

**FELIPE CONTOLI ISOLDI**

**HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA  
CUTÂNEA EM PACIENTES COM  
ENVELHECIMENTO FACIAL APÓS O  
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
FIBROBLASTOS CULTIVADOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2022**

**FELIPE CONTOLI ISOLDI**

**HISTOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA  
CUTÂNEA EM PACIENTES COM  
ENVELHECIMENTO FACIAL APÓS O  
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE  
FIBROBLASTOS CULTIVADOS.**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo Florencio da Silva

**SÃO PAULO**

**2022**

Isoldi, Felipe Isoldi.

**Histologia e imuno-histoquímica cutânea em pacientes com envelhecimento facial após o transplante autólogo de fibroblastos cultivados** / Felipe Contoli Isoldi. -- São Paulo, 2022.

XIX, 121f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em inglês: *Cutaneous histology and immunohistochemistry in patients with facial aging after autologous transplantation of cultivated fibroblasts.*

1. Terapêutica. 2. Pele. 3. Transplante Autólogo. 4. Histologia. 5. Imuno-Histoquímica. 6. Fibroblastos.



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIRURGIA TRANSLACIONAL**



Coordenação: Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho  
Prof. Dr. Marcel Jun Sugawara Tamaoki

Orientador: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira  
Coorientador: Prof. Dr. Rinaldo Florencio da Silva

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Catia, por doarem parte de suas vidas para a minha educação e formação acadêmica e profissional. Aos meus irmãos, Fernanda e Fabio, por ampararem e acudirem minha jornada. Às minhas amadas esposa Carla e filha Lara, pelo amor, carinho e fé em mim, e à toda a minha família por ser o alicerce inabalável do meu ser e refúgio para o meu coração!

Dedico também ao querido, Prof. Bernardo Hochman (*in memoriam*), professor da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp, pelo seu interesse e devoção à pesquisa e meu iniciador neste universo.

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS**, primeiramente, companheiro de todas as horas.

À **PROFA. DRA. LYDIA MASAKO FERREIRA**, titular da disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), orientadora da presente tese, pelo seu comprometimento, sabedoria e incrível espírito empreendedor, possibilitando o desenvolvimento humano nos âmbitos acadêmico, científico e profissional. Minha mentora e incentivadora!

AO **PROF. DR. ALFREDO GRAGNANI FILHO**, professor coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pela amizade, trabalho e gestão exemplar do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

AO **PROF. MARCEL JUN SUGAWARA TAMAOKI**, vice-coordenador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pela dedicação e excelência no seu trabalho de supervisão do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

AOS **PROFESSORES** do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, Daniela Francescato Veiga, Fábio Xerfan Nahas, Flávio Faloppa, João Carlos Belloti, Max Domingues Pereira, Miguel Sabino Neto, Moisés Cohen, Rene Jorge Abdalla, pela instrução, dedicação e atenção a todos os alunos.

AOS **COLEGAS** do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Translacional, pela amizade, companheirismo e sugestões para a presente tese.

**AO PROF. DR. NÍLCEO S. MICHALANY**, colaborador voluntário do Departamento de Anatomia Patológica da Unifesp, no setor de dermatopatologia, pela sua colaboração no planejamento inicial quanto às avaliações histológicas da pele da presente tese.

**AO PROF. DR. MANUEL DE JESUS SIMÕES**, titular de histologia e biologia estrutural do Departamento de Morfologia e Genética da Unifesp e ao **PROF. DR. RINALDO FLORENCIO DA SILVA**, pós-doutor em ciências, na área de biologia estrutural e funcional com ênfase em histologia da Unifesp, e coorientador da presente tese, por abrirem as portas do laboratório para a colaboração e orientação nas análises histológicas e imuno-histoquímicas.

**AO PROF. DR. RADOVAN BOROJEVIC**, coordenador do Laboratório Excellion, pela parceria e cooperação, sem a qual não teria sido possível a realização do presente estudo.

**ÀS PROFA. DRA. LEILA BLANES e PROFA. DRA. FABIANE FURTADO**, **AOS DR. MAURO NAKAHARA, DRA. LUDMILA KOBAYASHI, DRA. LETICIA ODO, DR. IVAN D. OLIVERIA SANTOS**, e **AOS ALUNOS BRUNO TOPIS, TANIA TOPIS e RAQUEL CUNSKIS CHIOCHETTE** pela colaboração, cooperação e sinergia no estudo temático, principalmente, e nos estudos associados, como o presente estudo.

**AOS PROFESSORES E PÓS-GRADUANDOS** do Departamento de Morfologia e Genética da Unifesp, por me receberem no laboratório e dividirem comigo suas horas de trabalho e equipamentos.

**AOS FUNCIONÁRIOS** do laboratório de histologia do Departamento de Morfologia e Genética da Unifesp, pelo carinho e

dedicação com que exercem suas funções, para que se possa manter o ambiente organizado e disciplinado, para a concretização dos estudos.

À **ISABELLA CLEMENTINO DE OLIVEIRA**, biotécnica do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa casa de São Paulo e à **PROFA. DRA. ARIADINY DE LIMA CAETANO**, professora assistente de farmacologia na Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela ajuda na finalização das análises laboratoriais de imuno-histoquímica, cedendo seu espaço no laboratório do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, chefiado pela **PROFA. DRA. LUCIANA MALAVOLTA QUAGLIO**, em um momento de pandemia no qual o laboratório da Unifesp estava fechado.

À **MARTA REIS, MAX HENRIQUE BOTELHO GONÇALVES DA SILVA, SILVANA APARECIDA DA COSTA DE ASSIS** e **RENATO LOPES SAVEDRA**, secretárias e assistentes da Disciplina de Cirurgia Plástica, pela sua dedicação e carinho no cuidado da dinâmica das atividades da disciplina.

A **TODOS** que colaboraram, direta ou indiretamente, para a elaboração e concretização deste trabalho.



“O homem científico não pretende alcançar um resultado imediato. Ele não espera que suas ideias avançadas sejam imediatamente aceitas. Seus trabalhos são como sementes para o futuro. Seu dever é lançar as bases para aqueles que estão por vir e apontar o caminho”.

*NIKOLA TESLA (1856-1943)*

# SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>V</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS, ACRÔNIMOS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>XV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIX</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>7</b>
<b>3 LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
<b>4 MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>73</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>
<b>NORMAS ADOTADAS</b> .....	<b>83</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à espessura da epiderme (em $\mu\text{m}$ ) nas diferentes regiões analisadas. ....	28
<b>Tabela 2</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à espessura da derme (em $\mu\text{m}$ ) nas diferentes regiões analisadas. ....	30
<b>Tabela 3</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à área vascular (por $\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas. ....	32
<b>Tabela 4</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto ao índice de celularidade ( $\text{n}^\circ/\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas. ....	34
<b>Tabela 5</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à birrefringência das fibras colágenas (%) pelo método de <i>Picrosirius Red</i> -Polarização nas diferentes regiões analisadas. ....	38
<b>Tabela 6</b> - Comparação dos dados das análises histomorfométricas das três regiões agrupadas (pré-auricular, retroauricular e submental) entre os grupos pré- e pós-tratamento com TAF. ....	41
<b>Tabela 7</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao AE1/AE3 nas diferentes regiões analisadas. ....	43
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à densidade numérica de células imunopositivas à vimentina (por $\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas. ....	46
<b>Tabela 9</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade à elastina (%) nas diferentes regiões analisadas. ....	49

<b>Tabela 10</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade ao colágeno tipo I (%) nas diferentes regiões analisadas. ....	52
<b>Tabela 11</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade ao colágeno tipo III (%) nas diferentes regiões analisadas. ....	55
<b>Tabela 12</b> - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade à Fibronectina (%) nas diferentes regiões analisadas. ....	58
<b>Tabela 13</b> - Comparação dos dados das análises imuno-histoquímicas das três regiões agrupadas (pré-auricular, retroauricular e submental) entre os grupos pré- e pós-tratamento com TAF. ....	60

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a espessura da epiderme nas áreas de estudo, com significância estatística (SM em três meses,  $p=0,003$ ; RA em seis meses,  $p=0,020$ ; e SM em 12 meses,  $p=0,011$ , respectivamente). E: Epiderme. D: Derme. Coloração: H.E. ....29
- Figura 2** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a Espessura da derme nas áreas de estudo, com significância estatística (SM em três meses,  $p=0,028$ ; SM em seis meses,  $p=0,047$ ; e SM em 12 meses,  $p=0,035$ , respectivamente). D: Derme. Coloração: H.E. ....31
- Figura 3** - Fotomicrografias de cortes histológicos mostrando a área vascular da derme nas áreas de estudo, com significância estatística (PA em seis meses,  $p=0,004$ ; RA em seis meses,  $p=0,034$ ; e SM em seis meses,  $p<0,001$ , respectivamente). VS: Vasos sanguíneos. Coloração: H.E. ....33
- Figura 4** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da derme, mostrando o índice de celularidade nas áreas de estudo, com significância estatística (RA em três meses,  $p=0,046$ ; RA em seis meses,  $p=0,016$ ; e RA em 12 meses,  $p<0,041$ , respectivamente). N: Núcleos celulares. Coloração: H.E. ....35
- Figura 5** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a distribuição das fibras colágenas na derme (coradas em azul) nos grupos controle, três, seis e 12 meses após TAF. Coloração: T.M. ....37
- Figura 6** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porção da pele submetidos ao método de *Picrosirius Red*-Polarização, nas áreas de estudo, com significância estatística (PA em três meses,  $p=0,027$ ; SM em três meses,  $p=0,033$ ; e PA em 12 meses,  $p<0,014$ , respectivamente). ....40
- Figura 7** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de queratinócitos (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade

	(%) ao AE1/AE3 da derme com significância estatística (SM em três meses, $p < 0,001$ ; PA em seis meses, $p = 0,046$ ; e SM em 12 meses, $p < 0,002$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....	44
<b>Figura 8 -</b>	Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de Vimentina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à densidade numérica de células (por $\text{mm}^2$ ) à vimentina da derme com significância estatística (SM em três meses, $p < 0,001$ ; SM em seis meses, $p = 0,031$ ; e PA em 12 meses, $p < 0,001$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....	47
<b>Figura 9 -</b>	Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de elastina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) à elastina da derme com significância estatística (RA em três meses, $p < 0,001$ ; RA em seis meses, $p = 0,004$ ; e PA em 12 meses, $p = 0,004$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....	50
<b>Figura 10 -</b>	Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de COL1 (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao COL1 da derme com significância estatística (RA em três meses, $p = 0,001$ ; SM em três meses, $p = 0,001$ ; e RA em seis meses, $p = 0,003$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....	53
<b>Figura 11 -</b>	Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de COL3 (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao COL3 da derme com significância estatística (RA em três meses, $p < 0,001$ ; SM em seis meses, $p = 0,014$ ; e SM em 12 meses, $p = 0,035$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....	56

**Figura 12** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de fibronectina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) à fibronectina da derme com significância estatística (RA em três meses,  $p < 0,001$ ; SM em seis meses,  $p = 0,003$ ; e SM em 12 meses,  $p = 0,002$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina. ....59

# LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS, ACRONIMOS E SÍMBOLOS

<b>AAIS</b>	<i>Assessment of Aesthetic Improvement Scale</i>
<b>AH</b>	cido hialurnico
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceína
<b>G</b>	Gauge
<b>GC</b>	Gel de colágeno
<b>GC</b>	Grupo controle
<b>GE</b>	Grupo experimento
<b>HA</b>	cido hialurnico
<b>IC</b>	Intervalo de confiana
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>µm</b>	Micrmetro
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milmetro
<b>PA</b>	Pr-auricular
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PHA</b>	Plasma humano autólogo
<b>RA</b>	Retroauricular
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RUV</b>	Radiação ultravioleta
<b>SBF</b>	Soro bovino fetal
<b>SM</b>	Submental
<b>TAF</b>	Transplante autólogo de fibroblastos



**TEWL**      *Transepidermal water loss*

## RESUMO

**Introdução:** A pele envelhecida representa um desafio frente às diversas estratégias terapêuticas vigentes. O Transplante autólogo de fibroblastos cultivados (TAF) se destacaria por repovoar a derme com fibroblastos, restaurando sua funcionalidade. **Objetivo:** Avaliar as características histológicas e imuno-histoquímicas da pele da face envelhecida de pacientes submetidos ao TAF. **Método:** Foram recebidos os fragmentos de pele envelhecida da face de 20 pacientes submetidas ao TAF. Cortes histológicos desses fragmentos das regiões pré-auricular, retroauricular e submental obtidos antes do TAF, representaram o grupo controle; e, após o TAF, o grupo experimento. Houve randomização das hemifaces, bem como para a coleta no seguimento com três, seis e 12 meses. As análises em Hematoxilina e Eosina investigaram a organização da pele, espessuras da epiderme e derme, vascularização e índice de celularidade. Na coloração Tricrômico de Masson, verificou-se a análise morfológica qualitativa da derme. O *Picrosirius Red* (polarização) constatou o conteúdo, a orientação e birrefringência das fibras colágenas. Na imuno-histoquímica, detectou-se os marcadores para citoqueratinas (AE1 + AE3), células mesoteliais (vimentina), elastina, fibras colágenas tipos I e III e fibronectina. **Resultados:** Após o TAF, evidenciou-se maiores espessuras da epiderme ( $p < 0,001$ ) e derme ( $p < 0,001$ ), bem como neovascularização ( $p < 0,001$ ) e aumento na celularidade ( $p = 0,002$ ); feixes de fibras colágenas mais organizados, espessos e íntegros; e, sob luz polarizada, birrefringência mais intensa das fibras colágenas. Também, maior imunoexpressão às citoqueratinas ( $p = 0,044$ ), vimentina ( $p = 0,014$ ), elastina ( $p = 0,004$ ), colágenos tipo I ( $p = 0,044$ ), tipo III ( $p = 0,031$ ) e fibronectina ( $p < 0,001$ ).

**Conclusão:** O TAF restaurou as características morfológicas da pele envelhecida da face.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Aged skin represents a challenge in the face of the various current therapeutic strategies. The autologous transplant of cultured fibroblasts (ATF) would stand out for repopulating the dermis with fibroblasts, restoring its functionality. **Objective:** To evaluate the histological and immunohistochemical characteristics of aged facial skin in patients undergoing ATF. **Method:** Fragments of aged skin from the face of 20 patients undergoing ATF were received. Histological sections of these fragments from the preauricular, retroauricular and submental regions obtained before the ATF, represented the control group; and, after the ATF, the experiment group. There was randomization of the hemifaces, as well as for the collection in the follow-up with three, six and 12 months. Hematoxylin and Eosin analyzes investigated skin organization, epidermis and dermis thickness, vascularization and cellularity index. In Masson's Trichrome stain, the qualitative morphological analysis of the dermis was verified. Picrosirius Red (polarization) verified the content, orientation and birefringence of collagen fibers. In immunohistochemistry, markers for cytokeratins (AE1 + AE3), mesothelial cells (vimentin), elastin, collagen fibers types I and III and fibronectin were detected. **Results:** After ATF, there was greater thickness of the epidermis ( $p < 0.001$ ) and dermis ( $p < 0.001$ ), as well as neovascularization ( $p < 0.001$ ) and increased cellularity ( $p = 0.002$ ); more organized, thicker and more intact collagen fiber bundles; and, under polarized light, more intense birefringence of collagen fibers. Also, greater immunoexpression of cytokeratins ( $p = 0.044$ ), vimentin ( $p = 0.014$ ), elastin ( $p = 0.004$ ), type I ( $p = 0.044$ ), type III ( $p = 0.031$ ) and fibronectin ( $p < 0.001$ ) collagens. **Conclusion:** The ATF restored the morphological characteristics of the aged skin of the face.

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A pele possui os componentes dos principais sistemas reguladores do corpo, como os Sistemas Nervoso, Endócrino e Imune (SLOMINSKI & WORTSMAN, 2000; ZMIJEWSKI & SLOMINSKI, 2011), além de possuir elementos competentes de outros sistemas menores e órgãos, como vasos sanguíneos, linfáticos, glândulas e músculos. Ademais, a pele responde às reatividades emocionais e, pela exterioridade, exhibe-se como o cartão de visitas do indivíduo (CASEY, 2002; TOBIN, 2017). Em paralelo, apresenta-se como barreira físico-química entre os meios externo e interno, protegendo o organismo contra a desidratação, invasão de patógenos, agressões do meio ambiente e etc. Juntas, todas essas atribuições participam da homeostase cutânea (CASEY, 2002; YANEZ *et al.*, 2017).

No entanto um evento indelével e de ação contínua na pele é o seu envelhecimento. A pele está sujeita a todo instante às ações do envelhecimento intrínseco (ou cronológico) e extrínseco (sob influência ambiental), resultando na atenuação e supressão de parte de sua estrutura e capacidade funcional (KHAVKIN & ELLIS, 2011; NEWTON *et al.*, 2015; ZHANG & DUAN, 2018). O envelhecimento cutâneo se manifesta por mudanças perceptíveis (observáveis) na aparência externa da pele, bem como alterações tangíveis em sua composição e estrutura microscópicas. Entre os fatores intrínsecos, destacam-se a influência genética e hormonal (TOBIN, 2017; ZHANG & DUAN, 2018; BOCHEVA, SLOMINSKI, SLOMINSKI, 2019). E, quanto ao envelhecimento extrínseco, ressaltam-se

os fatores ambientais, principalmente a radiação ultravioleta (UVR), o tabagismo, especificidades na dieta diária, agentes químicos, traumas, entre outros (FISHER *et al.*, 2002; RABE *et al.*, 2006; POLJSAK, DAHMANE, GODIC, 2013; KAMMEYER & LUITEN, 2015). Os efeitos da UVR na pele são considerados como os principais aceleradores do seu envelhecimento, recebendo designação distinta de fotoenvelhecimento cutâneo. Ambos os tipos de envelhecimento têm suas características peculiares, mas agem sobrepostos e em sinergia (KHAVKIN & ELLIS, 2011; KAMMEYER & LUITEN, 2015; TOBIN, 2017).

O envelhecimento intrínseco da pele é quase imperceptível e lento, demonstrando variações entre populações, indivíduos de mesma etnia e em diferentes topografias corporais (ORÍÁ *et al.*, 2003; TOBIN, 2017). Caracteriza-se substancialmente por uma pele delgada, sem manchas, lisa, pálida, ressecada, menos elástica e com rítides finas (TOBIN, 2017). Ainda, alterações relacionadas à tela subcutânea na face, principalmente por adelgaçamento ou atrofia, determinam as linhas de expressão mais evidentes (LEMPERLE *et al.*, 2001; NEWTON *et al.*, 2015). Isso transcorre no próprio tecido mole, por modificações funcionais e estruturais da pele, de modo que há redução progressiva da população de leucócitos e principalmente fibroblastos dérmicos, conseqüentemente com menor produção e deposição de colágeno, redução nas conexões entre as fibras colágenas e achatamento da junção dermoepidérmica (redução das papilas dérmicas) (FISHER, VARANI, VOORHEES, 2008; KHAVKIN & ELLIS, 2011; ZHANG & DUAN, 2018). Esse último está também relacionado à redução no número global de vasos e do aporte vascular para a epiderme, prejudicando o suporte de nutrientes ao tecido (BASSETTO *et al.*, 2013).

Essencialmente, o maior fator influenciador do envelhecimento extrínseco é a exposição à UVR acumulada e desprotegida ao longo dos anos. Esse processo está significativamente presente nas topografias corporais expostas ao ambiente, como a face, o pescoço, braços, mãos e pernas (FISHER *et al.*, 2002; TOBIN, 2017). Em 80% dos casos do envelhecimento da pele da face são provocados pelo fotoenvelhecimento. As características da pele envelhecida pelos fatores extrínsecos incluem ríides grosseiras, textura áspera da epiderme, coloração pálida e com pigmentação malhada aleatória (melanose) e redução importante da sua elasticidade e hidratação (ORÍÁ *et al.*, 2003; GRUNEBAUM & HEFFELFINGER, 2011; ZHANG & DUAN, 2018).

Na histologia, verifica-se o achatamento da junção dermoepidérmica (perda das papilas da derme papilar) como a mudança mais consistente encontrada na pele envelhecida (GRUNEBAUM & HEFFELFINGER, 2011; NEWTON *et al.*, 2015). A redução da superfície de contato entre a epiderme e a derme reprime a resistência às forças de cisalhamento da pele, bem como restringe a oferta de nutrientes e oxigênio à camada mais superficial (FISHER *et al.*, 2002; KAMMEYER & LUITEN, 2015; NEWTON *et al.*, 2015). Esse efeito é também influenciado pelas alterações diretas da elastose solar, com perda de componentes da matriz extracelular (MEC), como as microfibrilas (ricas em fibrilinas, vimentina e fibronectina) presentes na própria junção dermoepidérmica, as quais são um marcador do fotoenvelhecimento (KUMAZAKI *et al.*, 1991; RABE *et al.*, 2006; SZEIMIES *et al.*, 2012; COTOFANA *et al.*, 2016; OSTROWSKA-PODHORODECKA & MCCULLOCH, 2021).

Para o reparo ou estabilização dessas alterações inerentes ao envelhecimento cutâneo, cada fator causal pode ser alvo de uma ou mais



terapias, associadas às mudanças no estilo de vida, incluindo a orientação alimentar, cessação do tabagismo e etilismo e, principalmente, a proteção solar contínua (RABE *et al.*, 2006; GRUNEBAUM & HEFFELFINGER, 2011; TOBIN, 2017). No entanto cada uma das terapias ou procura interromper os danos vigentes, ou se esforça em apenas aprimorar algum parâmetro funcional e estrutural da pele, porém sem intervir diretamente nas características intrínsecas e/ou nos mecanismos do envelhecimento da pele.

Nesse sentido, o transplante autólogo de fibroblastos (TAF) se destacaria como uma terapia inovadora capaz de repovoar a derme com “novos” fibroblastos, estimulando a produção e organização das fibras colágenas e de outras proteínas da MEC, restaurando os danos do envelhecimento cutâneo (SVENSJÖ *et al.*, 2002; SOLAKOGLU, TIRYAKI, CILOGLU, 2008; BASSETTO *et al.*, 2013; MACHALIŃSKI *et al.*, 2016; ITAYA *et al.*, 2017; ZHANG & DUAN, 2018; BAJOURI *et al.*, 2020). Os fibroblastos autólogos seriam obtidos da pele do paciente (biópsia cutânea), cultivados, multiplicados e, em seguida, transferidos para seringas esterilizadas para serem injetados diretamente na derme do paciente (WATSON *et al.*, 1999; KELLER *et al.*, 2000; THANGAPAZHAM, DARLING, MEYERLE, 2014). Após o TAF, as propriedades biossintéticas dos fibroblastos seriam otimizadas, produzindo-se colágeno “novo” e em maior quantidade, promovendo a organização da MEC, refletindo em melhorias clínicas (THANGAPAZHAM, DARLING, MEYERLE, 2014; ZORIN *et al.*, 2017), biofísicas (MACHALIŃSKI *et al.*, 2016; ZORIN *et al.*, 2017) e histológicas da pele da face envelhecida (BASSETTO *et al.*, 2013; ZORIN *et al.*, 2017; BAJOURI *et al.*, 2020).

Diante desse panorama, há necessidade de se investigar as mudanças ocorridas, em nível estrutural da pele envelhecida (análise histológica), com

ênfoque na derme, em suas células (principalmente, o fibroblasto, com incremento nos agrupamentos celulares e biossíntese) e na MEC (reorganização das fibras e feixes de colágeno, promoção das sinalizações celulares e síntese proteica, por exemplo), bem como as mudanças funcionais (imuno-histoquímica) decorrentes do TAF, em uma abordagem integral e abrangente, com a seleção criteriosa da casuística (padronizada), diferentemente dos estudos pgressos (WATSON *et al.*, 1999; SOLAKOGLU, TIRYAKI, CILOGLU, 2008; BASSETTO *et al.*, 2013; MACHALIŃSKI *et al.*, 2016; ZORIN *et al.*, 2017).

## **2 OBJETIVO**

## **2 OBJETIVO**

Avaliar as características histológicas e imuno-histoquímicas da pele da face envelhecida de pacientes submetidos ao transplante autólogo de fibroblastos cultivados

### **3 LITERATURA**

### 3 LITERATURA

WATSON *et al.* (1999) realizaram um estudo clínico (piloto) prospectivo, incluindo apenas 10 pacientes adultos (de 24 a 69 anos) com ríides faciais. As amostras de pele de cada paciente foram obtidas por biópsias de 3 mm (*punch*) retroauricular, armazenadas e enviadas ao laboratório para a cultura dos fibroblastos. Em seguida, foram preparadas as seringas esterilizadas de 2 ml, contendo de 1,3 a 1,5 ml de suspensão de fibroblastos cultivados, para a aplicação na face. Foram realizadas fotografias padronizadas dos pacientes antes e após seis meses do TAF. Ainda, amostras de tecido cutâneo foram obtidas, após o TAF, na área retroauricular para análise histológica. Na histologia, verificou-se o aumento da espessura e densidade das fibras de colágeno na derme. Os autores concluíram que o TAF poderia ser uma opção de tratamento eficaz para a ritidose e cicatrizes atróficas em face.

KELLER *et al.* (2000) investigaram a atividade funcional, a capacidade de contração e as propriedades oncogênicas potenciais de fibroblastos humanos autólogos cultivados usados para aumentar os tecidos moles da face. Vinte pacientes com idades entre 37 e 61 anos com ritidose facial e cicatriz atrófica na face foram tratados com o TAF. As amostras de pele (4 mm) foram coletadas da área retroauricular e encaminhadas para o laboratório. As células foram cultivadas, expandidas e transferidas para seringas em uma medida de  $4 \times 10^7$  células totais (células de 4º, 5º e 6º passagens). Fibroblastos cultivados de cicatriz hipertrófica foram utilizados

como controle. Para a avaliação da oncogenicidade, células de 7<sup>o</sup> passagem foram injetadas na tela subcutânea na dose de  $4 \times 10^7$  em dois ratos *nus* BALB/c de 1,5 meses. Melhora clínica foi observada nos pacientes que receberam o TAF para a correção dos sulcos nasolabiais e em pacientes com cicatrizes atróficas em sete e 12 meses após a terceira injeção. A citometria de fluxo mostrou que os fibroblastos cultivados mantinham a produção ativa de colágeno. Estudos *in vitro* confirmaram a capacidade de contração normal dos fibroblastos cultivados. Os fibroblastos cultivados ( $4 \times 10^7$  células/animal) não induziram neoplasias malignas nas amostras no período de dois meses após o transplante. Os autores concluíram segurança no uso do TAF e eficácia no tratamento da ritidose facial.

ZHAO *et al.* (2008) investigaram, em um estudo experimental, utilizando coelhos, se os fibroblastos após o TAF poderiam sobreviver em longo prazo e ainda secretar colágeno. Dividiram 10 animais em dois grupos: dois animais no grupo com fibroblastos autólogos marcados com [3H] TdR e oito animais no grupo com fibroblastos não marcados. Em cada grupo, nas orelhas direitas, foram injetados na “transição” dérmica  $8 \times 10^7$  fibroblastos autólogos na quarta passagem (subgrupo experimental), enquanto nas orelhas esquerdas foram injetadas apenas solução salina tamponada com PBS (subgrupo controle). A cultura primária de fibroblastos autólogos foi realizada com tecido obtido por biópsia cutânea. O local das injeções foi marcado, pois outras duas injeções semelhantes foram feitas em intervalos de duas semanas. Os animais foram submetidos à morte induzida indolor cinco meses após o transplante, os locais das injeções foram explantados. Os tecidos foram analisados por autorradiografia e pela histologia. As células marcadas com [3H] TdR sobreviveram e foi encontrada maior quantidade de fibrócitos no subgrupo experimental. A profundidade da derme foi

significativamente diferente entre o subgrupo experimental (701,3 +/- 31,5  $\mu\text{m}$ ) e o subgrupo controle (638,3 +/- 23,9  $\mu\text{m}$ ) do grupo não marcado ( $p < 0,01$ ). Houve também uma diferença significativa de produção do colágeno tipo III entre o subgrupo experimental ( $2,63 \pm 1,41 \text{ cm}^2$ ) e o subgrupo controle ( $1,05 \pm 0,90 \text{ cm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença significativa de produção do colágeno tipo I entre o subgrupo experimental ( $56,25 \pm 14,41 \text{ cm}^2$ ) e o subgrupo controle ( $55,41 \pm 16,59 \text{ cm}^2$ ) ( $p > 0,05$ ). Os autores concluíram que o estudo evidenciou a sobrevivência dos fibroblastos cultivados e autotransplantados *in vivo* por um longo período de tempo (mais de 5 meses) e capazes de secretar colágeno.

EÇA *et al.* (2012) realizaram um estudo clínico com a aplicação do TAF, em oito mulheres entre 45 e 65 anos, não tabagistas, as quais apresentavam flacidez e ritidose periorbital, cinco para compor o GE e três o GC. As pacientes do GE foram submetidas ao procedimento de biópsia cutânea (cerca de  $1 \text{ cm}^3$ ), na região inguinal, para a captação de fibroblastos. As amostras de tecido foram lavadas com solução salina tamponada com PBS e suplementada com 1% de penicilina/estreptomicina e, em seguida, cultivadas. A expansão dos fibroblastos ocorreu até a quarta passagem. Depois que a cultura primária atingiu 70% de confluência, as células foram tratadas com 0,25% de solução de tripsina (LGC<sup>®</sup>), lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por cinco minutos. O botão de células (*pellet*) foi ressuspensão em PBS e dividido em duas alíquotas: 1 ml para expansão e 1 ml para injeção. As injeções na derme superficial foram realizadas de maneira retroinjetora linear, com média de  $3,85 \times 10^6$  células / ml. As injeções foram aplicadas nas rítides frontais, periorais, sulco nasolabial, mento e periorbital, em um total de quatro sessões, com intervalo de 15 dias entre cada sessão. No GC, apenas o PBS, foi injetado nas mesmas



topografias. Os autores concluíram que a terapia utilizada no estudo promoveu melhorias clínicas, na flacidez da pele periorbital, mas não conseguiu melhorar a aparência das linhas ríides superficiais e profundas durante o período avaliado.

BASSETTO *et al.* (2013) estudaram a histologia da pele de 16 pacientes adultos que seriam submetidos à abdominoplastia ou revisão da cicatriz de cesárea, após o TAF proveniente da derme desses tecidos, para o preenchimento dos sulcos nasolabiais e lábios. Para a avaliação histológica, três pacientes que seriam submetidos aos procedimentos reconstrutivos, em múltiplos estágios, para a obesidade, foram submetidos ao enxerto de derme injetável no tecido subcutâneo (que posteriormente seria ressecado) em outras topografias corporais. Os enxertos foram colhidos e examinados aos três, sete e 12 meses após o TAF. O exame histológico da derme processada e injetada mostrou manutenção do volume, ao longo do tempo, neovascularização e reorganização estrutural com feixes de colágeno e fibroblastos aninhados, os quais se assemelhavam à derme reticular. Como conclusão, os autores sugeriram que o uso de derme autóloga “processada” foi viável como preenchedor. Essa tática poderia ser recomendada para pacientes que requeressem correção de preenchimento e que seriam submetidos a procedimentos concomitantes envolvendo a excisão da derme de uma doadora potencial.

MACHALIŃSKI *et al.* (2016) investigaram a histologia da pele da face, após o TAF, em uma série de três casos. Os fibroblastos cultivados ( $1,5 \times 10^6$  células / ml, de 4<sup>o</sup> passagem) foram injetados na derme da região retroauricular direita (GE) e, para o GC, injeções contendo apenas PBS foram aplicadas na região retroauricular esquerda. Biópsias das áreas injetadas de ambos os grupos foram obtidas antes e três meses após as

injeções. Os autores relataram que a derme, após o TAF, apresentou um aumento do número de fibroblastos, no diâmetro dos feixes de fibras de colágeno e na densidade de fibras reticulares, microfibrilas ricas em fibrilina-1 e fibras elásticas comparadas ao controle, por análise histomorfométrica e imuno-histoquímica. Concluíram que o TAF poderia ser uma terapia adjuvante eficaz ao tratamento do fotoenvelhecimento da pele da face.

ZORIN *et al.* (2017) realizaram um estudo clínico, não randomizado, do tipo série de casos prospectivos, com a aplicação do TAF, em 17 pacientes (quatro homens e 13 mulheres), com sinais clínicos faciais do fotoenvelhecimento. O TAF foi injetado nos pacientes ( $15 \times 10^6$  células / ml, de quarta passagem), em duas sessões com intervalo de um mês (GE), bem como outra injeção sem células (GC), na topografia retroauricular de cada paciente, para posterior biópsia e exame histológico. A avaliação histológica da pele foi realizada com um, três, seis e 12 meses de seguimento dos pacientes. As lâminas foram coradas em H.E., para avaliar mudanças morfológicas, em relação à espessura da epiderme e à distância média entre os apêndices da pele e, com a impregnação com prata, para avaliar a densidade do colágeno. Também, a imuno-histoquímica foi realizada em secções de parafina utilizando anticorpos contra CD45 e vimentina (DAKO). Os autores relataram uma remodelação das microestruturas da derme, acompanhada de aumento progressivo do conteúdo de colágeno e da espessura da derme (até  $62,5 \pm 6,7\%$  em 12 meses). Essas modificações histológicas foram expressadas nas avaliações clínicas pelo aumento da elasticidade da pele ( $24,0 \pm 4,3\%$  na área periorbital) e espessura da pele e pela diminuição do número e profundidade das rítes ( $46 \pm 7\%$  ao final do período de observação). Por fim, concluíram que o TAF tem ação moduladora na pele, ao longo do período avaliado, após a sua aplicação.

GRETHER-BECK *et al.* (2020) realizaram estudo clínico (fase I) randomizado e controlado por placebo para avaliar o TAF no fotoenvelhecimento cutâneo da face. Dezesete pacientes foram incluídos. No GE, quatro áreas nas nádegas foram submetidas à injeção intradérmica, em intervalos mensais, com o TAF ( $25 \times 10^6$  células / ml, de 4º passagem). No GC, o placebo foi injetado de maneira semelhante. Como desfecho primário, verificaram os possíveis eventos adversos locais e os desfechos secundários, avaliaram a expressão de genes relacionados à homeostase da MEC. As amostras de tecido foram coletadas após quatro semanas das injeções. A análise das culturas das células da derme focou na expressão de pró-colágeno tipo I por ELISA. Os autores concluíram que, apesar de ser um estudo preliminar e com pequena casuística, o TAF foi bem tolerado, sem eventos adversos graves locais relatados até um ano após a primeira injeção. Ainda, o TAF resultou em uma suprarregulação significativa de TGF $\beta$ 1, CTGF, COL1A1, COL1A2, COL3A1 e expressão de mRNA lumican pelos fibroblastos transplantados, mantendo adequada a homeostase da MEC.

## **4 MÉTODOS**

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Desenho de pesquisa

O presente estudo se propôs a realizar as análises histológicas e imuno-histoquímicas de amostras de pele da face de pacientes mulheres, Fitzpatrick III e com fotoenvelhecimento cutâneo submetidas ao TAF procedentes de um estudo predecessor (Apêndices de 1 a 4).

### 4.2 Processamento das amostras de pele

Os fragmentos de pele recebidos foram imediatamente fixados em solução de formalina 10% tamponada com fosfato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) por 24 horas e em temperatura ambiente. Em seguida, esses fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, impregnados em parafina líquida (temperatura de 60°C) e, subsequentemente, incluídos em parafina. A inclusão foi realizada de forma a se obter cortes sagitais da pele, para as análises da epiderme e derme.

Com o auxílio de um micrótomo (Minot, Leica, RM Modelo 2145), foram obtidos cortes seriados com 4 µm de espessura, os quais foram distendidos em banho-maria e coletados em lâminas histológicas. Os cortes destinados às reações imuno-histoquímicas foram coletados em lâminas

histológicas silanizadas (Starfrost®) para a melhor adesão. Após a secagem por uma hora em estufa a 60°C, as lâminas foram destinadas aos métodos e análises específicas descritas a seguir.

Todas as análises, histológica e imuno-histoquímica, foram realizadas pelo pesquisador principal, com o auxílio do professor colaborador do Departamento de Morfologia e Genética da Unifesp, Disciplina de Histologia e Biologia Estrutural (Dr. Rinaldo Florencio da Silva), sob supervisão do professor titular Dr. Manuel de Jesus Simões. Além disso, as fotomicrografias das reações de imuno-histoquímica foram obtidas no laboratório do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, coordenado pela Profa. Dra. Luciana Malavolta Quaglio.

#### **4.2.1 Métodos de coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E) e Tricrômico de Masson (T.M)**

Os cortes histológicos representando cada região investigada da face à direita (PAD, RAD e SMD) e à esquerda (PAE, RAE e SME) foram selecionados. Todos foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e água corrente. Em seguida, foram corados com H.E e T.M, como previamente descrito (KIERNAN, 2008). Realizou-se a desidratação dos cortes em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (Entellan®). Posteriormente, as fotomicrografias dos cortes corados foram documentadas por um microscópio de luz (Axio Lab.A1, Carl Zeiss),

acoplado a uma videocâmara de alta resolução (AxioCam ICc 5, Carl Zeiss) e, assim, submetidas à análise morfológica e histomorfométrica.

#### **4.2.1.1 Análise morfológica e histomorfométrica**

Os cortes corados com H.E foram utilizados, para a avaliação da organização histológica geral da pele, mensuração das espessuras da epiderme e da derme, vascularização e do índice de celularidade. Para a avaliação da organização histológica geral da pele, bem como das espessuras da epiderme e derme, cinco campos contendo a epiderme e a derme, em cada corte histológico (um corte para cada setor investigado da face), foram capturados aleatoriamente com o microscópio em objetiva de 10x. Assim, para cada um desses parâmetros, um total de 30 campos por paciente (15 campos por hemiface) foram analisados. Em cada campo, seis medidas de espessura, ao longo de toda a camada da epiderme e derme, foram realizadas separadamente. Para cada parâmetro, uma média de cada região da face investigada por paciente foi obtida e expressa em  $\mu\text{m}$ .

Para a vascularização, seis campos da região da derme, em cada corte histológico (um corte para cada região investigada da face), foram capturados aleatoriamente com o microscópio ajustado em objetiva de 20x. Dessa forma, um total de 36 campos por paciente (18 campos por hemiface) foram analisados. Em cada campo, as áreas vasculares foram medidas, e uma média de cada região da face investigada por paciente foi obtida e expressa em  $\mu\text{m}^2$ . Para a avaliação do índice de celularidade, nove campos da derme,

em cada corte histológico (um corte para cada região investigada da face), foram capturados aleatoriamente com o microscópio ajustado em objetiva de 40x. Para a obtenção do índice, um total de 54 campos por paciente (27 campos por hemiface) foram analisados. Em cada campo, o número de núcleos celulares totais foi contado manualmente (utilizando-se o *software* ImageJ®), e uma média de cada região da face investigada por paciente foi obtida e expressa em  $\mu\text{m}^2$ .

Os cortes corados com T.M foram destinados, para a análise morfológica qualitativa do tecido conjuntivo da derme, incluindo a organização das fibras colágenas. Para tanto, seis campos da derme, em cada corte histológico, foram capturados aleatoriamente com o microscópio ajustado em objetiva de 20x. Foram utilizados dois cortes com intervalo mínimo de 100  $\mu\text{m}$  entre os cortes para cada região investigada da face. Dessa forma, um total de 72 campos por paciente (36 campos por hemiface, sendo 12 campos para cada região investigada da face) foram analisados. Todos os parâmetros morfológicos e histomorfométricos foram avaliados e aferidos utilizando o *software* AxioVision® Rel 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemanha).

#### **4.2.1.2. Método do *Picrosirius Red* - Polarização**

Para a avaliação do conteúdo, orientação e birrefringência das fibras colágenas, três cortes histológicos (com intervalo mínimo de 100  $\mu\text{m}$  entre os cortes), representando cada região investigada da face, foram



selecionados. Os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações crescentes de álcool etílico e água corrente. Em seguida, foram incubados por uma hora em solução de *Sirius Red* a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado e, subsequentemente, lavados rapidamente em água acidificada. Logo depois, os cortes foram então desidratados em álcool etílico, diafanizados em xilol e montados em meio permanente (Entellan®). As fotomicrografias dos cortes submetidos a esse método foram documentadas pelo mesmo microscópio utilizado, para as análises morfológica e histomorfométrica, porém com a adição de um filtro de luz polarizada. Em objetiva de 20x, cinco campos da derme foram aleatoriamente capturados em cada corte histológico. Dessa forma, foram analisados um total de 90 campos por paciente (45 campos por hemiface, sendo 15 campos para cada região investigada da face).

A orientação e intensidade da birrefringência emitida pelas fibras colágenas foram analisadas de forma semiquantitativa pelo *software* ImageJ® (NIH, Baltimore, MD, disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>). Para tanto, os seguintes matizes foram definidos: vermelho/laranja 2–38 e 230–256, amarelo 39–51 e verde 52–128. Os matizes foram isolados por um filtro de histograma disponível em “*Threshold Color*”, o qual converteu as cores em *pixels*. Uma imagem em preto e branco foi criada, na qual os *pixels* pretos representaram os tons de birrefringência amarelo-laranja-vermelho, enquanto os *pixels* brancos representaram os tons restantes. Os *pixels* pretos foram convertidos para a porcentagem de colágeno birrefringente na área total por campo (ARRUDA *et al.*, 2007; KOSHIMIZU *et al.*, 2013; SASSO *et al.*, 2020). Assim, em cada campo, a intensidade da birrefringência das fibras colágenas foi mensurada, e uma média de cada região da face investigada por paciente foi obtida e expressa em porcentagem.

#### 4.2.2 Reações imuno-histoquímicas

Os cortes histológicos aderidos em lâminas silanizadas foram selecionados para a detecção imuno-histoquímica de: citoqueratina (AE1 + AE3), marcador de células de origem mesenquimal e filamentos intermediários (vimentina), elastina (elastin), fibras colágenas tipo I (COL1) e III (COL3) e fibronectina (fibronectin). Para tanto, os cortes foram desparafinizados, hidratados e imersos em peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos, protegidos da luz, para a inativação da peroxidase endógena. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e submetidos à recuperação antigênica, por meio da incubação em tampão citrato de sódio 0,001M (pH 6,0), aquecido em panela a vapor, durante 40 minutos à temperatura de 90 a 94°C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram incubados com albumina bovina a 2% diluído em PBS (fosfato de sódio 0,05M + cloreto de sódio 0,2M – pH 7,2). Subsequentemente, os cortes foram incubados em câmara úmida a 4°C *overnight* com um dos seguintes anticorpos primários: AE1/AE3 clone (IR 05361-2, *Dako/Agilent*, diluído 1:100), vimentina clone (IR 63061-2, *Dako/Agilent*, diluído 1:100), antielastina monoclonal de rato (Mob230 / Mob230-05, *Diagnostic BioSystems*, diluído 1:100), anticolágeno I policlonal de coelho (orb213757, *Biorbyt*, diluído 1:1000), anticolágeno III policlonal de coelho (orb213759, *Biorbyt*, diluído 1:400) e antifibronectina policlonal de coelho (RP013, *Diagnostic BioSystems*, diluído 1:100).

Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS e incubados, no anticorpo secundário (Polímero-Envision Flex/HRP, *Dako/Agilent*), durante 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Após as lavagens em

---

PBS, as reações foram reveladas em solução contendo 3.3-diaminobenzidina (DAB, *Dako/Agilent*), os cortes foram então contraincolorados com hematoxilina e montados em Entellan® (Merck). Como controle negativo de cada reação, os cortes foram submetidos às mesmas etapas, excetuando-se a etapa de incubação com os anticorpos primários; nessa etapa, os cortes foram incubados com soro não imunizado.

#### 4.2.3 Avaliação da imunopositividade

As fotomicrografias dos cortes submetidos às reações imunohistoquímicas foram documentadas por um microscópio de luz (Axio Lab.A1, Carl Zeiss), acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxioCam ICc 5, Carl Zeiss). Para cada imunomarcação, três cortes histológicos (com intervalo mínimo de 100  $\mu\text{m}$  entre os cortes), representando cada região investigada da face, foram analisados. Em cada corte histológico, três campos foram aleatoriamente capturados com o microscópio em objetiva de 40x. Assim, obteve-se um total de 54 campos por paciente (27 campos por hemiface, sendo nove campos para cada região investigada).

Para a análise da imunexpressão de vimentina, o número total de células imunopositivas na derme foi quantificado em cada campo; assim, uma média desse número foi obtida, para cada região investigada da face, a partir da média de cada corte histológico. Os resultados foram expressos em densidade numérica de células imunopositivas por  $\text{mm}^2$ . Para as outras

imunomarcações, a análise da imunopositividade foi realizada por densitometria. Para as análises das imagens, utilizando-se o *software* Axiovision® 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Alemanha), foram demarcados 10 pontos em regiões previamente padronizadas por campo. Em cada ponto demarcado, o *software* gerou um valor em porcentagem (%) após sua análise. A média da porcentagem foi obtida, para cada setor investigado da face, com base na média de cada corte histológico.

### **4.3 Análise estatística**

Após a coleta dos dados, foi caracterizada a distribuição da frequência relativa (percentuais) pelo Teste de Igualdade de Duas Proporções. Para a análise de correlação entre variáveis quantitativas, foi utilizada a Correlação de Pearson. Para a principal análise do estudo, que é comparação entre os grupos, foi utilizado o teste de Teste de Qui-Quadrado, quando as variáveis foram qualitativas e o teste T-*Student* Pareado para a análise de média das variáveis quantitativas. Para os dados de distribuição de normalidade, foi utilizado o similar não paramétrico de teste de Wilcoxon.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 e intervalo de confiança de 95% para todas as análises. Para todas as análises estatísticas, foram utilizados os *softwares* SPSS® V20, Minitab® 16 e Excel® Office 2010.

## **5 RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Distribuição das pacientes nos grupos TAF

Em estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira (PI e responsável pelo projeto temático), as pacientes foram distribuídas em três grupos de seguimento após o TAF com três, seis e 12 meses, por randomização simples realizada por *software* disponível em [www.randomization.com](http://www.randomization.com) (Quadro 1).

**Quadro 1** - Distribuição das pacientes nos três, seis e 12 meses após TAF (n=20).

3 meses (n=7)	6 meses (n=7)	12 meses (n=6)
002	001	006
009	003	007
011	004	008
013	005	015
016	010	017
018	012	020
019	014	

Não houve perda ou fragmentos insuficientes de pele para as análises do presente estudo.

## **5.2 Análise morfológica e histomorfométrica**

### **5.2.1 Análise dos cortes corados com hematoxilina e eosina**

Nos cortes corados com H.E, a espessura da epiderme se apresentou significativamente maior na região SM, três e 12 meses após o tratamento com TAF, em comparação ao pré-tratamento nessa região. Seis meses após o tratamento, a espessura da epiderme se apresentou com significância estatística menor, na região RA, em comparação à condição pré-tratamento. Comparando os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, um aumento significativo na espessura da epiderme foi observado após o TAF, 12 meses após a aplicação. Não foram observadas diferenças com significância estatística, na espessura da epiderme em outras regiões e períodos, antes e após o tratamento com TAF (Tabela 1, Figura 1).

**Tabela 1** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à espessura da epiderme (em  $\mu\text{m}$ ) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	127,8	130,3	56,3	0,185
		Pós	115,0	112,6	50,0	
	RA	Pré	122,8	118,0	46,4	0,870
		Pós	118,5	124,0	37,0	
	SM	Pré	121,5	115,7	44,0	<b>0,003*</b>
		Pós	154,8	159,1	53,7	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	88,1	58,9	68,9	0,432
		Pós	86,8	67,3	52,4	
	RA	Pré	55,3	68,4	81,5	<b>0,020*</b>
		Pós	93,1	49,0	37,4	
	SM	Pré	92,6	60,3	76,3	0,432
		Pós	72,6	57,5	42,6	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	120,9	120,2	46,1	0,206
		Pós	131,3	133,5	47,5	
	RA	Pré	125,8	115,6	64,6	0,382
		Pós	133,4	127,1	56,4	
	SM	Pré	126,8	126,7	38,9	<b>0,011*</b>
		Pós	153,2	158,3	49,3	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\* $p < 0,05$



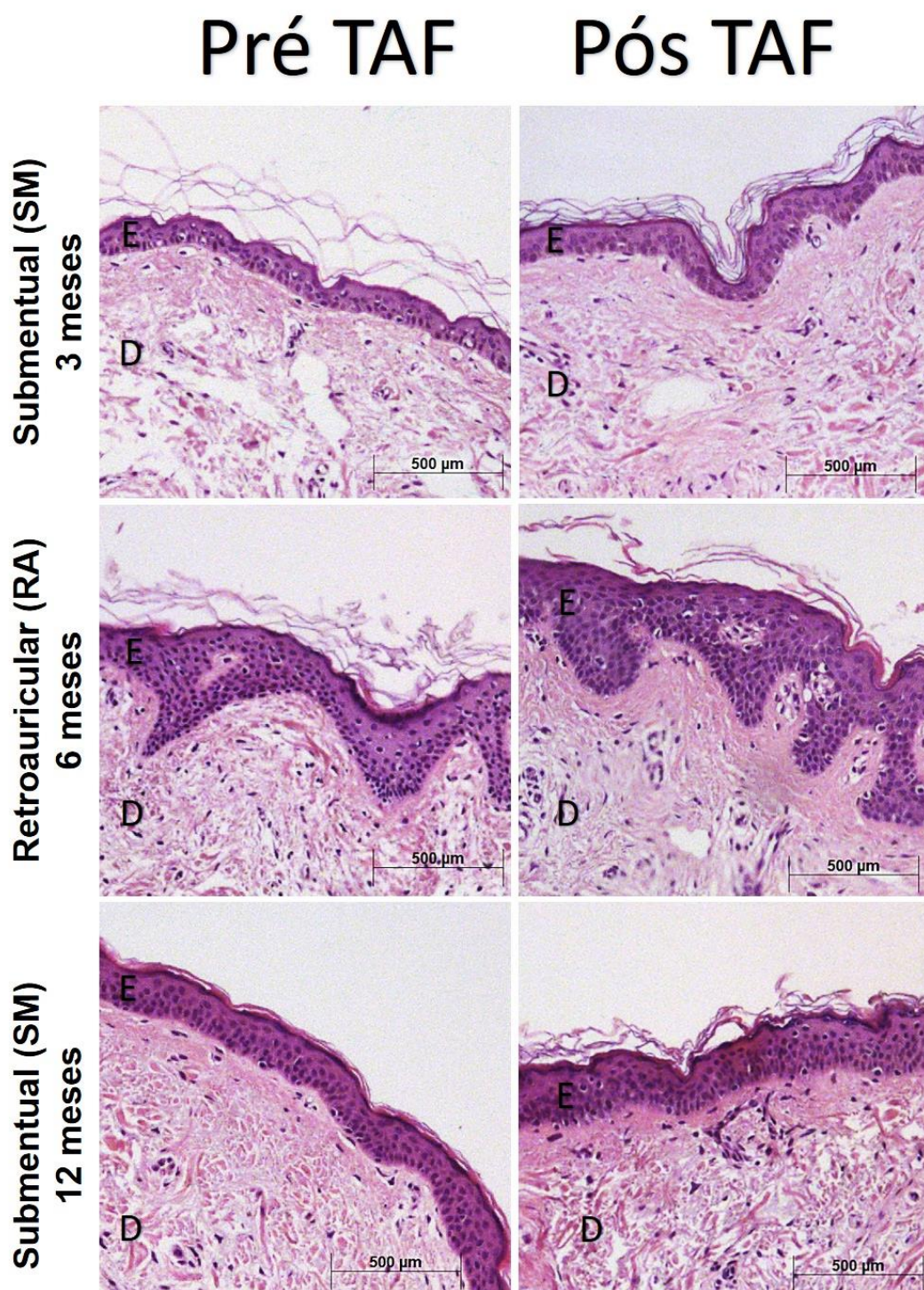


Figura 1 - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a espessura da epiderme nas áreas de estudo, com significância estatística (SM em três meses,  $p=0,003$ ; RA em seis meses,  $p=0,020$ ; e SM em 12 meses,  $p=0,011$ , respectivamente). E: Epiderme. D: Derme. Coloração: H.E.

Um aumento significativo, na espessura da derme, foi observado nas regiões PA e SM, três e seis meses após o tratamento com TAF, em comparação à condição pré-tratamento. Doze meses após o tratamento com TAF, foi observada maior espessura da derme na região SM. Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, um aumento significante na espessura da derme foi observado, na face das pacientes que receberam o TAF, três e seis meses após o tratamento. Em outras regiões e períodos, a espessura da derme não diferiu de forma significativa entre os períodos pré e pós-tratamento com TAF (Tabela 2, Figura 2).

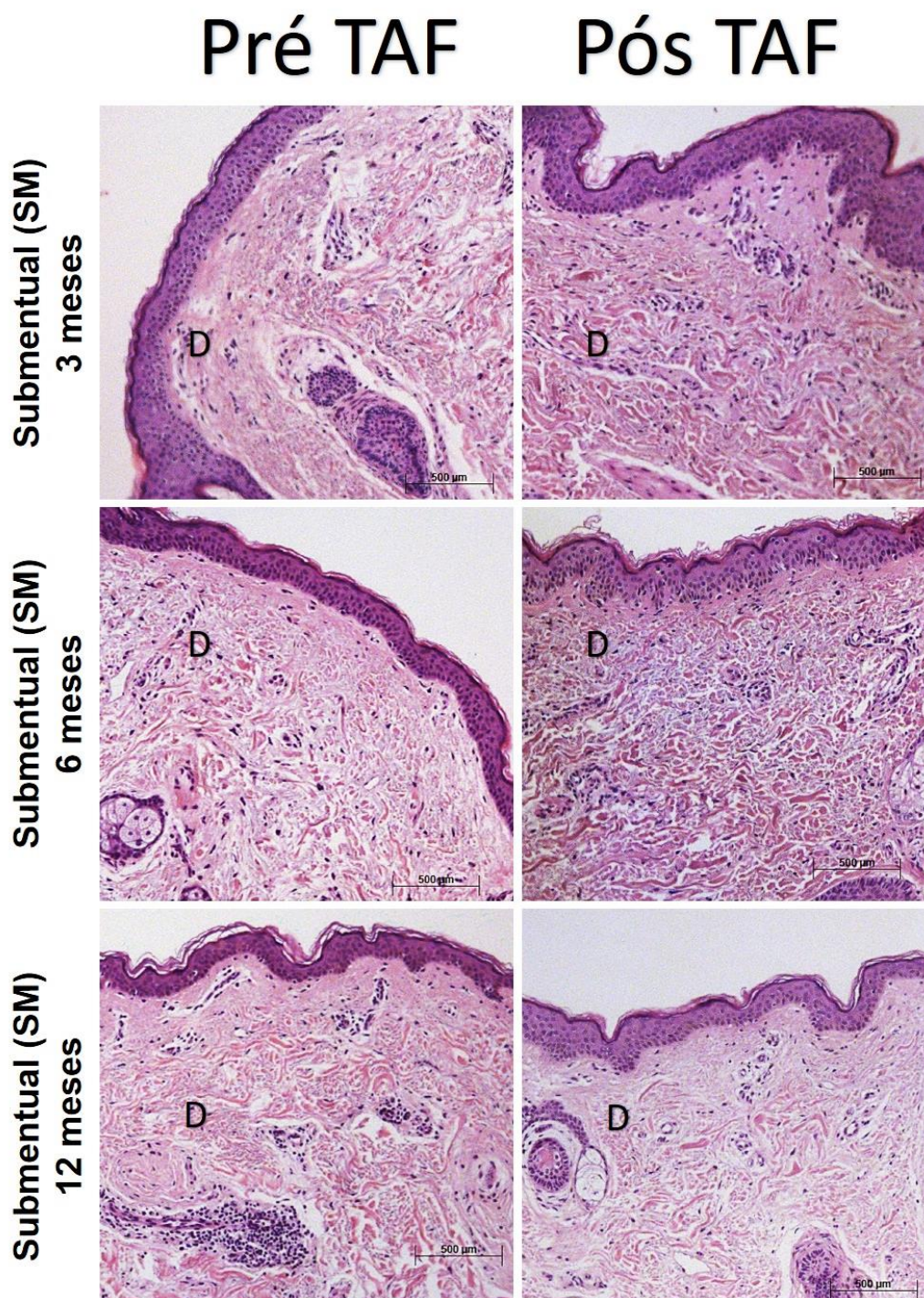
**Tabela 2** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à espessura da derme (em  $\mu\text{m}$ ) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	2.064	2.151	930	<b>0,020*</b>
		Pós	2.513	2.578	953	
	RA	Pré	2.581	2.837	1.064	0,706
		Pós	2.419	2.688	1.063	
	SM	Pré	2.828	3.037	1.123	<b>0,028*</b>
		Pós	3.142	3.503	1.090	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	765	774	231	<b>0,009*</b>
		Pós	896	916	251	
	RA	Pré	907	896	228	0,461
		Pós	942	1.026	286	
	SM	Pré	979	947	181	<b>0,047*</b>
		Pós	1.040	1.072	192	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	2.124	2.218	903	0,370
		Pós	2.229	2.499	862	
	RA	Pré	2.447	2.759	920	0,734
		Pós	2.384	2.457	915	
	SM	Pré	2.697	2.925	1.065	<b>0,035*</b>
		Pós	2.980	3.153	1.073	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submentual (SM).

\*p<0,05



**Figura 2** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a Espessura da derme nas áreas de estudo, com significância estatística (SM em três meses,  $p=0,028$ ; SM em seis meses,  $p=0,047$ ; e SM em 12 meses,  $p=0,035$ , respectivamente). D: Derme. Coloração: H.E.

Os cortes histológicos corados com H.E mostraram a vascularização da derme mais evidente com seis meses após o TAF, nas três regiões da face avaliadas, em comparação à condição pré-tratamento (Tabela 3, Figura3).

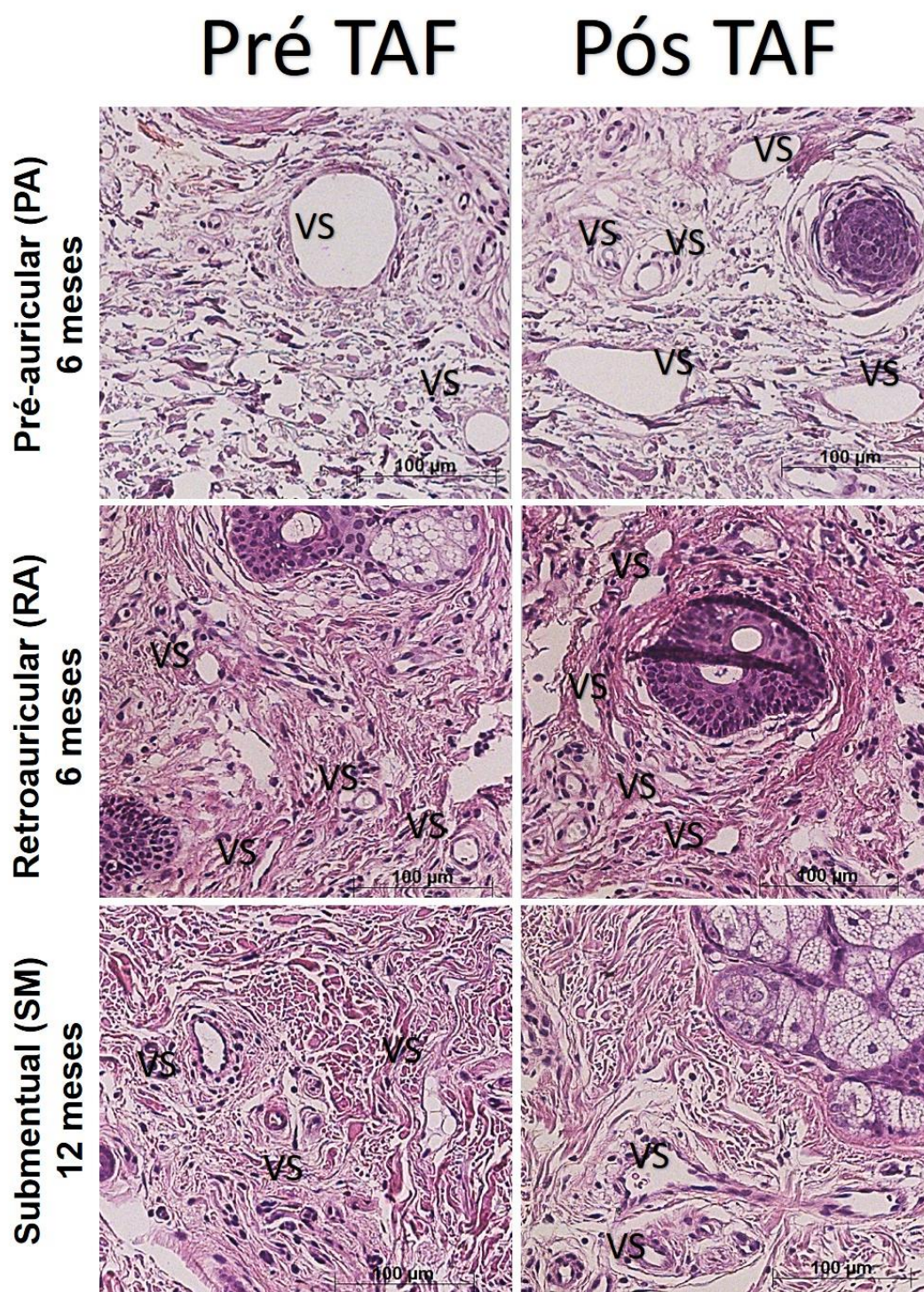
**Tabela 3** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à vascularização da derme (por  $\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	605,4	481,7	470,8	0,666
		Pós	626,0	467,4	736,1	
	RA	Pré	714,9	563,7	574,7	0,413
		Pós	584,6	517,4	308,7	
	SM	Pré	504,3	473,3	269,6	0,876
		Pós	494,1	390,9	275,0	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	571,2	434,8	386,2	<b>0,004*</b>
		Pós	903,1	735,8	613,4	
	RA	Pré	720,7	599,8	537,8	<b>0,034*</b>
		Pós	1.139,8	873,4	1.407,0	
	SM	Pré	549,6	491,2	322,6	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	859,6	740,7	623,0	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	476,5	453,1	285,5	0,153
		Pós	596,5	540,5	314,3	
	RA	Pré	641,6	470,1	496,4	0,753
		Pós	611,7	598,9	404,6	
	SM	Pré	499,3	423,5	320,9	0,371
		Pós	575,0	498,4	381,7	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submentual (SM).

\*p<0,05



**Figura 3** - Fotomicrografias de cortes histológicos mostrando a vascularização da derme nas áreas de estudo, com significância estatística (PA em seis meses,  $p=0,004$ ; RA em seis meses,  $p=0,034$ ; e SM em seis meses,  $p<0,001$ , respectivamente). VS: Vasos sanguíneos. Coloração: H.E.

Quanto ao índice de celularidade, mais núcleos celulares totais foram observados na derme das regiões RA e SM, três meses após o tratamento com TAF, em comparação ao pré-tratamento. Seis e 12 meses após o TAF, a derme da região RA apresentou maior presença de núcleos celulares totais, em comparação ao pré-tratamento. Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, o índice de celularidade se manteve significativamente maior, no período de três meses e menor nos períodos de seis e doze meses, em comparação à condição pré-tratamento (Tabela 4, Figura 4).

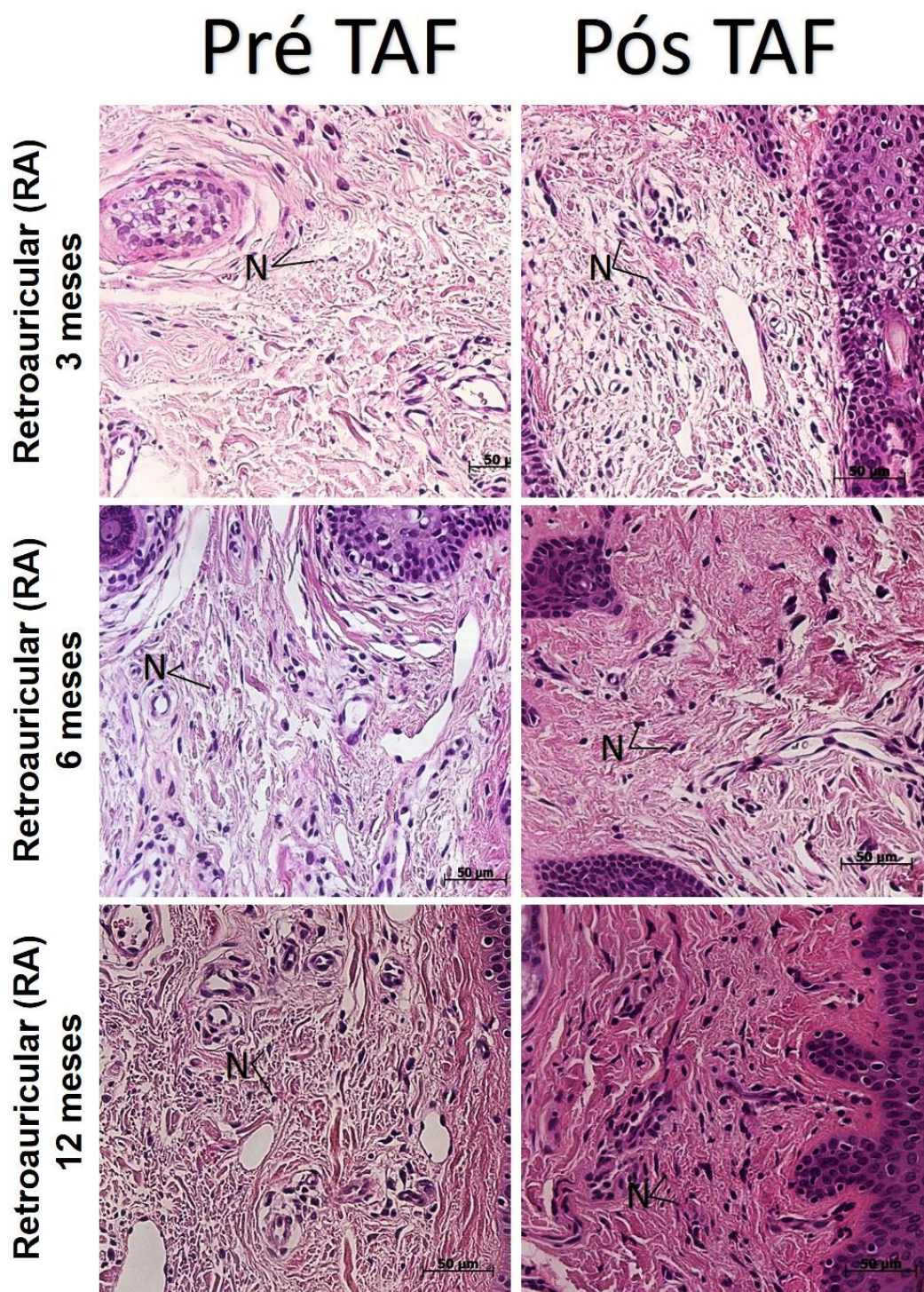
**Tabela 4** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto ao índice de celularidade ( $n^{\circ}/\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	166,8	153,0	81,5	0,754
		Pós	161,9	165,0	29,6	
	RA	Pré	184,9	167,0	72,5	<b>0,046*</b>
		Pós	223,7	233,0	38,3	
	SM	Pré	135,0	128,0	30,3	<b>0,016*</b>
		Pós	157,9	151,0	44,7	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	184,3	180,0	43,2	0,085
		Pós	161,0	138,0	75,2	
	RA	Pré	158,0	147,0	44,1	<b>0,016*</b>
		Pós	195,8	186,0	55,7	
	SM	Pré	154,4	147,0	47,5	0,366
		Pós	146,8	129,0	58,3	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	192,7	166,5	53,6	0,112
		Pós	167,1	142,0	49,2	
	RA	Pré	167,2	166,0	51,1	<b>0,041*</b>
		Pós	209,6	232,5	42,9	
	SM	Pré	193,8	201,5	70,4	0,157
		Pós	162,3	154,0	48,9	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\* $p < 0,05$

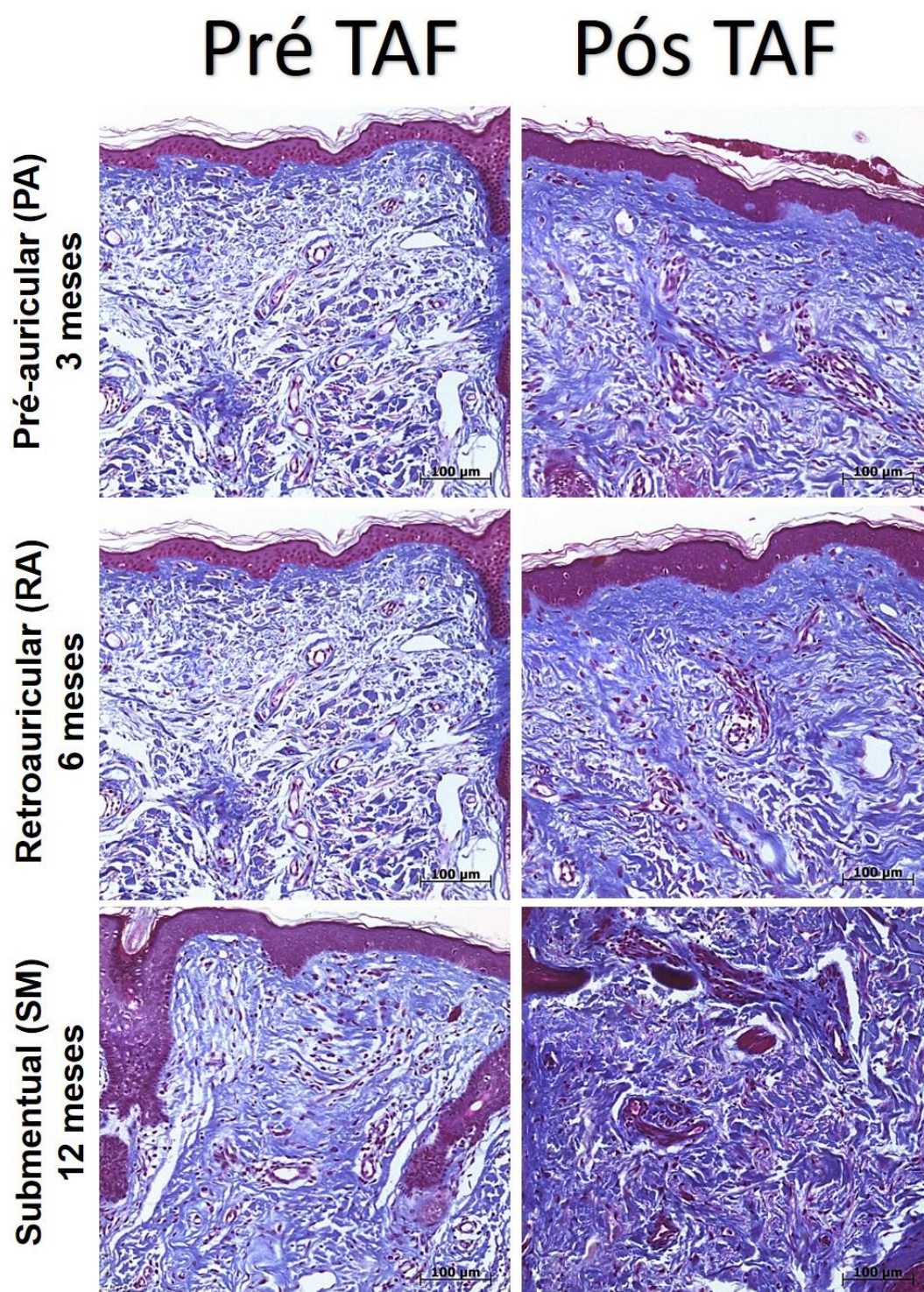


**Figura 4** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da derme, mostrando o índice de celularidade nas áreas de estudo, com significância estatística (RA em três meses,  $p=0,046$ ; RA em seis meses,  $p=0,016$ ; e RA em 12 meses,  $p=0,041$ , respectivamente). N: Núcleos celulares. Coloração: H.E.

### **5.2.2 Análise dos cortes corados com Tricrômico de Mason**

Na condição pré-tratamento, a derme da face das pacientes apresentou fibras colágenas mais delgadas, fragmentadas e orientadas mais esparsa (menos lineares e em paralelo), apresentando espaços entre os elementos fibrilares da matriz. Em contrapartida, após o tratamento com TAF, as fibras colágenas se apresentaram mais densamente agrupadas e organizadas em feixes espessos e paralelos ao longo da matriz extracelular. Foram observados menores espaços entre os elementos fibrilares da matriz, sobretudo, na região da derme papilar (Figura 5).





**Figura 5** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele, mostrando a distribuição das fibras colágenas na derme (coradas em azul) nos grupos controle, três, seis e 12 meses após TAF. Coloração: T.M.

### 5.2.3 *Picrosirius red*-Polarização: análise do tecido cutâneo

A análise da proporção entre as fibras de colágeno tipos III e I, por birrefringência, comparando-se os períodos pré e pós-tratamento, entre as três topografias analisadas, nos diferentes grupos de seguimento foi evidenciada na Tabela 5. Foi observado o ajuste na proporção entre os colágenos tipo III e I no seguimento de três meses nas regiões pré-auricular e submental, e aos 12 meses na região pré-auricular.

**Tabela 5** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à birrefringência das fibras colágenas (%) pelo método de *Picrosirius Red*-Polarização nas diferentes regiões analisadas.

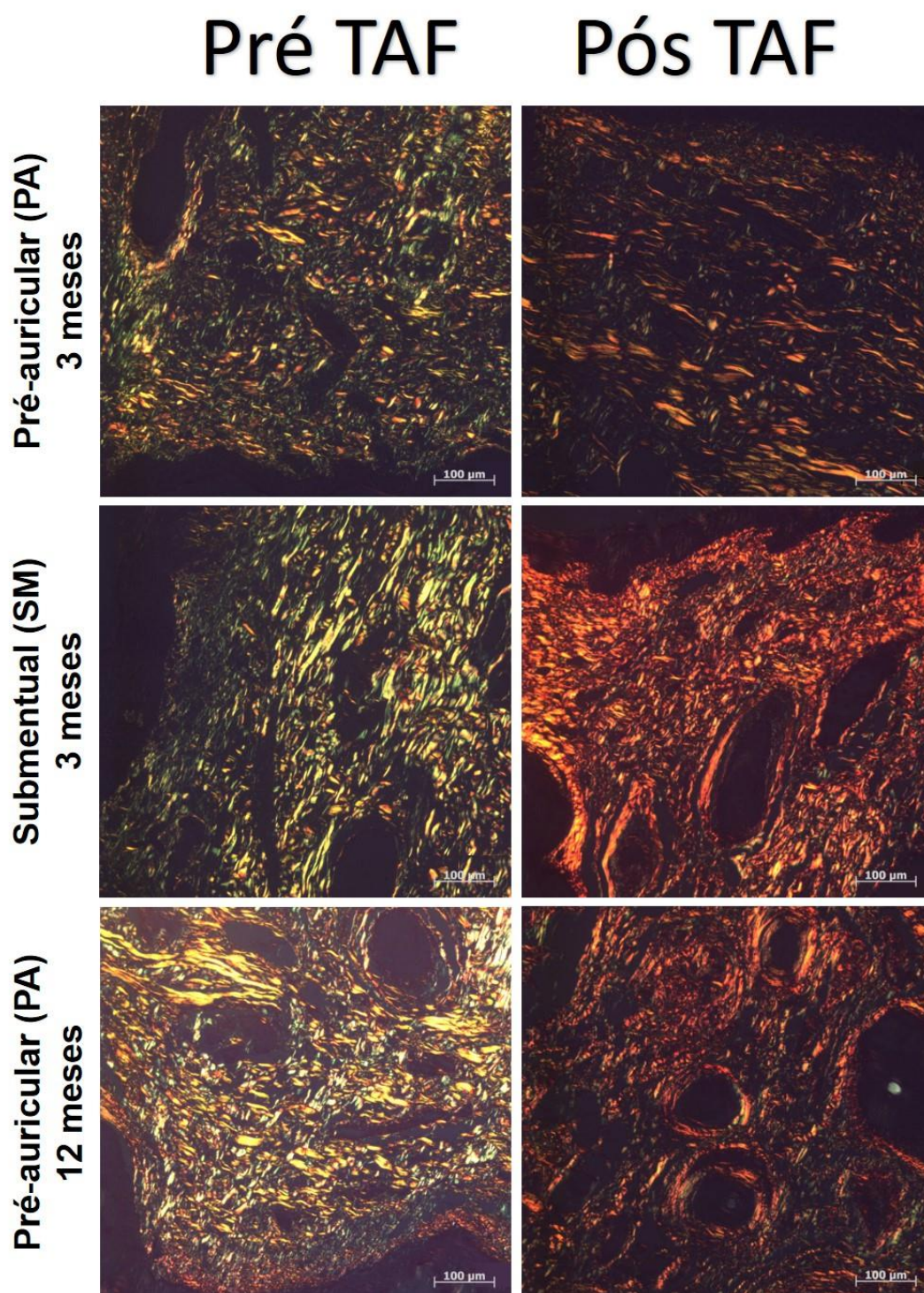
Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	P
Grupo 3 Meses	PA	Pré	11.497	12.310	3.787	<b>0,027*</b>
		Pós	8.921	7.785	3.073	
	RA	Pré	11.403	11.798	1.979	0,394
		Pós	11.125	10.474	4.482	
	SM	Pré	19.392	19.353	5.556	<b>0,033*</b>
		Pós	16.164	16.251	4.754	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	10.845	11.821	4.062	0,543
		Pós	10.725	11.861	2.915	
	RA	Pré	10.441	10.213	2.037	0,230
		Pós	12.135	11.543	4.850	
	SM	Pré	16.020	17.268	4.720	0,073†
		Pós	12.783	10.489	3.817	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	16.911	10.829	12.420	<b>0,014*</b>
		Pós	9.595	9.719	3.068	
	RA	Pré	16.947	15.039	11.232	0,058†
		Pós	11.278	10.204	4.693	
	SM	Pré	10.905	9.887	3.372	0,157
		Pós	13.039	11.453	3.804	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05

O colágeno tipo I tem forte birrefringência e foi evidenciado pelas colorações avermelhada e alaranjada na polarização; já o colágeno tipo III tem birrefringência fraca e apareceu mais esverdeado ou amarelado fraco na polarização (Figura 6).



**Figura 6** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porção da pele submetidos ao método de *Picrosirius Red*-Polarização, nas áreas de estudo, com significância estatística (PA em três meses,  $p=0,027$ ; SM em três meses,  $p=0,033$ ; e PA em 12 meses,  $p=0,014$ , respectivamente).

A tabela 6 reuniu as informações gerais das análises histomorfométricas, comparando as três regiões de estudo agrupadas (PA, RA e SM) entre os grupos pré e pós-TAF.

**Tabela 6** - Comparação dos dados das análises histomorfométricas das três regiões agrupadas (pré-auricular, retroauricular e submental) entre os grupos pré- e pós-tratamento com TAF.

Tipo de análise	Seguimento	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p	
Espessura Epiderme	Grupo 3 meses	Pré	124,0	120,5	48,8	0,243
		Pós	129,4	125,3	50,4	
	Grupo 6 meses	Pré	91,3	62,5	75,0	0,228
		Pós	71,6	55,3	46,0	
	Grupo 12 meses	Pré	124,5	118,2	50,5	<b>0,004*</b>
		Pós	139,3	136,1	51,6	
Espessura Derme	Grupo 3 meses	Pré	2.491	2.673	1.081	<b>0,013*</b>
		Pós	2.691	2.854	1.076	
	Grupo 6 meses	Pré	884	875	231	<b>0,002*</b>
		Pós	959	1.028	251	
	Grupo 12 meses	Pré	2.423	2.622	983	0,115
		Pós	2.531	2.689	998	
Vascularização	Grupo 3 meses	Pré	608,2	483,9	460,8	0,432
		Pós	568,2	469,0	486,7	
	Grupo 6 meses	Pré	613,8	493,3	428,7	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	967,5	751,1	956,7	
	Grupo 12 meses	Pré	539,1	447,4	382,5	0,285
		Pós	594,4	514,2	365,7	
Quantificação de Células	Grupo 3 meses	Pré	162,2	145,0	67,6	<b>0,008*</b>
		Pós	181,2	177,0	48,2	
	Grupo 6 meses	Pré	155,3	173,0	47,6	<b>0,004*</b>
		Pós	178,2	134,0	62,9	
	Grupo 12 meses	Pré	165,5	201,5	58,4	<b>0,004*</b>
		Pós	198,7	152,5	46,2	
Proporção das fibras de colágeno III e I por birrefringência	Grupo 3 meses	Pré	14.097	13.140	5.486	<b>0,003*</b>
		Pós	12.070	11.174	5.114	
	Grupo 6 meses	Pré	12.435	11.763	4.517	0,468
		Pós	11.881	11.543	3.972	
	Grupo 12 meses	Pré	14.921	11.195	10.090	0,065†
		Pós	11.304	10.780	4.091	

Teste de Wilcoxon. \*p<0,05.

### 5.3 Análises imuno-histoquímicas

#### 5.3.1 Imunopositividade ao *AE1 + AE3*

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica, para a detecção de citoqueratinas (AE1/AE3), evidenciaram imunopositividade na epiderme, nas três regiões da face analisadas de todas as pacientes, em todos os períodos pré e pós-tratamento com TAF. No entanto maior imunopositividade ao AE1/AE3 foi observada na epiderme da região submental, nos períodos de três e 12 meses pós-TAF (SM), com significância estatística em comparação à condição pré-tratamento dessa região (Tabela 7, Figura 7).

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas (pré-auricular, retroauricular e submental), antes e após o tratamento com TAF, esse mesmo padrão de imunopositividade foi encontrado. No período de seis meses após o TAF, maior imunopositividade foi encontrada, na região pré-auricular (PA), ainda com significância estatística quando comparada à condição pré-tratamento. Não foram observadas diferenças estatísticas, em outros períodos avaliados, quanto à imunopositividade ao AE1/AE3 (Tabelas 13).

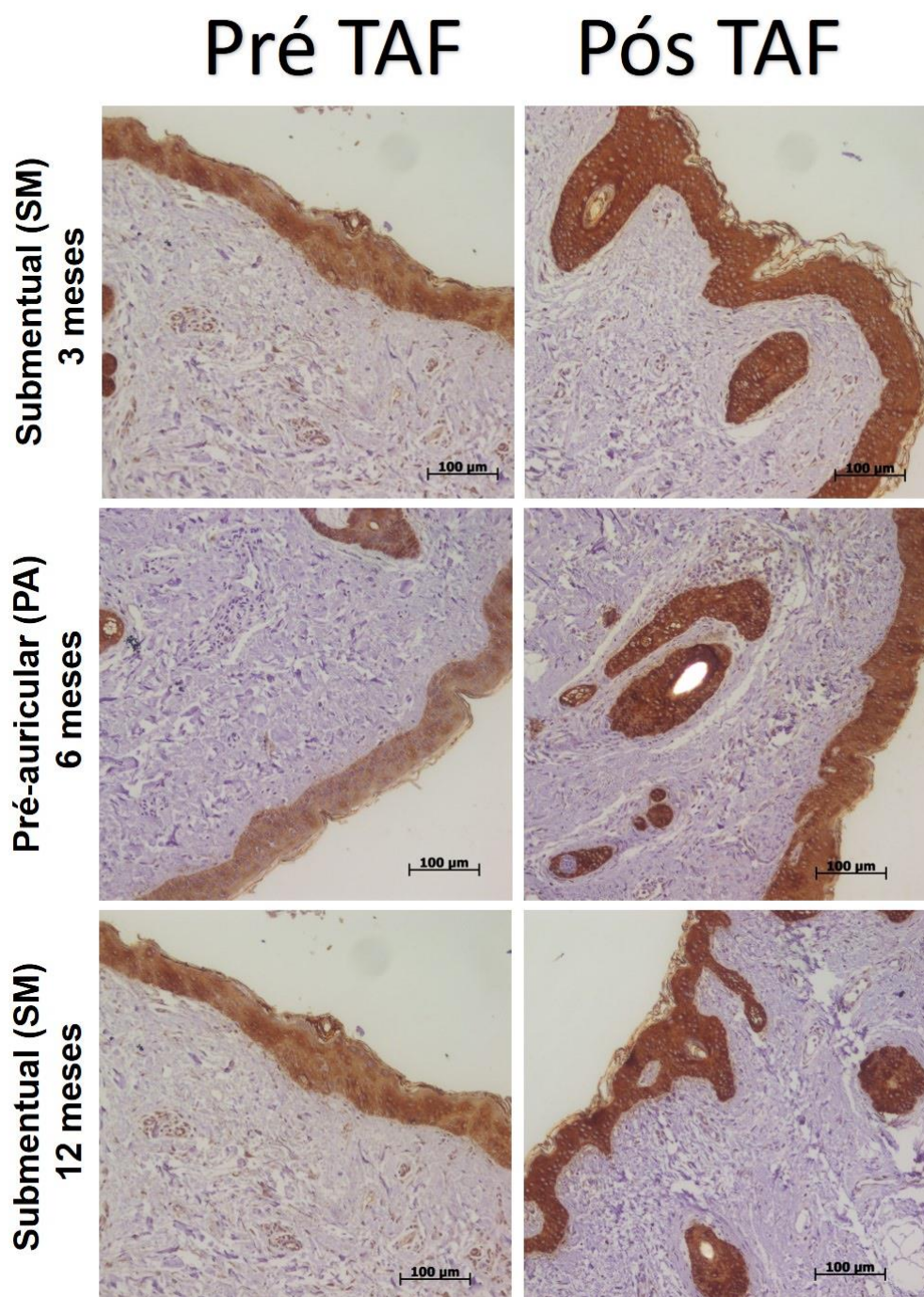
**Tabela 7** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade ao AE1/AE3 (citoqueratinas) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	72,54	73,37	11,02	0,054†
		Pós	78,57	78,53	5,32	
	RA	Pré	78,61	80,66	10,23	0,821
		Pós	79,47	77,65	5,96	
	SM	Pré	66,48	67,29	3,27	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	75,19	75,85	5,56	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	74,29	76,78	5,68	<b>0,046*</b>
		Pós	78,41	74,24	8,70	
	RA	Pré	75,95	75,50	6,44	0,566
		Pós	76,83	79,05	8,49	
	SM	Pré	74,37	75,85	5,16	0,958
		Pós	74,17	72,45	8,09	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	73,84	75,02	5,59	0,744
		Pós	74,97	72,64	8,67	
	RA	Pré	74,16	72,71	9,68	0,306
		Pós	76,46	76,12	9,38	
	SM	Pré	75,01	76,27	9,03	<b>0,002*</b>
		Pós	80,99	80,40	8,03	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05



**Figura 7** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de queratinócitos (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao AE1/AE3 da derme com significância estatística (SM em três meses,  $p < 0,001$ ; PA em seis meses,  $p = 0,046$ ; e SM em 12 meses,  $p < 0,002$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.



### 5.3.2. Densidade numérica de células imunopositivas à vimentina

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica, para a detecção de vimentina (células mesenquimais, por exemplo, fibroblasto), mostraram imunopositividade, na derme das três regiões da face analisadas de todas as pacientes, em todos os períodos antes e após o tratamento com TAF. Entretanto um número significativo maior de células imunopositivas foi observado, na região submental, no período de três meses após o TAF (SM), porém esse número foi significativamente menor, na região submental, no período de seis meses após o TAF, em comparação à condição pré-tratamento. No período de 12 meses após o TAF, o número de células imunopositivas foi significativamente maior, nas regiões pré-auricular (PA) e retroauricular (RA), quando comparado à condição pré-tratamento (Tabela 8, Figura 8).

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, o número de células imunopositivas à vimentina foi significativamente maior, nos períodos de três e 12 meses pós-TAF, em comparação à condição pré-tratamento. Diferenças estatisticamente significantes não foram observadas em outros períodos e regiões avaliados (Tabela 13).

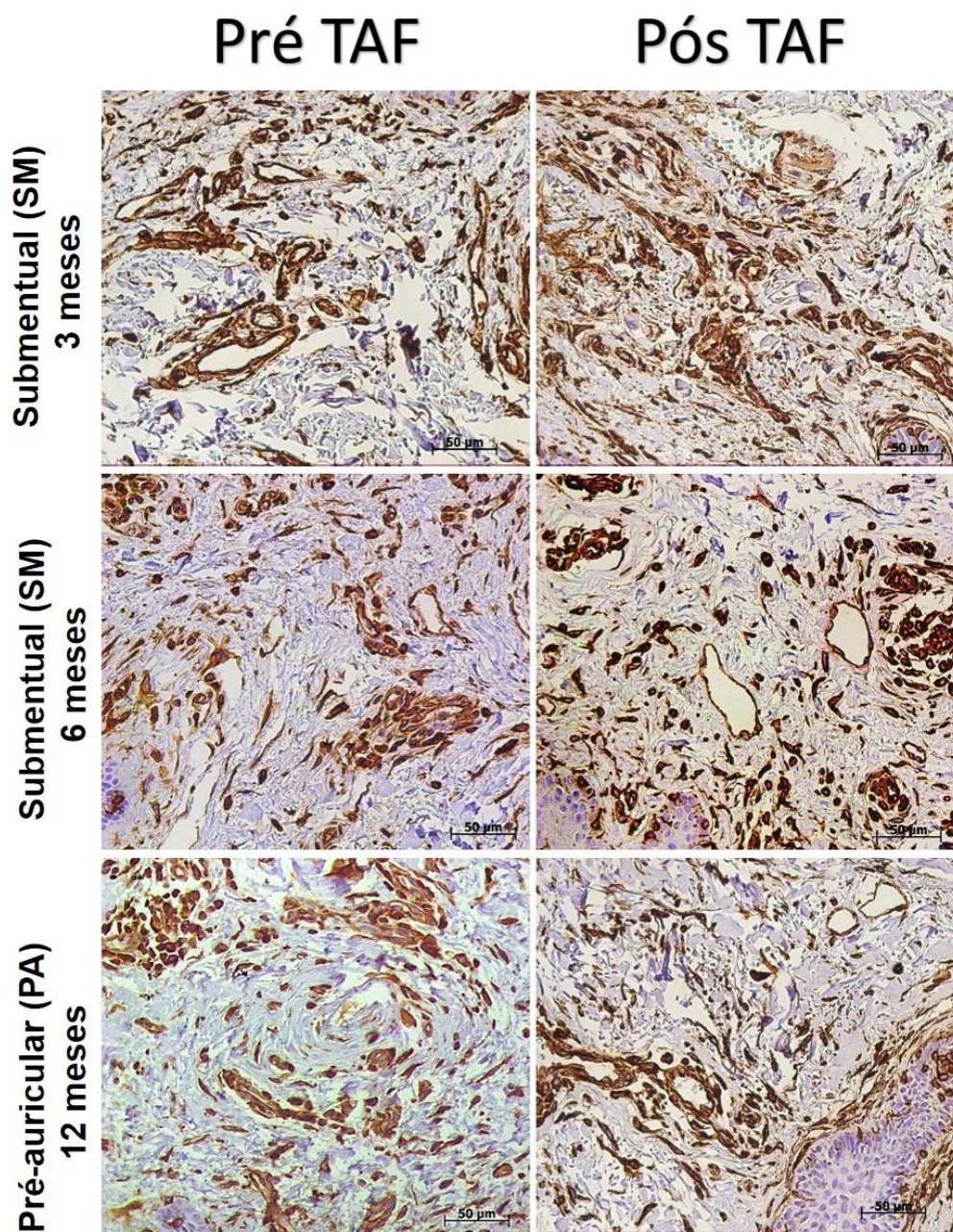
**Tabela 8** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à densidade numérica de células imunopositivas à vimentina (por  $\mu\text{m}^2$ ) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	0,876	0,88	0,067	0,364
		Pós	0,866	0,85	0,044	
	RA	Pré	0,893	0,89	0,019	0,173
		Pós	0,901	0,90	0,030	
	SM	Pré	0,807	0,81	0,015	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	0,888	0,89	0,034	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	0,866	0,86	0,050	0,353
		Pós	0,874	0,89	0,055	
	RA	Pré	0,879	0,88	0,047	0,586
		Pós	0,889	0,89	0,054	
	SM	Pré	0,838	0,89	0,051	<b>0,031*</b>
		Pós	0,878	0,83	0,055	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	0,851	0,86	0,058	<b>0,001*</b>
		Pós	0,909	0,91	0,030	
	RA	Pré	0,887	0,90	0,066	<b>0,046*</b>
		Pós	0,909	0,93	0,058	
	SM	Pré	0,829	0,82	0,052	0,052†
		Pós	0,871	0,87	0,040	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05



**Figura 8** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de Vimentina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à densidade numérica de células (por  $\text{mm}^2$ ) à vimentina da derme com significância estatística (SM em três meses,  $p < 0,001$ ; SM em seis meses,  $p = 0,031$ ; e PA em 12 meses,  $p < 0,001$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.

### 5.3.3. Imunopositividade à elastina

Os cortes submetidos à imuno-histoquímica evidenciaram imunopositividade à elastina (fibras elásticas), nas três regiões da face analisadas de todas as pacientes, em todos os períodos pré e após o tratamento com TAF. No entanto, no período de três meses após o TAF, a imunopositividade foi significativamente maior na região retroauricular (RA) e significativamente menor na região submental (SM), em comparação à condição pré-tratamento. No período de seis meses após o TAF, a imunopositividade à elastina se mostrou significativamente menor nas regiões pré-auricular (PA) e retroauricular (RA); em contrapartida, no período de 12 meses após o TAF; as regiões pré-auricular (PA) e retroauricular (RA) mostraram maior imunopositividade à elastina, em comparação à condição pré-tratamento (Tabela 9, Figura 9).

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, a imunopositividade à elastina foi significativamente menor, no período de seis meses, porém, significativamente maior, no período de 12 meses após o tratamento. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes em outros períodos e regiões avaliados (Tabela 13).

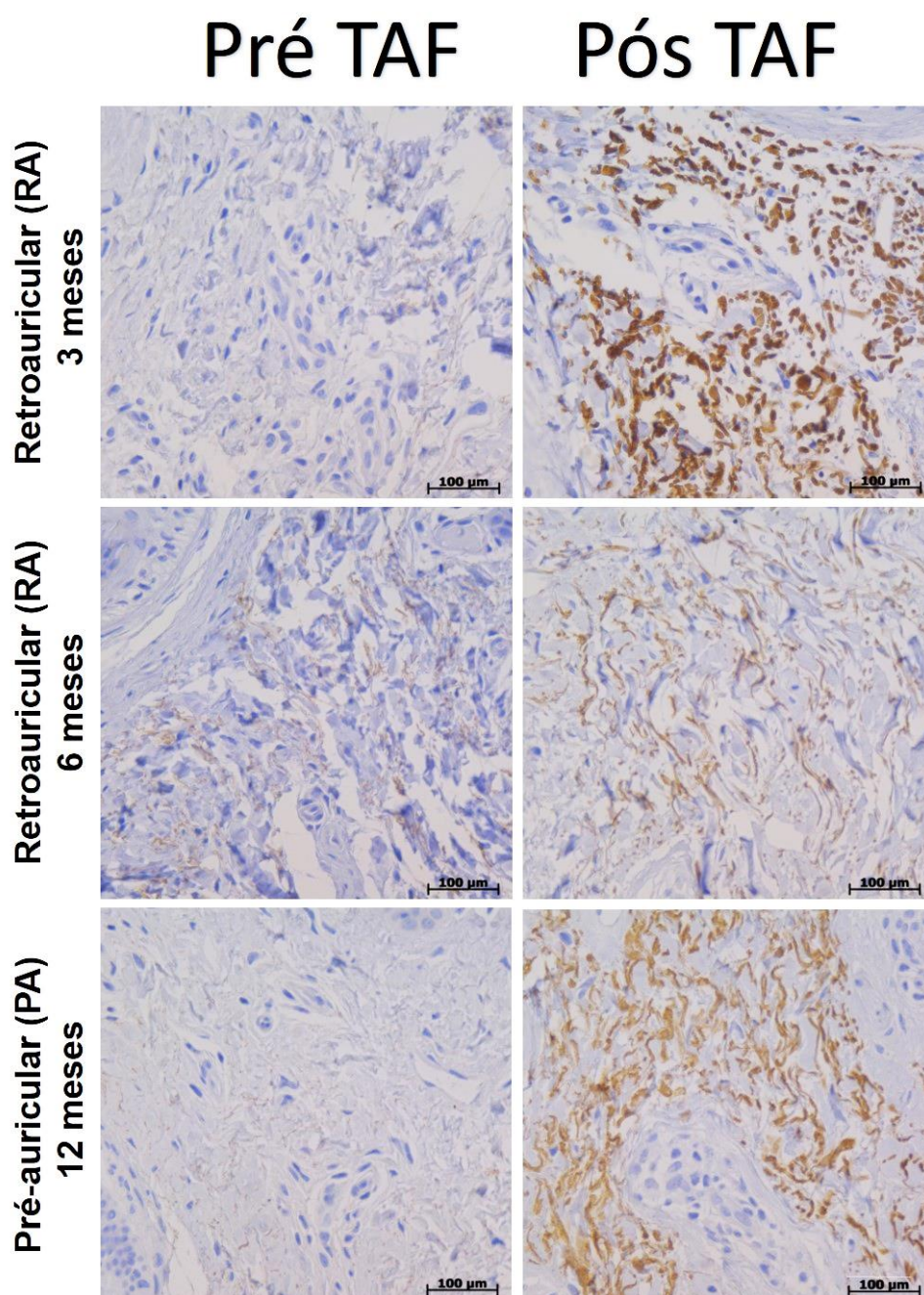
**Tabela 9** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade à elastina (%) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	77,22	77,56	7,95	0,192
		Pós	74,65	75,06	3,27	
	RA	Pré	71,80	72,43	4,85	<0,001*
		Pós	77,04	77,25	2,83	
	SM	Pré	69,91	70,91	4,29	0,011*
		Pós	71,43	69,61	2,24	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	71,78	76,12	3,21	0,040*
		Pós	75,13	69,18	7,09	
	RA	Pré	72,58	77,07	2,95	0,004*
		Pós	76,76	72,89	4,64	
	SM	Pré	71,16	70,81	2,68	0,404
		Pós	72,20	74,12	5,66	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	72,05	71,90	4,97	0,004*
		Pós	76,33	76,93	5,50	
	RA	Pré	73,06	73,18	5,08	0,039*
		Pós	75,83	75,41	3,21	
	SM	Pré	74,17	75,36	5,05	0,327
		Pós	73,12	73,39	4,13	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05



**Figura 9** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de elastina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) à elastina da derme com significância estatística (RA em três meses,  $p < 0,001$ ; RA em seis meses,  $p = 0,004$ ; e PA em 12 meses,  $p = 0,004$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.

#### 5.3.4. Imunopositividade ao colágeno tipo I

A imunopositividade ao colágeno tipo I (COL1) foi observada, na derme de todas as regiões analisadas da face das pacientes, em todos os períodos do pré e após o tratamento com TAF. No período de três meses após o TAF, essa imunopositividade foi significativamente maior, nas regiões retroauricular (RA) e submental (SM), em comparação à condição pré-tratamento. No período de seis meses após o TAF, a imunopositividade ao colágeno tipo I foi significativamente menor na região retroauricular (RA), quando comparada à condição pré-tratamento nessa região (Tabela 10, Figura 10).

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, a imunopositividade ao colágeno tipo I foi significativamente maior no período de três meses após o TAF, em comparação à condição pré-tratamento. Diferenças estatísticas significantes não foram observadas em outros períodos e regiões avaliados (Tabela 13).

**Tabela 10** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade ao colágeno tipo I (%) nas diferentes regiões analisadas.

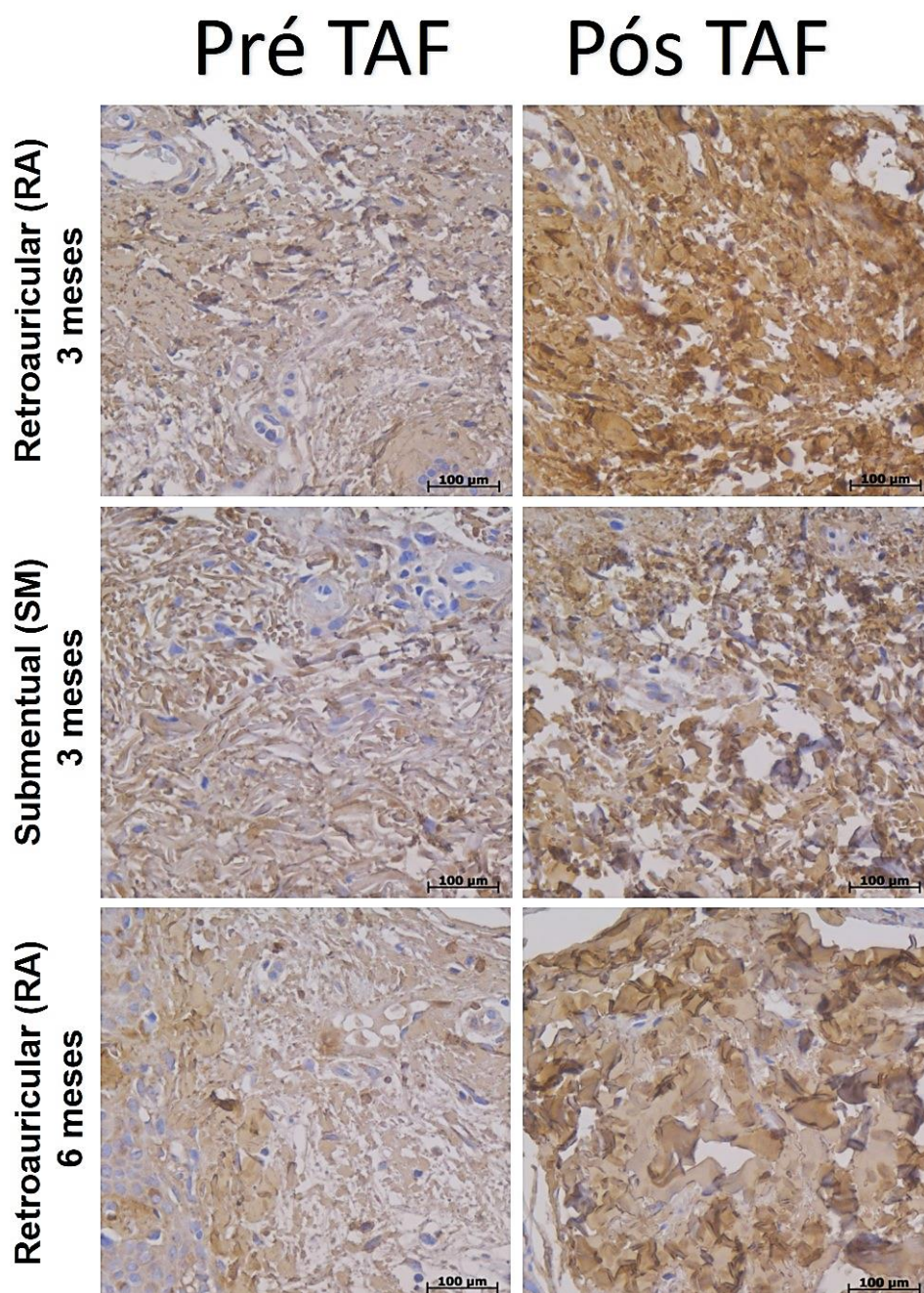
Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	P
Grupo 3 Meses	PA	Pré	56,42	56,34	13,07	0,414
		Pós	52,01	52,05	6,11	
	RA	Pré	49,13	49,18	5,46	<b>0,001*</b>
		Pós	55,80	55,86	3,80	
	SM	Pré	45,78	45,77	3,45	<b>0,001*</b>
		Pós	48,50	48,57	0,83	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	51,41	51,05	6,23	0,715
		Pós	52,35	52,47	9,76	
	RA	Pré	48,44	53,68	5,82	<b>0,003*</b>
		Pós	53,36	48,54	4,15	
	SM	Pré	49,65	48,69	3,96	0,889
		Pós	49,41	50,21	7,07	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	52,45	51,52	10,28	0,586
		Pós	54,00	51,91	8,12	
	RA	Pré	49,29	48,56	4,76	0,085†
		Pós	52,98	52,86	8,46	
	SM	Pré	51,99	51,47	5,94	0,557
		Pós	52,94	51,31	6,19	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05





**Figura 10** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de COL1 (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao COL1 da derme com significância estatística (RA em três meses,  $p=0,001$ ; SM em três meses,  $p=0,001$ ; e RA em seis meses,  $p=0,003$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.

### 5.3.5. Imunopositividade ao colágeno tipo III

A imunopositividade ao colágeno tipo III (COL3) foi observada na derme de todas as regiões analisadas da face das pacientes, em todos os períodos antes e após o tratamento com TAF. No período de três meses após o TAF, essa imunopositividade foi significativamente maior, em todas as regiões analisadas, em comparação à condição pré-tratamento. No período de seis meses após o TAF, a imunopositividade ao colágeno tipo III foi significativamente maior na região pré-auricular (PA) e, significativamente menor na região submental (SM), quando comparada a essas regiões antes do tratamento. No período de 12 meses após o TAF, essa imunopositividade foi significativamente maior na região submental (SM), em comparação à condição pré-tratamento (Tabela 11, Figura 11).

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, a imunopositividade ao colágeno tipo III foi significativamente maior, no período de três meses após o TAF, em comparação à condição pré-tratamento. Não foram observadas diferenças com significância estatística em outros períodos e regiões avaliados (Tabela 13).

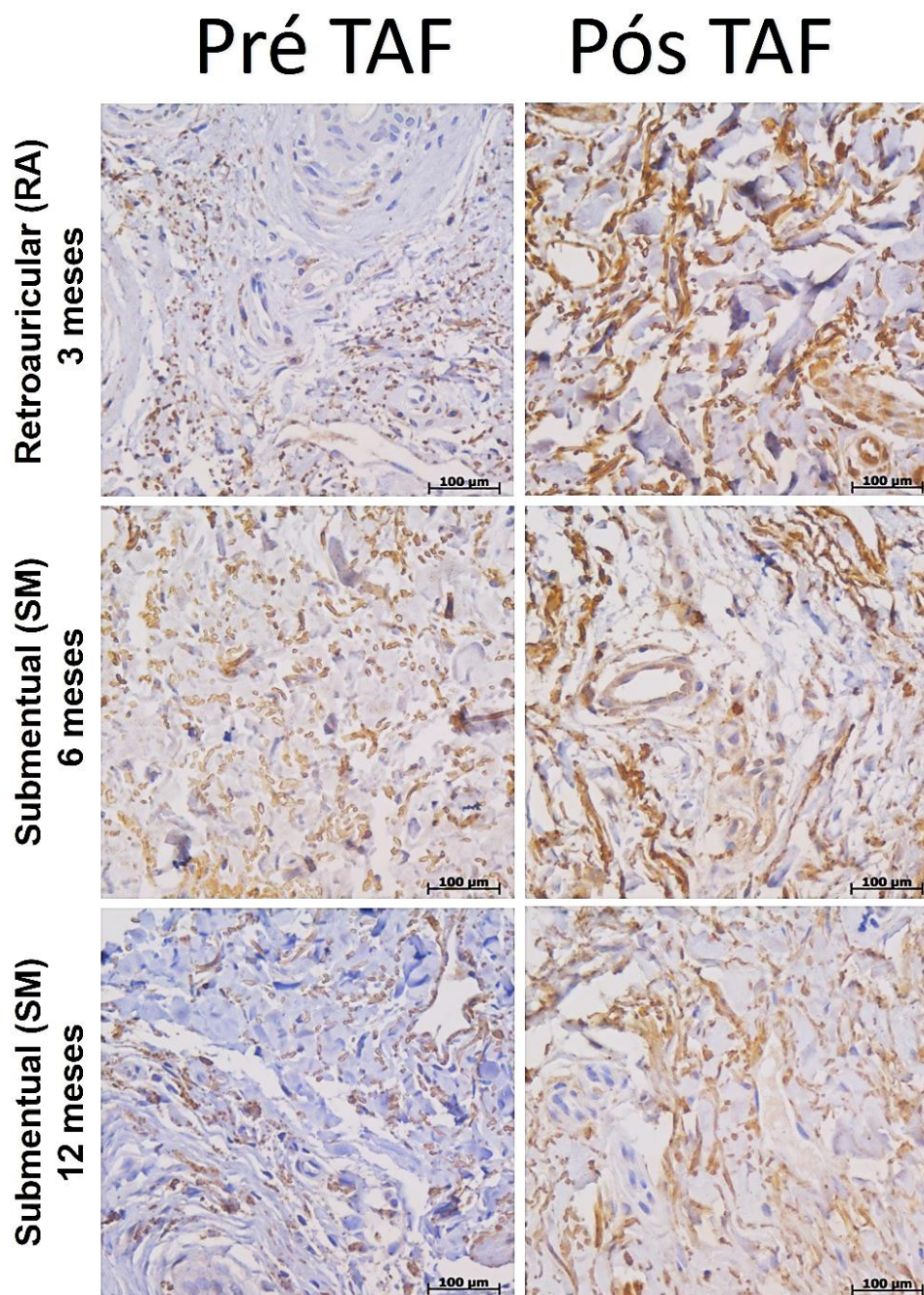
**Tabela 11** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade ao colágeno tipo III (%) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	68,76	73,61	5,19	<b>0,001*</b>
		Pós	73,76	68,74	3,44	
	RA	Pré	69,12	69,12	3,68	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	76,16	76,15	2,39	
	SM	Pré	66,61	66,62	2,47	<b>0,019*</b>
		Pós	69,84	69,95	4,04	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	68,50	69,66	5,39	<b>0,017*</b>
		Pós	72,23	73,07	6,37	
	RA	Pré	70,90	69,82	4,85	0,502
		Pós	68,93	70,46	5,79	
	SM	Pré	68,77	72,79	3,98	<b>0,014*</b>
		Pós	72,63	69,05	4,06	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	71,00	71,33	4,98	0,396
		Pós	69,67	70,68	6,58	
	RA	Pré	69,46	69,85	7,71	0,948
		Pós	70,79	71,10	2,97	
	SM	Pré	68,24	68,73	5,90	<b>0,035*</b>
		Pós	72,70	73,67	2,88	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05



**Figura 11** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de COL3 (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) ao COL3 da derme com significância estatística (RA em três meses,  $p < 0,001$ ; SM em seis meses,  $p = 0,014$ ; e SM em 12 meses,  $p = 0,035$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.

### **5.3.6. Imunopositividade à fibronectina**

A imunopositividade à fibronectina foi observada na derme de todas as regiões analisadas da face das pacientes, em todos os períodos pré e após o tratamento com TAF. No período de três meses após o TAF, a imunopositividade à fibronectina foi significativamente menor, na região pré-auricular (PA) e significativamente maior, nas regiões retroauricular (RA) e submental (SM), em comparação à condição pré-tratamento. No período de seis meses após o TAF, a imunopositividade à fibronectina foi significativamente maior, nas três regiões da face analisadas, quando comparada à imunopositividade dessas regiões antes do tratamento. No período de 12 meses após o TAF, a imunopositividade foi significativamente maior na região submental (SM), em comparação à condição pré-tratamento (Tabela 12, Figura 12).

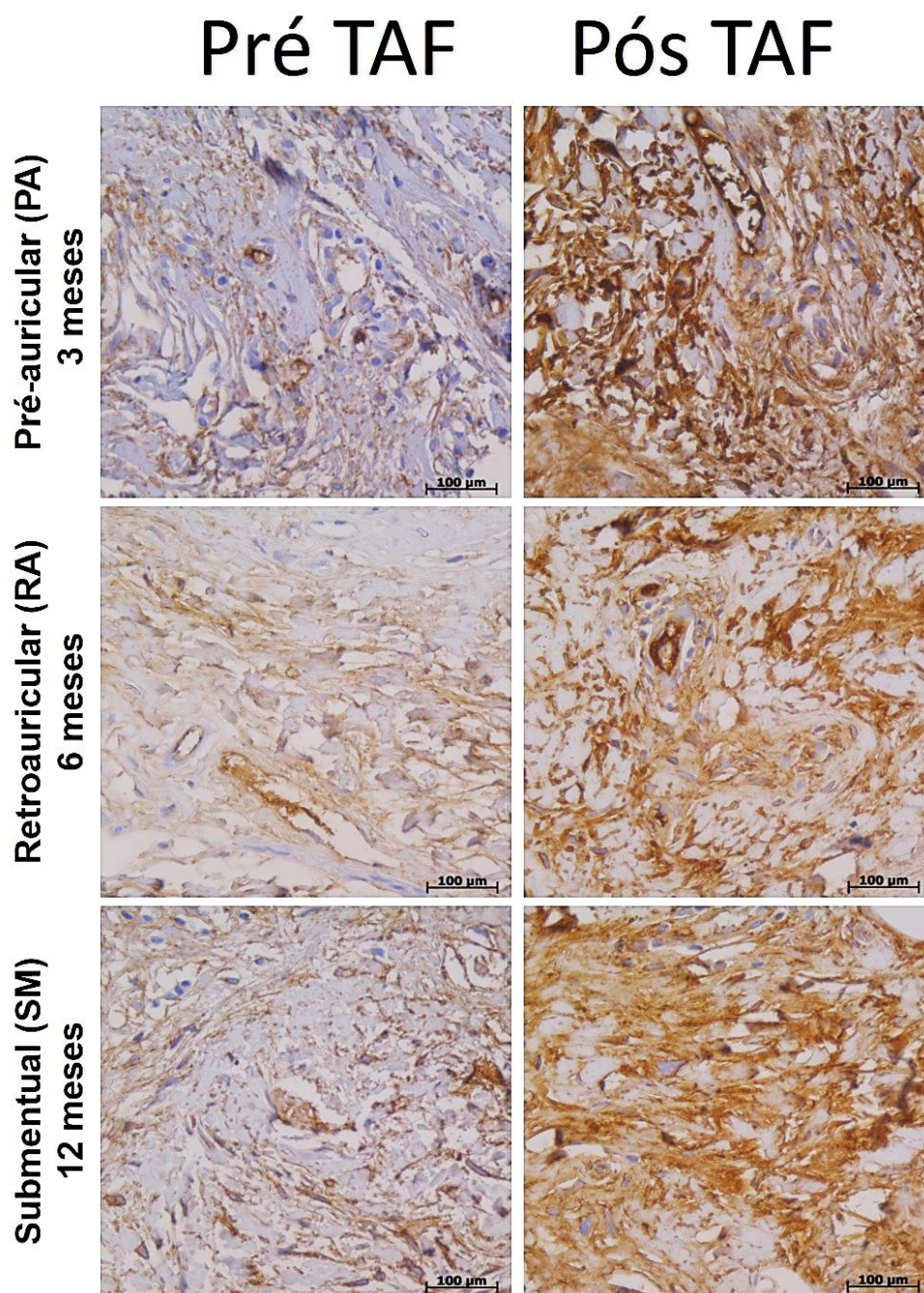
**Tabela 12** - Comparação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade à Fibronectina (%) nas diferentes regiões analisadas.

Seguimento	Topografia	Período	Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Grupo 3 Meses	PA	Pré	56,26	70,76	5,64	<0,001*
		Pós	70,75	55,68	3,43	
	RA	Pré	61,88	61,89	3,09	<0,001*
		Pós	65,39	65,83	2,39	
	SM	Pré	55,69	55,73	4,94	<0,001*
		Pós	61,20	60,09	4,35	
Grupo 6 Meses	PA	Pré	56,83	57,18	4,18	0,003*
		Pós	62,65	61,86	7,53	
	RA	Pré	60,08	60,87	6,62	0,003*
		Pós	65,91	67,69	6,65	
	SM	Pré	60,32	59,05	4,81	0,007*
		Pós	65,58	65,87	6,12	
Grupo 12 Meses	PA	Pré	61,90	63,37	8,94	0,420
		Pós	63,03	63,05	8,15	
	RA	Pré	67,90	67,78	6,05	0,845
		Pós	67,47	67,66	5,50	
	SM	Pré	60,39	60,94	4,98	0,002*
		Pós	67,09	67,09	5,10	

Teste de Kruskal-Wallis.

Legenda: topografias pré-auricular (PA), retroauricular (RA) e submental (SM).

\*p<0,05



**Figura 12** - Fotomicrografias de cortes histológicos de porções da pele submetidas às reações imuno-histoquímicas para a detecção de fibronectina (evidenciadas em marrom). Avaliação entre o pré e o pós-tratamento com TAF, para cada grupo de seguimento, quanto à imunopositividade (%) à fibronectina da derme com significância estatística (RA em três meses,  $p < 0,001$ ; SM em seis meses,  $p = 0,003$ ; e SM em 12 meses,  $p = 0,002$ , respectivamente). Contracoloração: Hematoxilina.

Quando comparados os dados das três regiões da face agrupadas, antes e após o tratamento com TAF, a imunopositividade à fibronectina foi significativamente maior, no período de seis meses após o TAF, em comparação à condição pré-tratamento. Diferenças com significância estatística não foram observadas em outros períodos e regiões avaliados (Tabela 13).



**Tabela 13** - Comparação dos dados das análises imuno-histoquímicas das três regiões agrupadas (pré-auricular, retroauricular e submental) entre os grupos pré- e pós-tratamento com TAF.

Tipo de análise	Seguimento		Média	Mediana	Desvio-Padrão	p
Quantificação de Queratinócitos (AE1+AE3)	Grupo 3 meses	Pré	72,5	72,1	10,1	<b>0,001*</b>
		Pós	77,7	77,2	5,8	
	Grupo 6 meses	Pré	76,2	75,9	5,9	0,538
		Pós	75,1	74,3	8,4	
	Grupo 12 meses	Pré	74,3	74,3	8,2	<b>0,009*</b>
		Pós	77,5	76,6	8,9	
Quantificação de Vimentina ( <i>Vimentin</i> )	Grupo 3 meses	Pré	0,859	0,880	0,055	<b>0,001*</b>
		Pós	0,885	0,890	0,039	
	Grupo 6 meses	Pré	0,874	0,870	0,049	0,739
		Pós	0,867	0,880	0,058	
	Grupo 12 meses	Pré	0,856	0,860	0,063	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	0,896	0,910	0,047	
Quantificação de Elastina ( <i>Elastin</i> )	Grupo 3 meses	Pré	73,5	72,5	6,4	0,435
		Pós	73,9	74,3	4,1	
	Grupo 6 meses	Pré	72,2	74,7	3,7	<b>0,012*</b>
		Pós	74,4	72,2	5,8	
	Grupo 12 meses	Pré	73,1	73,0	5,0	<b>0,012*</b>
		Pós	75,1	75,2	4,5	
Quantificação de Colágeno tipo I (COL1)	Grupo 3 meses	Pré	50,4	48,5	9,4	<b>0,012*</b>
		Pós	52,1	51,1	5,1	
	Grupo 6 meses	Pré	51,5	50,1	5,6	0,167
		Pós	50,1	49,5	7,4	
	Grupo 12 meses	Pré	51,2	50,4	7,4	0,077
		Pós	53,3	52,4	7,5	
Quantificação de Colágeno tipo III (COL3)	Grupo 3 meses	Pré	69,8	69,0	4,9	<b>0,031*</b>
		Pós	71,6	70,8	4,7	
	Grupo 6 meses	Pré	70,7	70,5	5,0	0,717
		Pós	70,0	70,5	5,6	
	Grupo 12 meses	Pré	69,6	70,2	6,3	0,312
		Pós	71,1	71,8	4,6	
Quantificação de Fibronectina ( <i>Fibronectin</i> )	Grupo 3 meses	Pré	62,8	61,9	7,7	0,686
		Pós	60,9	60,7	5,1	
	Grupo 6 meses	Pré	59,1	58,6	5,5	<b>&lt;0,001*</b>
		Pós	64,7	65,0	6,8	
	Grupo 12 meses	Pré	63,8	62,9	7,4	0,124
		Pós	65,5	66,0	6,8	

Teste de Wilcoxon. \*p<0,05.

## **6 DISCUSSÃO**

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo recebeu fragmentos de pele de pacientes mulheres submetidas ao TAF e seguidas, periodicamente, em três, seis e 12 meses. Nesse seguimento, foram randomizadas quanto à obtenção dos fragmentos cutâneos (biópsia por *punch*), para as avaliações histológicas e imunohistoquímicas da pele, em comparação à pele (controle) obtida no período pré-tratamento.

Diferentemente dos demais artigos na literatura, no estudo temático do qual o presente estudo teve sua origem, padronizaram-se os critérios de inclusão das pacientes, a fim de uniformizar e homogeneizar a casuística, com mulheres adultas, fototipo cutâneo III de Fitzpatrick e fotoenvelhecimento da face. Esse rigor consistiria no interesse em estabelecer uma população passível de se traçar paralelos com outros estudos similares e enriquecer as discussões, pois tratou-se das características cutâneas (fenotípicas) de uma das populações habitualmente requerente dos procedimentos de rejuvenescimento e regeneração da pele da face. Em contrapartida, os estudos preexistentes pertinentes ao tema do TAF, para a regeneração ectomesenquimal e mesodérmica da face, incluíram, geralmente, pacientes de ambos os sexos, adultos, sem designar o fototipo da pele ou outra especificação, associando o tratamento de cicatrizes atróficas e ritidose facial, com ou sem atribuição ao fotoenvelhecimento (SOLAKOGLU, TIRYAKI, CILOGLU, 2008; ZHAO et al., 2008; SMITH

et al., 2012; MACHALIŃSKI et al., 2016; ITAYA et al., 2017; ZORIN et al., 2017; GREYER-BECK et al., 2020). Ademais, o número de pacientes incluídos é variável e, na maioria, em número reduzido. Nesse contexto, a população dos pacientes submetidos ao TAF compreende uma população heterogênea, de modo que as discussões e conclusões devem ser cautelosas, sem extrapolações, uma vez que os grupos estudados não são comparáveis.

Em uma análise integral do tecido cutâneo, a pele após o TAF, mostrou-se nas colorações tanto pelo H.E. quanto pelo T.M. com aumento significativo da espessura da epiderme em 12 meses. Observou-se também, o aumento significativo da espessura da derme em três e seis meses, e uma tendência ao aumento com 12 meses. Houve melhora da organização da derme (com enfoque na região papilar), apresentando as fibras colágenas mais densas, mais realinhadas e arranjo em paralelo. Quanto ao índice de celularidade, para os três períodos de tempo, observou-se aumento significativo na população celular, evidenciando o repovoamento da pele fotoenvelhecida e sua manutenção ao longo do tempo.

Esses achados corroboraram com as primeiras pesquisas no assunto do TAF, como WATSON *et al.* (1999), em que os autores verificaram aumento na densidade celular dos fibroblastos e na espessura da derme nas áreas tratadas com o TAF, sem haver características histológicas inflamatórias locais. Ainda, pesquisa mais recente também evidenciou tais modificações na pele. MACHALIŃSKI *et al.* (2016) encontraram, em amostras de pele coletadas três meses após o TAF, tanto o número de fibroblastos na derme quanto o diâmetro dos feixes de colágeno foram significativamente maiores em comparação à pele antes do tratamento ( $p < 0,001$ ). Também, relataram o aumento da densidade de fibras reticulares, fibrilina-1 ricas em microfibrilas, e fibras elásticas.

O envelhecimento cutâneo está intimamente relacionado à dinâmica do fibroblasto no tecido, com a diminuição da sua população na derme, redução de motilidade, proliferação e, principalmente, redução da produção de colágeno e outras proteínas da MEC (ZORIN *et al.*, 2017). Estudos *in vitro* demonstraram que os fibroblastos ainda mantêm um potencial proliferativo (quiescente), na pele de adultos e idosos, garantindo-lhes potencial reparador e regenerador (passível de ser estimulado e reiniciado) independentemente da idade do paciente (MACHALIŃSKI *et al.*, 2016; ZORIN *et al.*, 2017). Nesse sentido, o aumento no índice de celularidade observado no presente estudo poderia inferir também um aumento na população de fibroblastos, confirmado posteriormente pela imunopositividade à vimentina, bem como estimulando a funcionalidade desse tipo celular pela produção de colágeno e outras proteínas da MEC, conforme resultados do presente estudo.

Ainda, quanto às demais avaliações histológicas realizadas, o presente estudo encontrou aumento significativo na vascularização apenas no período de seis meses após o TAF. De maneira geral, o fotoenvelhecimento cutâneo apresenta um aumento dos vasos sanguíneos da pele e sua dilatação (HELFRICH *et al.*, 2015). BASSETTO *et al.* (2013) identificaram, em seu estudo, a viabilidade do TAF no tecido, em todo o período estudado (12 meses). Após três meses do TAF, bem como com sete e 12 meses, foi identificada atividade de anticorpo específico CD31 para células endoteliais, sugerindo neovascularização após a transferência celular. Foram identificadas as presenças de células gigantes ao redor de áreas que receberam o TAF, entre sete e 12 meses do procedimento. Porém, não se verificou reação granulomatosa ou infiltração leucocitária. O padrão dos feixes de colágeno sofreu reorganização progressiva e, aos 12 meses, era

semelhante ao dos feixes grossos de fibras de colágeno encontrados na derme reticular, com fibroblastos distribuídos de forma ordenada, ao contrário do arranjo grosseiro e desorganizado encontrado em cicatrizes patológicas, hipertrófica e quelóide, por exemplo. Dessas considerações, poder-se-ia inferir que o traumatismo no tecido associado ao TAF e sua distribuição topográfica na face (perfuração da agulha e injeção intradérmica), por exemplo, não estimularia uma resposta cicatricial intensa, pró-inflamatória, capaz de interferir negativamente à regeneração do tecido cutâneo.

A birrefringência dos colágenos III e I apresentou significância nas áreas estudadas em três e 12 meses e, na avaliação global, apenas com três meses. À vista disso, verificou-se, a presença de mais colágeno do tipo I na pele após o TAF. É sabido que na pele do indivíduo adulto, há maior produção de colágeno do tipo I em relação ao tipo III, determinando uma relação de cerca de 6:1 (BURGESON *et al.*, 1976), porém, menores quantidades de ambos os colágenos e uma menor proporção de colágeno I : III são observados na faixa etária idosa (RONG *et al.*, 2008). Ainda, cerca de 40% da produção de colágeno do tipo III se reduz na pele fotoenvelhecida (SCHWARTZ *et al.*, 1993). O presente estudo apresentou um ajuste na proporção entre os tipos de colágenos e suas produções, indicando efeito do TAF no tecido fotoenvelhecido.

Na investigação por imuno-histoquímica, a análise comparativa das regiões investigadas, pré e pós-tratamento, nos três períodos de seguimento, evidenciou significância estatística, em todos os marcadores verificados. A marcação pelo coquetel de anticorpo para citoqueratinas (AE1/AE3), o qual detecta células epiteliais que expressam queratina, apresentou marcação mais robusta e aumento significativo em três e 12 meses de seguimento após o TAF. Regularmente, a pele fotoenvelhecida apresenta maior taxa de

proliferação da epiderme (queratinócitos), heterogeneidade dos queratinócitos na camada basal e disqueratose, resultando primeiramente em hipertrofia dessa camada (no início do dano solar), mas sua atrofia a longo prazo. A caracterização da casuística do estudo temático, o qual atribuiu as amostras de pele para o presente estudo, foi elaborada para homogeneizar as características da pele fotoenvelhecida e, como resultado do TAF, observou-se maior marcação na epiderme e organização estratificada dessa camada. Atualmente, sabe-se que o fibroblasto possui um papel central na homeostase, diferenciação e cicatrização da pele, bem como na estruturação da derme (JEVTIĆ *et al.*, 2020). Quando estão em reduzido número ou com sua funcionalidade atenuada, há também prejuízo na estruturação da epiderme, interferindo na diferenciação dos queratinócitos basais e prejudicando toda a estratificação dessa camada (EL-GHALBZOURI *et al.*, 2002; JEVTIĆ *et al.*, 2020). Ou seja, o aumento no índice de celularidade da derme, potencialmente pelo aumento da população de fibroblastos na derme, estimularia também a organização e funcionalidade da epiderme.

A vimentina (marcador de célula mesotelial) é uma proteína estrutural, compondo os filamentos intermediários de células mesenquimais no citoesqueleto, microtúbulos e microfilamentos de actina, atuando como principal componente de ancoragem e estabilização celular, inclusive do fibroblasto (CHENG *et al.*, 2016). O seu aumento significativo foi observado nos três períodos, quando comparadas as regiões da face avaliadas no presente estudo. Isso compreenderia com o aumento populacional de fibroblastos após o TAF, aumentando a produção dessa importante estrutural na pele, bem como desempenhando um papel regulador central na arquitetura das fibras colágenas (OSTROWSKA-PODHORODECKA & MCCULLOCH, 2021). ZORIN *et al.* (2017), em seu estudo clínico,

verificaram que as regiões onde aplicaram o TAF na face apresentavam agregação de fibroblastos, na histologia, e com intensa marcação de vimentina, pela imuno-histoquímica. Também, o TAF contribuiu para um aumento na espessura da derme, em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ), após um e 12 meses.

A marcação pela elastina foi observada com aumento significativo em três, seis e 12 meses de segmento. Essa presença poderia indicar a elastogênese promovida (quantidade e qualidade das fibras elásticas) tanto pelos fibroblastos regionais reativados pelo TAF, como pelos fibroblastos trazidos à derme pelo TAF (WEIHERMANN *et al.*, 2017). Isso acarretaria em uma melhora clínica observada pelo ganho de elasticidade da pele, uma vez que a pele fotoenvelhecida é caracterizada pela elastose, material elastótico desorganizado depositado na derme substituindo a arquitetura normal da fibra elástica (SOLAKOGLU, TIRYAKI, & CILOGLU, 2008; ZHANG & DUAN, 2018).

Quanto às marcações para os colágenos dos tipos I e III, o presente estudo evidenciou aumento significativo para ambos, principalmente o do tipo III, com maior expressão em todos os três períodos de seguimento após o TAF. O fotoenvelhecimento cutâneo acarreta em modificações no tamanho, por fragmentação, e na organização das fibras colágenas (KHAVKIN & ELLIS, 2011; TOBIN, 2017). E, embora já mencionado anteriormente, o fotoenvelhecimento também afeta a proporção entre os colágenos tipos I e III, pela redução na produção e em sua modulação (SCHWARTZ *et al.*, 1993; RONG *et al.*, 2008). Assim, conforme os achados histológicos, a imuno-histoquímica endossou a produção de ambos os tipos de colágeno, notadamente, na pele após o tratamento pelo TAF.



Outro marcador utilizado no presente estudo foi a fibronectina, a qual é uma glicoproteína adesiva da MEC, conectando-se, por exemplo, ao colágeno pelos receptores do tipo integrina, atuando na adesão, migração, morfologia, diferenciação e transformação celular (KUMAZAKI, KOBAYASHI, & MITSUI, 1993). A sua presença no tecido está relacionada ao envelhecimento celular (KUMAZAKI *et al.*, 1991). O envelhecimento *in vivo* dos fibroblastos da pele é acompanhado pela regulação positiva da expressão de fibronectina (KUMAZAKI *et al.*, 1997). Nesse sentido, o presente estudo observou o aumento significativo da fibronectina em todos os três períodos de seguimento após o TAF. Esses achados confirmariam que os fragmentos de pele realmente eram de pacientes com envelhecimento da pele, mas, também, poderiam inferir que o TAF, apesar de trazer outras alterações benéficas para a pele fotoenvelhecida, não teria uma ação direta para que de forma semelhante pudesse restaurar o tecido cutâneo. Por outro lado, sua marcante marcação sugeriria a restauração arquitetural da pele, com enfoque na derme e seus componentes (CLARK, 1983).

Esses resultados, sejam pela análise individualizada das regiões estudadas ou em conjunto, indicaram uma renovação tecidual da pele após a aplicação do TAF, representada pela imunomarcção das proteínas estruturais produzidas, principalmente, por fibroblastos. No panorama da imuno-histoquímica, verificando-se a análise integral dos dados, as imunoexpressões de vimentina, elastina, colágenos tipos I e III, e fibronectina corroboraram a literatura anteriormente descrita. SOLAKOGLU, TIRYAKI, CILOGLU (2008) encontraram aumento de precursores da elastina, os quais são expressos no início da síntese de fibras elásticas: elauninas e oxitalanos. O envelhecimento da pele também estaria relacionado à progressiva degeneração da elastina (ZHANG & DUAN,

2018). Os autores, então, apontaram que, por ser uma prova indireta da síntese de elastina, esse resultado sugeriria um papel adicional do TAF, na prevenção do envelhecimento da pele, além de sua capacidade de preenchimento. Encontraram, também, que o colágeno produzido, após o TAF, tinha características de fibras mais afiladas, e a espessura dessas fibrilas aumentou com a maturação do feixe. Por fim, aventaram que o HA combinado com o TAF determinou maior estabilidade ao tecido e à síntese dos componentes da MEC, pelo incremento vascular (neoangiogênese). Outra particularidade do presente estudo foi a de investigar três regiões distintas da face, de maneira independente, as quais podem variar quanto à exposição solar: a submental receberia maior incidência das RUV, enquanto a retroauricular, mais protegida pela orelha e cabelo, menor incidência. Isso poderia ilustrar o fato de a região submental ter apresentado significância estatística mais vezes dentre todas as análises realizadas, alertando a relevância do potencial terapêutico que o TAF possui, pelos seus efeitos restauradores na região mais fotoenvelhecida das três investigadas.

À medida que a pele envelhece, ocorre seu adelgaçamento como um todo (SHAH & KENNEDY, 2018). Acredita-se que isso ocorra na epiderme, em parte, em razão do achatamento do papilar da derme sobre ela, reduzindo a superfície de contato dermoepidérmica, decorrendo em fragilizar o tecido (GILHAR *et al.*, 2004). Isso acarretaria no prejuízo do aporte de nutrientes, debilita funções fisiológicas, como a cicatrização de feridas e compromete o *turnover* celular na epiderme, resultando em uma descamação menos efetiva da pele (KHAVKIN & ELLIS, 2011; TOBIN, 2017). A composição geral da pele também é alterada, com uma proporção maior de colágeno tipo III que o tipo I, com fragmentação das fibras (RONG *et al.*, 2008). Conjectura-se que o conteúdo total de colágeno, por unidade de área da superfície da pele,

diminui em aproximadamente 1% ao ano (RONG *et al.*, 2008; SHAH & KENNEDY, 2018). Esse cenário, somado à fragmentação das fibras de elastina na pele, determinaria a ‘elastose solar’ (ZHANG & DUAN, 2018; WIDGEROW & NAPEKOSKI, 2021).

O presente estudo demonstrou que o TAF foi capaz de modular e restaurar a pele da face de maneira a reduzir as transformações decorrentes do fotoenvelhecimento, com enfoque nas alterações estruturais e funcionais determinadas na elastose, nas quais se destacam as alterações de qualidade e espessura da epiderme, decréscimo em produção e fragmentação dos feixes de fibras colágenas, desproporção entre os colágenos tipo III e I, maior ação das colagenases e desorganização da MEC. À vista disso, o TAF repovoou a derme com “*novos*” fibroblastos, retomando a capacidade de síntese proteica e organização tecidual (derme), em combinação com as outras proteínas estruturais da MEC, como a vimentina, elastina e fibronectina. Essa restauração foi também associada à criação de tecido vascular de suporte, neovascularização, determinando a recuperação global da pele.

O forte do presente estudo foi a seleção e o rigor nos critérios de inclusão das pacientes para a investigação da ação do TAF na pele da face fotoenvelhecida quanto à sua remodelação (estrutural) e modulação (funcional). Sendo assim, a uniformidade das características selecionadas, na população em estudo, poderia determinar comparações compreensíveis com outros estudos de casuística similar e também com estudos de continuação da presente linha de pesquisa. Essas evidências revelaram o exercício das funções regenerativas e remodeladoras dos fibroblastos no tecido cutâneo, as quais vêm sendo estudadas na Medicina Regenerativa, porém com maior apelo às feridas e cicatrizes (DRISKELL *et al.*, 2013; DRISKELL & WATT, 2015; ROGNONI *et al.*, 2018). E, nesse sentido, há necessidade de se

complementar e aprofundar as pesquisas do comportamento do TAF, na regeneração tecidual, promovendo a restauração da pele, em toda a sua organização e revertendo as danificações do fotoenvelhecimento. Em contraponto, poder-se-ia observar limitação do presente estudo quanto à seletividade étnica, restringindo uma potencial amplitude de variabilidades biológicas não permitindo que os resultados encontrados pudessem ser explorados e extrapolados para grupos populacionais heterogêneos. Outro aspecto importante seria a marcação dos fibroblastos transferidos pelo TAF para uma avaliação pormenorizada das suas atribuições em separado no tecido, bem como, em conjunto com os fibroblastos locais.

Como perspectivas, haveria a necessidade também de se investigar a ação do TAF acerca da heterogeneidade dos fibroblastos, obtidos não apenas das dermes papilar e reticular, mas de diferentes topografias corporais (diferentes linhagens) (THANGAPAZHAM, DARLING, MEYERLE, 2014; DRISKELL & WATT, 2015). Ainda, correlacionar as mudanças nas características histológicas e imuno-histoquímicas com as propriedades clínicas e biofísicas da pele submetidas ao TAF; tal qual, correlacionar mudanças comportamentais, como interferências nutricionais e dietéticas (micronutrientes antienvhecimento, antioxidantes e fatores enzimáticos moduladores de vias de expressão proteicas específicas – metaloproteinases) (CAO *et al.*, 2020).

## **7 CONCLUSÃO**

## 7 CONCLUSÃO

O TAF restaurou as características morfológicas da pele fotoenvelhecida da face, verificadas na histologia e imuno-histoquímica (aumento da espessura da pele, repovoamento celular da derme, organização dos feixes de fibras colágenas e adequação na proporção entre os colágenos tipo III e I, e aumento das proteínas estruturais da MEC).

## **8 REFERÊNCIAS**

## 8 REFERÊNCIAS

Arruda E, Mundy K, Calve S, Baar K. Denervation does not change the ratio of collagen I and collagen III mRNA in the extracellular matrix of muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*; 2007 Feb;292(2):R983–R987.

Asselineau D, Prunieras M. Reconstruction of ‘simplified’ skin: control of fabrication. *Br J Dermatol*. *Br J Dermatol*; 1984;111(Suppl 27):219–22.

Bajouri A, Orouji Z, Taghiabadi E, Nazari A, Shahbazi A, Fallah N, et al. Long-term follow-up of autologous fibroblast transplantation for facial contour deformities, a non-randomized phase IIa clinical trial. *Cell J. Royan Institute (ACECR)*; 2020;22(1):75–84.

Bassetto F, Turra G, Salmaso R, Lancerotto L, Del Vecchio DA. Autologous injectable dermis: A clinical and histological study. *Plast Reconstr Surg*. 2013;131(4):589e-596e.

Bocheva G, Slominski RM, Slominski AT. Neuroendocrine aspects of skin aging. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2798.

Burgeson RE, El Adli FA, Kaitila II, Hollister DW. Fetal membrane collagens: identification of two new collagen alpha chains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(8):2579–83.

Cao C, Xiao Z, Wu Y, Ge C. Diet and Skin Aging-From the Perspective of Food Nutrition. *Nutrients*. *Nutrients*; 2020 Mar 1;12(3):870.

Casey G. Physiology of the skin. *Nurs Stand*. 2002;16(34):47–51.

Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, Lindström M, Ivaska J, Ny T, et al.



Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- $\beta$ -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(30):E4320–7.

Clark RAF. Fibronectin in the skin. *J Invest Dermatol*. *J Invest Dermatol*; 1983;81(6):475–9.

Cotofana S, Fratila AAM, Schenck TL, Redka-Swoboda W, Zilinsky I, Pavicic T. *The Anatomy of the Aging Face: A Review*. *Facial Plast Surg*. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2016 Jun 1;32(3):253–60.

Driskell RR, Lichtenberger BM, Hoste E, Kretzschmar K, Simons BD, Charalambous M, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*. 2013;504(7479):277–81.

Driskell RR, Watt FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol*. 2015;25(2):92–9.

Eça LP, Pinto DG, Pinho AMS de, Mazzetti MPV, Odo MEY. Autologous Fibroblast Culture in the Repair of Aging Skin. *Dermatologic Surg*. 2012;38(2 Part 1):180–4.

El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponc M. Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol*. 2002;147(2):230–43.

Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002;138(11):1462–70.

Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: Fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch. Dermatol*. 2008. p. 666–72.

Gilhar A, Ullmann Y, Karry R, Shalaginov R, Assy B, Serafimovich S, et al. Aging of human epidermis: Reversal of aging changes correlates with reversal of keratinocyte Fas expression and apoptosis. *Journals Gerontol -*

---

Ser A Biol Sci Med Sci. 2004;59(5):411–5.

Grether-Beck S, Marini A, Jaenicke T, Goessens-Rück P, McElwee KJ, Hoffmann R, et al. Autologous Cell Therapy for Aged Human Skin: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase-I Study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2020;33(1):9–16.

Grunebaum LD, Heffelfinger RN. Photoaging. *Curr Probl Dermatol*. 2011;42:122–30.

Helfrich YR, Maier LE, Cui Y, Fisher GJ, Chubb H, Fligel S, et al. Clinical, Histologic, and Molecular Analysis of Differences Between Erythematotelangiectatic Rosacea and Telangiectatic Photoaging. *JAMA dermatology*. 2015;151(8):825–36.

Itaya T, Hirai T, Hirai T, Numoto H, Takeda H, Ueda M. The Use of Fibroblasts for Ameliorating Structural Changes Associated with Skin Aging. *Rejuvenation Res*. 2017;20(5):383–8.

Jevtić M, Löwa A, Nováčková A, Kováčik A, Kaessmeyer S, Erdmann G, et al. Impact of intercellular crosstalk between epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on skin homeostasis. *Biochim Biophys acta Mol cell Res*. 2020;1867(8):118722.

Kammeyer A, Luiten RM. Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 2015;21:16–29.

Keller G, Sebastian J, Lacombe U, Toft K, Lask G, Revazova E. Safety of injectable autologous human fibroblasts. *Bull Exp Biol Med*. 2000;130(8):786–9.

Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19(2):229–34.

Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4th ed. Bloxham UK : Scion; 2008.

Koshimizu J, Beltrame F, de Pizzol J, Cerri P, Caneguim B, Sasso-Cerri E. NF- $\kappa$ B overexpression and decreased immunoexpression of AR in the muscular layer is related to structural damages and apoptosis in cimetidine-treated rat vas deferens. *Reprod Biol Endocrinol. Reprod Biol Endocrinol*; 2013 Apr 9;11(1):1–10.

Kumazaki T, Kobayashi M, Mitsui Y. Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp Cell Res. Exp Cell Res*; 1993;205(2):396–402.

Kumazaki T, Robetorye RS, Robetorye SC, Smith JR. Fibronectin expression increases during in vitro cellular senescence: correlation with increased cell area. *Exp Cell Res. Exp Cell Res*; 1991;195(1):13–9.

Kumazaki T, Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y. Expression of endothelin, fibronectin, and mortalin as aging and mortality markers. *Exp Gerontol. Exp Gerontol*; 1997;32(1–2):95–103.

Lemperle G, Holmes RE, Cohen SR, Lemperle SM. A classification of facial wrinkles. *Plast Reconstr Surg. Lippincott Williams and Wilkins*; 2001;108(6):1735–50.

Machaliński B, Brodkiewicz A, Szumilas K, Rogińska D, Kawa MP, Stecewicz I, et al. Morphologic Changes in the Dermis After the Single Administration of Autologous Fibroblastic Cells: A Preliminary Study. *Transplant Proc. Elsevier USA*; 2016 Oct 1;48(8):2833–9.

Newton VL, McConnell JC, Hibbert SA, Graham HK, Watson RE. Skin aging: molecular pathology, dermal remodelling and the imaging revolution. *G Ital Dermatol Venereol. 2015 Dec*;150(6):665–74.

Oriá RB, Ferreira FVA, Santana ÉN, Fernandes MR, Brito GAC. Study of age-related changes in human skin using histomorphometric and autofluorescence approaches. *An Bras Dermatol. Sociedade Brasileira de Dermatologia*; 2003;78(4):425–34.

Ostrowska-Podhorodecka Z, McCulloch CA. Vimentin regulates the

assembly and function of matrix adhesions. *Wound Repair Regen. Wound Repair Regen*; 2021 Jul 1;29(4):602–12.

Poljsak B, Dahmane R, Godic A. Skin and antioxidants. *J Cosmet Laser Ther.* 2013 Apr 5;15(2):107–13.

Rabe JH, Mamelak AJ, McElgunn PJS, Morison WL, Sauder DN. Photoaging: Mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol. J Am Acad Dermatol*; 2006 Jul;55(1):1–19.

Regnier M, Asselineau D, Lenoir MC. Human epidermis reconstructed on dermal substrates in vitro: an alternative to animals in skin pharmacology. *Ski Pharmacol. Skin Pharmacol*; 1990;3(2):70–85.

Rognoni E, Pisco AO, Hiratsuka T, Sipilä KH, Belmonte JM, Mobasser SA, et al. Fibroblast state switching orchestrates dermal maturation and wound healing. *Mol Syst Biol. EMBO*; 2018 Aug;14(8):e8174.

Rong YH, Zhang GA, Wang C, Ning FG. Quantification of type I and III collagen content in normal human skin in different age groups. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2008;24(1):51–3.

Sasso GR da S, Florencio-Silva R, Fonseca CCN, Cezar LC, Carbonel AAF, Gil CD, et al. Effects of estrogen deficiency followed by streptozotocin-induced diabetes on periodontal tissues of female rats. *J Mol Histol. J Mol Histol*; 2020 Aug 1;51(4):353–65.

Schwartz E, Cruickshank FA, Christensen CC, Perlish JS, Lebwohl M. Collagen alterations in chronically sun-damaged human skin. *Photochem Photobiol. Photochem Photobiol*; 1993;58(6):841–4.

Shah AR, Kennedy PM. *The Aging Face.* Med Clin North Am. W.B. Saunders; 2018 Nov 1;102(6):1041–54.

Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the Skin. *Endocr Rev.* 2000 Oct;21(5):457–87.

Smith SR, Munavalli G, Weiss R, Maslowski JM, Hennegan KP, Novak JM. A multicenter, double-blind, placebo-controlled trial of autologous fibroblast therapy for the treatment of nasolabial fold wrinkles. *Dermatologic Surg.* 2012;38(7 PART 2):1234–43.

Solakoglu S, Tiryaki T, Ciloglu SE. The Effect of Cultured Autologous Fibroblasts on Longevity of Cross-Linked Hyaluronic Acid Used as A Filler. *Aesthetic Surg J. Aesthet Surg J*; 2008 Jul;28(4):412–6.

Svensjö T, Yao F, Pomahac B, Winkler T, Eriksson E. Cultured autologous fibroblasts augment epidermal repair. *Transplantation. Lippincott Williams and Wilkins*; 2002 Apr 15;73(7):1033–41.

Szeimies RM, Torezan L, Niwa A, Valente N, Unger P, Kohl E, et al. Clinical, histopathological and immunohistochemical assessment of human skin field cancerization before and after photodynamic therapy. *Br J Dermatol.* 2012 Jul;167(1):150–9.

Thangapazham RL, Darling TN, Meyerle J. Alteration of skin properties with autologous dermal fibroblasts. *Int J Mol Sci. MDPI AG*; 2014 May 13;15(5):8407–27.

Tobin DJ. Introduction to skin aging. *J Tissue Viability.* 2017 Feb;26(1):37–46.

Watson D, Keller GS, Lacombe V, Fodor PB, Rawnsley J, Lask GP. Autologous fibroblasts for treatment of facial rhytids and dermal depressions. A pilot study. *Arch Facial Plast Surg.* 1999;1(3):165–70.

Weihermann AC, Lorencini M, Brohem CA, de Carvalho CM. Elastin structure and its involvement in skin photoageing. *Int J Cosmet Sci. Blackwell Publishing Ltd*; 2017 Jun 1;39(3):241–7.

Widgerow AD, Napekoski K. New approaches to skin photodamage histology—Differentiating “good” versus “bad” Elastin. *J Cosmet Dermatol. Blackwell Publishing Ltd*; 2021 Feb 1;20(2):526–31.

Yanez DA, Lacher RK, Vidyarthi A, Colegio OR. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2017 Apr 23;469(3–4):455–63.

Zhang S, Duan E. Fighting against Skin Aging: The Way from Bench to Bedside. *Cell Transplant*. 2018 May 25;27(5):729–38.

Zhao Y, Wang J, Yan X, Li D, Xu J. Preliminary survival studies on autologous cultured skin fibroblasts transplantation by injection. *Cell Transplant*. 2008;17(7):775–83.

Zmijewski MA, Slominski AT. Neuroendocrinology of the skin. *Dermatoendocrinol*. 2011 Jan 27;3(1):3–10.

Zorin V, Zorina A, Cherkasov V, Deev R, Kopnin P, Isaev A. Clinical-instrumental and morphological evaluation of the effect of autologous dermal fibroblasts administration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017;Mar;11(3):778–86.

**NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

Instituto Nacional da Propriedade Industrial [Internet]. Classificação Internacional de Patentes (IPC – 2015). 201. [citado 15 Ago 2017]. Disponível em: <http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/patente/classificacao-de-patentes>


Descritores em Ciências da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde [Internet]. São Paulo: BIREME; 2017 [citado 15 Ago 2017]. Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Ferreira LM. Projetos, Dissertações e Teses: Orientação normativa: guia prático. São Paulo: RED Publicações; 2017. 120p.



**APÊNDICES**

## APÊNDICE 1 – CEP


Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 15 de fevereiro de 2008  
CEP 1787/07

Ilmo(a). Sr(a).  
 Pesquisador(a) LYDIA MASAKO FERREIRA  
 Co-Investigadores: Lia Fleissig Ferreira; Leila Blanes  
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo  
 Patrocinador: Recursos Próprios.

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL**

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Estudo clínico sobre a eficácia da cultura de fibroblastos autólogos na regeneração tecidual ectodérmica na face”.**

**CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO:** Estudo clínico com intervenção terapêutica não randomizado.

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** risco mínimo, desconforto leve com procedimento de coleta de sangue e biópsia.

**OBJETIVOS:** Avaliar a eficácia do uso de fibroblastos autólogos cultivados na regeneração tecidual ectodérmica na face.

**RESUMO:** Serão estudados um total de 9 pacientes do sexo feminino, com idade entre 50 e 70 anos, que serão submetidas a procedimento estético para correção de sulcos e ritides na face com o uso de preenchimento de fibroblasto autólogo. Será realizada a obtenção da pele da área doadora (pele da região occipital) e transportada ao laboratório sob refrigeração no pré e pós procedimento cirúrgico para avaliação da pele após o uso de fibroblastos autólogos para o preenchimento das deformidades na face. A área doadora será suturada e o paciente acompanhado até a retirada dos pontos. Uma mostra do meio de cultura em que a biópsia foi transportada será separada para controle de contaminação microbiológica. Os fibroblastos que serão fornecidos pelo laboratório Excellion, serão isolados até 24 horas após a coleta da biópsia, e expandidas em cultura congelada e criopreservada. As injeções geradas na aplicação serão preparadas em grau cirúrgico e livres de qualquer contaminação microbiana e química. O fibroblasto será injetado por via intradérmica nas regiões da face com deformidades. As pacientes serão fotografadas no pré e pós-operatório. Para esse tratamento serão necessárias 3 sessões de aplicações com intervalo de 30 dias. As pacientes serão avaliadas em relação a qualidade de vida e auto-estima com questionários já validados no Brasil..

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** O uso de fibroblastos autógenos como um sistema de reparação de defeitos da derme e subcutâneo tem resultados promissores..

**MATERIAL E MÉTODO:** descritos os procedimentos cirúrgicos e laboratoriais que serão realizados por equipe especializada.

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil  
 Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

TCLE: apresentado adequadamente.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 6 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Não envolve obtenção de título.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 14/02/09 e 14/02/10.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1787/07



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 6 de janeiro de 2010.  
CEP 1787/07  
CONEP

Ilmo(a). Sr(a).  
Pesquisador(a) LYDIA MASAKO FERREIRA  
Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da  
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo clínico sobre a eficácia da cultura de fibroblastos autólogos na regeneração tecidual ectodérmica na face**".

Prezado(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU Emenda 1 (versão de 15/Dez/2009; acréscimo de avaliações)** do projeto de pesquisa acima referenciado.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

CEP 1787/07

OBS: Informamos que, de acordo com a carta Circular nº 003-CONEP/CNS de 14 de fevereiro de 2001 não há necessidade do parecer da CONEP para emendas aos protocolos, salvo quando o CEP solicitar. Nos projetos de Grupo I e II, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las à ANVISA junto com o parecer aprobatório do CEP/UNIFESP.

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

## **APÊNDICE 2 – DELINEAMENTO DO ESTUDO PREDECESSOR**

O estudo predecessor se trata de um projeto temático acerca do TAF na regeneração ecto e mesodérmica da pele da face fotoenvelhecida, que tem como Pesquisador Principal a Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira (PI do projeto) e a participação de outros alunos como Profa. Leila Blanes, Drs. Fabiane Furtado, Mauro Nakahara, Ludmila Kobayashi, Leticia Odo e Ivan Dunshee Oliveira Santos, e, alunos de graduação da Escola Paulista de Medicina Bruno Topis, Tania Topis.

Tratou-se de um estudo primário, analítico, observacional em seres humanos, transversal, autocontrolado, aleatorizado, cego para as análises laboratorial e estatística e realizado em centro único. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, sob o número 1787/07, após o seu registro na Plataforma Brasil (Apêndice 1).

Foram recebidas as amostras de pele de 20 pacientes, de universo uniforme quanto à idade, à pele, critérios de não inclusão e procedimentos, em blocos de parafina, visto que cada paciente contribuiu com seis amostras no total, após aleatorização da hemiface, por exemplo, três do lado direito (Grupo pré-TAF – grupo controle, uma amostra pré-auricular (PA), uma amostra retroauricular (RA) e uma amostra submentual (SM)) e três amostras do lado esquerdo (Grupo pós-TAF – grupo experimento, uma amostra pré-auricular (PA), uma amostra retroauricular (RA) e uma amostra submentual (SM)). As pacientes foram seguidas por um ano, havendo também aleatorização para a coleta de fragmentos da hemiface tratada com o TAF

---

com três, seis ou 12 meses. Dessa forma, o presente estudo contemplou o total de 120 blocos de parafina para a realizar todas as análises.

### **Casuística**

A casuística foi formada por pacientes mulheres, entre 50 e 70 anos, com a pele da face apresentando fotoenvelhecimento, verificado pela presença de ríides e flacidez, fototipo cutâneo III de Fitzpatrick e menopausa há, no mínimo, três anos. Todas as pacientes incluídas foram informadas sobre as finalidades gerais, riscos e benefícios do presente estudo e deram o aval mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Não foram incluídas as pacientes com qualquer tipo de comorbidade clínica descompensada; doenças do colágeno, reumatológica ou autoimune; antecedente atual ou pregresso de neoplasia maligna de qualquer tecido; aplicação cutânea de *peeling* químico (fenol, ácido tricloroacético, glicólico, salicílico, retinoico, etc) e/ou procedimento físico (microdermoabrasão, dermoabrasão, *ressurfacing*) na face há menos de 12 meses; uso de preenchedor de qualquer natureza na região cervicofacial; tabagismo e/ou etilismo atuais; uso crônico de corticosteroide; reações alérgicas de qualquer natureza; distúrbio psiquiátrico; histórico pregresso ou atual de abuso de droga; cicatrização patológica; paciente com intenção de realizar qualquer outro procedimento na face ou região cervical no prazo de três anos do estudo; patologia ortodôntica infecciosa e/ou tratamento ortodôntico vigente.

Foram excluídas as pacientes que não cumpriram qualquer uma das etapas relacionadas ao presente estudo, aquelas que desejaram por livre

vontade não mais fazer parte e aquelas que apresentaram qualquer um dos critérios de não inclusão após terem sido incluídas no estudo. Outrossim, foram excluídas as pacientes cujas amostras de tecido estavam insuficientes para as análises propostas.

### **Cálculo amostral**

Para o cálculo amostral, respeitando-se os critérios de elegibilidade das pacientes incluídas, verificando-se a abrangência do tema de *“transplante autólogo de fibroblastos para a terapêutica do fotoenvelhecimento cutâneo da face”*, foi determinada uma amostragem mínima suficiente de 15 pacientes. Uma vez que o Teorema do Limite Central preconiza a distribuição normal padrão de amostras com 30 ou mais sujeitos de pesquisa (casos e controles). Para o nível de significância de 0,05 e um poder de teste de 80%, foram incluídas 20 pacientes no presente estudo, o qual é autocontrolado.

### **Parâmetros de avaliação da pele**

Foram avaliados o exame clínico, fotometria (VISIA®), fotografia padronizada, biofísica e morfologia da pele da face, a qualidade de vida dos pacientes, por meio de questionários validados, e as avaliações histológicas e imuno-histoquímicas da pele fotoenvelhecida tratada pelo TAF.

### **Período preparatório**

Para cada uma das pacientes, foi realizado exame físico detalhado, exames laboratoriais, dados de questionários de qualidade de vida e foi solicitado o uso diário, nos períodos da manhã e tarde, de protetor solar (Spectra Ban® T FPS 30) e, no período noturno, de hidratante (loção lanette) na região cervicofacial. Todas foram orientadas a evitar a exposição solar excessiva e desprotegida. O período preparatório foi de 30 dias seguidos.

### **Biópsia cutânea**

Após o período preparatório, todas as pacientes foram submetidas à biópsia cutânea da região occipital, cerca de 2 cm<sup>2</sup>, em topografia padronizada distante posteriormente 3 cm do lóbulo da orelha, ao nível de um plano transversal mais inferior. Esse procedimento foi realizado com bisturi de lâmina nº 15, após a assepsia com clorexidina alcoólica 0,5% e o bloqueio anestésico local prévio (lidocaína 2% com adrenalina 1/200,000). Após o procedimento de biópsia cutânea, o fragmento de pele foi lavado com solução fisiológica 0,9% e armazenado em frasco de coleta, contendo meio de cultivo (DMEM 10% adicionado de ciprofloxacina 1 mg/ml e anfotericina B 0,5 mg/ml). O material foi transportado imediatamente ao laboratório, sob refrigeração a 4 °C. A sutura cutânea foi realizada com pontos simples, utilizando o fio monofilamentar de náilon 5-0, cuja retirada ocorreu no 7º dia de pós-operatório.

Foi separada uma amostra do meio de cultura, em que a biópsia foi transportada para o controle de contaminação microbiológica e, quando positivo, realizou-se o antibiograma.

### **Obtenção de plasma humano autólogo (PHA) a partir de sangue total**



Todas as pacientes também foram submetidas à coleta de sangue periférico realizada em Banco de Sangue, para a suplementação dos meios de cultura com o plasma separado. O plasma foi incubado em banho-maria a 37 °C com CaCl<sub>2</sub>, para a formação do coágulo. Em seguida, o plasma foi armazenado em geladeira, durante 12 horas, centrifugado e, ulteriormente, transferido para o tubo apropriado. Posteriormente, foi filtrado em membrana branca lisa e esterilizada (0,22 μm). Uma amostra foi separada para o teste de coagulação e exame de controle de qualidade (microbiológico). O plasma foi congelado e armazenado até o seu uso.

### **Transporte do Material**

Todo material (pele e sangue) das pacientes foram colocadas em box de isopor individual, esterilizada com termômetro e entregue para a transportadora Latam até o estado do RJ. De lá o material foi levado à Petrópolis onde foi realizada a cultura no Laboratório Excellion, coordenado pelo Prof. Radovan Borojevic.

### **Cultura primária de fibroblastos**

Os fibroblastos coletados da amostra de pele foram isolados em etapas de dissociação mecânica e enzimática, realizadas em até 24 horas após a realização da biópsia cutânea, no laboratório Excellion. Essas células foram expandidas em cultura, congeladas e criopreservadas em tanques de nitrogênio (a -96°C). Todo o procedimento foi realizado em ambiente controlado (classe 6, 10,000 partículas/m<sup>3</sup>, com filtros HEPA) e em fluxo laminar classe II (ISSO 5).

Essas células da derme foram isoladas e mantidas em cultura conforme protocolo adaptado de Asselineau & Prunieras (ASSELINEAU & PRUNIERAS, 1984) e Régnier, Asselineau & Lenoir (REGNIER, ASSELINEAU, & LENOIR, 1990). Primeiramente, o tecido foi fracionado mecanicamente com o auxílio de uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm<sup>3</sup>. Os fragmentos foram dissociados enzimaticamente, em banho-maria a 37°C, com solução de colagenase 1 mg/ml, durante 12 horas. A suspensão celular foi filtrada em malha de nylon estéril (1.000 µm) acoplada a uma seringa, por 10 minutos a 1.200 rpm. Em seguida, o *pellet* foi novamente suspenso em meio de cultura padrão (meio Dulbecco com 10% de soro humano autólogo com ciprofloxacina 1 µg/ml). As células foram contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer, plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup>, na concentração de 10<sup>6</sup> células/ml e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após o período de as garrafas atingirem cerca de 90% de confluência, as células foram dissociadas com solução de tripsina 0,125% e replaqueadas na proporção de 1:2. Para a preparação das seringas, contendo os fibroblastos cultivados, foram utilizadas células até a 8ª passagem. Para o auxílio no cultivo, foi utilizado o PHA aprontado previamente. Após a expansão da cultura de fibroblastos, sete dias antes de se realizar as injeções de fibroblastos autólogos em cada paciente, o meio padrão foi substituído pelo meio de pré-injeção (DMEM sem vermelho de fenol, suplementado com 10% PHA, *Highclone*, fabricado pelo LGC Biotecnologia Brasil).

No dia em que a paciente foi submetida ao transplante autólogo de fibroblastos, as células foram previamente lavadas com solução fisiológica 0,9%, dissociadas das garrafas com solução tripsina 0,125%, centrifugadas durante 10 minutos (1.200 rpm), contadas, novamente suspensas em solução fisiológica 0,9%, suplementadas com soro autólogo (5%) e distribuídas em

10 seringas esterilizadas de 1 ml (preparadas livres de qualquer contaminação microbiana e química).

A suspensão celular foi distribuída na concentração de  $10^6$  células/400  $\mu\text{L}$  (ou  $2,5 \times 10^6$  células/ml), sendo 400  $\mu\text{l}$  o volume final de cada seringa, as quais ficaram mantidas a  $4^\circ\text{C}$  até o momento do procedimento. Vinte minutos antes da aplicação das injeções, as células foram homogeneizadas manualmente e colocadas em campo cirúrgico em temperatura ambiente. As injeções foram aplicadas em um intervalo de, no máximo, 8 horas após o término da manipulação.

Nas seringas de 1 ml, foram utilizadas agulhas 13G x 4,5'', respeitando-se a distância mínima de 1 cm entre os pontos de inoculação, por meio de técnica de retroinjeção intradérmica. Cada injeção correspondeu a quatro aplicações de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  (ou  $2,5 \times 10^5$  células).

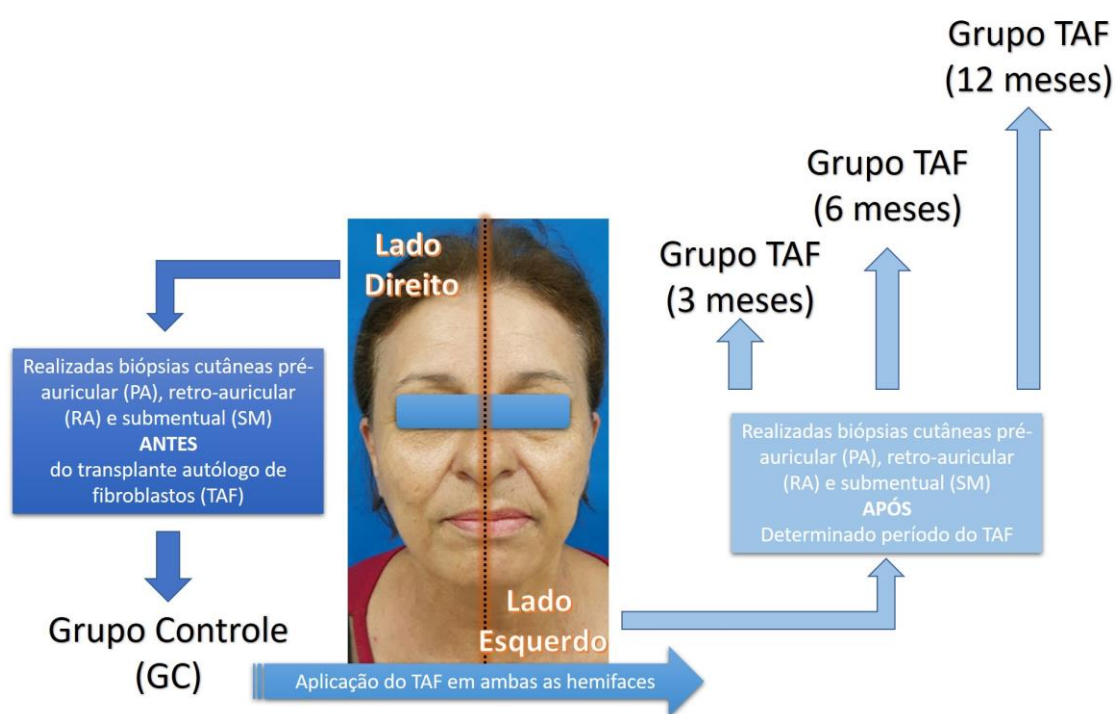
### **Transplante autólogo de fibroblastos (TAF)**

Após cultivo dos fibroblastos, as células foram transportadas da empresa Excellion do RJ para o laboratório da Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira, com os mesmos cuidados que foram transportados o material de SP para o RJ. No box transportado, havia 10 seringas de 1cc de fibroblastos para serem injetadas nas faces das pacientes.

Na pele da face de cada uma das pacientes, foi feita a antissepsia com álcool 70%, protegendo os olhos, narinas e lábios. A técnica utilizada foi a de retroinjeção intradérmica, para o TAF. Foram realizadas três sessões de transplante de 100  $\mu\text{L}$ /cada (ou  $2,5 \times 10^5$  células), em cada paciente, com intervalo de 30 dias cada uma.

### **Distribuição dos grupos no presente estudo**

Todas as avaliações precedentes ao procedimento de transplante autólogo de fibroblastos foram determinadas como pertencentes ao Grupo Controle (GC). As avaliações após o procedimento foram determinadas como pertencentes ao Grupo Transplante Autólogo de Fibroblastos (TAF), divididas nos períodos de seguimento de três, seis e 12 meses, após a randomização (Figura 2).



**Figura 13. Representação da formação dos grupos do presente estudo.**

### **Randomização dos pacientes para os grupos TAF**

As pacientes incluídas no presente estudo (n=20) foram randomizadas quanto à inclusão, em cada grupo determinado pelo período de seguimento,

após o TAF: três, seis e 12 meses. Foi utilizado o programa de computador disponível no website [www.randomization.com](http://www.randomization.com) para a distribuição aleatória nos três grupos, três meses (n=7), seis meses (n=7) e 12 meses (n=6).

### APÊNDICE 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### 8.3. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA APLICAÇÃO DE FIBROBLASTOS AUTÓLOGOS CULTIVADOS NO REJUVENECIMENTO FACIAL

Eu, abaixo assinado(a), \_\_\_\_\_ RG n° \_\_\_\_\_, afirmo estar devidamente informado(a) e esclarecido(a), e portanto, submeto-me a aplicação de fibroblastos autólogos, para auxiliar no rejuvenecimento facial.

Fui informado(a) que fibroblastos autólogos são um tipo de célula presente na minha pele, que dentre outras funções produzem colágeno, e que serão cultivados a partir de biópsia da região occipital (nuca) que será realizada 45 dias antes das tres aplicações de transplantes. Estas células passam por um processo de cultura seguindo normas rígidas de manipulação (Excellion) e após algumas semanas estarão prontas para aplicação. A aplicação causa um efeito de melhoria de rugas, depressões, e da elasticidade cutânea, principalmente após a terceira semana. A durabilidade dos efeitos do procedimento tem sido descrita em artigos internacionais, como até cerca de 5 anos. Para atingir o efeito desejado, são necessárias 3 sessões de aplicações com intervalo de 30 dias. Também fui esclarecido(a) que este tratamento já vem sendo estudado, e existe experiência de uso no exterior e vários casos no Rio de Janeiro (documentados mais de 100 casos), que comprovaram esses resultados por no mínimo 5 anos, tendo-se estabelecido um bom grau de segurança inclusive a longo prazo e já está aprovado pela ANVISA.

Como a aplicação é injetado por via intradérmica com uma agulha, estou ciente que a sensação de dor da picada é suportável, não necessitando obrigatoriamente, nenhum tipo de anestesia. Entretanto, fui informado(a) que é possível, eventualmente, sentir ardor de intensidade variável durante a injeção do medicamento, ou discreto desconforto temporário no local da injeção, como formigamento. Nos dias subseqüentes, também fui avisado(a) que pode ocorrer intercorrências, como edema (inchaço), eritemas ou equimoses (manchas avermelhadas ou arroxeadas), parestesias locais (adormecimento, hipersensibilidade ou

formigamento local) (com duração de 5 a 15 dias), à semelhança de outras injeções de preenchimentos (como de ácido hialurônico).

Estou ciente, também que sentirei os efeitos desejados dos fibroblastos autólogos geralmente em 21 dias da terceira aplicação, porém sempre variando de uma pessoa para outra. Serão realizadas avaliações periódicas até completar 1 ano, que inclui preenchimento de questionários de qualidade de vida, realização de fotografias, avaliação de sensibilidade da pele. Fui esclarecida que neste período não poderei deixar de retornar as visitas, e não poderei realizar qualquer procedimento na face, pescoço e dentário sem comunicar os médicos deste estudo.

Fui orientado(a) que durante as primeiras 48 horas após a aplicação dos fibroblastos autólogos, não devo manipular ou massagear a face e devo fazer compressa fria a noite. Estou ciente, portanto, que a desobediência dessas orientações médicas podem causar efeitos indesejáveis e outras intercorrências. Caso haja necessidade, tenho como entrar em contato com meu médico(a). Dra Lydia Masako Ferreira Tel-55764118; Dr Mauro N Nakahara tel- 55716579 (email-mauro\_nakahara@yahoo.com) e enfa Leila Blanes tel- 9539-3041

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

Nome do paciente ou responsável	CPF	Assinatura

Nome do médico	CRM	Assinatura

#### 7.4 FICHA BIOMETROLOGIA

Nome:

Idade:

Horário limpeza da pele:

Horário início das coletas:

## APÊNDICE 4 – CARTA DE INFORMAÇÃO

### CARTA DE INFORMAÇÃO

#### *Estudo clínico sobre a eficácia da cultura de fibroblastos autólogos na regeneração tecidual ectodérmica na face*

Este projeto tem como objetivo avaliar a cultura de fibroblastos autólogos no tratamento de rugas ou sulcos pronunciados na região da face.

Fui informado(a) que fibroblastos autólogos são um tipo de célula presente na minha pele, que dentre outras funções produzem colágeno, e que são cultivados a partir de biópsia da região occipital (nuca). Estas células passam por um processo de cultura seguindo normas rígidas de manipulação (Excellion) e após algumas semanas estão prontas para aplicação. A aplicação causa um efeito de preenchimento de rugas e depressões, e melhora da elasticidade da pele, principalmente após a terceira semana cuja durabilidade tem sido descrita como até cerca de 5 anos (Boss et al 2000; Weiss et al 2007). Para atingir o efeito desejado, são necessárias 3 sessões de aplicações com intervalo de 30 dias. Também fui esclarecido(a) que este tratamento já vem sendo estudado, e existe uma larga experiência de uso no exterior e alguns casos no Rio de Janeiro, tendo-se estabelecido um bom grau de segurança inclusive a longo prazo e já está aprovado pela ANVISA.

Como a aplicação é injetado por via intradérmica com uma agulha, estou ciente que a sensação de dor da picada é suportável, não necessitando obrigatoriamente, nenhum tipo de anestesia. Entretanto, fui informado(a) que é possível, eventualmente, sentir ardor de intensidade variável durante a injeção do medicamento, ou discreto desconforto temporário no local da injeção, como formigamento. Nos dias subseqüentes, também fui avisado(a) que pode ocorrer intercorrências, porém mínimas e transitórias, como edema (inchaço), eritemas ou equimoses (manchas avermelhadas ou arroxeadas), parestesias locais (adormecimento, hipersensibilidade ou formigamento local) (com duração de 5 a 15 dias).

Estou ciente, também que sentirei os efeitos desejados dos fibroblastos autólogos geralmente em 21 dias da terceira aplicação, porém sempre variando de uma pessoa para outra.

Fui orientado(a) que durante as primeiras 48 horas após a aplicação dos fibroblastos autólogos, devo reduzir a manipulação ou massagens locais. Fazer compressa fria. Durante todo o estudo não poderei tomar sol ou iniciar algum tratamento ortodôntico. Estou ciente, portanto, que a desobediência dessas orientações médicas podem causar efeitos indesejáveis e outras intercorrências.

Antes do procedimento e após, serão realizadas fotografias e avaliada a qualidade de vida, auto-estima e capacidade funcional por meio de dois questionários (Short-Form – 36, Rosenberg-UNIFESP-EPM, Skindex e HAQ-20). Esses questionários estão em anexo a este termo e você gastará cerca de 20 minutos para respondê-los. Também será realizada avaliação de algumas propriedades físicas e mecânicas da pele: perda de água, temperatura, pH, sebo, alinhamento das fibras colágenas, distensibilidade e sensibilidade, o que não causará nenhum desconforto.

É garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas, não sendo divulgada sua identificação.



Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Os dados coletados serão somente utilizados para esta pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Lydia Masako Ferreira, que pode ser encontrada na R. Napoleão de Barros, 715 - 4º andar, Tel: 5576-4118. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) - R. Botucatu, 572 - 1º andar - conjunto 14, Tel: 5571-1062, FAX: 5539-7162.

**Termo de Consentimento Informado (Livre e Esclarecido):**

Eu, \_\_\_\_\_, portador(a) do RG No. \_\_\_\_\_, após ter lido a carta de informação e ter sido esclarecido(a) pela Dra Lydia Masako Ferreira a respeito do projeto de pesquisa "Estudo clínico sobre a eficácia da cultura de fibroblastos autólogos na regeneração tecidual ectodérmica na face.", concordo em participar deste estudo. Estou ciente de que não serei identificado (a) em nenhum momento deste estudo, que minhas respostas não influenciarão em nada o meu tratamento e que não corro riscos ao me submeter a este estudo. Ficou claro que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e sei que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidades ou qualquer prejuízo ao meu tratamento.

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do paciente ou representante legal)      Data: \_\_/\_\_/\_\_

\_\_\_\_\_  
(Assinatura da testemunha)      Data: \_\_/\_\_/\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária, o Consentimento Livre e Esclarecido deste (a) paciente para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
Dra Lydia Masako Ferreira      Data \_\_/\_\_/\_\_