



**PRÓ REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

JAKELINE CRISTIANE DA SILVA

**UMA NOVA FONTE DE CÉLULAS-TRONCO:
QUANTIDADE E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS A
PARTIR DO TECIDO ADIPOSEO DA REGIÃO SUBMANDIBULAR E
SUBMENTUAL**

**A NEW SOURCE OF STEM CELLS:
QUANTITY AND VIABILITY OF STEM CELLS OBTAINED FROM ADIPOSE TISSUE
OF THE SUBMANDIBULAR AND SUBMENTUAL REGION**

MARINGÁ - PR

2023



**PRÓ REITORIA ACADÊMICA
DIRETORIA DE PESQUISA, EXTENSÃO E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM ODONTOLOGIA**

JAKELINE CRISTIANE DA SILVA

**UMA NOVA FONTE DE CÉLULAS-TRONCO:
QUANTIDADE E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS A
PARTIR DO TECIDO ADIPOSE DA REGIÃO SUBMANDIBULAR E
SUBMENTUAL**

**A NEW SOURCE OF STEM CELLS:
QUANTITY AND VIABILITY OF STEM CELLS OBTAINED FROM ADIPOSE TISSUE
OF THE SUBMANDIBULAR AND SUBMENTUAL REGION**

Dissertação formato tradicional apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Odontologia do Centro Universitário Ingá UNINGÁ, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Odontologia, linha de pesquisa em Harmonização Orofacial.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Barbosa Câmara de Souza

Coorientador: João César Zielak

FICHA CATALÓGRAFICA

Da Silva, Jakeline Cristiane

Uma nova fonte de células-tronco: Quantidade e viabilidade de células-tronco obtidas a partir do tecido adiposo da região submandibular e submental / Da Silva, Jakeline Cristiane - Maringá, 2023. - 47 p.: il.; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Centro Universitário Ingá Uningá, 2023

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: _____

Data: 06 de fevereiro de 2023

FOLHA DE APROVAÇÃO

JAKELINE CRISTIANE DA SILVA

**UMA NOVA FONTE DE CÉLULAS-TRONCO:
QUANTIDADE E VIABILIDADE DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS A PARTIR
DO TECIDO ADIPOSEO DA REGIÃO SUBMANDIBULAR E SUBMENTUAL**

**A NEW SOURCE OF STEM CELLS:
QUANTITY AND VIABILITY OF STEM CELLS OBTAINED FROM ADIPOSE TISSUE OF
THE SUBMANDIBULAR AND SUBMENTUAL REGION**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Barbosa Câmara de Souza

Centro Universitário Ingá - UNINGÁ

Prof. Dr. João César Zielak

Universidade Positivo

Profa. Dra. Célia Marisa Rizzatti Barbosa

Centro Universitário Ingá - UNINGÁ

MARINGÁ - PR

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à Deus, que me deu força, sabedoria, oportunidade e condições de realizar todo o projeto. Me manteve firme e em paz com seu infinito amor.

À minha família: meus pais e minha filha que são motivação para seguir, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Centro Universitário Ingá - UNINGÁ, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. Ricardo Benedito de Oliveira.

À Coordenadora dos Cursos de Pós-Graduação do Centro Universitário Ingá – UNINGÁ, Profa. Dra. Karina M. Salvatore Freitas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana Barbosa Câmara de Souza, que foi Imprescindível, brilhante e admirável nesta última etapa, obrigada por ter mostrado o caminho.

Ao meu co-orientador, João Zielak, que foi fundamental nesse trabalho, agradeço a oportunidade de se fazer pesquisa.

A pesquisadora Moira Leão, que fez todo o processo laboratorial e me ensinou cada detalhe com paciência.

Aos professores da Área de Harmonização Orofacial, Profa. Dra. Célia Rizzatti Barbosa, Prof. Dr. Jose Ricardo de Albergaria Barbosa, Prof. Dr. Giancarlo De La Torre Canales, pelas orientações e ensinamentos.

Aos meus amigos, Claudia Judachesci, Eduardo Helm Neto, Cintia Vale, e Ana Furtado, pela amizade, força e perseverança nesta caminhada tão importante nas nossas vidas, obrigado por tudo.

RESUMO

Introdução: O tecido adiposo possui uma fração vascular estromal (FVE) rica em células-tronco mesenquimais capazes de se diferenciar e, pela sua facilidade de acesso (em relação à medula óssea, por exemplo), tem sido estudada como uma fonte importante para regeneração dos tecidos. De acordo com a literatura, o meio mais comum de coleta deste material é pela lipoaspiração corporal e bichectomia. **Objetivo:** O presente estudo *in vitro* teve como objetivo isolar células-tronco mesenquimais de tecido adiposo proveniente da lipoaspiração de gordura submentoniana e submandibular e verificar sua viabilidade para aplicação clínica. **Materiais e Métodos:** Três pacientes do sexo feminino, idade média 56,5 anos com lipodistrofia moderada da região submental foram selecionadas para participarem da pesquisa. Previamente ao procedimento foi realizado a coleta sanguínea venosa para a obtenção do PPP. A gordura extraída na lipoaspiração da região submental e submandibular foi enviada para o Centro de Processamento Celular Curitiba Biotech em seringas com DMEM e submetida ao protocolo para extração da FVE. Foi realizada a lavagem da amostra com PBS, a digestão da gordura com colagenase, centrifugação e utilizada 10ml de tampão de lise de eritrócito para os 4 tubos a 4°C por 10 minutos. Após, foi adicionado DMEN, centrifugado e filtrado através de um filtro de 100µm e incubado durante à noite a 37°C e 5% de CO₂ em meio de controle (DMEN 10% FBS, 1% solução antibiótica/antimicótica). As células aderentes foram mantidas em condições decultura padrão até atingirem confluência (80-90%). A viabilidade celular e a caracterização das células presentes na FVE foram avaliadas por microscopia de luz e imunofenotipagem por citometria de fluxo. **Resultados:** A partir do processamento foi possível obter mais de 99% de células-tronco mesenquimais na amostra. **Conclusão:** O tecido adiposo proveniente da região submental e submandibular apresentou mais de 99% de células-tronco mesenquimais, se caracterizando como uma importante fonte de células-tronco.

Palavras-chave: Células-tronco. Lipoaspiração. Fração vascular estromal.

ABSTRACT

Introduction: Adipose tissue has a stromal vascular fraction (SVP) rich in mesenchymal stem cells capable of differentiating and, due to its ease of access (compared to bone marrow, for example), it has been studied as an important source for regeneration of the fabrics. According to the literature, the most common means of collecting this material is through body liposuction and bichectomy. **Objective:** This *in vitro* study aimed to isolate mesenchymal stem cells from adipose tissue derived from liposuction of submental and submandibular fat and verify its viability for clinical application. **Materials and Methods:** Three female patients, mean age 56.5 years, with moderate lipodystrophy of the submental region were selected to participate in the research. Prior to the procedure, venous blood collection was performed to obtain the PPP. The fat extracted in the liposuction of the submental and submandibular region was sent to the Centro de Processamento Celular Curitiba Biotech in syringes with DMEM and submitted to the protocol for extracting the FVE. The sample was washed with PBS, the fat was digested with collagenase, centrifugation and used 10ml of erythrocyte lysis buffer for the 4 tubes at 4°C for 10 minutes. Afterwards, DMEM was added, centrifuged and filtered through a 100µm filter and incubated overnight at 37°C and 5% CO₂ in control medium (DMEM 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic solution). Adherent cells were maintained under standard culture conditions until they reached confluence (80-90%). Cell viability and characterization of cells present in the FVE were evaluated by light microscopy and immunophenotyping by flow cytometry. **Results:** The described protocol enabled the obtention of more than 99% of mesenchymal stem cells in samples from the submental region. **Conclusion:** The adipose tissue from the submental and submandibular region presented more than 99% of mesenchymal stem cells, characterizing itself as an important source of stem cells.

Keywords: Stem cells. Liposuction. Stromal vascular fraction.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	11
2.2 OBTENÇÃO DA FVE	12
2.3 TESTES LABORATORIAIS.....	16
2.3.1 Contagem e Viabilidade Celular	16
2.3.2 Citometria de Fluxo	17
2.4 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	18
3 RESULTADOS.....	19
4 DISCUSSÃO	20
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	23
6 RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA SOCIEDADE.....	24
REFERÊNCIAS.....	25
APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	28
APÊNDICE 2 – FICHA DE TRIAGEM	33
APÊNDICE 3 – RESULTADOS INDIVIDUAIS DA IMUNOFENOTIPAGEM PARA CONTAGEM DE MARCADORES	37

1 INTRODUÇÃO

Com o exponencial aumento de procedimentos estéticos e anseio por técnicas inovadoras que tragam resultados relevantes e longevos, a terapia com células-tronco (CT), ainda pouco explorada, tem sido sugerida como uma possibilidade para isso. A correção de defeitos de tecidos moles e o rejuvenescimento facial pelo estímulo da migração de fibroblastos e síntese de colágeno (VON HEIMBURG *et al.*, 2004), podem ser questões alcançadas por meio desta tecnologia (PARK *et al.*, 2008).

Existem dois tipos de CT: as CT embrionárias e as que são extraídas de tecidos maduros. As CT embrionárias apresentam a capacidade de formar qualquer tecido do corpo (JEZIERSKA-WOŹNIAK *et al.*, 2010) pela divisão de blastômeros do zigoto. No entanto, seu uso prático é limitado devido problemas potenciais de regulação celular e regulamentos éticos e legais. Já as CT extraídas de tecidos maduros são mais especializadas e dão origem a apenas alguns tipos de tecidos do corpo. Essas células podem ser extraídas do cordão umbilical, medula óssea, polpa dentária e, ainda, do tecido adiposo humano, não enfrentando grandes considerações éticas, o que facilita seu acesso (JEZIERSKA-WOŹNIAK *et al.*, 2010).

O tecido adiposo humano é formado por adipócitos, macrófagos, monócitos, linfócitos T e B, células endoteliais, pré-adipócitos, fibroblastos e células-tronco mesenquimais (CTM). Este conjunto celular é chamado de fração vascular estromal (FVE) (AMIRKHANI *et al.*, 2016; SIGNOR *et al.*, 2016). As células-tronco do tecido adiposo são denominadas multipotentes e possuem diversos efeitos parácrinos, contribuindo para a recuperação e regeneração dos tecidos que estão isolados e de diversos tipos celulares e tecidos do organismo. Tais células produzem e secretam uma ampla variedade de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que atuam de forma parácrina na regeneração do tecido *in vivo* (YARAK; OKAMOTO, 2010). Considerando a diferenciação celular, as células-tronco do tecido adiposo podem se diferenciar em miócitos, células neuronais, condrócitos, cardiomiócitos, adipócitos e osteoblastos, a depender do estímulo e demanda do organismo (OEDAYRAJSINGH-VARMA *et al.*, 2006). Diante disso, pesquisas têm sido desenvolvidas para verificar o potencial dessas células em

diversas áreas da saúde.

A extração de CT a partir do tecido adiposo oferece maiores vantagens por apresentar baixo risco para doadores, elevado número de CT (é possível coletar até 1L de tecido adiposo) e por ser capaz de manter seu potencial proliferativo de oito a dez passagens sem deterioração em sua capacidade de auto renovação, além da ausência de rejeição imunológica (ZUTTON *et al.*, 2013). Estudos prévios utilizaram células-tronco adiposas humanas derivadas do corpo adiposo da bochecha e demonstraram sua diferenciação em células neurais dopaminérgicas, melhorando os sintomas de Parkinson em um modelo animal (TAKAHASHI *et al.*, 2017). Ainda, foi possível produzir células da glândula salivar a partir de co-cultura de células-tronco derivadas do corpo adiposo da bochecha com fibroblastos derivados de glândula salivar humana (KAWAMAKI *et al.*, 2016). Neste último caso, a partir do transplante *in vivo* dessas células para glândulas submandibulares de camundongos, houve formação de novos tecidos, demonstrando o alto potencial dessas células (KAWAMAKI *et al.*, 2016).

Sabendo do elevado potencial de regeneração que as CTM podem causar, também foi proposto seu uso na estética facial. A regeneração das fibras de elastina e colágeno, bem como melhora da densidade capilar e redução da inflamação foram demonstradas a nível histológico e celular (COHEN *et al.*, 2017). Rigotti *et al.* (2016) demonstrou, ainda, que a terapia de rejuvenescimento facial com CTM e FVE tem maior potencial que as realizadas com plasma rico em plaqueta. Ainda, observou-se que a utilização da FVE permite uma volumização local e melhora da textura da pele a longo prazo (COHEN, 2015). A FVE também promove melhora em cicatrizes de acne, envelhecimento perioral, alopecia e rejuvenescimento estético. Assim, a FVE se caracteriza como um produto autólogo com aplicação exitosa em procedimentos de rejuvenescimento facial.

Estudos prévios avaliaram o potencial de proliferação e diferenciação da gordura extraída da região abdominal e do corpo adiposo da bochecha (VON HEIMBURG *et al.*, 2004). Contudo, a literatura carece de estudos avaliando o potencial do tecido adiposo derivado da região submental e submandibular, embora a demanda por este procedimento tenha aumentado bastante nos últimos anos, especialmente após a resolução do Conselho Federal de

Odontologia 198/2019 de 29 de janeiro de 2019 que regulamenta a Harmonização Orofacial como especialidade. Assim, hipotetiza-se que a gordura extraída desse local também tenha uma FVE com CT capazes de promover síntese de colágeno quando aplicada na face. No entanto, até o momento, nenhum estudo caracterizou os componentes desse tecido adiposo.

1.1 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi realizar a obtenção da fração vascular estromal a partir do tecido adiposo proveniente da lipoaspiração submental e submandibular e avaliar a viabilidade de células-tronco dessa região.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Positivo (CAAE: 26611919.0.0000.0093). Pacientes com lipodistrofia moderada da região submental e submandibular foram triados na Clínica de Odontologia da Universidade Positivo para a remoção cirúrgica da gordura destas regiões-alvo. Para esse estudo, a amostra deveria ser composta por três pacientes. Como critério de inclusão, as pacientes deveriam ser do sexo feminino, com idade entre 50 e 60 anos, estar na menopausa, ser leucoderma e apresentar lipodistrofia moderada da região submandibular e submental. Ainda, as pacientes não poderiam ter se submetido ao procedimento de lipoaspiração química ou mecânica dessa região.

Previamente ao procedimento, os seguintes exames laboratoriais foram solicitados: Hemograma completo, creatinina, glicemia em jejum, D dímero, e coagulograma. Ainda, solicitou-se exames sanguíneos obrigatórios para armazenamento autólogo de células, como: Trypanosoma cruzi (Chagas) - IgG, Trypanosoma cruzi (Chagas) - IgM, citomegalovírus - IgG, Citomegalovírus - IgM, HIV total (HIV I e HIV II), HIV - Antígeno P24, HTLV I ou HTLV II, hemograma com contagem de plaquetas ou frações, hepatite B - HBSAG40306968, hepatite B - HBCAC-IgM (anti- HBC total), hepatite B -

HBSAC (anti-HBS), hepatite C - Anti-HCV, grupo sanguíneo ABO e fator RH0, treponema pallidum (sífilis) - FTA-ABS-IgG, treponema pallidum (sífilis) – FTA-ABS-IgM, toxoplasma gondii (toxoplasmose) – IgG 40307832, Toxoplasma gondii (toxoplasmose) – IgM, pesquisa de RT-PCR para SARS-CoV2 (COVID-19), e pesquisa de Anticorpos IgG e IgM. Os pacientes que não atendessem qualquer um dos critérios nos exames seriam excluídos.

2.2 OBTENÇÃO DA FVE

O tecido adiposo foi obtido por lipoaspiração da região submandibular e submental, por meio de seringa estéril de 20 ml (BD, Franklin Lakes, EUA) e cânulas aspirativas de 15 cm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro (Marca FAGA), bico de pato com 2 furos em série de 3,5mm (FAGA), com injeção de soro fisiológico estéril associado a cloridrato de Articaína 4% com Epinefrina 1:100.00 (5,4 ml artcaína/100 ml soro) (Figura 1). O material coletado foi enviado ao Centro de Processamento Celular da Curityba Biotech, devidamente acondicionado em tubos Falcon de 50 ml contendo meio para cultivo (DMEM low glucose; Gibco, Waltham, EUA), antifúngico 250 µg/mL (anfotericina B), antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 mg/mL (Gibco, Waltham, EUA) em temperatura ambiente (Figura 2). A manipulação do material biológico em sistema aberto ocorreu em cabine de segurança biológica (Telstar Bio II Advance, FACScalibur, BD, Franklin Lakes, EUA) instalada em sala limpa ISO 7 (Figura 3). Aproximadamente 14g de gordura foram obtidas, sendo metade usada para cultivo celular e a outra porção para aplicação clínica. A gordura coletada foi deixada por 5min em uma estante para decantar, e, com uma seringa e agulha 22G, o precipitado (solução tumescente com sangue) foi aspirado e descartado. Após, um novo período de 5min em banho maria foi realizado para continuar o processo de decantação.



Figura 1. Lipoaspiração com seringa para coleta da gordura.

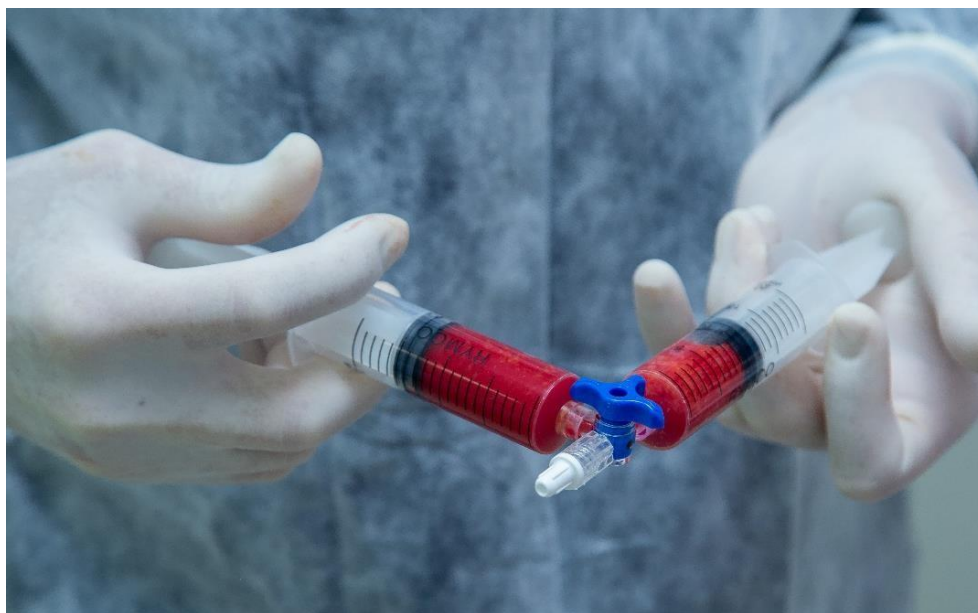


Figura 2. Gordura coletada sendo misturada no meio de cultura (DMEM).

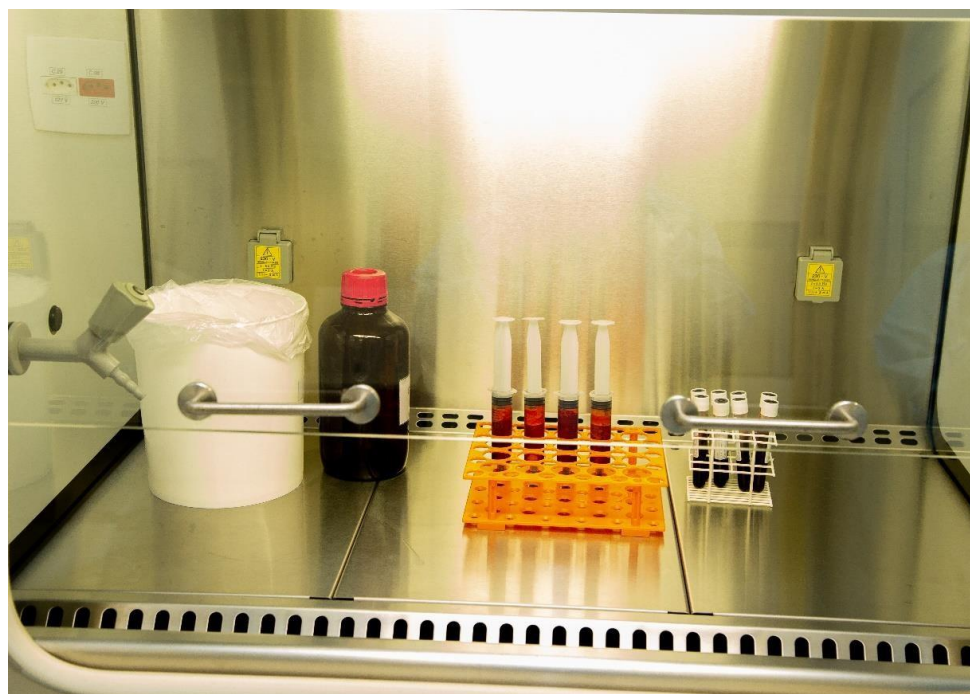


Figura 3. Cabine de segurança biológica (Telstar Bio II Advance) instalada em sala limpa ISO 7.

Dentro do Fluxo a amostra foi lavada por 5 vezes com PBS, ficando em banho maria à temperatura de 38°C, e suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina para a remoção de potenciais contaminantes como sangue e detritos. Com uma pipeta de Pasteur, coletou-se a gordura sobrenadante e o PBS foi descartado (Figura 4).



Figura 4. Lavagem da amostra com PBS.

Para cada eppendorf foi adicionado 0,014g de colagenase tipo I (cálculo de 0,2% do volume total de gordura), dissolvida em PBS e filtrada com filtro de seringa 0,22 μ m, cobrindo toda a gordura. Em sequência, os tubos com a solução gordura/colagenase foram incubados em banho maria por 1h a 37°C, com agitação.

Após a digestão, o tecido estava completamente liquefeito sem tecido sólido visível. Neste momento, adicionou-se um volume igual de meio de cultura (DMEM) à mistura para neutralização da colagenase. A suspensão de células foi filtrada usando malha de nylon de 100 μ m para remover tecidos não digeridos, utilizando em um tubo de 50 ml, que depois foi repassado para quatro tubos de 15 ml, contendo 6 ml de gordura e 6ml de DMEM cada. Em seguida, o material foi levado para centrifuga por 10min com 1200 rpm. Após a centrifugação, a solução foi separada em duas camadas com o pellet celular no fundo e os adipócitos no sobrenadante, sendo este último

descartado (Figura 5).

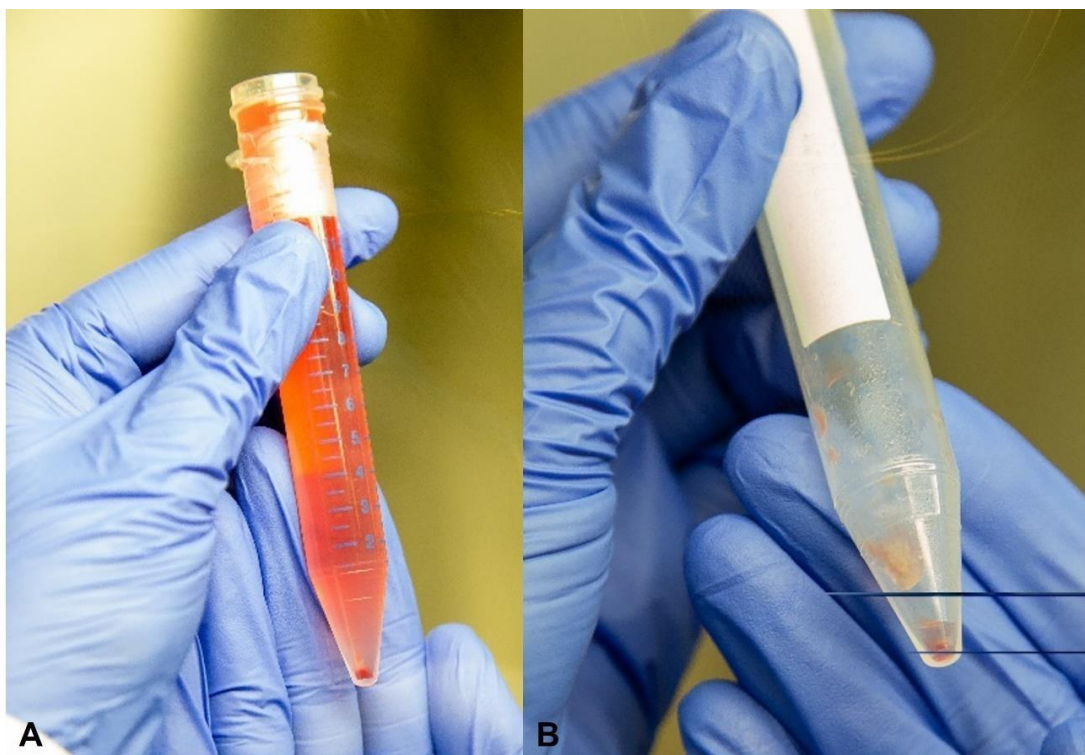


Figura 5. Obtenção da Fração Vascular Estromal. A, Tubo após centrifugação, demonstrando a fração vascular estromal no fundo do tubo e os adipócitos no sobrenadante. B, Pellet celular.

Para ressuspensão do pellet, foi utilizada 10ml de tampão de lise de eritrócito (168mM, 10mM KHCO₃, 0,1nM EDTA-4Na) para os 4 tubos a 4°C por 10 minutos. Após, foi adicionado 5ml de DMEN e centrifugado à 200G por 5 min. Assim, o pellet foi ressuspensão em meio e filtrado através de um filtro de 100µm e incubado durante à noite a 37°C e 5% de CO₂ em meio de controle (DMEN 10% FBS, 1% solução antibiótica/antimicótica). As células aderentes foram mantidas em condições de cultura padrão até atingirem confluência (80-90%)

2.3 TESTES LABORATORIAIS

2.3.1 Contagem e Viabilidade Celular

As amostras cultivadas em placas de 24 poços (TSP24, TSP48, CSP24

e CSP48), antecedendo o ensaio de viabilidade celular, houve uma avaliação em microscopia de luz para confirmar a confluência celular. Seguindo para a avaliação da viabilidade celular, o meio foi retirado das placas (PPP e DMEM-controle) e 1 ml de tripsina (Trypsin, EDTA 0,025%, Gibco) adicionada, e o conjunto incubado por 5 minutos a 37°C. Após incubação, a tripsina foi inativada com mesmo volume de meio DMEM acrescido de 10% de SFB. Posteriormente, as células foram transferidas para tubos de centrifugação de 15 ml (um tubo para cada grupo) e centrifugadas a 200xg por 5 min. O pellet foi ressuspensão em 4mL de DMEM + 10% SFB, mantido em garrafa de cultivo celular para isolamento de CTM e cumprimento de protocolo de validação para células-tronco (Figura 7) (DOMINICI *et al.*, 2006).

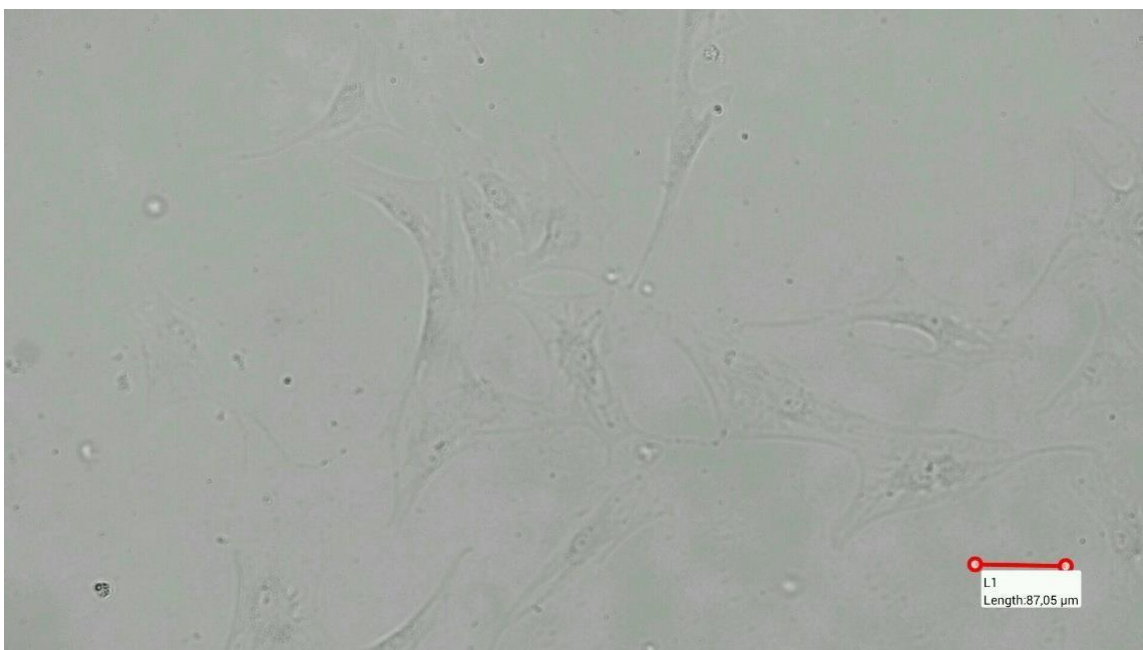


Figura 7. Imagem em microscopia de luz invertida do cultivo celular em condições ideais. Células em cultivo celular DMEM, condições ideais de cultivo) (barra = 87,05µm).

2.3.2 Citometria de Fluxo

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

Os dados gerados no citômetro de fluxo são provenientes do Módulo de Software de Viabilidade e Conteúdo Muse® intuitivo, que fornece uma análise

detalhada sobre a contagem de células viáveis, ou seja, células vivas com capacidade proliferativa, e uma contagem celular total, além de fornecer a porcentagem de viabilidade da amostra.

As células mantidas em cultivo (incubadora a 37 °C, 5% de CO₂; Panasonic Corporation, Osaka, Japão), foram acompanhadas diariamente, por meio de microscopia de luz invertida (Motic AE31E Series, Vancouver, Canadá). O acompanhamento ocorreu por sete dias para confirmação da aderência celular, bem como para avaliar sua morfologia e confluência. Posteriormente, as células foram tripsinizadas e avaliadas por citometria de fluxo

2.4 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

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

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

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

extracelular cartilaginosa.

3 RESULTADO

A FVE foi extraída de três voluntárias do sexo feminino. Contudo, apenas duas pacientes (Paciente 1 e Paciente 2, respectivamente) tiveram o material processado adequadamente. Para a paciente 1, o número de células foi $64/\text{nm}^3$, enquanto a paciente 2 apresentou $43/\text{nm}^3$. É importante enfatizar que, para as duas voluntárias, a análise imunofenotípica confirmou a presença de mais de 99% de células tronco mesenquimais (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual correspondente à celularidade total obtida por meio do teste de Imunofenotipagem.

Marcador	Percentual	
	Paciente 1	Paciente 2
CD105++	99,9%	99,9%
CD73++	99,9%	98,3%
CD90+++	100%	99,0%
CD81++	100%	100%
CD31+	0,1%	0,1%
CD45, CD3, CD19, CD34, CD14 e HLA-DR	Negativos	Negativos

Dentre os marcadores avaliados, estão:

CD105, conhecido como endoglina e originalmente reconhecido pelo MAb SH2; CD73, conhecido como ecto 5 nucleotidase e originalmente reconhecido pelo MAb SH3 e SH4;

CD90, também conhecido como Thy- 1);

CD81, testraspaninas (resposta imunossupressora);

CD31, marcadores hematopoiéticos;

CD45, marcador de pan-leucócitos; CD 3, marcador de Linfócito T;

CD19, são marcadores de células B que também podem aderir a CTM em cultura e permanecer vitais por meio de interações estromais;

CD34, marca progenitores hematopoiéticos primitivos e células endoteliais;

CD14, proeminentemente expressos em monócitos e macrófagos, as células hematopoiéticas mais prováveis de serem encontradas em uma cultura de MSC;

E as moléculas HLA-DR que não são expressas em CTM.

Ainda, uma terceira paciente foi submetida à cirurgia para avaliação da viabilidade celular. Contudo, uma divergência na rotação da centrifugação (maior tempo de rotação), levou à morte celular, não sendo possível isolar as células tronco da amostra. Assim, é importante enfatizar a necessidade de seguir o protocolo descrito anteriormente para obtenção eficaz da FVE.

4 DISCUSSÃO

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, é definido o nível de pureza de CTM com 95% de expressão de CD105, CD73 e CD90 (DOMINICI *et al.*, 2006). No presente trabalho a média de CD105 e CD90 foi 99,9%, ou seja, a região submandibular e submental teve presença maciça de CTM. Estudo prévio reportou a presença de 80% de CTM após obtenção de tecido adiposo pela lipoaspiração corporal (OEDAYRAJSINGH-VARMA *et al.*, 2006) e 92% na região do tronco (ALMEIDA *et al.*, 2008). Já para o corpo adiposo da bochecha, os valores foram mais altos, atingindo 96,3% para o marcador CD90 e 97,2% para o CD105 de CTM (LISBOA *et al.*, 2021). Estudo prévio comparou a expressão de marcadores de superfície de CTM derivadas da medula óssea (BMMSCs) e de tecido adiposo corporal (CHUN-YU LI *et al.*, 2015). Os autores observaram 87% de marcadores CD105 e 99,48% de CD90 para BMMSCs, enquanto no tecido adiposo as porcentagens foram superiores para CD105 (90%) e semelhantes para CD90 (99,03%).

O presente trabalho avaliou a presença de CTM em mulheres com idade média de 56 anos e na menopausa, onde é conhecido que o envelhecimento diminui a quantidade de células-tronco (KEEFE *et al.*, 2015; SAJKO *et al.*,

2004). Porém, o resultado obtido foi de um percentual de quase 100% CTM. Um estudo prévio avaliando a presença de células-tronco obtidas pela lipoaspiração convencional da região abdominal de cinco voluntárias do sexo feminino com idades entre 25 e 29 anos (WANG *et al.*, 2017), demonstrou 18,6% de CD105+ em células de primeira passagem e 90,7% de CD105+ naquelas que sofreram diferenciação em células osteogênicas. Mesmo a amostra sendo pacientes jovens, o percentual obtido foi abaixo de 95%, divergindo das pacientes analisadas no atual trabalho. Esse resultado é justificado pelo potencial do tecido adiposo obtido da região estudada.

Quantificar e observar a viabilidade de células-tronco obtidas a partir da lipoaspiração do tecido adiposo submandibular e submental é um grande marco no estudo dessas células. Até o momento, a lipoaspiração corporal é um dos procedimentos mais estudados para isolamento da FVE (YOSHIMURA *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2014; OEDAYRAJSINGH-VARMA *et al.*, 2006). Porém, por ocorrer a nível hospitalar, com necessidade de sedação e convalescença, trás riscos ao paciente. Em contrapartida, a lipoaspiração da região submental e submandibular é realizada em ambulatório, sem necessidade de sedativos e com rápida recuperação. Desta forma, se torna uma região de fácil coleta de CTM, podendo ser realizada por um maior de profissionais, como médicos e cirurgiões-dentistas. Ainda, é importante ressaltar que durante o procedimento cirúrgico para obtenção do tecido adiposo foi utilizada a solução de articaína com soro fisiológico, uma vez que o uso de lidocaína para realizar o procedimento cirúrgico tem um impacto negativo na sobrevivência das CTM (WANG *et al.*, 2014). Logo, o adequado manejo cirúrgico também propiciou maior viabilidade das células no presente estudo.

Apesar do presente estudo avaliar apenas a viabilidade das CTM extraídas da FVE da gordura da região submandibular e submental por meio da “lipoaspiração de papada” e contar apenas com dois participantes, ele tem o poder de demonstrar que esse tecido precisa ser amplamente estudado, pois pode ser utilizado tanto para aprimorar os procedimentos de harmonização orofacial, como possível regeneração de outras regiões do corpo. Assim, novos estudos são encorajados para avaliar o potencial de

diferenciação das CTM dessa região e sua aplicabilidade clínica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tecido adiposo proveniente da região submental e submandibular apresenta fração vascular estromal rica em células-tronco mesenquimais, com presença de mais de 99% dessas células. Sugere-se, então, que o tecido adiposo dessa região seja a fonte mais rica em CTM.

6 RELEVÂNCIA E IMPACTO DO TRABALHO PARA SOCIEDADE

A descoberta da gordura submental e submandibular como uma nova fonte rica em células tronco, abre um leque de oportunidades para tratamentos tanto da área estética, como o rejuvenescimento facial, estudos já demonstraram que as ADSCs produzem muitos fatores de crescimento úteis, aumentam a produção de colágeno em estudos com animais e reverterem o envelhecimento da pele em testes com humanos. (Park *et al.*, 2008) , alopecia, preenchimento labial (MIQUELETTI *et al.*, 2019) mas também em diversas áreas da saúde devido a seu papel na cicatrização, tratamentos de doenças degenerativas, correção de defeitos ósseos, entre outros. Este procedimento apresenta uma grande vantagem sobre as demais formas de obtenção, uma vez que a extração da gordura por meio de lipoaspiração é um procedimento com baixo custo, indolor e fácil execução, sem necessidade de ambiente hospitalar. Desta forma, profissionais médicos e cirurgiões-dentistas podem ter como opção tratamentos com a FVE, retirada de uma lipoaspiração de “papada”.

REFERÊNCIAS

- 1- Almeida A, Campa A, Vale A, Lima B F, Daud E D., Stocchero, I N., Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar. *Cirugía plástica ibero-latinoamericana*, 34, 1, p. 71–75, 2008.
- 2- Amirkhani, m. A., Shoaehassani, a., Soleiman, m., Hejazi, s., Ghalichi, I., & Nilforoushzadeh, m. A. (2016). Rejuvenation of facial skin and improvement in the dermal architecture by transplantation of autologous stromal vascular fraction: a clinical study. *Bioimpacts*, 6(3), 149-154.
- 3- Chun-yu Li, Xiao-yun Wu, Jia-bei Tong, Xin-xin Yang, Jing-li Zhao, Quan-fu Zheng, Guo-bin Zhao and Zhi-jie Ma. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy Li et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:55
- 4- Cohen, S. R. (2015). Commentary on: expanded stem cells, stromal-vascular fraction, and platelet-rich plasma enriched fat: comparing results of different facial rejuvenation approaches in a clinical trial. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(3), 271-274.
- 5- Cohen, S. R., Hewett, S., Ross, L., Delaunay, F., Goodacre, A., Ramos, C., Leong, T., & Saad, A. (2017). Regenerative cells for facial surgery: biofilling and biocontouring. *Aesthetic Surgery Journal*, 37(suppl_3), S16-S32
- 6- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, F, Krause, D., Deans, R., Keating, A, Prockop, DJ., & Horwitz, e. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *The international society for cellular therapy position statement*, 8(4), 315-317
- 7- Jezierska-Woźniak K, Nosarzewska D, Tutas A, Mikołajczyk A, Okliński M, Jurkowski MK. Wykorzystanie tkanki tłuszczowej jako źródła mezenchymalnych komórek macierzystych [Use of adipose tissue as a source of mesenchymal stem cells]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2010 Jul 27;64:326-32. Polish. PMID: 20679688.
- 8- Kawakami, M., Ishikawa, H., Tanaka, A., & Mataga, I. (2016). Induction and differentiation of adipose-derived stem cells from human buccal fat pads into salivary gland cells. *Human cell*, 29(3), 101–110.

- 9- Keefe, A.C., Lawson, J.A., Flygare, S.D., Fox, Z.D., Colasanto, M.P., Mathew, S.J., Yandell, M., and Kardon, G. (2015). Muscle stem cells contribute to myofibres in sedentary adult mice. *Nat. Commun.* 6, 7087.
- 10- Lisboa DG, Fonseca SC da, Stroparo JL de O, Mendes RA, Vieira ED, Cavalari VC, Leão Neto R da R, Gabardo MCL, Deliberador TM, Franco CRC, Leão MP, Zielak JC. Characterization and viability of the stromal vascular fraction from the Bichat fat ball associated with platelets-poor plasma - an option for aesthetic treatments. *RSD.* 2021;10(8):e37010817341.
- 11- Miqueletti M, Teixeira SAF, Silva RR, Dias IP. Fração vascular estromal da gordura de bichat e sua aplicabilidade na harmonização orofacial . *Face* 2019;1(1):38-45
- 12- Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy.* 2006;8(2):166-77. doi: 10.1080/14653240600621125. PMID: 16698690.
- 13- Park BS, Jang KA, Sung JH, Park JS, Kwon YH, Kim KJ, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging. *Dermatol Surg.* 2008 Oct;34(10):1323-6. doi: 10.1111/j.1524-4725.2008.34283.x. Epub 2008 Jun 27. PMID: 18616537.
- 14- Rigotti, G., Charles-de-Sá, L., Gontijo-de-Amorim, N. F., Takiya, C. M., Amable, P. R., Borojevic, R., Benati, D., Bernardi, P., & Sbarbati, A. (2016). Expanded Stem Cells, Stromal-Vascular Fraction, and Platelet-Rich Plasma Enriched Fat: Comparing Results of Different Facial Rejuvenation Approaches in a Clinical Trial. *Aesthetic surgery journal*, 36(3), 261–270.
- 15- Signor C , Steiner D D, Roth M L B J, Gasques L S, Benetton K, Santos N H. Fração vascular estromal, uma nova terapêutica no fotoenvelhecimento: estudo comparativo e controlado surg cosmet dermatol 2016;8(2):104-8.
- 16- Sajko, S., Kubínová, L., Cvetko, E., Kreft, M., Wernig, A., and Eržen, I. (2004). Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 179–185
- 17- Takahashi, H., Ishikawa, H., & Tanaka, A. (2017). Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. *Human cell*, 30(2), 60–71.

- 18- Von Heimburg D, Hemmrich K, Haydarlioglu S, Staiger H, Pallua N. Comparison of viable cell yield from excised versus aspirated adipose tissue. *Cells Tissues Organs*. 2004;178(2):87-92. doi: 10.1159/000081719. PMID: 15604532.
- 19- Wang WZ, Fang XH, Williams SJ, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Lidocaine-induced ASC apoptosis (tumescence vs. local anesthesia). *Aesthetic Plast Surg*. 2014 Oct;38(5):1017-23. doi: 10.1007/s00266-014-0387-2. Epub 2014 Aug 7. PMID: 25099499.
- 20- Wang JM, Gu Y, Pan CJ, Yin LR. Isolation, culture and identification of human adipose-derived stem cells. *Exp Ther Med*. 2017 Mar;13(3):1039-1043. doi: 10.3892/etm.2017.4069. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28450938; PMCID: PMC5403475.
- 21- Yarak S., Okamoto O. K. -células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An bras dermatol*. 2010;85(5):647-56.
- 22- Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, Sato K, Inoue K, Nagase T, Koshima I, Gonda K. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*. 2006 Jul;208(1):64-76. doi: 10.1002/jcp.20636. PMID: 16557516.
- 23- Zuttion M S S R., Wenceslau C V , Lemos P. A, Kerkis C T. Células-tronco de tecido adiposo e a importância da padronização de um modelo animal para experimentação pré-clínica *rev. Bras. Cardiol. Invasiva* 21 (3) ,2013 .

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para coleta, processamento e armazenamento de material biológico.

Eu, _____,
portador do RG nº. _____, CPF nº _____,
declaro ter conhecimento de que a coleta de material biológico que será
realizada no paciente _____,
(idade) _____ anos, removido na(s) região(ões) _____
_____, pelo profissional habilitado e
credenciado pelo Centro de Processamento Celular (CPC) da Curityba
Biotech, CR ____ - ____, nº

destina-se ao processamento e armazenamento de material biológico visando um possível uso futuro em terapia ou em pesquisa. Entendo que o volume e a qualidade do material coletado e, conseqüentemente obtido após o processamento, irão variar conforme as condições de saúde do paciente e limitações técnicas no momento de cada coleta. Entendo que não haverá a coleta de material em quantidade maior do que o descarte biológico oriundo da cirurgia prevista e com indicação clínica e que não haverá a realização de um procedimento cirúrgico com o objetivo exclusivo de obtenção de material para armazenamento. Estou ciente que a responsabilidade pela coleta e encaminhamento do material biológico é do profissional que realiza o procedimento cirúrgico, e que este material deve ser encaminhado imediatamente após a remoção cirúrgica do material biológico, preenchimento dos dados de saúde na ficha de triagem clínica do paciente e do contrato de prestação de serviços com o CPC devidamente preenchido e assinado. Tenho consciência de que pelo fato de haver expectativa de potencial utilização clínica futura do material biológico para uso autólogo terapêutico ou em pesquisa há a necessidade de realização de exames de sangue (sorológicos) e que só após a análise dos resultados será feito o armazenamento. Compreendo que caso algum dos exames mostrem resultado positivo para alguma doença infectocontagiosa **o cliente será informado e o material somente será armazenado mediante compra de recipiente específico para armazenamento em separado, caso**

contrário, o material será descartado, tanto para uso autólogo (para a própria pessoa), quanto para uso alógeno (para uso em outra pessoa) e também para uso em pesquisas em animais ou in vitro (em laboratório).

Tenho ciência de que atualmente, no Brasil, não há nenhuma terapia celular reconhecida pelo Conselho Federal de Odontologia (CFO) ou pelo Conselho Federal de Medicina (CFM) para aplicação clínica do material que está sendo coletado, portanto, estou ciente de que o material biológico obtido encaminhado para o processamento e armazenamento podem não ter uma utilização clínica reconhecida.

Li e entendi que embora as pesquisas indiquem que células-tronco do tipo mesenquimais possam ser usadas para regenerar órgãos e tecidos lesionados por traumas ou doenças e também para minimizar os danos ocasionados por enfermidades como o infarto agudo de miocárdio, acidente vascular cerebral e isquemia de membros inferiores, a utilização futura do material coletado, processado e armazenado está condicionado à inclusão em um protocolo de pesquisa previamente autorizado por Comitê de Ética em Pesquisa e/ou Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (sistema CEP/CONEP), pelo reconhecimento terapêutico pelo CFM e/ou CFO, com registro na Anvisa ou por ordem judicial.

DESCONFORTOS E RISCOS:

Tenho conhecimento de que os procedimentos de remoção do material biológico são realizados sob anestesia e podem apresentar desconforto ou dor de pequena intensidade, além de risco de complicações diretamente proporcional à extensão e tipo da cirurgia. Nas remoções dos dentes decíduos em período de esfoliação (queda) natural, por exemplo, por ser um procedimento de rotina e por ser realizado por profissional especializado, tem risco de desconforto extremamente baixo, ao passo que a remoção dos terceiros molares (dentes do siso) ou uma bichectomia (remoção da porção gordurosa das bochechas) podem gerar edema (inchaço), aparecimento de hematomas (manchas roxas e/ou amareladas) além de dor pós-operatória. Os efeitos adversos costumam ser transitórios e de baixo índice de complicações, se as orientações profissionais forem

respeitadas. Estou ciente que devo comunicar ao profissional da saúde que está me atendendo caso ocorram qualquer uma destas ou outras complicações.

BENEFÍCIOS:

Estou ciente de que será feito um exame clínico e uma limpeza na região previamente à remoção do material biológico. Também estou ciente de que a equipe da Curityba Biotech comunicará o paciente (ou o seu representante legal em caso de paciente menor de idade ou incapaz) quando houver qualquer alteração nos exames de saúde do paciente. A Curityba Biotech manterá como BENEFÍCIO aos seus clientes o acesso aos dados de pesquisa e avanços científicos na área das Terapias Celulares Avançadas (Terapias Celulares, Engenharia Tecidual e Terapias Gênicas) mediante publicações e/ou acesso ao site da empresa. O paciente e/ou seu representante legal tem o direito de desistir de manter o material biológico armazenado a qualquer tempo e sem precisar haver qualquer justificativa, sem, contudo, haver qualquer prejuízo monetário futuro para o paciente ou representante legal.

Estou ciente de que:

Quando da presença de Tecidos Dentários Duros (esmalte e dentina) onde não há a presença de células-tronco, manifesto que estes tecidos duros devem ser:

descartados, após a coleta dos tecidos moles com potencial de obtenção de células-tronco, ou

doados para um Banco de Dentes para serem utilizados em pesquisa e/ou para fins didáticos.

Estou ciente que no momento da coleta devo indicar a destinação do material biológico quando da não continuidade do contrato, inclusive em caso de morte do beneficiário e/ou da desistência de manutenção do pagamento pelo armazenamento do material biológico, inclusive células, seus produtos e DNA do doador, portanto, manifesto que o material deve ser:

() descartado, ou

() doado para ser utilizado em pesquisa

Em caso de doação para pesquisa também devo informar se:

() quero ser informado caso o material biológico doado seja utilizado em alguma pesquisa;

() não quero ser informado caso o material biológico doado seja utilizado em alguma pesquisa.

Estou ciente que o material biológico doado pode não ser de interesse de pesquisa do CPC e/ou do Banco de Dentes e, portanto, poderá ser descartado, não estando disponível no caso de uma eventual necessidade futura.

Concordo que o meu histórico de saúde e os dados obtidos em relação aos procedimentos realizados poderão ser usados com a finalidade de melhorar o controle de qualidade do CPC da Curityba Biotech nos procedimentos de coleta, processamento e armazenamento de material biológico, assim como, para alimentar pesquisas que possam contribuir para o avanço científico no uso de células em terapias, além do uso didático. A empresa Curityba Biotech compromete-se a manter sigilo de todas as informações pessoais dos pacientes e profissionais por ela atendidos, portanto, **o sigilo pessoal das minhas respostas e dados pessoais estão assegurados.**

Declaro que li e entendi os esclarecimentos e orientações acima, compreendi os objetivos e minhas dúvidas foram esclarecidas, e por isso dou meu consentimento.

() sim, concordo com o descrito acima.

() não, não concordo e, portanto, não autorizo a realização da coleta, processamento e armazenamento do material biológico.

Curitiba, _____, _____, _____.

(Paciente e/ou Responsável)


As informações foram repassadas e as dúvidas esclarecidas por

no dia de _____ / _____ / _____

Em caso de dúvida deve-se entrar em contato com o responsável técnico: João César Zielak | (41) 992349202

jzielak@curitybabiotech.com.br | suporte@curitybabiotech.com.br

APÊNDICE 2 – FICHA DE TRIAGEM

	CURITIBA BIOTECNOLOGIA LTDA				
	FORMULÁRIO TÉCNICO (FMT)				
	Código CPC.FMT.15	Localizador SA-A-CPC1	Versão 03	Folha 34/5	Data de Efetividade 01/06/2021
Título: FICHA DE TRIAGEM CLÍNICA PARA COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO					

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elaborador:

NOME	CARGO	ÁREA	ASSINATURA/DATA
Moira Pedroso Leão	Diretora	Administrativa	

Revisor técnico:

NOME	CARGO	ÁREA	ASSINATURA/DATA
João César Zielak	Diretor	Administrativa	

Revisor da qualidade:

NOME	CARGO	ÁREA	ASSINATURA/DATA
Christiane Calixto	Farmacêutica Bioquímica	Técnica	

Aprovador:

NOME	CARGO	ÁREA	ASSINATURA/DATA
Moira Pedroso Leão	Diretora	Administrativa	

Nome do Paciente:	
Data do exame clínico: / / - - - -	
Data de Nascimento: / / - - - -	CPF:
Endereço:	
CEP:	Cidade:
Sexo () Feminino () Masculino	

HISTÓRICO DE SAÚDE	
Está fazendo algum tratamento médico? () sim () não	Qual?
Faz uso de algum medicamento? () Sim () Não	Qual(is) medicamento(s)?
Possui algum tipo de alergia? () sim () não	Qual?
Faz algum tratamento complementar (fitoterápico, homeopático...)?	() Não () Sim Qual?
Já realizou alguma intervenção cirúrgica?	() Não () Sim Qual?
Já recebeu transfusão de hemocomponentes ou fez uso de algum hemoderivado?	() Não () Sim Qual?
Já realizou algum transplante de células, tecidos ou órgãos ou xenotransplante (osso bovino, por exemplo)?	() Não () Sim Qual?
Possui alguma doença hereditária, hematológica ou imunológica?	() Não () Sim Qual?
Já teve algum tipo de doença maligna? () Não () Sim	Qual?
Fez viagem recente e/ou teve exposição a agentes infecciosos?	() Não () Sim Onde, qual e há quanto tempo?
Teve contato com alguém confirmado ou suspeito de covid-19?	() Não () Sim
Está ou teve algum destes sintomas: Febre, tosse, febre, coriza, dor de garganta, dificuldade para respirar, perda de olfato, alteração do paladar, cansaço, diminuição do apetite e falta de ar, distúrbios gastrointestinais - náusea/vômito/diarreia) ou tem/teve histórico de internação por falência respiratória aguda ou pneumonia?	() Não () Sim Qual(is) Há quanto tempo?
Tomou alguma vacina recentemente?	() Não () Sim Qual(is) Há quanto tempo?
Já teve alguma destas doenças e/ou sintomas deles?	() Anemia () Chikungunya () Covid-19 () Dengue () Diabetes () Doença no Fígado () Doença nos Rins () Febre Reumática () Febre sem diagnóstico () Hemorragias () Hepatite qual? () A () B () C () Hemofilia () Leucemia () Tuberculose () Zika

EXAME FÍSICO	
Apresenta lesões de pele ou mucosas? () Não () Sim	Qual?
Apresenta cicatrizes ou incisões cirúrgicas aparentes? () Não () Sim	Onde?
Apresenta icterícia? () Não () Sim	
Apresenta hepatomegalia? () Não () Sim	
Apresenta linfadenopatia difusa? () Não () Sim	Onde?

DADOS LABORATORIAIS	
Data: ____/____/____	
Tipagem Sanguínea: _____(O,A,B,AB) () Rh negativo () Rh positivo	
(PAI) – Pesquisa de Anticorpos séricos Irregulares	
Hemograma:	
Resultados sorológicos data: /_ /_	
- Citomegalovírus	- Covid-19 (IgG/IgM)
- HIV	- Doença de Chagas
- HTLV	- Hepatite B
- Hepatite C	- Sífilis
- Toxoplasmose	
- Malária (para moradores de áreas endêmicas ou que realizaram viagem para área endêmica em período inferior a 12 meses)	
- SARS-CoV2 (PCR) - Para casos suspeitos (ou doador alogênico)	
Anexar uma cópia dos resultados dos exames, impressa ou digital por meio do site/área restrita. *em caso de resultado positivo para o exame sorológico, repetir o exame positivado, conforme o Manual do Credenciado.	

DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO DE COLETA					
Responsável pela coleta					
Material Coletado (ex: polpa...)					
Sítio de Coleta (dente, região...)					
Data: ____/____/____	Hora de começo e fim da coleta: ____:____/____:____				
Tempo e temperatura da geladeira em que o material biológico foi armazenado previamente ao acondicionamento à caixa para transporte: ____h:____min Max:____°C Min:____°C					
Transportadora:					

DESCRIÇÃO DO TRANSOPERATÓRIO	
Realizou profilaxia? () Não; () Sim. Qual produto usou: pedra pomes () ; pasta profilática () ; Outros () Qual: (%)	
Realizou bochechos? () Não; () Sim. Qual produto usou: Clorexidina () (%); Perborato de Sódio (BlueM) () ; Peróxido de hidrogênio () (%); Cetilperidínio () ; Outros () Qual: (%)	
Usou anestésico tópico? () Não; () Sim. Qual: Benzocaína () (%); Tetracaína () (%); Xilocaína () (%); Outros () Qual: (%)	
Usou anestésico Injetável? () Não; () Sim. Qual: () mepivacaína () (%); prilocaína () (%); articaína () (%); citocaína () (%); Lidocaína () (%); Outros () Qual: (%)	
Anestésico com vaso constritor: () Não; () Sim. Qual: Adrenalina () (%); Noradrenalina () (%); Cloridrato de fenilefrina () (%)	

Realizou fenda para clivagem? () Não; () Sim Onde: () Vestibulo-lingual; () Mesio-distal; () Amelo-cementária.
Realizou odontosecção para remoção do elemento dentário? () Não; () Sim Qual elemento? () (11-48)(51-85)
Realizou remoção prévia de restaurações? () Não; () Sim Qual elemento? () (11-48) (51-85)
Realizou remoção prévia de cáries? () Não; () Sim Qual elemento? () (11-48) (51-85)
Mais alguma informação relevante em relação ao procedimento de coleta?

ASSINATURA CREDENCIADO

DATA

APÊNDICE 3 – RESULTADOS INDIVIDUAIS DA IMUNOFENOTIPAGEM PARA CONTAGEM DE MARCADORES



Hospital Nossa Senhora das Graças LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rua Alcides Munhoz, 433 - Merola - Curitiba - PR
Fone: (41) 3240-8588 / Fax: (41) 3240-8788
CNPJ: 78862198000189 / INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 0000182303



Paciente	[REDACTED]	Data Nasc.	14/10/1965	Prontuário	137429
Nome da Mãe	[REDACTED]	Idade	56 Anos	Alercimento	4538618 - Ext
Médico	Curitiba Biotecnologia (CRM 99999)	Convênio	Curitiba	Prescrição	10415063

Data de coleta: 11/08/2022 13:51

IMUNOFENOTIPAGEM PARA CLASSIFICAÇÃO DE LEUCEMIAS

NÚMERO INTERNO: 222889
Material: Cultivo celular
Método.: Citometria de Fluxo
Data de coleta na origem: 11/08/2022

Número de células: 64/mm³
PERCENTUAL (corresponde à celularidade total)
CD105++ em 99,9%
CD73++ em 99,9%
CD90+++ em 100%
CD31+ em 0,1%
CD81++ em 100%
CD45 negativo
CD3 negativo
CD19 negativo
CD34 negativo
CD14 negativo
HLA-DR negativo

Material: recebidos 15ml de material de cultivo celular recebido em meio DMEM, total de células na origem: 1,08x10⁸/mL, utilizados 11mL após cultura.

COMENTÁRIOS: A análise imunofenotípica desta amostra confirma a presença de mais de 99,99% de células tronco mesenquimais.

Legenda: + positivo (fraco); ++ positivo forte ou +++ muito forte; -/+ positivo parcial; +/++ ou +/+++ positivo heterogêneo
NOTA: O método foi desenvolvido e validado pelo laboratório de acordo com a RDC 302 de 13/10/2005, Art. 5.5.5.1, e utilize anticorpos monoclonais de aplicação internacional em pesquisa e diagnóstico (Grupo Euroflow e outros). Exame realizado no citômetro de fluxo FACs Canto II (8 cones e 10 parâmetros) e analisado no software Infinicyt.
Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico e outros exames laboratoriais como mielograma, biópsia de medula óssea, citogenética e biologia molecular para a conclusão diagnóstica.

Data e Hora da Aprovação: 12/08/2022 11:58

Ana Paula de Azambuja (CRM - 18561)

Impresso em: 22/08/2022 14:34:49



Hospital Nossa Senhora das Graças
LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rua Aldes Munhoz, 433 - Mercado - Curitiba - PR
Fone: (41) 3240-8568 / Fax: (41) 3240-8785
CNPJ: 76682198000169 / INSCRIÇÃO MUNICIPAL: 0000182303



Paciente	[REDACTED]	Data Nasc.	17/02/1965	Prontuário	169009
Nome da Mãe	[REDACTED]	Idade	57 Anos	Atendimento	4663329 - Ext
Médico	Curitiba Biotecnologia	Convênio	Curitiba Biotecnologia Ltda	Prescrição	10462792

Data de coleta: 13/09/2022 10:40

IMUNOFENOTIPAGEM PARA CLASSIFICAÇÃO DE LEUCEMIAS

NÚMERO INTERNO: 123178
Material: Cultivo celular
Método... Citometria de Fluxo
Data da coleta na origem: 13/09/2022

Número de células: 43/mm³
PERCENTUAL (corresponde à celularidade total)
CD105++ em 99,0%
CD73++ em 98,3%
CD90+++ em 99,0%
CD31+ em 0,1%
CD81++ em 100%
CD45 negativo
CD3 negativo
CD19 negativo
CD34 negativo
CD14 negativo
HLA-DR negativo

Material: recebido 15ml de material de cultivo celular recebido em meio DNEM, total de células na origem: NÃO INFORMADO.

COMENTÁRIOS: A análise imunofenotípica desta amostra confirma a presença de mais de 99,0% de células tronco mesenquimais.

Legenda: + positivo (fraco); ++ positivo forte ou +++ muito forte; -/+ positivo parcial; +/- ou +/-++ positivo heterogêneo

NOTA: O método foi desenvolvido e validado pelo laboratório de acordo com a RDC 302 de 13/10/2005, Art. 5.5.5.1., e utiliza anticorpos monoclonais de aplicação internacional em pesquisa e diagnóstico (Grupo Euroflow e outros). Exame realizado no citômetro de fluxo FACS Canto II (8 cores e 10 parâmetros) e analisado no software Infinicyt.

Todo teste laboratorial deve ser correlacionado com o quadro clínico e outros exames laboratoriais como mielograma, biópsia de medula óssea, citogenética e biologia molecular para a conclusão diagnóstica.

Data e Hora da Aprovação: 17/09/2022 10:25

Ana Paula de Azevedo (CRM - 19561)

Impresso em: 19/09/2022 10:31:04