Zanfi et al., 2008; Lee, 2012; Manos; Wolfgang, 2014).

Apesar da abordagem multidisciplinar, as taxas de recidiva permanecem altas, atingindo até 75% nos primeiros seis meses (Lynch et al., 2004; Schecter, 2011; Visschers et al., 2012). Assim, o uso de novas classes de medicamentos e terapias são empregados atualmente no tratamento da FEC. Dentre as novas estratégias disponíveis, recorre-se ao uso de agentes biológicos como o infliximabe. Este medicamento é um anticorpo monoclonal que se liga ao receptor de fator de necrose tumoral (TNF) das células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos, inibindo a cadeia de resposta inflamatória no organismo (Neurath et al., 1996; Present et al., 1999; Amiot et al., 2014). Embora sua indicação e seu uso recentes tanto para o tratamento de fístulas de origem inflamatórias intestinais quanto de outras etiologias,

os resultados a curto e médio prazo são insatisfatórios (Sands et al., 2004; Thia et al., 2009; Bourikas; Koutroubakis, 2010; Roumeguère et al., 2011; Alessandroni et al., 2011). Além disso, agentes biológicos em geral são potentes imunossupressores, aumentando o risco de os pacientes adquirirem infecções oportunistas ou reativarem infecções latentes - tuberculose e hepatite B. Outra desvantagem do seu uso deve-se ao custo elevado e potencial risco de reações locais de infusão e insuficiência cardíaca (Schwartz et al., 2004; de la Portilla et al., 2013).

Tanto as fístulas causadas por doenças inflamatórias intestinais quanto aquelas de outras origens apresentam elevada quantidade de TNF (Present et al., 1999; Cho, 2008; Rahbour et al., 2011). Essa substância apresenta importante atividade pró-inflamatória através da indução das citocinas Interleucina (IL)-1 e IL-6, aumento de leucócitos e também migração de células dos vasos sanguíneos por aumento da permeabilidade capilar (Lloyd; Gabe; Windsor, 2006; Rahbour et al., 2011). Assim, essa contínua atividade inflamatória presente na FEC atua de forma contrária à cicatrização tecidual, abrindo espaço para outras terapias com efeito nesse mecanismo.

Devido à ausência de terapias capazes de proporcionar resultados satisfatórios e permanentes no tratamento da fístula enterocutânea, tratamentos com células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA) começam a ser empregados em pacientes portadores de FEC recalcitrantes ou com restrições de serem submetidos ao uso de imunobiológico (Panés et al., 2016; Panés et al., 2018). As células-tronco (CT) são consideradas uma ferramenta promissora dentro da área de medicina regenerativa (MR) devido a sua capacidade de modular a resposta inflamatória e imunológica (Singer; Caplan, 2011; DelaRosa et al., 2012a; de la Portilla et al., 2013). A MR pode ser definida com uma área dentro da medicina que busca a substituição ou regeneração de células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função normal. Dentro dessa área, as células-tronco apresentam grande destaque. Os mecanismos de ação das CT são não apenas proliferação e diferenciação celular, mas principalmente efeito parácrino por meio da liberação de diversas substâncias, como citocinas, interleucinas e fatores de crescimento (DelaRosa et al., 2009; Doorn et al., 2012).

A aplicação de CTA na FEC começou a ser avaliada no início dos anos 2000, demonstrando resultados promissores (García-Olmo et al., 2003; García-Olmo et al., 2005; García-Olmo et al., 2009; Ciccocioppo et al., 2011; Scala et al., 2012). Entre as principais vantagens dessa nova terapia encontram-se a relativa praticidade de

aplicação, que poderia ser realizado sem a necessidade de prolongadas internações, o fato de ser pouco invasivo e não depender da capacidade do profissional de saúde, diferentemente do que acontece no tratamento cirúrgico (de la Portilla et al., 2013).

Quando presentes na FEC, as CTA são ativadas pelos mediadores inflamatórios locais, iniciando a produção de substâncias imunomoduladoras que sinalizam a redução da inflamação crônica e estimulam a cicatrização, favorecendo assim a resolução da fístula (Singer; Caplan, 2011; DelaRosa et al., 2012b; de la Portilla et al., 2013; García-Olmo et al., 2015). Essa remissão mostrou-se sustentada ao longo de meses, evitando o uso contínuo de medicamentos imunossupressores pelos pacientes ou tentativas frustradas de correção cirúrgica (Panés et al., 2018).

Apesar desse avanço recente no uso de CTA para o tratamento da FEC, o mecanismo de ação dessa terapia ainda não está completamente elucidado (Singer; Caplan, 2011; DelaRosa et al., 2012b; Jackson; Nesti; Tuan, 2012; Ryska et al., 2017; Bacakova et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a redução do diâmetro da fístula enterocutânea após aplicação perifistular de células-tronco alógenas derivadas de tecido adiposo em um modelo experimental murino.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Os desfechos secundários do estudo são:

- avaliar as alterações de histopatologia decorrentes da aplicação de CTA: quantidade de células inflamatórias, quantidade de vasos sanguíneos, escore de inflamação e escore de fibrose;
- avaliar alterações de expressão gênica relacionados ao processo inflamatório: CD68, TNF, IL-1, IL-10, metalometaproteinase 3 (MMP3) e metalometaproteinase 9 (MMP9).

3 REVISÃO DA LITERATURA

Células-tronco são definidas como unidades biológicas responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração dos órgãos e/ou tecidos do organismo. As CT são capazes de renovar uma população celular específica e também de se diferenciar em diversas outras linhagens celulares. Assim, apresentam grande potencial para uso em engenharia tecidual e terapias celulares (Weissman, 2000; Weissman, 2015; Dulak et al., 2015).

CT podem ser originadas de tecidos embrionários, fetais, adultos e de células diferenciadas após reprogramação genética, denominadas células-tronco pluripotentes induzidas. Apesar de as CT adultas apresentarem o menor potencial de se diferenciar em diversas linhagens celulares elas apresentam menor restrição ética e legal, quando comparadas aos tecidos embrionários e fetais, e também menor risco associado aos efeitos das mutações das células pluripotentes induzidas (Weissman, 2000; Kucia; Wu; Ratajczak, 2007; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Can, 2008; Kerr et al., 2008; Hua et al., 2009; Chen et al., 2011; Zuba-Surma et al., 2011; Ding et al., 2011; Da Sacco; De Filippo; Perin, 2011; Witkowska-Zimny et al., 2012; Jiao et al., 2012; Jaramillo-Ferrada et al., 2012; Zhang et al., 2012; Bryzek et al., 2013; Jaing, 2014; Tan; Ooi; Wang, 2014; Weissman, 2015; Dulak et al., 2015; Rony et al., 2015; Singh et al., 2015; Visvader; Clevers, 2016; Van Pham et al., 2016; Zou et al., 2016; Kargozar et al., 2018). Por isso, são a linhagem de preferência para uso em pesquisa e na medicina regenerativa (Bacakova et al., 2018) (Quadro 1).

Quadro 1 - Linhagens de células-tronco, tecidos de origem e potencial de diferenciação

Linhagem	Tecido de origem	Potencial de diferenciação
embrionária	mórula blastocisto	totipotente pluripotente
fetal	feto placenta líquido amniótico	pluripotente multipotente
adulto	medula óssea gordura pele músculo fígado sangue	multipotente oligopotente bipotente unipotente
induzida	células somáticas diferenciadas	pluripotente

Dentre os tecidos adultos viáveis para a obtenção de células-tronco, o tecido adiposo apresenta várias vantagens como pouca limitação de volume doador, localização subcutânea e técnica de obtenção pouco invasiva (Tobita; Orbay; Mizuno, 2011; Mizuno, 2013; Bacakova et al., 2018). Em comparação às células-tronco derivadas da medula óssea (CTMO), outra fonte possível de coleta, as CTA sofrem senescência mais tardiamente, apresentam maior potencial proliferativo e também maior produção autócrina de fatores de crescimento e imunomoduladores (Zhang et al., 2012; Hsiao et al., 2012; Mizuno, 2013; Ong; Sugii, 2013; Ding et al., 2013; Zhou et al., 2013; Melief et al., 2013; Barba et al., 2013; Kokai; Marra; Rubin, 2014; Frölich; Hagen; Kleinsasser, 2014; Varghese et al., 2017). Além disso, apesar de a concentração de CT na medula óssea ($0,2 \times 10^6$ células/g) e na gordura ($0,1 \times 10^6$ células/g) serem equivalentes, a facilidade de obtenção de tecido adiposo e a quantidade disponível para coleta possibilitam a obtenção de maiores quantidades de CT no tecido adiposo (Fettah et al., 2016; Alstrup et al., 2020).

As CTA pertencem à categoria de células mesenquimais (CTM), isto é, do tecido embrionário derivado da mesoderme. Assim, são capazes de se diferenciar facilmente nas linhagens celulares dos tecidos conjuntivos, como adipócitos, osteoblastos, fibroblastos, miócitos, condrócitos e células estromais, entre outras (Caplan, 2009). CTA são assim caracterizadas por rápida expansão, multipotência, efeitos imunomodulatórios e suporte à regeneração dos tecidos deflagrados pelos processos locais (Aggarwal; Pittenger, 2005; Phinney; Prockop, 2007).

Como todas as células possuem meia-vida e devem ser repostas ao mesmo ritmo que se esvaem, as células-tronco mesenquimais são a fonte proposta dessa reposição (Caplan, 2009). A necessidade de repor e regenerar tecidos é crescente, devido ao aumento de doenças degenerativas, neoplasias, trauma e malformações (Ikada, 2006; Shekkeris et al., 2012). Devido ao grande potencial de CTA em se proliferar e diferenciar, são as mais vantajosas na medicina regenerativa. Podem ser usadas tanto como aplicação direta no tecido acometido, isto é, na chamada terapia celular, quanto para engenharia celular, quando são aplicadas em estruturas específicas (Shekkeris et al., 2012; Zhang et al., 2012; Mizuno, 2013).

Inicialmente, os artigos demonstraram que os efeitos regenerativos das CTA eram decorrentes de sua intensa diferenciação e proliferação celular. Entretanto, atualmente seu efeito é creditado tanto à vasta gama de moléculas mediadoras da resposta inflamatória e imunológica, quanto ao seu potencial de modulação celular

(Singer; Caplan, 2011). Apesar de terem sido descobertas somente em 2002, mais de 3200 moléculas, 2400 proteínas e 80 fatores de crescimento já foram identificados como sendo produzidos por esse tipo de célula (Mead et al., 2014; Otero-Ortega et al., 2015; Kalinina et al., 2015; Riis et al., 2016).

Os principais mediadores produzidos pelas CTA capazes de mediar a resposta inflamatória local após o estímulo tecidual específico são indolamina 2-3 dioxigenase (IDO), interferon (IFN), óxido nítrico (NO), IL-10, prostaglandina E2 (PGE-2), *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), *human leukocyte antigen G5* (HLA-G5), *hepatocyte growth factor* (HGF), *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *transforming growth factor β* , (TGF- β), *leukemia-inhibitory factor* (LIF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *phosphatidylinositol-glycan biosynthesis class F protein* (PIGF), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), IL-6, *stem cell factor* (SCF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e angiopoetina (Doorn et al., 2012).

Essas substâncias atuam em fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos NK, linfócitos B, linfócitos T efetores (h1 e h2) e linfócitos T reguladores (Di Nicola et al., 2002; Krampera et al., 2003, Corcione et al., 2006; Raffaghello et al., 2008; Prigione et al., 2009; Ghannam et al., 2010; DelaRosa et al., 2012b). As ações celulares acontecem tanto por componentes dependentes de contato quanto por ação parácrina (Maccario et al., 2005; Sakaguchi et al., 2006; Liotta et al., 2008; Gonzalez-Rey et al., 2010). Seus principais efeitos podem ser agrupados em seis diferentes grupos: imunomodulação, angiogênese, estímulo ao crescimento e diferenciação de células-tronco locais, quimiotaxia, inibição da apoptose e inibição de fibrose (Singer; Caplan, 2011).

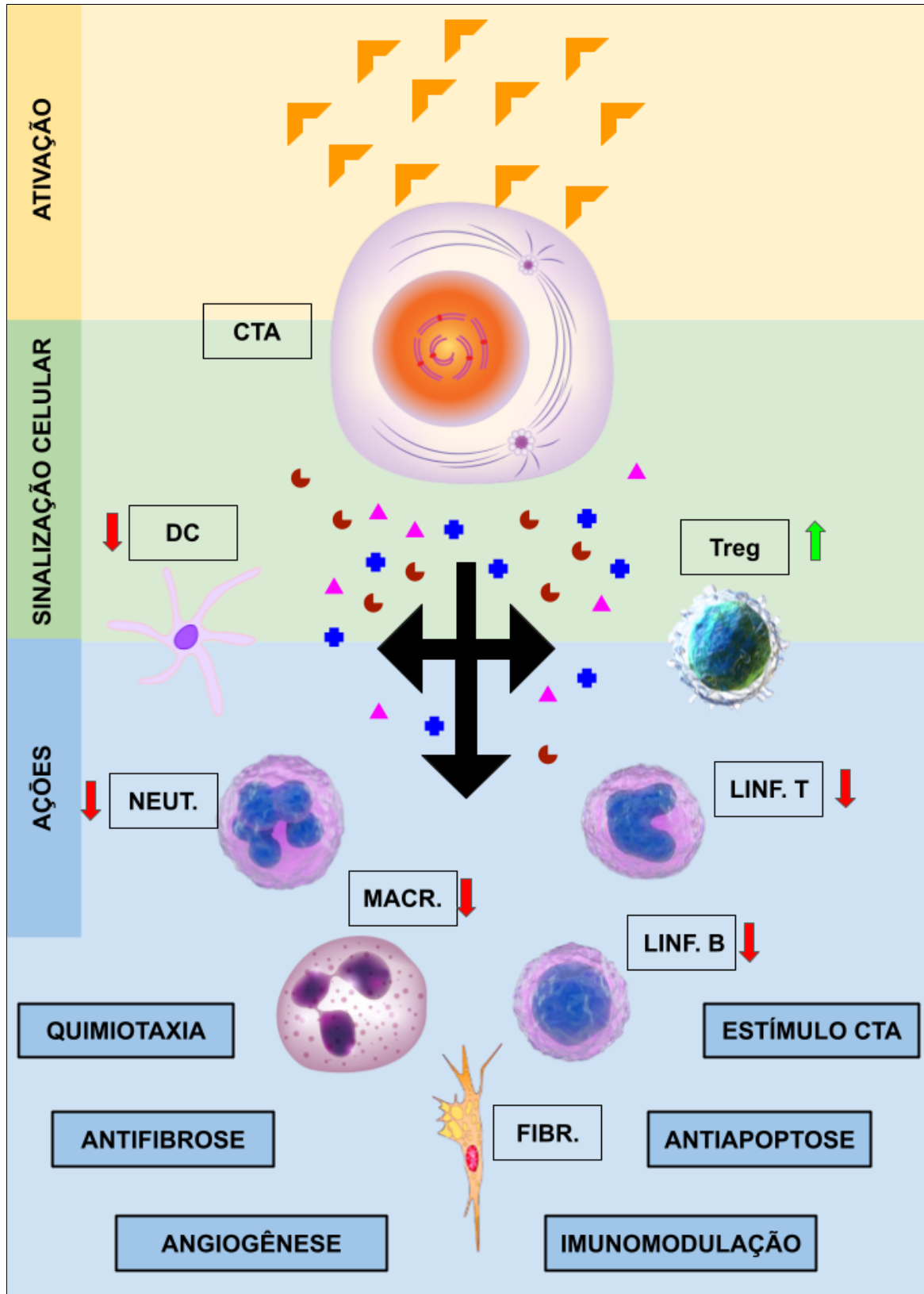
A modulação da resposta imune é deflagrada na presença de PGE2, HLA-G5, HGF, iNOS, IDO, TGF- β , LIF, IL-10. Essas moléculas promovem a inibição da proliferação de linfócitos TCD4+ e TCD8+ e linfócitos NK, a supressão da produção de imunoglobulinas por linfócitos B e plasmócitos, a inibição da maturação de células dendríticas e o estímulo da proliferação de linfócitos T reguladores.

O estímulo à angiogênese é decorrente da produção de matriz extracelular, VEGF, IGF-1, PIGF, MCP-1, bFGF e IL-6, enquanto o estímulo a proliferação e diferenciação de CT locais são devidos à ação de SCF, M-CSF, SDF-1, LIF e angiopoetina. A quimiotaxia é realizada pela liberação de dezenas de citocinas e seus ligantes (CCL e CXCL).

Por fim, os efeitos inibitórios sobre a apoptose ocorrem principalmente em decorrência das moléculas HGF, TGF- β , VEGF, IGF-1, GM-CSF e bFGF. Já os efeitos inibitórios sobre a fibrose ocorrem devido à ação de HGF e bFGF.

Todas essas ações efetuadas pelas CTA são decorrentes da ativação celular específica pelo meio onde estão (Caplan, 2007). Moléculas sabidamente capazes de deflagrar esse processo são TGF- β , IL-1, IFN- γ , TNF e interação com *toll-like receptors* (TLR) e monócitos CD14+ (Augello et al., 2005; Beyth et al., 2005; Krampera et al., 2006; Augello et al., 2007; Prasanna et al., 2010; DelaRosa; Lombardo, 2010; Zonca et al., 2012). Assim, a ativação correta da CTA para deflagrar o efeito esperado pode apresentar mecanismos variáveis que ainda não são conhecidos, podendo inclusive exercer efeito pró-inflamatório em determinadas situações (Waterman et al., 2010). A Figura 1 ilustra resumidamente os efeitos da ativação das CTA pelo meio em que se encontra, com a consequente deflagração de respostas imunológicas.

Figura 1 - Representação da ativação das células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA) pelas células e substâncias presentes no meio. As ações deflagradas pela CTA ocorrem tanto por sinalização dependente de contato celular quanto mecanismos não dependentes de contato



DC: células dendríticas; NEUT: neutrófilo; MACR: macrófago; FIBR: fibroblasto; LINF. B: linfócito B; LINF. T: linfócito T; Treg: linfócito T regulador.

Independentemente do mecanismo preciso de como essas ações são iniciadas, CTA apresentam importante ação reguladora da resposta imune e inflamatória, sendo capazes de contribuir com o tratamento de diversas doenças (Singer; Caplan, 2011). Áreas reconstrutivas, estéticas e cosmiátricas aplicam CTA de forma autóloga em associação com lipoenxertia com a intenção de promover melhor sobrevida do enxerto de gordura, melhorar a qualidade da pele decorrente de radioterapia e envelhecimento e também aumentar o volume da mama ou da face, como na síndrome de Parry-Romberg (Hanson; Gutowski; Hematti, 2010; Sterodimas et al., 2010; Tobita; Orbay; Mizuno, 2011; Nae et al., 2013; Kokai; Marra; Rubin, 2014). A aplicação em doenças deflagradas por causas imunes e inflamatórias como esclerose-múltipla e reação do enxerto contra o hospedeiro proporcionaram início encorajador para essa terapia (Locke; Windsor; Dunbar, 2009; Frölich; Hagen; Kleinsasser, 2014; Kokai; Marra; Rubin, 2014; Razavi et al., 2018). Na sequência, não apenas fístulas enterocutâneas presentes na doença de Crohn foram objeto de estudo. Atualmente, mais de duzentos ensaios clínicos com a utilização de CTA estão registrados na plataforma da *United States National Library of Medicine*, mostrando a diversidade da ação dessa terapia (ClinicalTrials.gov).

FEC são atualmente uma importante área de estudo com CTA. Diferentes tentativas de tratamento foram propostas, utilizando-se tanto material autólogo quanto alógeno, com aplicação local ou sistêmica (García-Olmo et al., 2009; de la Portilla et al., 2013; Panés et al., 2016; Ryska et al., 2017). Além disso, o método como as células são preparadas para infiltração e também a quantidade de células infiltradas apresentam variação de acordo com o estudo realizado.

Apesar de diversos estudos apresentarem resultados positivos quanto à remissão da FEC e na segurança dessa terapia, as alterações histológicas decorrentes da aplicação não são conhecidas (Jackson; Nesti; Tuan, 2012). Ainda, os mecanismos responsáveis pela ação dessas células no contexto da FEC também não foram descritos até o momento, o que ressalta a importância do aprofundamento dos estudos sobre essa terapia (Singer; Caplan, 2011, DelaRosa et al., 2012b, Bacakova et al., 2018).

4 MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Investigação Médica de Cirurgia Plástica (LIM04) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) entre os anos de 2019 e 2023.

Foram utilizados 26 ratos Wistar machos com 8 a 12 semanas de idade e peso variando de 300 g a 450 g. Esses animais foram alojados em biotério apropriado, com temperatura mantida entre 24 °C e 25 °C, ciclo dia e noite a cada 12 horas e com água e comida própria à espécie *ad libitum*.

O projeto seguiu a determinação de manipulação de animais em laboratório preconizado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da instituição em 14 de maio de 2019 com registro número 1278/2019.

4.1 DESENHO DO ESTUDO

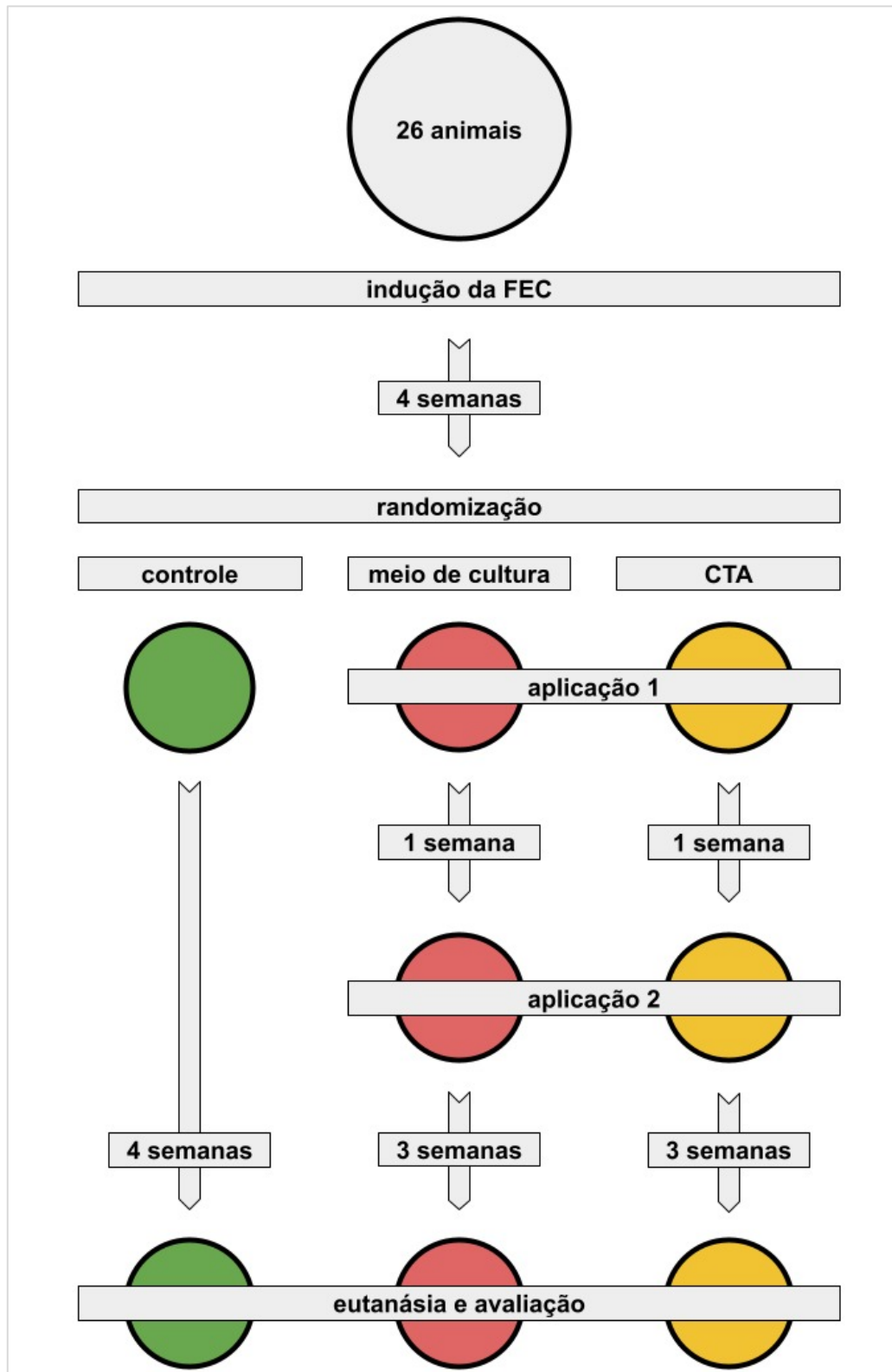
Estudo experimental, analítico e controlado avaliou os efeitos de duas aplicações perifistulares de células-tronco derivadas de tecido adiposo em animais submetidos a um modelo previamente validado de fístula enterocutânea (Camargo et al., 2022).

Os animais foram inicialmente submetidos ao procedimento cirúrgico para confecção de fístula enterocutânea. Após 4 semanas, os animais foram randomizados em três diferentes grupos:

1. controle (C);
2. meio de cultura (MC);
3. células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA).

No grupo MC, foram realizadas as aplicações do meio de cultura utilizado para o cultivo de células-tronco, enquanto no grupo CTA, foram aplicadas as células-tronco derivadas de tecido adiposo. Após um novo intervalo de 1 semana, os animais dos grupos MC e CTA foram submetidos a uma nova aplicação semelhante à etapa anterior. Por fim, após novo intervalo de 3 semanas, os efeitos da intervenção foram avaliados (Figura 2).

Figura 2 - Fluxograma do modelo experimental. Os animais são submetidos ao procedimento de confecção de fístula enterocutânea e, após 4 semanas, randomizados entre os grupos meio de cultura e células-tronco derivadas de tecido adiposo. Após 1 semana, recebem nova aplicação de meio de cultura ou célula tronco. Por fim, 3 semanas após a segunda aplicação, os animais são submetidos às avaliações e à eutanásia



4.2 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO

Três animais foram submetidos a anestesia por mistura de cloridrato de quetamina 100 mg/kg de peso (Ketamin[®], Cristália, Brasil) associada a cloridrato de xilazina 10 mg/kg de peso (Rompun[®], Bayer, Brasil) por via intraperitoneal. O tecido adiposo coletado por lipectomia da região abdominal foi transferido em tubo cônico e primeiramente lavado com solução salina fosfatada (*phosphate buffer saline* - PBS). Posteriormente esse tecido foi transferido em aproximadamente 5 mL de solução de colagenase IA 0,1% (Collagen IA[®], Sigma-Aldrich, Alemanha) diluída em *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) (Gibco Life Technologies[®], EUA) em uma placa Petri. Nesta placa, o tecido adiposo foi segmentado em fragmentos de 1 mm e depositados em tubos tipo Falcon de 50 mL completados com a colagenase na proporção 1:1 gordura x colagenase. O tubo foi incubado em banho-maria a 37 °C por 90 minutos e agitado manualmente em movimentos giratórios a cada 5 minutos. Passados os 90 minutos, a colagenase foi inativada adicionando solução STOP ao tubo na proporção 1:1 Solução STOP x colagenase.

O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm. O *pellet* resultante foi homogeneizado com 2 mL de solução de lise de hemácias e agitado manualmente por 10 min. Em seguida, adicionou-se 10 mL de PBS e o tubo foi novamente centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspenso em meio D20 e posteriormente transferido para uma garrafa T25, que ficou mantida em incubadora a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5%. O meio de cultura foi composto por 80% de DMEM/F12, 20% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell Embriolife, Brasil) e 1% de solução antibiótica e antimicótica com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Gibco Life Technologies[®], EUA).

Após as células atingirem o ponto de subconfluência com cerca de 80% da superfície da garrafa, as células foram liberadas para a amplificação. Realizou-se tripsinização com tripsina (Sigma-Aldrich, Alemanha) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich, Alemanha), onde o meio de cultura foi aspirado. Quando as garrafas atingiram 80% de confluência das células, foi adicionado T0,05%/E 0,02% nas garrafas que foram mantidas com essa solução por 5 minutos na incubadora, para que as células soltassem das garrafas. Depois de soltas, a ação da tripsina foi neutralizada adicionando solução STOP, na mesma proporção da tripsina. Todo o conteúdo foi transferido para tubo tipo Falcon de 50 mL e centrifugado

por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante resultante foi eliminado e o *pellet* ressuspenso em meio D20 e colocado em garrafas maiores ou dividido entre maiores quantidades de garrafas, de acordo com a passagem e a amplificação realizadas. Essas células foram amplificadas até a quarta passagem, na qual foram utilizadas.

4.3 CITOMETRIA DE FLUXO

Para confirmar a presença de células-tronco derivadas de tecido adiposo no material aplicado e também a imunofenotipagem, foram realizados ensaios de citometria de fluxo nas células preparadas.

Para o ensaio de citometria de fluxo, o meio de cultura foi retirado das garrafas de cultura e em seguida fez-se a digestão enzimática com tripsina/EDTA 0,25% por 2 minutos a 37 °C. A digestão foi finalizada com DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e a suspensão de células centrifugadas a 1800 rpm por 5 minutos. Foram realizadas duas lavagens com DMEM suplementado.

Descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 2 mL de DMEM para a contagem das células, utilizando-se corante azul de Tripán 0,4% em câmara de Neubauer, para o ajuste da concentração de 1×10^6 células / mL por poço de placa de cultura com fundo em "V".

Após a distribuição das células nas placas de cultura, realizou-se uma centrifugação a 1800 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e em seguida foi realizada lavagem com 170 µL de tampão MACS (PBS pH 7,2; EDTA 500 mM; 2,5 g albumina sérica bovina) com nova centrifugação.

Para a marcação foi adicionado tampão MACS, descontando-se o volume de anticorpo monoclonal de superfície (5 µL para cada anticorpo), totalizando volume de 100 µL. Foram utilizados os seguintes anticorpos (BD Biosciences, EUA):

- anti-human (controle);
- CD31 (marcador endotelial);
- CD45 (marcador hematopoiético);
- CD29 (marcador de célula tronco);
- CD73 (marcador célula tronco mesenquimal);
- CD90 (marcador célula tronco mesenquimal);
- CD105 (marcador célula tronco mesenquimal);
- PI (marcador de morte celular).

A placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens com 150 μ L de tampão MACS e centrifugação a 1800 rpm a temperatura ambiente.

As células foram ressuspensas em 200 μ L de paraformaldeído 1% e transferidas para tubos específicos para a análise no citômetro.

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de Fluxo LSR Fortessa utilizando-se o programa FACS-Diva TM v 6.13 (BD Biosciences, EUA). O programa FlowJo® v9.9.4 (FlowJo Software, Tree Star TM, EUA) foi utilizado para a análise dos dados.

O resultado da citometria resultou negativo para os marcadores CD31 e CD45, enquanto resultou positivo para CD29, CD73, CD90 e CD105 (Figura 3). Além disso, o marcador PI também apresentou resultado negativo (Figura 4). Assim foi comprovado a presença e viabilidade de células tronco derivadas de tecido adiposo na cultura, de acordo com o *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) (Dominici et al., 2006).

Figura 3 - Citometria de fluxo: os marcadores CD31 e CD45 apresentaram resultado negativo, enquanto os marcadores CD29, CD73, CD90 e CD105 apresentaram resultado positivo

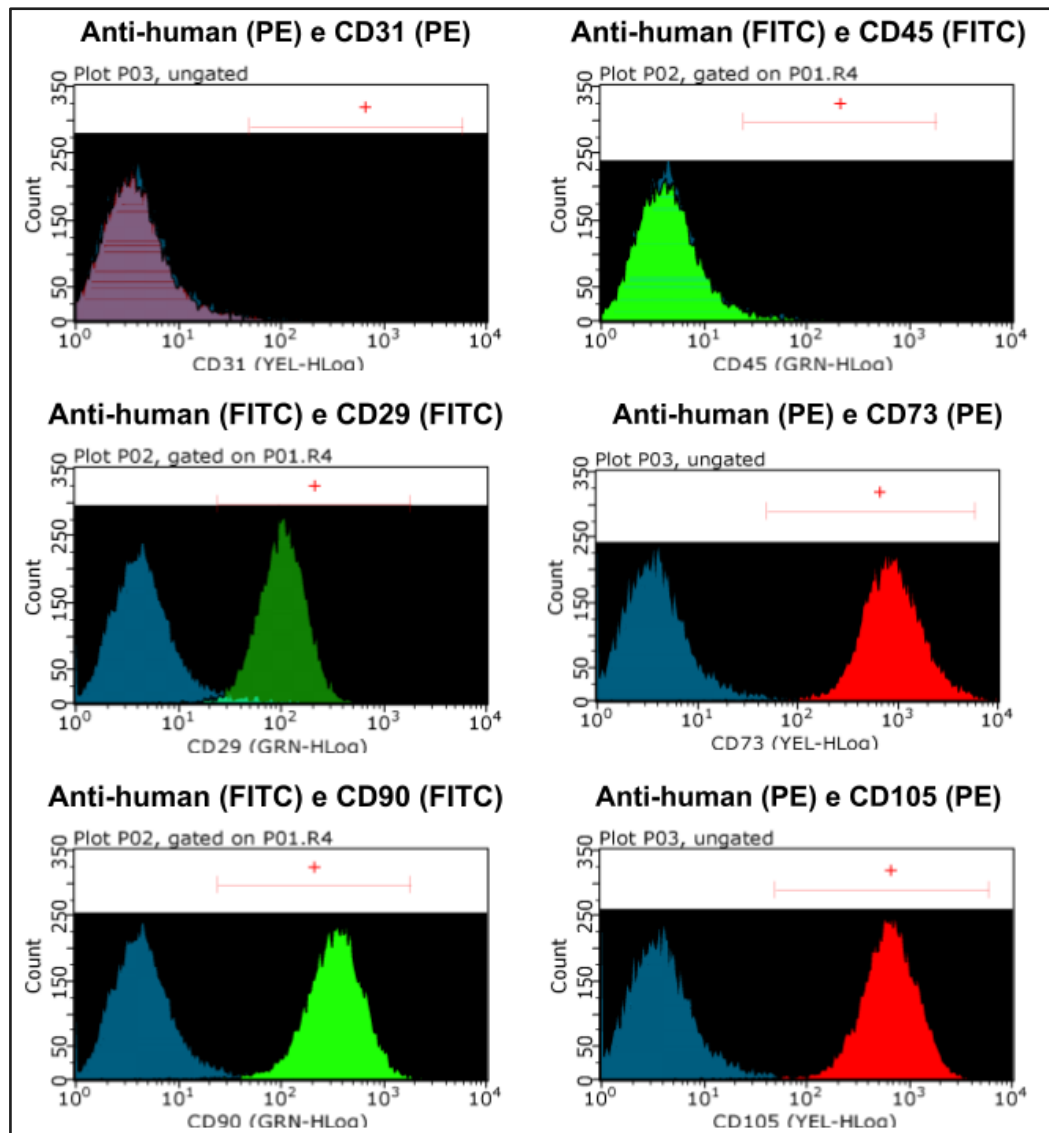
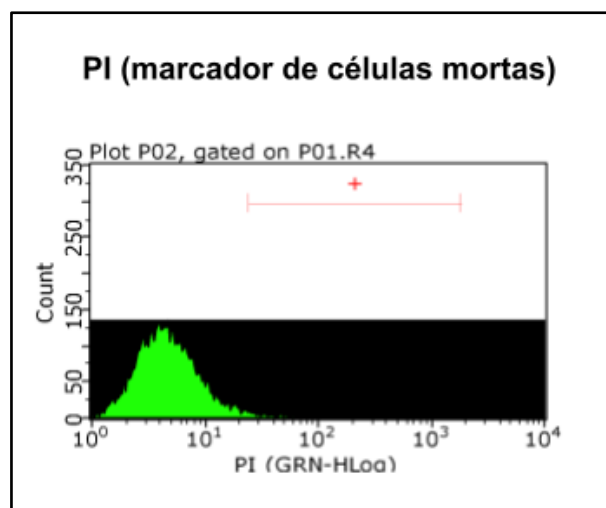


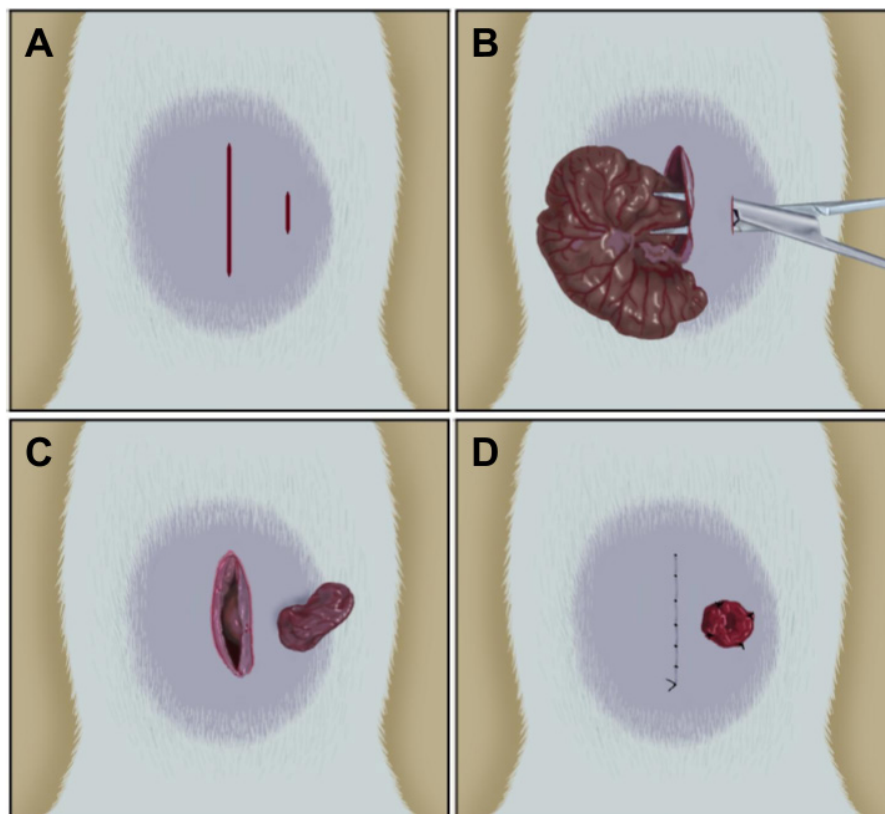
Figura 4 - Citometria de fluxo: marcador PI apresentou resultado negativo



4.4 INDUÇÃO DA FÍSTULA ENTEROCUTÂNEA

Os animais foram anestesiados com a combinação de cloridrato de quetamina 100 mg/kg de peso (Ketamin[®], Cristália, Brasil) associada a cloridrato de xilazina 10 mg/kg de peso (Rompun[®], Bayer, Brasil) por via intraperitoneal, e após a indução anestésica, os animais foram colocados em decúbito dorsal. Realizou-se a tricotomia na região abdominal do animal, em seção retangular de aproximadamente 7 cm x 6 cm, utilizando-se tricotomizador elétrico (Tricotomizador cirúrgico pivotado[®], 3M, Brasil) apropriado (Figura 5).

Figura 5 - Indução da fístula enterocutânea. A: Demarcação das incisões mediana de 5 cm e paramediana de 1 cm no animal posicionado em decúbito dorsal horizontal, sob anestesia. A distância entre as incisões é de 1 cm. **B:** O ceco é identificado pela incisão mediana de forma cuidadosa para evitar a torção das alças intestinais. A porção distal é exteriorizada pela contra-abertura. **C:** Antes do fechamento da incisão mediana, são realizados pontos de fixação entre a parede do ceco e a porção posterior da parede abdominal e também entre a serosa exteriorizada e a camada muscular. Abertura da porção distal é realizada apenas após o fechamento dos planos muscular e dermogorduroso, para evitar infecção. **D:** Após a abertura da alça, pontos de fixação de plano total são feitos com a pele



Incisão mediana de cerca de 5 cm foi realizada com a posterior localização do ceco. Uma incisão transparietal do lado esquerdo da incisão de 1 cm de extensão distando 1 cm da incisão mediana foi realizada por dissecação. A seguir, a extremidade do polo superior do ceco foi exteriorizada, tendo o cuidado de não promover a torção do mesentério ou das alças intestinais.

Procedeu-se a fixação do ceco à parte interna da parede abdominal pela sutura em plano seromuscular com 3 pontos de poliamida 5-0 (Mononylon[®], Ethicon, EUA). Posteriormente, a parte exteriorizada do ceco foi fixada à musculatura abdominal anterior com fio de poliamida 5-0 (Mononylon[®], Ethicon, EUA). A incisão mediana foi fechada então por meio de sutura contínua em dois planos - muscular e cutâneo - com fio de poliamida 4-0 (Mononylon[®], Ethicon, EUA).

Após o completo fechamento da parede abdominal, realizou-se uma incisão de 1 cm no polo superior da extremidade cecal exteriorizada. Foram realizados pontos em plano total fixando a mucosa cecal e a pele da contra-abertura da parede abdominal do animal através de pontos simples de poliamida 5-0 (Mononylon[®], Ethicon, EUA). Após o término do procedimento, todas as fístulas apresentavam 10 mm de diâmetro.

Analgesia pós-operatória foi realizada por aplicação de cloridrato de tramadol 50 mg/kg de peso (Tramadol[®], Grunenthal do Brasil Farmacêutica Ltda, Brasil) por via intramuscular e dipirona 500 mg/kg de peso (Novalgina[®], Bayer, Brasil) por via subcutânea durante os primeiros 3 dias pós-operatórios. Os animais ficaram em observação por 4 semanas para assegurar a maturação da FEC. Durante o período do estudo, não houve sinais de manipulação da FEC pelos animais.

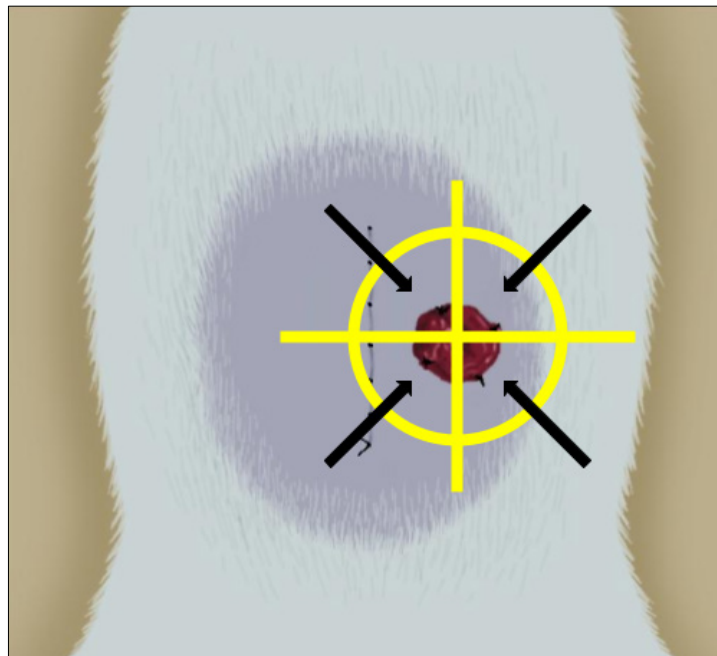
Estudo prévio com a utilização de 30 animais submetidos à aplicação de apenas uma dose de CTA garantiu ao grupo a experiência na técnica do modelo e no manuseio dos animais (Pagotto et al., 2023).

4.5 APLICAÇÃO PERIFISTULAR DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO

Os animais alocados nos grupos meio de cultura e CTA foram anestesiados com isoflurano 200 mL / min (Isufloran[®], Sigma-Aldrich, Alemanha). Antissepsia foi realizada pelo uso de clorexidina 0,3% tópico (Riohex[®], Rioquimica, Brasil) ao redor da FEC.

Os animais alocados ao grupo MC ou CTA receberam a injeção perifistular subdérmica de 0,5 mL dividida em quatro quadrantes, conforme a Figura 6.

Figura 6 - Aplicação perifistular subdérmica de 0,5 mL de solução de meio de cultura ou de células-tronco derivadas de tecido adiposo contendo 1×10^6 células. A região perifistular é dividida em quatro quadrantes (amarelo), sendo realizada uma infiltração em cada uma dessas quatro regiões (preto)



A solução do meio de cultura, descrita previamente, foi composta por 80% de DMEM/F12, 20% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica e antimicótica com penicilina, estreptomicina e anfotericina B (Gibco Life Technologies[®], EUA). Já a aplicação do grupo CTA apresentava 1×10^6 CTA em 0,5 mL de solução de meio de cultura.

A segunda aplicação, seguindo os mesmos parâmetros da aplicação inicial, ocorreu 1 semana após a primeira injeção. A divisão da FEC em quatro quadrantes não apresentou necessariamente relação com a primeira aplicação.

Após a segunda aplicação, os animais foram seguidos em um período de observação de 3 semanas, completando 4 semanas desde a primeira aplicação, quando foram submetidos às avaliações.

O aplicador era cego tanto em relação ao material administrado - meio de cultura ou CTA - quanto em relação aos grupos animais.

4.6 EUTANÁSIA

Após 4 semanas da primeira aplicação, os animais anestesiados com isoflurano sofreram eutanásia por inalação de dióxido de carbono 5% em câmara própria. O descarte dos animais ocorreu conforme a Cartilha de Orientação de Descarte de Resíduo no Sistema FMUSP-HC, que segue a Resolução número 306 de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), número 358, de 29 de abril de 2005.

Duas amostras de tecido englobando a fístula enterocutânea e o tecido perifistular onde foram feitas as aplicações foram coletadas para avaliação microscópica, uma para análise histopatológica e outra para análise de expressão gênica.

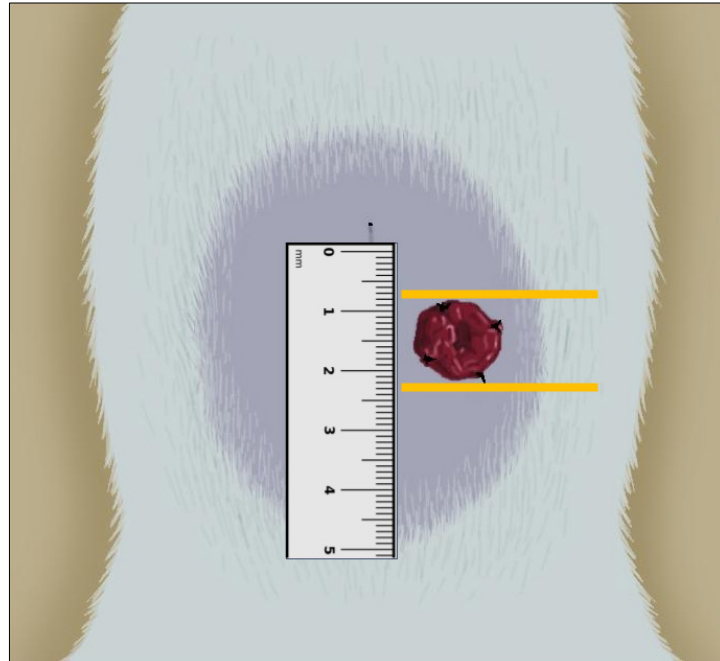
4.7 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Os animais foram examinados semanalmente para averiguar o estado geral, peso corpóreo e débito fistular. Após o período de 4 semanas da aplicação, foi avaliado o diâmetro das fístulas enterocutâneas.

A resolução da fístula enterocutânea foi caracterizada pela ausência de orifício externo, além de ausência de débito apesar de leve compressão no local, conforme as recomendações da *American Gastroenterological Association* (Sandborn et al., 2003).

O diâmetro da fístula foi mensurado com os animais em decúbito dorsal com régua milimetrada no maior diâmetro, por avaliador cego em relação aos grupos dos animais (Figura 7).

Figura 7 - Aferição do diâmetro da FEC por régua milimetrada posicionada no mesmo plano



4.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

As amostras foram transferidas para frascos de 30 mL preenchidos com formalina a 4%, sendo fixadas por 24 horas. A seguir as amostras foram submetidas à coloração de hematoxilina-eosina (HE).

As amostras foram analisadas por meio de microscopia óptica (Nikon®, EUA). Foram avaliadas as seguintes variáveis: quantificação de células inflamatórias (macrófagos e polimorfonucleares) e de vasos sanguíneos (arteríolas), além da análise de fibrose e inflamação.

A quantificação das células inflamatórias e de vasos sanguíneos para a densidade vascular foi analisada por contagem direta dessas estruturas em aumento de 40 vezes em 10 campos aleatórios por lâmina.

Já a análise de fibrose e inflamação também foi realizada em aumento de 40 vezes em 10 campos por lâmina. Os cenários observados nas lâminas foram classificados subjetivamente de acordo com um escore de 0 a 5, em que 0 representa o melhor cenário possível, com pouca ou nenhuma fibrose e infiltração anormal de células inflamatórias. Já o escore 5 apresenta o pior cenário, com altos níveis de fibrose e infiltração anormal de células inflamatórias.

Todas as etapas foram conduzidas por avaliadores cegos em relação aos grupos dos animais.

4.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

A análise da expressão gênica foi composta pelas etapas de extração de RNA total, seguida da reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR). Todas as etapas foram conduzidas por avaliadores cegos em relação aos grupos dos animais.

4.9.1 Extração de RNA total

A obtenção de RNA total foi feita por meio de cortes de 6 μm dos tecidos em criostato eletrônico multiuso (Hyrax C25[®], Carl Zeiss, Suíça). Para realizar os criocortes, inicialmente os tecidos foram congelados em água Milli-Q ultrapura, livre de DNase/RNase, utilizando nitrogênio líquido. As superfícies internas e externas do criostato foram higienizadas com etanol 70% e em seguida com RNase away, além dos 15 minutos de luz ultravioleta. Os criocortes de tecidos foram feitos com o criostato a -34 °C e, em seguida, foram colocados em tubos de 1,5 mL previamente pesados e numerados, para obtenção de aproximadamente 30 mg de tecido para os tecidos de FEC, para extração RNA total. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso.

Para extração de RNA total dos tecidos de FEC foi utilizado o kit RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Estes kits permitem o isolamento de todos os tipos de RNA dos espécimes cirúrgicos. Os tubos contendo as amostras receberam 600 μL de Tampão RLT previamente preparado com β -mercaptoetanol (β -ME) no qual se adicionou 10 μL de β -ME por 1 mL de Tampão RLT e, em seguida, os tubos foram homogeneizados em vortex (Stuart Scientific SA8[®], Sigma-Aldrich, Alemanha) por 60 segundos para que toda a solução de lise penetrasse no tecido. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos em velocidade máxima. Após a incubação, foi adicionado 200 μL de clorofórmio, também homogeneizados por vortex (Stuart Scientific SA8[®], Sigma-Aldrich, Alemanha) por 15 segundos e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação de 12.000 g por 15 minutos a 4 °C.

Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida e transferida para um novo tubo, onde foi adicionado aproximadamente o mesmo volume de etanol 70% a temperatura ambiente. A solução foi aplicada em uma coluna e submetida à centrifugação a 8.000 g por 15 segundos.

O filtrado foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda solução fosse passada pela coluna, utilizando o mesmo tubo coletor para as etapas de lavagem. A coluna foi lavada uma vez com a solução de lavagem RW1 (Qiagen®, Alemanha) e duas vezes com a solução de lavagem RPE (Qiagen®, Alemanha), seguidas de centrifugação a 15 segundos a 8.000 g, exceto pela última centrifugação. Nesta a centrifugação foi por 2 minutos a 8.000 g, sendo importante trocar o tubo coletor nesta etapa.

Após o descarte do filtrado, o material foi centrifugado por mais 1 minuto para remoção de qualquer fluido residual na coluna. As colunas foram então transferidas para um novo tubo, no qual foi adicionado 35 µL de água livre de RNase no centro da coluna para eluição do RNA total. Os tubos foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente centrifugados por 1 minuto à temperatura máxima para recuperar o RNA. As amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento de utilização.

A concentração e pureza do RNA total foram analisadas usando o NanoPhotometer® P-Class Spectrophotometer (Implen, Alemanha) e a integridade do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram consideradas amostras com qualidade suficiente para prosseguir para as próximas etapas: concentração de RNA total ≥ 60 ng/µL e graus de pureza avaliadas por meio das razões 260/280 e 260/230, idealmente entre 1,8 e 2,0. A análise da integridade do RNA levou em consideração a integridade das bandas 28 segundos e 18 segundos do RNA ribossômico (rRNA).

4.9.2 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

Para a etapa de avaliação de expressão gênica, inicialmente foi sintetizado o DNA complementar (cDNA). A síntese de cDNA foi realizada utilizando um input inicial entre 375 ng e 2000 ng de RNA total, por transcrição reversa utilizando High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo as orientações do kit e utilizando o equipamento Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, EUA). O produto amplificado foi armazenado a -20 °C até o uso. Somente foi diluído o cDNA no dia da reação de PCR em tempo real para análise de expressão gênica, com água livre de RNase, para a concentração padrão de 12,5 ng/μL.

A expressão dos genes foi investigada por meio de PCR em tempo real, utilizando a metodologia TaqMan. O Quadro 2 descreve os ensaios TaqMan (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizados para os seis genes de interesse do estudo, além de dois genes endógenos, específicos para amostras murinas.

Quadro 2 - Descrição dos ensaios TaqMan (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizados para seis genes de interesse e dois endógenos

Descrição	Gene	Nomenclatura	Ensaio TaqMan
Genes-alvo	<i>IL-1</i>	<i>Interleukin-1 receptor accessory protein</i>	Rn01404183_m1
	<i>IL-10</i>	<i>Interleukin 10</i>	Rn01483988_g1
	<i>TNF</i>	<i>Tumor Necrosis Factor</i>	Rn01525859_g1
	<i>MMP9</i>	<i>Matrix metalloproteinase 9</i>	Rn00579162_m1
	<i>CD68</i>	<i>Cluster of Differentiation 68</i>	Rn01495634_g1
	<i>MMP3</i>	<i>Matrix metalloproteinase 3</i>	Rn01495634_g1
Genes endógenos	<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	Rn01775763_g1
	<i>Actb</i>	<i>Actin Beta</i>	Rn00667869_m1

Para o preparo dos mixes, foram utilizados os respectivos ensaios TaqMan (Thermo Fisher Scientific, EUA), água ultrapura livre de RNase e TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme descrito no Quadro 3.

Quadro 3 - Preparo do mix para realização da PCR em tempo real, utilizando ensaios TaqMan

Reagentes	x1 (µL)
<i>TaqMan master mix 2x</i>	6,250
<i>TaqMan assay 20x</i>	0,625
H ₂ O	4,625
Volume final	11,5

Ao volume de 11,5 µL adicionou-se 1 µL de amostra de cDNA, totalizando 12,5 µL de volume final de reação. A amplificação foi realizada no equipamento ABI StepOne Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, EUA), de acordo com recomendações do fabricante, seguindo a ciclagem descrita no Quadro 4.

Quadro 4 - Ciclagem de corrida padronizada para a PCR em tempo real com ensaios TaqMan

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Incubação	50°C	2 minutos	1x
Ativação da enzima/Desnaturação	95°C	10 minutos	
Desnaturação	95°C	15 segundos	40X
Anelamento/extensão	60°C	1 minuto	

As amostras foram corridas em triplicatas técnicas e a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica foi realizada por meio do método de Ct comparativo (Livak; Schmittgen, 2001). Foi utilizado apenas o gene Gapdh como endógeno, pois o gene Actb apresentou uma grande variabilidade entre as amostras.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.10.1 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo do tamanho da amostra baseou-se em estudo prévio (Ryska et al., 2017), que considerou os seguintes valores da frequência de fechamento de fístula enterocutânea após a aplicação de fração vascular estromal (FVE): grupo controle 6,3% e grupo SVF 38%. Foi utilizado o programa STATA v14 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP), considerando-se p de alfa de 5% e poder de estudo 80%. O valor calculado foi de oito animais por grupos.

Considerando a perda de 20% de animais em cada grupo, o estudo foi iniciado com 30 animais, sendo três utilizados para captação de gordura e outros nove animais em cada um dos três grupos. Um animal foi descartado do estudo antes da randomização devido a óbito, resultando nos 26 animais utilizados (C = 8, MC = 9 e CTA = 9).

4.10.2 Análise descritiva e inferencial

As variáveis contínuas de distribuição normal foram descritas pela média e pelo desvio padrão. Já as variáveis contínuas de distribuição não-normal foram descritas pela mediana e pelo intervalo interquartil.

A análise inferencial comparou os grupos pelo teste de ANOVA para variáveis paramétricas ou *Kruskal-Wallis* para variáveis não-paramétricas. Em caso de significância foi realizado teste *post hoc Bonferroni* para análise pareada.

Foi utilizado o programa STATA v14 (StataCorp. 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX; StataCorp LP), considerando-se p de alfa de 5% e poder de estudo 80%.

4.10.3 Expressão gênica

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software estatístico SPSS v.25 e o nível de significância adotado foi de 5%. Inicialmente foi aplicado o teste de *Shapiro-Wilk* para verificar a normalidade dos dados e escolha dos testes estatísticos apropriados, a depender da distribuição paramétricas ou não paramétricas dos dados.

Para a comparação dos valores de dCT, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de *Bonferroni*. O grupo controle foi considerado como referência.

Por fim, foram construídos os gráficos de caixa (*box-plot*) no programa SPSS 18.0 e os gráficos *dot-plot* no programa Microsoft Excel 2010, para apresentar as comparações dos níveis de expressão gênica de cada gene de interesse.

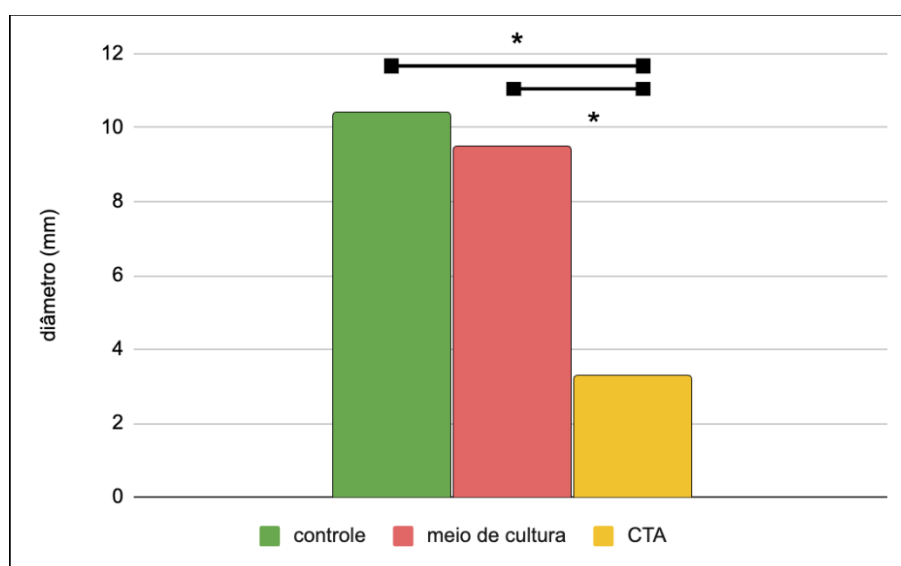
5 RESULTADOS

No total, 26 animais submetidos ao procedimento cirúrgico de fístula enterocutânea sobreviveram até o final do período programado para avaliação do resultado, sendo oito ratos no grupo controle e outros nove ratos tanto no grupo meio de cultura quanto no grupo de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

5.1 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A mensuração do diâmetro das fístulas revelou que o diâmetro das fístulas enterocutâneas nos animais do grupo células-tronco derivadas de tecido adiposo ($3,3 \text{ mm} \pm 0,6 \text{ mm}$) apresentou redução de 68,3% em comparação aos animais do grupo controle ($10,4 \text{ mm} \pm 2,3 \text{ mm}$) e de 65,3% em relação aos animais do grupo meio de cultura ($9,5 \text{ mm} \pm 4,1 \text{ mm}$). Análise inferencial entre os grupos por meio do teste *Kruskal-Wallis* revelou $p = 0,0159$. A análise pareada *post hoc* de *Bonferroni* indicou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupo controle e meio de cultura ($p = 0,187$), mas com diferença estatisticamente significativa tanto entre os grupos controle e CTA ($p = 0,002$), quanto entre os grupos MC e CTA ($p = 0,011$) (Gráfico 1).

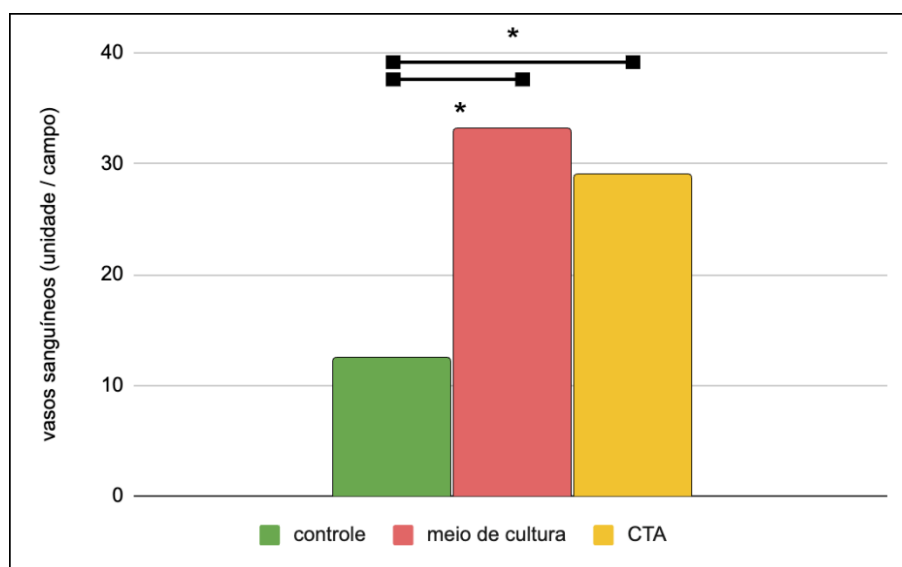
Gráfico 1 - Comparação do diâmetro da fístula enterocutânea entre os grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA). Teste *post hoc* de *Bonferroni* mostrou redução nos valores do grupo CTA em comparação aos grupos C e MC; * $p < 0,05$



5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A quantidade de vasos sanguíneos dos animais submetidos à aplicação de CTA (29,1 vasos/campo \pm 8,3 vasos/campo) apresentou aumento de 134,7% em relação à encontrada no grupo controle (12,4 vasos/campo \pm 4,3 vasos/campo) e variação de 12,1% em relação ao grupo meio de cultura (33,1 vasos/campo \pm 5,4 vasos/campo) (Gráfico 2). Análise inferencial entre os grupos por meio do teste *Kruskal-Wallis* revelou $p = 0,003$. A análise pareada *post hoc* de *Bonferroni* indicou não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupo CTA e MC ($p = 0,12$), mas com diferença estatisticamente significativa tanto entre os grupos controle e CTA ($p = 0,02$) e quanto entre os grupos controle e MC ($p < 0,001$).

Gráfico 2 - Comparação da quantidade de vasos sanguíneos entre os grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA). Teste *post hoc* de *Bonferroni* mostrou redução nos valores do grupo C em comparação aos grupos MC e CTA; * $p < 0,05$



A quantidade de células inflamatórias no grupo células-tronco derivadas de tecido adiposo foi 12,1% superior ao grupo controle e 17,8% inferior ao grupo meio de cultura, conforme apresentado na Tabela 1 ($p = 0,29$, *Kruskal-Wallis*).

Tabela 1 - Comparação entre a presença de células inflamatórias e vasos sanguíneos nos grupos controle, meio de cultura e células-tronco derivadas de tecido adiposo

	células inflamatórias (unidades/campo) média (DP)
Controle	453, 4 (170,2)
Meio de cultura	618,4 (253,1)
CTA	508,4 (294,7)
p	0,12

CTA: células-tronco derivadas de tecido adiposo; DP: desvio-padrão.
Teste de Kruskal-Wallis.

A avaliação do escore de inflamação e de fibrose do tecido da fístula enterocutânea é indicada na Tabela 2. Em relação ao grupo controle, o escore de fibrose no grupo CTA apresentou redução de 15,3% em relação ao grupo controle. Já em relação ao escore de inflamação, os resultados foram semelhantes.

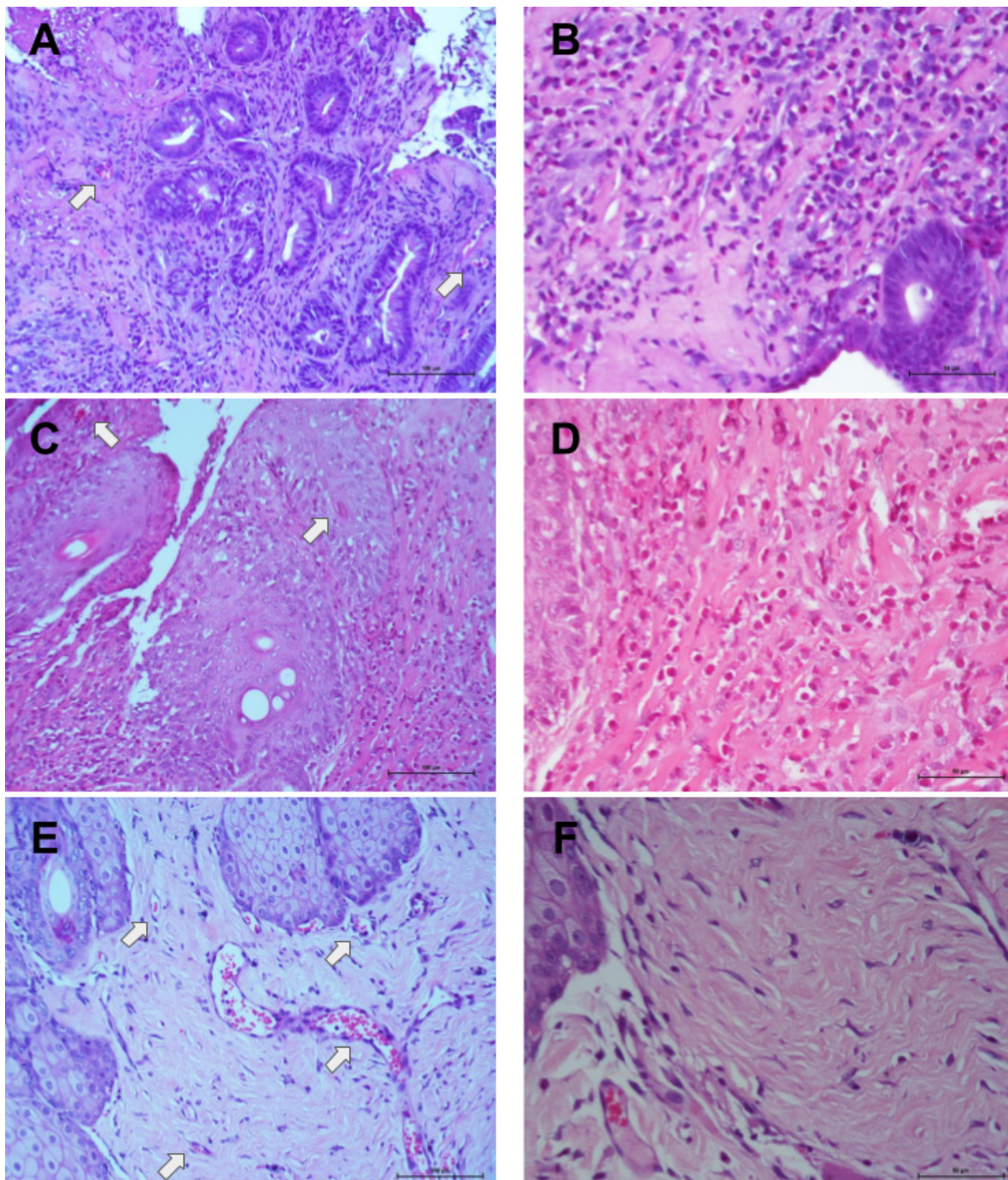
Tabela 2 - Comparação entre os escores de inflamação e fibrose nos grupos controle (C), meio de cultura (MC) e células-tronco (CTA) derivadas de tecido adiposo

	escore de inflamação média (DP)	escore de fibrose média (DP)
Controle	3,75 (0,5)	4,25 (0,5)
Meio de cultura	3,7 (0,7)	3,9 (0,9)
CTA	3,6 (0,7)	3,6 (0,7)
p	0,844	0,222

C: controle; MC: meio de cultura; CTA: células-tronco derivadas de tecido adiposo.
Teste de Kruskal-Wallis.

Na Figura 8, são apresentados os cortes histopatológicos dos três grupos com amplificação de 20 x e 40 x, onde é possível visualizar a transição das vilosidades intestinais para a pele, no limite da fístula enterocutânea, e também vasos sanguíneos, células inflamatórias e a fibrose tecidual. Todos os cortes apresentam escala métrica.

Figura 8 - Análise histopatológica. Grupo controle (A e B). A. A imagem apresenta um corte histopatológico submetido a aumento de 20x, em que é possível visualizar poucos vasos sanguíneos (seta). B. Com aumento de 40x, pode ser observada uma grande infiltração de células inflamatórias. Grupo meio de cultura (C e D). C. Este corte amplificado em 20x apresenta poucos vasos sanguíneos. D. Na amplificação de 40x, é possível identificar também grande quantidade de células inflamatórias, além de deposição desorganizada de matriz extracelular. Grupo CTA (E e F). E. Em aumento de 20x, é possível identificar uma grande quantidade de vasos sanguíneos. F. Na amplificação de 40x, além de reduzida quantidade de células inflamatórias, é identificada deposição organizada de matriz extracelular. CTA: células-tronco derivadas de tecido adiposo



5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

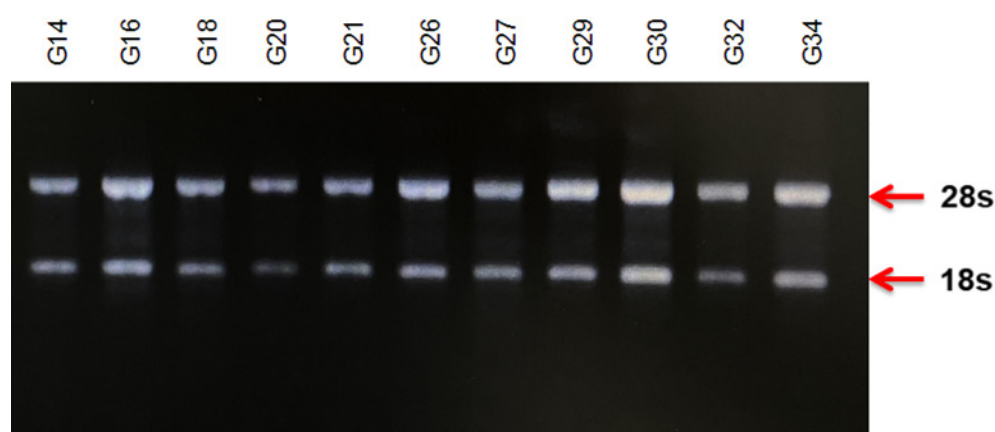
5.3.1 Análise de quantidade e qualidade das amostras de RNA total obtidas

As amostras que apresentaram os parâmetros de qualidade dentro do esperado seguiram para as etapas posteriores de síntese de cDNA e análise de expressão gênica. As amostras que apresentaram concentração de RNA total < 60 ng/μL ou degradação do RNA e que ainda apresentavam tecido disponível foram novamente extraídas e àquelas cujos tecidos já haviam sido esgotados foram excluídas do projeto.

Levando em consideração todas as amostras, observamos um *range* de 1,72-2,08 para a razão 260/280 e 0,65-2,25 para a razão de 260/230, indicando um processo correto de extração de RNA total.

A eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para todas as amostras, utilizando um input de 200 ng de RNA, e permitiu avaliar a integridade do RNA através da análise das bandas 18S e 28S do rRNA. As amostras apresentaram de forma clara a presença das duas bandas de rRNA, confirmando a boa qualidade das amostras, conforme demonstrado na Figura 9.

Figura 9 - Gel de agarose 1% realizado com as amostras de RNA total, mostrando boa integridade do rRNA. A banda superior representa a banda 28S e a banda inferior representa 18S (rRNA)



5.3.2 Descrição da casuística do estudo

Foram preservadas 22 amostras para extração de RNA total. As demais não apresentaram condições adequadas de conservação, apesar da conformidade com as melhores práticas laboratoriais. Destas, duas não obtiveram um rendimento suficiente para prosseguir para a etapa de síntese cDNA, e uma não apresentou um resultado adequado durante a análise de expressão gênica. Desta forma, as análises finais incluíram 19 amostras, distribuídas em três grupos, conforme descrito no Quadro 5.

Quadro 5 - Casuística do estudo com tecido de fístula enterocutânea

Grupo	Número de amostras
controle	4
meio de cultura	9
células-tronco derivadas de tecido adiposo	6

5.3.3 Resultado da análise de expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, foram comparados os níveis de expressão de cada gene de interesse entre os grupos controle, grupo MC e grupo CTA, tendo o grupo controle como referência, conforme descrito na Tabela 3.

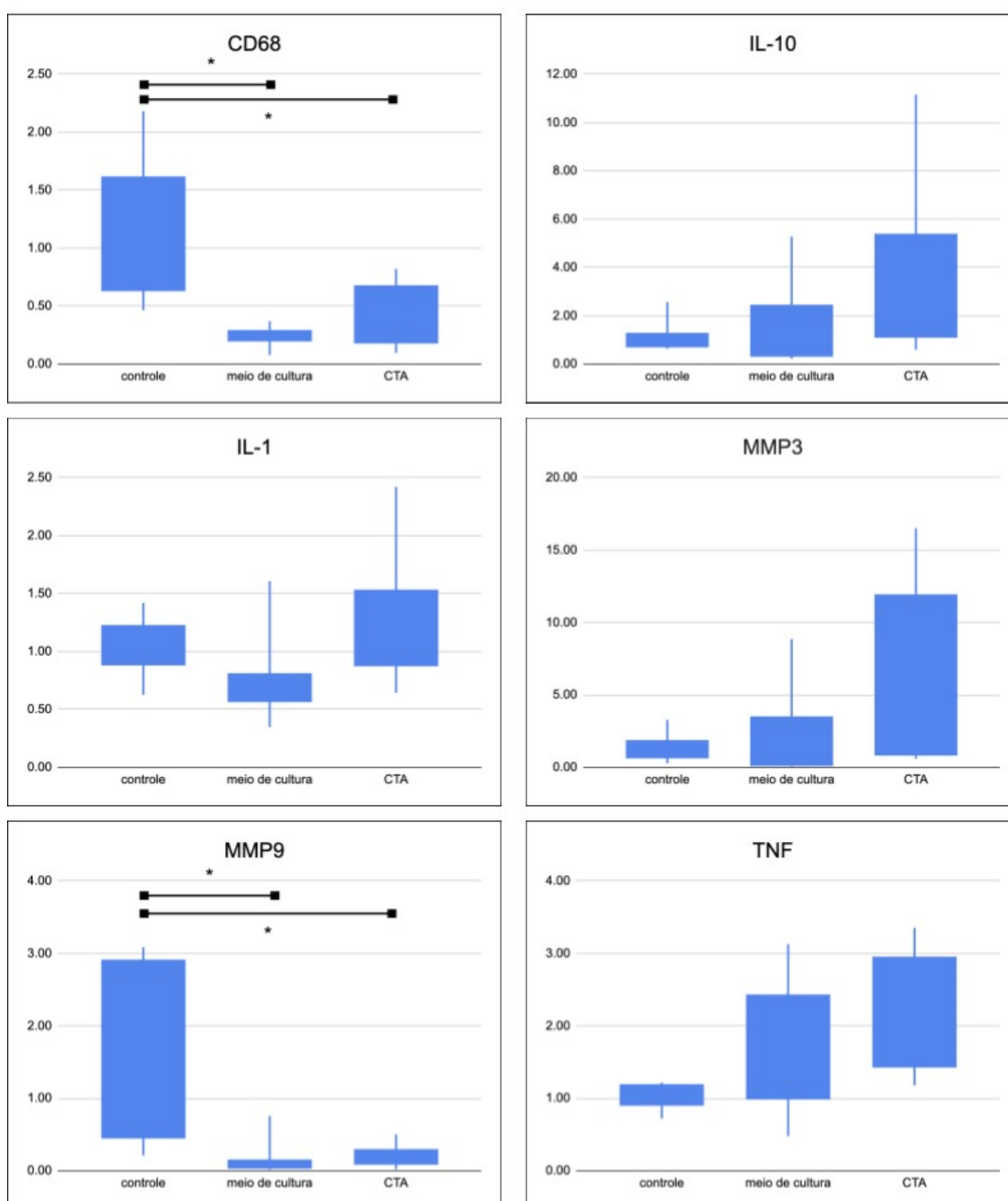
Tabela 3 - Comparação da expressão dos genes de interesse entre os grupos controle, meio de cultura e células-tronco derivadas de tecido adiposo, tendo o grupo controle como referência

Genes	C	MC	CTA	F	p
	FC Média (DP)	FC Média (DP)	FC Média (DP)		
<i>CD68</i>	1,19 (0,78)	0,23 (0,09)	0,58 (0,65)	5,9	0,012*
<i>IL-10</i>	1,19 (0,92)	1,59 (1,79)	4,04 (4,03)	1,8	0,199
<i>IL-1</i>	1,04 (0,33)	0,75 (0,36)	1,27 (0,66)	2,7	0,099
<i>MMP3</i>	1,43 (1,31)	2,59 (3,32)	6,09 (7,59)	1,0	0,379
<i>MMP9</i>	1,66 (1,50)	0,15 (0,23)	0,19 (0,18)	6,5	0,009*
<i>TNF</i>	1,02 (0,23)	1,68 (1,01)	2,11 (0,96)	1,9	0,184

FC: *Fold Change*; DP: desvio-padrão; C: controle; MC: meio de cultura; CTA; *células-tronco derivadas de tecido adiposo*; teste ANOVA de uma via; *p<0,05.

O *post hoc* de *Bonferroni* demonstrou que o gene *CD68* no grupo CTA apresentou uma diminuição de 51,3% em relação ao grupo controle (FC = 0,23; $p = 0,012$). Para o gene *MMP9* foi demonstrada a redução da expressão do gene em 88,6% ao se comparar o grupo CTA com o grupo controle ($p=0,009$) Não foram detectadas diferenças nas comparações dos níveis de expressão dos demais genes (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Comparação dos níveis de expressão dos genes *CD68*, *IL-10*, *IL-1*, *MMP3*, *MMP9* e *TNF* entre os grupos controle, meio de cultura (MC) e células-tronco derivadas de tecido adiposo (CTA). O grupo controle foi utilizado como referência. Teste *post hoc* de *Bonferroni*; * $p < 0,05$



6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito de duas sessões de aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo no tratamento de fístulas enterocutâneas em um modelo experimental murino. Os resultados demonstraram que a aplicação de CTA reduziu 68% e 65% o diâmetro das fístulas em comparação com o grupo controle e o grupo tratado com meio de cultura, respectivamente. Além disso, na avaliação microscópica, houve um aumento na densidade vascular nos animais tratados com CTA de 135% em relação ao grupo controle, sem, no entanto, diferenças significativas na quantidade de células inflamatórias entre os grupos. A análise de expressão dos genes CD68 e MMP9 evidenciou, respectivamente, em relação ao grupo controle, uma redução de 51% e 89% nos animais tratados com CTA, sugerindo que as células-tronco podem modular a resposta inflamatória e a remodelação do tecido na fístula enterocutânea através desses genes.

Os achados encontrados foram consistentes com resultados de estudos prévios da literatura (García-Olmo et al., 2009; de la Portilla et al., 2013; Park et al., 2016; Ryska et al., 2017; Panés et al., 2018; Dozois et al., 2019; Carvello et al., 2019; Barnhoorn et al., 2020). É importante ressaltar que, apesar de todos demonstrarem resultados positivos e bem tolerados, os métodos empregados são heterogêneos. Tecido adiposo e medula óssea foram utilizados para coleta de células-tronco, que foram administradas de forma autóloga ou alógena. A aplicação ocorreu diretamente no tecido perifistular ou então as células foram semeadas em matriz acelular introduzida na fístula, como fibrina ou outros materiais sintéticos absorvíveis. A quantidade de células introduzidas também variou de 4 a 120 milhões por caso. Por fim, o tempo em que o desfecho foi avaliado variou de 30 dias a 1 ano. Esses diferentes protocolos enfatizam a necessidade do desenvolvimento de maior conhecimento para uniformizar os tratamentos.

Nesse sentido, consensos sobre a identificação precisa de células-tronco derivadas de tecido adiposo e também sobre a definição de boas práticas laboratoriais para o emprego de terapias celulares foram estabelecidas. De acordo com a *International Society for Cellular Therapy*, CTM são definidas por três critérios: (i) são possíveis de isolar por adesão ao plástico e expandida *in vitro* em meio contendo soro sem nenhum fator de crescimento ou citocina; (ii) expressão de marcadores de superfície específicos, como antígeno leucocitário humano (HLA) classe I, CD73, CD90 e CD105, além da ausência de CD11, CD14, CD31, CD34 e CD45; (iii) capacidade de diferenciação *in vitro* para células de linhagem mesenquimal (Dominici

et al., 2006; Pittenger et al., 1999; Jiang et al., 2007; Gregory; Ylostalo; Prockop, 2005) Por fim, *European Medicines Agency Committee for Advanced Therapies* (EMA Guideline, 671639/2008) definiu protocolos de segurança para o emprego e estudos de terapias celulares.

As avaliações histopatológicas do presente estudo revelaram aumento da densidade vascular após a infiltração de CTA e semelhantes quantidades de células inflamatórias, apesar da importante redução do diâmetro da ferida. A cicatrização é sabidamente um processo contínuo e, muitas vezes, separado em etapas de forma didática, de acordo com os principais achados do momento (Patel; Maheshwari; Chandra, 2016). A fase inflamatória, que é a inicial, é caracterizada pela intensa migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, que passam a produzir diversas citocinas e fatores de crescimento, como PDGF, TGF- β , β -FGF, TNF, IL-1, IL-2 e IL-6 (Patel; Maheshwari; Chandra, 2016; Mazini et al., 2020). Na sequência, a fase proliferativa é caracterizada pela produção de matriz extracelular pelos fibroblastos, que se movimentam pelo tecido cicatricial através da degradação da matriz prévia pela produção de MMP. Formação de novos vasos sanguíneos e a epitelização também ocorrem de forma intensa nesta fase. Por fim, na fase de remodelamento, há redução na quantidade de células inflamatórias e aumento progressivo da força tênsil do tecido. Em feridas crônicas, onde esses processos não ocorrem de forma coordenada para a resolução, são encontrados elevados níveis de TNF, IL-1, IL-6 e MMP (Patel; Maheshwari; Chandra, 2016). Assim, o momento em que as amostras teciduais foram colhidas para análise neste estudo sugere representar uma organização para o encerramento da fase inflamatória, devido à presença de quantidade inalterada de células inflamatórias, mas com aumento da densidade vascular e com redução do diâmetro da ferida.

Apesar de a quantidade de células inflamatórias não mostrar diferenças significativas entre os grupos estudados, a avaliação da expressão gênica indica diferentes funções dessas células. Os macrófagos, presentes em todas as fases da cicatrização, são inicialmente ativados para um estado pró-inflamatório, estimulando a presença de outras células do sistema imune e também a liberação de citocinas e fatores de crescimento (Mahdavian et al., 2011). Conforme a ferida caminha para a resolução, o estado de ativação dos macrófagos e as ações executadas por esse tipo celular são alteradas. Um dos principais marcadores dessa alteração fenotípica é a glicoproteína CD68 (Chistiakov et al., 2016). Ela é amplamente utilizada como

marcador citoquímico em análises histoquímicas para identificar monócitos/macrófagos em tecidos com processos inflamatórios ativos, já que são regulados positivamente na presença de estímulos inflamatórios como oxLDL, lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), IFN- γ e doença inflamatória intestinal (Chistiakov et al., 2016). Neste estudo, a avaliação por qRT-PCR indicou redução de expressão de CD68 nas amostras de tecido submetidas a aplicação de CTA, demonstrando uma mudança no processo cicatricial em direção à resolução da ferida.

As metaloproteinases da matriz (MMPs) desempenham um papel crucial na degradação de proteínas da matriz extracelular, como colágeno, proteoglicanos e elastina, contribuindo para a remodelação tecidual (Mazini et al., 2020). Embora estejam envolvidas em várias doenças, incluindo câncer, artrite, doença pulmonar obstrutiva crônica e sepse, as MMPs também têm funções importantes em processos fisiológicos, como cicatrização de feridas, angiogênese e regulação inflamatória. Sua atividade é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (Fischer; Riedl, 2021). Desequilíbrios entre MMPs e TIMPs podem levar a doenças graves, e a modulação da rede de MMPs por meio de inibidores tem sido explorada como uma abordagem terapêutica potencial.

Neste estudo, a redução da 88,6% da expressão de MMP9 no grupo CTA ($0,19 \pm 0,18$) em relação ao grupo controle ($1,66 \pm 1,50$) ($p = 0,009$) indica a capacidade dessas células em modular a resposta imune e é compatível com a intensa redução do tamanho da ferida, caminhando para a resolução. Diferentes tipos de MMPs apresentam preferências por substratos específicos, ao mesmo tempo em que a redução da atividade de uma MMP pode estimular o aumento compensatório da atividade de outras, balanceando a ação final (Fischer; Riedl, 2021). Assim, a tendência de alta da expressão da MMP3 pode representar esse processo. Compreender o papel de MMPs específicas em diferentes processos de cicatrização é crucial para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

A IL-10 é uma citocina que desempenha um papel crucial na regulação da resposta imunológica e possui propriedades anti-inflamatórias. Ela inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por células Th1, macrófagos, monócitos, neutrófilos e outras células apresentadoras de antígenos (Saraiva; Vieira; O'Garra, 2020). A IL-10 também regula a expressão de moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em monócitos e limita a proliferação de células T. Além disso, descobriu-se que a IL-10 desempenha um papel na promoção da reparação

epitelial e cicatrização de feridas (Quiros et al., 2017). Ela regula a matriz extracelular e a função dos fibroblastos, levando à secreção de fatores que estimulam a proliferação de células epiteliais e o fechamento de feridas. O presente estudo indicou uma esperada tendência de alta da IL-10 no grupo tratado com CTA em relação aos grupos controle de meio de cultura, visualizando um dos possíveis mecanismos relacionados ao efeito imunomodulador das CTA. No contexto da doença inflamatória intestinal, a deficiência de IL-10 está associada à colite, e aumentar os níveis de IL-10 tem mostrado efeitos benéficos em modelos animais, o que pode também ter contribuído para a redução do diâmetro da ferida (Cardoso et al., 2018).

Já o TNF é uma importante citocina pró-inflamatória. Ele estimula a vasodilatação, a formação de edema, a adesão de leucócitos ao epitélio, regula a coagulação sanguínea, contribui para o estresse oxidativo em locais de inflamação e, indiretamente, induz à febre (Zelová; Hošek, 2013). Além disso, o TNF induz a angiogênese e regula a remodelação tecidual pela sua ação estimulatória sobre as MMPs. A avaliação da expressão gênica do TNF neste estudo não mostrou alteração entre os grupos, apesar do aumento de vasos sanguíneos e da redução da ferida no grupo CTA. Assim como neste estudo, a modulação dos níveis de TNF tem sido alvo promissor no tratamento de doenças inflamatórias intestinais. No entanto, ainda há muito a ser descoberto sobre os mecanismos pelos quais o TNF regula a reação inflamatória.

Por fim, a IL-1 desempenha um papel importante na cicatrização, sendo envolvida na resposta inflamatória inata e na ativação das células do sistema imunológico durante esse processo (Dinarello, 2018). A IL-1, encontrada constitutivamente em células saudáveis, é liberada em condições de morte celular, estimulando a produção de quimiocinas e a infiltração de células como neutrófilos e monócitos. Essa resposta inflamatória controlada desempenha um papel crucial na cicatrização de tecidos danificados, promovendo a reparação e regeneração adequadas. Este estudo não encontrou diferença entre os grupos na expressão de IL-1, indicando que a resolução da ferida avançou apesar de se manterem semelhantes, sugerindo outro mecanismo de ação.

Além da própria atividade celular, o processo de preparo também pode influenciar no resultado da aplicação de CTA. Como a cultura e a manipulação de células em laboratório é técnico e trabalhoso, o uso autólogo de CTA seria uma dificuldade para o tratamento de pacientes gravemente enfermos. Felizmente, o

transplante alógeno de células-tronco é viável sem a necessidade de supressão do sistema imunológico do hospedeiro, o que é uma vantagem significativa em aplicações clínicas (Le Blanc et al., 2003). A vantagem de usar o transplante alógeno de células-tronco derivadas de gordura é que a compatibilidade do antígeno leucocitário humano não é necessária. Isso ocorre porque as CTA expressam baixos níveis de moléculas HLA classe I e não expressam HLA classe II. Isso as torna imunologicamente privilegiadas e reduz a probabilidade de rejeição pelo sistema imunológico do receptor. Além disso, as CTA possuem propriedades imunomoduladoras que suprimem as atividades de vários tipos de células imunológicas, incluindo células T, células B, células NK e células dendríticas.

Uma alternativa ao processo enzimático de preparo celular em laboratório é o método mecânico. A repetida passagem da gordura proveniente de lipoaspiração por filtros de diâmetros progressivamente menores promove a lise dos adipócitos e a preservação das células da fração vascular estromal, que são ricas em células-tronco (Tonnard et al., 2013). Esse processo apresenta a grande vantagem de possibilitar o uso de tecido autólogo e com o preparo em poucos minutos, em pacientes saudáveis e com áreas doadoras. Em 100 mL de lipoaspiração, são obtidas cerca de 2×10^6 células por esse processo, das quais cerca de 5,1% ($0,1 \times 10^6$ células) foram identificadas como CD34 negativas, isto é, compatíveis com CTA. Em comparação ao protocolo utilizado neste estudo, seria necessária a coleta de 1.000 mL de gordura de lipoaspiração para a obtenção de 1×10^6 CTA, quantidade aplicada neste modelo experimental, e dificilmente obtida de pacientes gravemente acometidos por FEC e desnutrição.

Existem formas de contornar essa reduzida quantidade de células provenientes desse processo de emulsificação seriada. A centrifugação da gordura proveniente de lipoaspiração é capaz de aumentar a concentração de células em cerca de 100 a 1000% vezes, além de também aumentar a porcentagem de células-tronco disponíveis em cerca de 55% a 425% (Pallua; Grasys; Kim, 2018; Zheng et al., 2019). Esse processo, apesar de representar um discreto aumento da complexidade e da duração do preparo das células, reduz os riscos regulatórios e de contaminação laboratorial, podendo indicar uma alternativa para o uso de CTA autóloga mecanicamente preparada.

Além da importância de considerar a quantidade células-tronco transferidas, cabe ressaltar a presença de outras substâncias também relacionadas com estímulos de regeneração tecidual, como fatores de crescimento e citocinas. O meio de cultura

onde as células-tronco são condicionadas (MC-CTA) é rico nessas substâncias ao mesmo tempo em que é livre de preocupações relacionadas à segurança genética e diferenciação celular maligna indesejada (Guo et al., 2022). Por isso, há um interesse crescente na literatura nessa modalidade de tratamento livre de células, no qual já foram identificadas mais de 1700 proteínas (Sanchez-Macedo et al., 2022).

A relação entre esse meio de cultura e as células-tronco é fundamental para a definição fenotípica dessas células. Por isso, as soluções utilizadas no laboratório para amplificar a contagem celular não podem ter sua influência descartada. O meio de cultura utilizado neste estudo foi composto de 80% DMEM/F12, 20% soro fetal bovino e 1% antibióticos penicilina, estreptomicina e anfotericina B. DMEM/F12 é composto por aminoácidos, vitaminas, sais inorgânicos, dextrose e outras componentes, enquanto o SFB contém proteínas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios que ainda requerem estudos adicionais (Lee et al., 2022). Assim, contém substâncias biologicamente ativas que podem interferir não apenas na diferenciação das células-tronco, mas também no próprio processo de cicatrização.

Da mesma forma que este estudo indicou aumento na quantidade de vasos sanguíneos também no grupo submetido a infiltração de meio de cultura apenas, além da diminuição da expressão de CD68 e MMP9, estudos prévios demonstraram algum efeito sobre os mecanismos de reparação tecidual. Guo et al. (2022) demonstraram a maior concentração de VEGF em um modelo experimental *ex vivo* de pele nas amostras submetidas a aplicação de DMEM quando em comparação às outras amostras submetidas a aplicação de CTA ou de MC-CTA. Já Jiang et al. (2022), em modelo murino de escleroderma, encontraram maior espessura da derme e da fração de colágeno na pele dos animais submetidos a aplicação de PBS, quando em comparação com gordura, gordura enriquecida com FVE e apenas FVE.

As substâncias produzidas pelas CTA e encontradas no meio de cultura onde são cultivadas podem apresentar importância maior que a compreendida atualmente. É conhecido que as CTA são atraídas para locais com processos inflamatórios e cicatriciais ativos, independente se inseridas diretamente no local ou à distância (DelaRosa et al., 2012b). Entretanto, o tempo em que essas células permanecem no local de forma ativa, antes de se diferenciarem, deixarem de ser viáveis ou qualquer outro possível desfecho ainda não é esclarecido. Em um estudo com a aplicação local de CTA marcadas por bioluminescência, 50% da intensidade do sinal se manteve presente na ferida após 2 dias e apenas 10% após 30 dias, mostrando uma intensa

redução da quantidade celular (Ryska et al., 2017). Em outro estudo, a mudança da expressão da proteína CD44 após 9 dias de aplicação de CTA na ferida pode indicar a diferenciação das células (Guo et al., 2022). Como os efeitos dessa terapia podem ser encontrados meses após a aplicação, a ação celular pode ser apenas uma das envolvidas no processo da cicatrização.

Algumas limitações do estudo podem ser mencionadas. Os protocolos utilizados em estudos anteriores foram heterogêneos, variando em relação à origem das células-tronco, administração, dose, modelo animal e tempo de avaliação. Isso destaca a necessidade de desenvolver um maior conhecimento e uniformizar os tratamentos. Além disso, dada a complexidade da resposta imunológica em termos de agentes celulares se moleculares, a avaliação do efeito da CTA poderia incluir também outros alvos. Por fim, a translação do resultado experimental para humanos também requer cautela, dados às diferenças biológicas.

Sugestões para futuras pesquisas incluem a padronização dos protocolos de tratamento com células-tronco derivadas de tecido adiposo, explorando diferentes doses e vias de administração. Além disso, é importante investigar a interação entre as células-tronco e outros fatores, como fatores de crescimento e citocinas presentes no meio de cultura, para entender melhor os mecanismos de ação das células-tronco na cicatrização. Também é necessário investigar a duração da atividade das células-tronco no local da ferida e a possibilidade de diferenciação dessas células ao longo do tempo.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, células-tronco derivadas de tecido adiposo foram avaliadas no tratamento de fístulas enterocutâneas em modelo experimental murino. Os resultados demonstraram que, após a aplicação dessas células, houve redução do diâmetro das fístulas, aumento da densidade vascular e alteração da expressão gênica de MMP9 e CD68, revelando concordâncias clínica, histopatológica e biomolecular nesta amostra. Esses achados indicam que a aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo pode promover a resolução da fístula pela formação de novos vasos sanguíneos e pela modulação da resposta inflamatória, sendo uma potencial estratégia terapêutica nessa patologia.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com Estilo Vancouver.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.

Alessandrini L, Kohn A, Cosentino R, Marrollo M, Papi C, Monterubbianesi R, Tersigni R. Local injection of infliximab in severe fistulating perianal Crohn's disease: an open uncontrolled study. *Tech Coloproctol*. 2011 Dec;15(4):407-12.

Alexandrides IJ, Liu P, Marshall DM, Nery JR, Tzakis AG, Thaller SR. Abdominal wall closure after intestinal transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Sep;106(4):805-12.

Alivizatos V, Felekis D, Zorbalas A. Evaluation of the effectiveness of octreotide in the conservative treatment of postoperative enterocutaneous fistulas. *Hepatogastroenterology*. 2002 Jul-Aug;49(46):1010-2.

Alpers DH. Enteral feeding and gut atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002 Nov;5(6):679-83.

Alstrup T, Eijken M, Brunbjerg ME, Hammer-Hansen N, Møller BK, Damsgaard TE. Measured Levels of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Adipose Tissue Is Strongly Dependent on Harvesting Method and Stem Cell Isolation Technique. *Plast Reconstr Surg*. 2020 Jan;145(1):142-150.

Alvarez C, McFadden DW, Reber HA. Complicated enterocutaneous fistulas: failure of octreotide to improve healing. *World J Surg*. 2000 May;24(5):533-8.

Amiot A, Setakhr V, Seksik P, Allez M, Treton X, De Vos M, Laharie D, Colombel JF, Abitbol V, Reimund JM, Moreau J, Veyrac M, Flourié B, Cosnes J, Lemann M, Bouhnik Y. Long-term outcome of enterocutaneous fistula in patients with Crohn's disease treated with anti-TNF therapy: a cohort study from the GETAID. *Am J Gastroenterol*. 2014 Sep;109(9):1443-9.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90.

Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007 Apr;56(4):1175-86.

Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review. *Biotechnol Adv*. 2018 Jul-Aug;36(4):1111-1126.

Barba M, Cicione C, Bernardini C, Michetti F, Lattanzi W. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: state of the art. *Biomed Res Int*. 2013;2013:416391.

- Barnhoorn MC, Wasser MNJM, Roelofs H, Maljaars PWJ, Molendijk I, Bonsing BA, Oosten LEM, Dijkstra G, van der Woude CJ, Roelen DL, Zwaginga JJ, Verspaget HW, Fibbe WE, Hommes DW, Peeters KCMJ, van der Meulen-de Jong AE. Long-term Evaluation of Allogeneic Bone Marrow-derived Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Crohn's Disease Perianal Fistulas. *J Crohns Colitis*. 2020 Jan 1;14(1):64-70.
- Berry SM, Fischer JE. Classification and pathophysiology of enterocutaneous fistulas. *Surg Clin North Am*. 1996 Oct;76(5):1009-18.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2214-9.
- Bourikas LA, Koutroubakis IE. Anti-TNF and fistulizing perianal Crohn's disease: use in clinical practice. *Curr Drug Targets*. 2010 Feb;11(2):187-97.
- Braga M, Gianotti L, Gentilini O, Parisi V, Salis C, Di Carlo V. Early postoperative enteral nutrition improves gut oxygenation and reduces costs compared with total parenteral nutrition. *Crit Care Med*. 2001 Feb;29(2):242-8.
- Bryzek A, Czekaj P, Plewka D, Komarska H, Tomsia M, Lesiak M, Sieroń AL, Sikora J, Kopaczka K. Expression and co-expression of surface markers of pluripotency on human amniotic cells cultured in different growth media. *Ginekol Pol*. 2013 Dec;84(12):1012-24.
- Camargo CP, Kubrusly MS, Lee AD, Traldi MC, Maluf FC, Costa AC, Figueira ERR, Gemperli R, Carneiro-D'Albuquerque LA, Galvão FH. Simplified Model of Enterocutaneous Fistula in the Rat. *Acta Sci Gastrointest Dis*. 2022;5(1):6-10.
- Campos AC, Andrade DF, Campos GM, Matias JE, Coelho JC. A multivariate model to determine prognostic factors in gastrointestinal fistulas. *J Am Coll Surg*. 1999 May;188(5):483-90.
- Can A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Haematol*. 2008 Jun 5;25(2):57-9.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007 Nov;213(2):341-7.
- Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):318-24.
- Cardoso A, Gil Castro A, Martins AC, Carriche GM, Murigneux V, Castro I, Cumano A, Vieira P, Saraiva M. The Dynamics of Interleukin-10-Afforded Protection during Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Front Immunol*. 2018 Mar 1;9:400.
- Carlsen BT, Farmer DG, Busuttil RW, Miller TA, Rudkin GH. Incidence and management of abdominal wall defects after intestinal and multivisceral transplantation. *Plast Reconstr Surg*. 2007 Apr 1;119(4):1247-1255.

Carvello M, Lightner A, Yamamoto T, Kotze PG, Spinelli A. Mesenchymal Stem Cells for Perianal Crohn's Disease. *Cells*. 2019 Jul 23;8(7):764.

Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2011 Jul 18;18(1):49.

Chistiakov DA, Killingsworth MC, Myasoedova VA, Orekhov AN, Bobryshev YV. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Lab Invest*. 2017 Jan;97(1):4-13.

Cho JH. The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jun;8(6):458-66.

Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut*. 2011 Jun;60(6):788-98.

Collier B, Guillaumondegui O, Cotton B, Donahue R, Conrad A, Groh K, Richman J, Vogel T, Miller R, Diaz J Jr. Feeding the open abdomen. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2007 Sep-Oct;31(5):410-5.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.

Cowan KB, Cassaro S. Enterocutaneous Fistula. [Updated 2021 Aug 11]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459129/>.

Da Sacco S, De Filippo RE, Perin L. Amniotic fluid as a source of pluripotent and multipotent stem cells for organ regeneration. *Curr Opin Organ Transplant*. 2011 Feb;16(1):101-5.

Dárdai E, Piriti S, Nagy L. Parenteral and enteral nutrition and the enterocutaneous fistula treatment. II. Factors influencing the outcome of treatment. *Acta Chir Hung*. 1991;32(4):305-18.

David A, Galvão F, Pécora R, Pugliese V, Tannuri U, D'Albuquerque L. Tratamento da Falência Intestinal Complicada. A era do Transplante Intestinal. *Int J Nutrol*. 2011;4(2):30-1.

Davis KG, Johnson EK. Controversies in the care of the enterocutaneous fistula. *Surg Clin North Am*. 2013 Feb;93(1):231-50.

de la Portilla F, Alba F, García-Olmo D, Herrerías JM, González FX, Galindo A. Expanded allogeneic adipose-derived stem cells (eASCs) for the treatment of complex perianal fistula in Crohn's disease: results from a multicenter phase I/IIa clinical trial. *Int J Colorectal Dis*. 2013 Mar;28(3):313-23.

DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol.* 2012b Dec;23(6):978-83.

DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, Rico L, Camarillo E, García L, Abad JL, Trigueros C, Delgado M, Büscher D. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2009 Oct;15(10):2795-806.

DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:865601.

DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, Lombardo E, Tarazona R, Casado JG. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev.* 2012a May 20;21(8):1333-43.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3838-43.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018 Jan;281(1):8-27.

Ding DC, Chou HL, Hung WT, Liu HW, Chu TY. Human adipose-derived stem cells cultured in keratinocyte serum free medium: Donor's age does not affect the proliferation and differentiation capacities. *J Biomed Sci.* 2013 Aug 14;20(1):59.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5-14.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

Doorn J, Moll G, Le Blanc K, van Blitterswijk C, de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012 Apr;18(2):101-15.

Dozois EJ, Lightner AL, Mathis KL, Chua HK, Kelley SR, Fletcher JG, Dietz AB, Friton JJ, Butler GW, Faubion WA. Early Results of a Phase I Trial Using an Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Coated Fistula Plug for the Treatment of Transsphincteric Cryptoglandular Fistulas. *Dis Colon Rectum.* 2019 May;62(5):615-622.

Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-37.

Edmunds LH Jr, Williams GM, Welch CE. External fistulas arising from the gastrointestinal tract. *Ann Surg*. 1960 Sep;152(3):445-71.

EMA Guideline, 671639/2008. Guideline on Quality, Non-Clinical and Clinical Aspects of Medicinal Products Containing Genetically Modified Cells; Ema: Amsterdam, The Netherlands, 2012.

Farooqi N, Tuma F. Intestinal Fistula. [Updated 2022 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534208/>.

Fettah A, Özbek N, Özgüner M, Azık F, Işık P, Avcı Z, Yaralı N, Uçkan D, Tunç B. Factors associated with bone marrow stem cell yield for pediatric allogeneic stem cell transplantation: The impact of donor characteristics. *Pediatr Transplant*. 2017 Feb;21(1).

Fischer T, Riedl R. Challenges with matrix metalloproteinase inhibition and future drug discovery avenues. *Expert Opin Drug Discov*. 2021 Jan;16(1):75-88.

Frölich K, Hagen R, Kleinsasser N. Mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe (ASC) - Grundlagen und Anwendung in der HNO-Heilkunde [Adipose-derived stromal cells (ASC) - basics and therapeutic approaches in otorhinolaryngology]. *Laryngorhinootologie*. 2014 Jun;93(6):369-80.

Galland RB, Spencer J. Radiation-induced gastrointestinal fistulae. *Ann R Coll Surg Engl*. 1986 Jan;68(1):5-7.

Galvão FH, Waitzberg DL, Bacchella T, Gama-Rodrigues J, Machado MC. Transplante de intestino delgado [Small intestine transplantation]. *Arq Gastroenterol*. 2003 Apr-Jun;40(2):118-25.

García-Olmo D, García-Arranz M, García LG, Cuellar ES, Blanco IF, Prianes LA, Montes JA, Pinto FL, Marcos DH, García-Sancho L. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell-based therapy. *Int J Colorectal Dis*. 2003 Sep;18(5):451-4.

García-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation. *Dis Colon Rectum*. 2005 Jul;48(7):1416-23.

García-Olmo D, Guadalajara H, Rubio-Perez I, Herreros MD, de-la-Quintana P, Garcia-Arranz M. Recurrent anal fistulae: limited surgery supported by stem cells. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 21;21(11):3330-6.

García-Olmo D, Herreros D, Pascual I, Pascual JA, Del-Valle E, Zorrilla J, De-La-Quintana P, Garcia-Arranz M, Pascual M. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: a phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum*. 2009 Jan;52(1):79-86.

- Gayral F, Campion JP, Regimbeau JM, Blumberg J, Maisonobe P, Topart P, Wind P; Lanreotide Digestive Fistula. Randomized, placebo-controlled, double-blind study of the efficacy of lanreotide 30 mg PR in the treatment of pancreatic and enterocutaneous fistulae. *Ann Surg*. 2009 Dec;250(6):872-7.
- Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010 Jul 1;185(1):302-12.
- González-Pinto I, González EM. Optimising the treatment of upper gastrointestinal fistulae. *Gut*. 2001 Dec;49 Suppl 4(Suppl 4):iv22-31.
- Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(1):241-8.
- Gregory CA, Ylostalo J, Prockop DJ. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. *Sci STKE*. 2005 Jul 26;2005(294):pe37.
- Gribovskaja-Rupp I, Melton GB. Enterocutaneous Fistula: Proven Strategies and Updates. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016 Jun;29(2):130-7.
- Guo X, Schaudinn C, Blume-Peytavi U, Vogt A, Rancan F. Effects of Adipose-Derived Stem Cells and Their Conditioned Medium in a Human Ex Vivo Wound Model. *Cells*. 2022 Apr 2;11(7):1198.
- Haffejee AA. Surgical management of high output enterocutaneous fistulae: a 24-year experience. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2004 May;7(3):309-16.
- Hanson SE, Gutowski KA, Hematti P. Clinical applications of mesenchymal stem cells in soft tissue augmentation. *Aesthet Surg J*. 2010 Nov-Dec;30(6):838-42.
- Heimroth J, Chen E, Sutton E. Management Approaches for Enterocutaneous Fistulas. *Am Surg*. 2018 Mar 1;84(3):326-333.
- Hesse U, Ysebaert D, de Hemptinne B. Role of somatostatin-14 and its analogues in the management of gastrointestinal fistulae: clinical data. *Gut*. 2001 Dec;49 Suppl 4(Suppl 4):iv11-21.
- Hollington P, Mawdsley J, Lim W, Gabe SM, Forbes A, Windsor AJ. An 11-year experience of enterocutaneous fistula. *Br J Surg*. 2004 Dec;91(12):1646-51.
- Hsiao ST, Asgari A, Lokmic Z, Sinclair R, Dusting GJ, Lim SY, Dilley RJ. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells Dev*. 2012 Aug 10;21(12):2189-203.
- Hua J, Yu H, Dong W, Yang C, Gao Z, Lei A, Sun Y, Pan S, Wu Y, Dou Z. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. *Tissue Cell*. 2009 Dec;41(6):448-55.

Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006 Oct 22;3(10):589-601.

Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Concise review: clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012 Jan;1(1):44-50.

Jaing TH. Umbilical cord blood: a trustworthy source of multipotent stem cells for regenerative medicine. *Cell Transplant*. 2014;23(4-5):493-6.

Jaramillo-Ferrada PA, Wolvetang EJ, Cooper-White JJ. Differential mesengenic potential and expression of stem cell-fate modulators in mesenchymal stromal cells from human-term placenta and bone marrow. *J Cell Physiol*. 2012 Sep;227(9):3234-42.

Jiang W, Wang J, Lin J, Jiang S, Quan Y, Liao Y, Gao J, Cai J. Adipose-Derived Stem Cell-Enriched Lipotransfer Reverses Skin Sclerosis by Suppressing Dermal Inflammation. *Plast Reconstr Surg*. 2022 Sep 1;150(3):578-587.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.

Jiao F, Wang J, Dong ZL, Wu MJ, Zhao TB, Li DD, Wang X. Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram*. 2012 Aug;14(4):324-33.

Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, Ageeva L, Sharonov G, Ischenko D, Alekseev D, Grigorieva O, Sysoeva V, Rubina K, Lazarev V, Govorun V. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 11;6:221.

Kargozar S, Mozafari M, Hashemian SJ, Brouki Milan P, Hamzehlou S, Soleimani M, Joghataei MT, Gholipourmalekabadi M, Korourian A, Mousavizadeh K, Seifalian AM. Osteogenic potential of stem cells-seeded bioactive nanocomposite scaffolds: A comparative study between human mesenchymal stem cells derived from bone, umbilical cord Wharton's jelly, and adipose tissue. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Jan;106(1):61-72.

Kasperek MS, Bruckmeier A, Beigel F, Müller MH, Brand S, Mansmann U, Jauch KW, Ochsenkühn T, Kreis ME. Infliximab does not affect postoperative complication rates in Crohn's patients undergoing abdominal surgery. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Jul;18(7):1207-13.

Kerr CL, Hill CM, Blumenthal PD, Gearhart JD. Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):412-21.

Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*. 2014 Apr;163(4):399-408.

- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
- Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.
- Kucia M, Wu W, Ratajczak MZ. Bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells: their developmental origin and biological significance. *Dev Dyn*. 2007 Dec;236(12):3309-20.
- Lal S, Teubner A, Shaffer JL. Review article: intestinal failure. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006 Jul 1;24(1):19-31.
- Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.
- Lee AD, Galvao FH, Dias MC, Cruz ME, Marin M, Pedrol CN, David AI, Pecora RA, Waitzberg DL, D'Albuquerque LA. Home parenteral nutrition program and referral of potential candidates for intestinal and multivisceral transplantation in a single Brazilian center. *Transplant Proc*. 2014 Jul-Aug;46(6):1839-41.
- Lee DY, Lee SY, Yun SH, Jeong JW, Kim JH, Kim HW, Choi JS, Kim GD, Joo ST, Choi I, Hur SJ. Review of the Current Research on Fetal Bovine Serum and the Development of Cultured Meat. *Food Sci Anim Resour*. 2022 Sep;42(5):775-799.
- Lee SH. Surgical management of enterocutaneous fistula. *Korean J Radiol*. 2012 Jan-Feb;13 Suppl 1(Suppl 1):S17-20.
- Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):279-89.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Lloyd DA, Gabe SM, Windsor AC. Nutrition and management of enterocutaneous fistula. *Br J Surg*. 2006 Sep;93(9):1045-55.
- Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg*. 2009 Apr;79(4):235-44.
- Lundy JB, Fischer JE. Historical perspectives in the care of patients with enterocutaneous fistula. *Clin Colon Rectal Surg*. 2010 Sep;23(3):133-41.

Lynch AC, Delaney CP, Senagore AJ, Connor JT, Remzi FH, Fazio VW. Clinical outcome and factors predictive of recurrence after enterocutaneous fistula surgery. *Ann Surg*. 2004 Nov;240(5):825-31.

Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.

Mahdavian Delavary B, van der Veer WM, van Egmond M, Niessen FB, Beelen RH. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*. 2011 Jul;216(7):753-62.

Manos LL, Wolfgang CL. The management of enterocutaneous fistulas. *Current Surgical Therapy*, 11th Ed. Philadelphia: Saunders; 2014. p. 142-5.

Martinez JL, Luque-de-León E, Ballinas-Oseguera G, Mendez JD, Juárez-Oropeza MA, Román-Ramos R. Factors predictive of recurrence and mortality after surgical repair of enterocutaneous fistula. *J Gastrointest Surg*. 2012 Jan;16(1):156-63.

Marzo M, Felice C, Pugliese D, Andrisani G, Mocci G, Armuzzi A, Guidi L. Management of perianal fistulas in Crohn's disease: an up-to-date review. *World J Gastroenterol*. 2015 Feb 7;21(5):1394-403.

Mazini L, Rochette L, Admou B, Amal S, Malka G. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. *Int J Mol Sci*. 2020 Feb 14;21(4):1306.

Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014 Oct 7;9(10):e109305.

Meguid MM, Campos AC. Nutritional management of patients with gastrointestinal fistulas. *Surg Clin North Am*. 1996 Oct;76(5):1035-80.

Meguid MM, Debonis D, Meguid V, Hill LR, Terz JJ. Complications of abdominal operations for malignant disease. *Am J Surg*. 1988 Nov;156(5):341-5.

Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Jun;2(6):455-63.

Mizuno H. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *J. Oral Biosciences*. 2013;5:132-136.

Murphy J, Hotouras A, Koers L, Bhan C, Glynn M, Chan CL. Establishing a regional enterocutaneous fistula service: the Royal London hospital experience. *Int J Surg*. 2013;11(9):952-6.

Nae S, Bordeianu I, Stăncioiu AT, Antohi N. Human adipose-derived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(4):919-24.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2605-16.

NHS England. 2013/2014 NHS Standard Contract for Intestinal Failure (Adult) [NHS Commissioning Board (NHS England)] [internet]. 2013 [citado 2022 ago. 29]. Disponível em: <https://www.england.nhs.uk/wp-content/uploads/2019/07/a08-intestinal-failure-adult-1.pdf>.

Nightingale J, Woodward JM; Small Bowel and Nutrition Committee of the British Society of Gastroenterology. Guidelines for management of patients with a short bowel. *Gut*. 2006 Aug;55 Suppl 4(Suppl 4):iv1-12.

Nightingale JM. The medical management of intestinal failure: methods to reduce the severity. *Proc Nutr Soc*. 2003 Aug;62(3):703-10.

Ong WK, Sugii S. Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Jun;45(6):1083-6.

Osborn C, Fischer JE. How I do it: gastrointestinal cutaneous fistulas. *J Gastrointest Surg*. 2009 Nov;13(11):2068-73.

Otero-Ortega L, Gutiérrez-Fernández M, Ramos-Cejudo J, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Sobrino T, Hernanz TN, Campos F, López JA, Cerdán S, Vázquez J, Díez-Tejedor E. White matter injury restoration after stem cell administration in subcortical ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Jun 19;6(1):121. doi: 10.1186/s13287-015-0111-4.

Pagotto VPF, Camargo CP, Cáceres PV, Altran CS, Gemperl R. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic strategy for enterocutaneous fistula: an experimental model study. *Acta Cir Bras*. 2023;38:e384523.

Pallua N, Grasys J, Kim BS. Enhancement of Progenitor Cells by Two-Step Centrifugation of Emulsified Lipoaspirates. *Plast Reconstr Surg*. 2018 Jul;142(1):99-109.

Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, Dignass A, Nachury M, Ferrante M, Kazemi-Shirazi L, Grimaud JC, de la Portilla F, Goldin E, Richard MP, Diez MC, Tagarro I, Leselbaum A, Danese S; ADMIRE CD Study Group Collaborators. Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2018 Apr;154(5):1334-1342.e4.

Panés J, García-Olmo D, Van Assche G, Colombel JF, Reinisch W, Baumgart DC, Dignass A, Nachury M, Ferrante M, Kazemi-Shirazi L, Grimaud JC, de la Portilla F, Goldin E, Richard MP, Leselbaum A, Danese S; ADMIRE CD Study Group Collaborators. Expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells (Cx601) for complex perianal fistulas in Crohn's disease: a phase 3 randomised, double-blind controlled trial. *Lancet*. 2016 Sep 24;388(10051):1281-90.

- Park KJ, Ryoo SB, Kim JS, Kim TI, Baik SH, Kim HJ, Lee KY, Kim M, Kim WH. Allogeneic adipose-derived stem cells for the treatment of perianal fistula in Crohn's disease: a pilot clinical trial. *Colorectal Dis*. 2016 May;18(5):468-76.
- Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care*. 2016 Jan;25(1):46-55.
- Pécora RA, David AI, Lee AD, Galvão FH, Cruz-Junior RJ, D'Albuquerque LA. Small bowel transplantation. *Arq Bras Cir Dig*. 2013 Jul-Sep;26(3):223-9.
- Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2896-902.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- Polk TM, Schwab CW. Metabolic and nutritional support of the enterocutaneous fistula patient: a three-phase approach. *World J Surg*. 2012 Mar;36(3):524-33.
- Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One*. 2010 Feb 2;5(2):e9016.
- Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med*. 1999 May 6;340(18):1398-405.
- Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and $\gamma\delta$ T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):693-702.
- Quinn M, Falconer S, McKee RF. Management of Enterocutaneous Fistula: Outcomes in 276 Patients. *World J Surg*. 2017 Oct;41(10):2502-2511.
- Quiros M, Nishio H, Neumann PA, Siuda D, Brazil JC, Azcutia V, Hilgarth R, O'Leary MN, Garcia-Hernandez V, Leoni G, Feng M, Bernal G, Williams H, Dedhia PH, Gerner-Smidt C, Spence J, Parkos CA, Denning TL, Nusrat A. Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *J Clin Invest*. 2017 Sep 1;127(9):3510-3520.
- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151-62.
- Rahbour G, Hart AL, Al-Hassi HO, Ullah MR, Gabe SM, Knight SC, Warusavitarne J, Vaizey CJ. Prospective study of immunological factors in non-inflammatory bowel disease enterocutaneous fistulas. *BMC Surg*. 2011 May 27;11:12.

- Rahbour G, Siddiqui MR, Ullah MR, Gabe SM, Warusavitarne J, Vaizey CJ. A meta-analysis of outcomes following use of somatostatin and its analogues for the management of enterocutaneous fistulas. *Ann Surg*. 2012 Dec;256(6):946-54.
- Razavi S, Ghasemi N, Mardani M, Salehi H. Co-Transplantation of Human Neurotrophic Factor Secreting Cells and Adipose-Derived Stem Cells in Rat Model of Multiple Sclerosis. *Cell J*. 2018 Apr;20(1):46-52.
- Riis S, Stensballe A, Emmersen J, Pennisi CP, Birkelund S, Zachar V, Fink T. Mass spectrometry analysis of adipose-derived stem cells reveals a significant effect of hypoxia on pathways regulating extracellular matrix. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Apr 14;7(1):52.
- Rolandelli R, Roslyn JJ. Surgical management and treatment of sepsis associated with gastrointestinal fistulas. *Surg Clin North Am*. 1996 Oct;76(5):1111-22.
- Rony IK, Baten A, Bloomfield JA, Islam ME, Billah MM, Islam KD. Inducing pluripotency in vitro: recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif*. 2015 Apr;48(2):140-56.
- Roumeguère P, Bouchard D, Pigot F, Castinel A, Juguet F, Gaye D, Capdepon M, Zerbib F, Laharie D. Combined approach with infliximab, surgery, and methotrexate in severe fistulizing anoperineal Crohn's disease: results from a prospective study. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Jan;17(1):69-76.
- Roy D. Surgery in tropical countries. In: Taylor, O. Higgin, Chisholm, editors. *Surgical management*. London: William Heinemann Medical Books Ltd; 1986.
- Ryska O, Serclova Z, Mestak O, Matouskova E, Vesely P, Mrazova I. Local application of adipose-derived mesenchymal stem cells supports the healing of fistula: prospective randomised study on rat model of fistulising Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol*. 2017 May;52(5):543-550.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:8-27.
- Sanchez-Macedo N, McLuckie M, Grünherz L, Lindenblatt N. Protein Profiling of Mechanically Processed Lipoaspirates: Discovering Wound Healing and Antifibrotic Biomarkers in Nanofat. *Plast Reconstr Surg*. 2022 Aug 1;150(2):341e-354e.
- Sandborn WJ, Fazio VW, Feagan BG, Hanauer SB; American Gastroenterological Association Clinical Practice Committee. AGA technical review on perianal Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2003 Nov;125(5):1508-30.
- Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2004 Feb 26;350(9):876-85.
- Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020 Jan 6;217(1):e20190418.

- Scala M, Spagnolo F, Trapasso M, Strada P, Moresco L, Santi P. Association of vacuum-assisted closure and platelet gel for the definitive surgical repair of an enterocutaneous fistula: a case report. *In Vivo*. 2012 Jan-Feb;26(1):147-50.
- Schechter WP. Management of enterocutaneous fistulas. *Surg Clin North Am*. 2011 Jun;91(3):481-91.
- Schwartz DA, Herdman CR. Review article: The medical treatment of Crohn's perianal fistulas. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 May 1;19(9):953-67.
- Shekkeris AS, Jaiswal PK, Khan WS. Clinical applications of mesenchymal stem cells in the treatment of fracture non-union and bone defects. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012 Mar;7(2):127-33.
- Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:457-78.
- Singh B, George BD, Mortensen NJ. Surgical therapy of perianal Crohn's disease. *Dig Liver Dis*. 2007 Oct;39(10):988-92.
- Singh VK, Kumar N, Kalsan M, Saini A, Chandra R. Mechanism of Induction: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). *J Stem Cells*. 2015;10(1):43-62.
- Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Nov;63(11):1886-92.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Tan Y, Ooi S, Wang L. Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014 Jan;9(1):63-72.
- Teixeira PG, Inaba K, Dubose J, et al. Enterocutaneous fistula complicating trauma laparotomy: a major resource burden. *Am Surg* 2009;75:30–2.
- Thia KT, Mahadevan U, Feagan BG, Wong C, Cockeram A, Bitton A, Bernstein CN, Sandborn WJ. Ciprofloxacin or metronidazole for the treatment of perianal fistulas in patients with Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Jan;15(1):17-24.
- Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med*. 2011 Feb;11(57):160-70.
- Tong CY, Lim LL, Brody RA. High output enterocutaneous fistula: a literature review and a case study. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2012;21(3):464-9.
- Tonnard P, Verpaele A, Peeters G, Hamdi M, Cornelissen M, Declercq H. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Oct;132(4):1017-1026.

- Van Pham P, Truong NC, Le PT, Tran TD, Vu NB, Bui KH, Phan NK. Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Cell Tissue Bank*. 2016 Jun;17(2):289-302.
- Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Feb 28;8(1):45.
- Visschers RG, van Gemert WG, Winkens B, Soeters PB, Olde Damink SW. Guided treatment improves outcome of patients with enterocutaneous fistulas. *World J Surg*. 2012 Oct;36(10):2341-8.
- Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol*. 2016 Apr;18(4):349-55.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010 Apr 26;5(4):e10088.
- Weissman IL. Stem cells are units of natural selection for tissue formation, for germline development, and in cancer development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Jul 21;112(29):8922-8.
- Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68.
- Weledji EP, Chichom AM. Aetiology and impact of intra- abdominal sepsis on surgical management. *East Cent Afr J Surg*. 2012;17: 3.
- Weledji EP. Perspectives on Enterocutaneous Fistula: A Review Article. *Med Clin Rev*. 2017;3:5.
- Whiteford MH, Kilkenny J 3rd, Hyman N, Buie WD, Cohen J, Orsay C, Dunn G, Perry WB, Ellis CN, Rakinic J, Gregorcyk S, Shellito P, Nelson R, Tjandra JJ, Newstead G; Standards Practice Task Force; American Society of Colon and Rectal Surgeons. Practice parameters for the treatment of perianal abscess and fistula-in-ano (revised). *Dis Colon Rectum*. 2005 Jul;48(7):1337-42.
- Wise PE, Schwartz DA. Management of perianal Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006 Apr;4(4):426-30.
- Witkowska-Zimny M, Walenko K, Wałkiewicz AE, Pojda Z, Przybylski J, Lewandowska-Szumieł M. Effect of substrate stiffness on differentiation of umbilical cord stem cells. *Acta Biochim Pol*. 2012;59(2):261-4.
- Yin J, Wang J, Yao D, Zhang S, Mao Q, Kong W, Ren L, Li Y, Li J. Is it feasible to implement enteral nutrition in patients with enteroatmospheric fistulae? A single-center experience. *Nutr Clin Pract*. 2014 Oct;29(5):656-61.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

Zanfi C, Cescon M, Lauro A, Dazzi A, Ercolani G, Grazi GL, Del Gaudio M, Ravaioli M, Cucchetti A, La Barba G, Zanello M, Cipriani R, Pinna AD. Incidence and management of abdominal closure-related complications in adult intestinal transplantation. *Transplantation*. 2008 Jun 15;85(11):1607-9.

Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res*. 2013 Jul;62(7):641-51.

Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:793823.

Zheng H, Qiu L, Su Y, Yi C. Conventional Nanofat and SVF/ADSC-Concentrated Nanofat: A Comparative Study on Improving Photoaging of Nude Mice Skin. *Aesthet Surg J*. 2019 Oct 15;39(11):1241-1250.

Zhou Z, Chen Y, Zhang H, Min S, Yu B, He B, Jin A. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*. 2013 Apr;15(4):434-48.

Zonca M, Mancheño-Corvo P, DelaRosa O, Mañes S, Büscher D, Lombardo E, Planelles L. APRIL and BAFF proteins increase proliferation of human adipose-derived stem cells through activation of Erk1/2 MAP kinase. *Tissue Eng Part A*. 2012 Apr;18(7-8):852-9.

Zou T, Fan J, Fartash A, Liu H, Fan Y. Cell-based strategies for vascular regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2016 May;104(5):1297-314.

Zuba-Surma EK, Wojakowski W, Ratajczak MZ, Dawn B. Very small embryonic-like stem cells: biology and therapeutic potential for heart repair. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Oct 1;15(7):1821-34.

APÊNDICE

Apêndice A - Comparação do resultado de diferentes estudo sobre aplicação de células-tronco derivadas de tecido adiposo em fístula enterocutânea

Autores	Origem	Administração	Dose	Modelo	Resultado	Tempo
García-Olmo et al., 2009	gordura, autólogo	local	4 a 30 x 10 ⁶ células	humano, 5 casos	75% resolução	8 semanas
de la Portilla et al., 2013	gordura, alógeno	local	20 x 10 ⁶ células	humano, 24 casos	36,8% resolução	12 semanas
Park et al., 2016	gordura, alógeno	local com cola de fibrina	3 x 10 ⁷ células	humano, 6 casos	16,7% resolução	8 semanas, 4 e 6 meses
Ryska et al., 2017	gordura, alógeno	local	4 x 10 ⁶ células	murino, 32 casos	38% resolução x 6,3% placebo	30 dias
Panés et al., 2018	gordura, alógeno	local	120 x 10 ⁶ células	humano, 212 casos	56,3% resolução x 38,6% placebo	52 semanas
Dozois et al., 2019	gordura, autólogo	plug sintético absorvível	20 x 10 ⁶ células	humano, 15 casos	20% resolução, 53,3% melhora parcial, 26,7% sem melhora	6 meses
Barnhoorn et al, 2020	medula óssea, alógeno	local	1, 3 ou 9 x 10 ⁷ células	humano, 21 casos	63%, 100% e 43% resolução	24 semanas